



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Recenzja dorobku naukowego, organizacyjnego i dydaktycznego  
dr n. biol. Joanny Jacków

Podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego jest cykl 4 publikacji oryginalnych zrealizowanych w obszarze badawczym pod wspólnym tytułem „Gojenie zmian nadżerkowych i owrzodzeń związanych z pęcherzowym oddzielaniem się naskórka: od zrozumienia patogenezы do leczenia”.

Pęcherzowe oddzielanie się naskórka to genodermatoza o bardzo zróżnicowanym, zależnym od rodzaju uszkodzeń/defektów genetycznych obrazie klinicznym. Obecnie znamy już mutacje dotyczące 21 genów, które związane są z rozwojem różnych form EB. Precyzyjna lokalizacja topograficzna zmutowanych genów w obrębie naskórka, błony podstawnej oraz skóry właściwej, rodzaje i kombinacje tych mutacji, a również konsekwencje tych zmian na poziomie białka RNA tłumaczą zmienność fenotypową w różnych postaciach klinicznych EB. Jedną z najcięższych postaci EB jest postać recesywna, dystroficzna RDEB. W tej postaci stwierdzono bialleliczne mutacje, takie jak małe insercje lub delecje w genie *COL7A1*, kodującym kolagen 7 wchodzący w skład włókien zakotwiczących. Natomiast mutacje w genie *COL17A1* są powiązane z postacią łączącą JEB. Wytwarzanie nieprawidłowego kolagenu XVII lub całkowity brak produkcji tego białka jest wynikiem różnych mutacji w obrębie genu. Pojawiają się wówczas na skórze i śluzówkach pacjentów pęcherze, nadżerki, owrzodzenia ale także takie objawy jak łysienie, dystrofia paznokci i nieprawidłowości rozwoju zębów.

W najcięższych postaciach EB mutacje w genach kodujących określone składniki połączenia naskórkowo-skórnego zaburzają proces gojenia się ran, pęcherze przekształcają się w niegojące się owrzodzenia prowadząc do rozległego bliznowacenia i zniekształceń. Prowadzi to w najcięższych postaciach RDEB do wystąpienia takich powikłań jak deformacja rąk i stóp, zwężenie krtani, przelyku wywołując niepełnosprawność i kalectwo, niejednokrotnie rozwijają się złośliwe raki płaskonabłonkowe na skórze i śluzówkach.

Wydział Lekarski

Katedra Dermatologii

ul. Kopernika 50

PL 31-501 Kraków

tel.: +48 (12) 424 86 62

dermatologiakrakow.cm-uj.krakow.pl

U większości dzieci także w stosunkowo łagodnie przebiegających postaciach EB nawet niewielki uraz powoduje powstawanie pęcherzy ustępujących niejednokrotnie z tworzeniem nadżerek a nawet trudno gojących się owrzodzeń. Biorąc pod uwagę fakt, że obecnie nadal w większości przypadków ciężkich postaci EB nie dysponujemy skutecznymi metodami terapii poza ochroną przed urazami, zapobieganiem infekcjom- a leczenie ma charakter ochronno-objawowy podjęty przez Habilitantkę szeroko zakrojony profil badań jest bardzo aktualny i może pomóc nie tylko w poznaniu molekularnych zaburzeń prowadzących do rozwoju różnych postaci EB ale także pomóc w opracowaniu nowych, skutecznych metod terapii tej nadal nieuleczalnej choroby. Prowadzone przez Dr n. biol. Joannę Jacków badania będące przedmiotem oceny są kontynuacją i rozwinięciem badań prowadzonych do pracy doktorskiej zatytułowanej „Fizjologiczna rola „zrzucania” kolagenu XVII”. W oparciu o te badania Habilitantka opracowała nowy model myszy typu knock-in o nazwie „nie zrzucający” kolagenu XVII- dla celów zbadania procesów regeneracji tkanek i gojenia się ran w EB. Opracowanie nowego modelu badawczego pozwoliło Dr Jacków na prowadzenie badań, których wyniki opublikowała w pierwszej pracy oryginalnej z cyklu prac do habilitacji.

Jacków J., Schlosser A., Sormunen R., Nyström A., Sitaru C., Tasanen K., Bruckner-Tuderman L. i Franzke CW “Generation of a functional non-shedding collagen XVII mouse model: Relevance of collagen XVII shedding in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2016; 136, 516-525.” Badanie dotyczy modelu myszy knock-in, które funkcjonalnie „niezrucają” kolagenu XVII i znaczenia tego zjawiska w procesie gojenia skóry.

Jest to pierwszy artykuł w cyklu na temat specyficznego modelu mysiego „niezrucającego” kolagenu typu XVII i znaczenia zrzucania kolagenu typu XVII w gojeniu się ran. Myszy „niezrucające” kolagenu XVII (*Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*), które produkują wyłącznie zmutowany delta 41(Δ41) kolagen XVII, wytworzono stosując strategię knock-in polegającą na wprowadzeniu delekcji 123 bp do eksonu 18 genu *Col17a1*. Myszy *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* były nie do odróżnienia od swoich miotów *Col17a1*, hodowane w warunkach typowych - nie wykazywały żadnych różnic w masie ciała i długości życia. Myszy te nie rozwinęły ani pęcherzy skórnych na łapach i w okolicy genitalnej, ani utraty włosów lub paznokci spowodowanych „zruceniem” kolagenu XVII u normalnych myszy. Analiza histologiczna nie ujawniła żadnych oczywistych

zmian w architekturze skóry myszy *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*. Ponadto analiza ultrastrukturalnej lokalizacji kolagenu Δ41 XVII w skórze wykazała podobny rozkład i częstotliwość w porównaniu z kolagenem typu dzikiego XVII. Jednak analiza ultrastrukturalna strefy połączenia naskórkowo-skórnego ujawniła znacznie zwiększoną grubość BMZ u myszy „niezrzucających” *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*, zwłaszcza blaszki lucida. Aby potwierdzić udział „zrzucania” kolagenu XVII we wczesnej epitelizacji rany, skrawki skórne zabarwiono przeciwciałami rozpoznającymi zrzuconą ektodomenę lub postać pełnej długości. Wyniki te sugerują, że ekspresja i zrzucanie kolagenu XVII spełniają określone funkcje podczas ponownego nabłonkowania rany. Na podstawie wcześniej opisanych dowodów zbadano rolę zrzucania kolagenu XVII w regeneracji ran, analizując gojenie ran o pełnej grubości 8 mm na skórze. Zamykanie ran u myszy *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* było znacznie przyspieszone między dniem 1 a 6 w porównaniu z młodymi miotami typu dzikiego, ale nie wykazało znaczących różnic w późniejszych fazach. Podsumowując, w pierwszej pracy z cyklu została przedstawiona regulacyjna rola kolagenu XVII podczas gojenia się ran na skórze. Funkcjonalny „niezrzucający” kolagenu XVII myszy model, stanowi dobre narzędzie do badania patofizjologicznego znaczenia „zrzucania” ektodomen podczas regeneracji ran.

2. Jacków J. [autor korespondujący], Löffek S., Nyström A., Tasanen K., Bruckner-Tuderman L. i Franzke C.W. Collagen XVII shedding suppresses re-epithelialization by directing keratinocyte migration and dampening mTOR Signaling. *J Invest Dermatol.* 2016; 136, 1031-1041” praca jest kontynuacją badań w dziedzinie „zrzucania” kolagenu typu XVII podczas gojenia się ran.

W tym badaniu model myszy „niezrzucających” *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* wykorzystano do zbadania mechanizmu molekularnego, za pomocą którego zrzucanie ektodomeny kolagenu XVII reguluje nabłonkowanie rany. Zgodnie z wynikami wcześniejszych badań wskazującymi szybsze gojenie się ran opisanymi w pierwszym artykule z tego cyklu, znacznie wydłużone języki nabłonkowe zaobserwowano u myszy „niezrzucających” *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* zarówno w 3, jak i w 6 dni po zranieniu. Wykazano, że było to związane ze zwiększoną proliferacją keratynocytów- stwierdzono z zastosowaniem analizy histologicznej wzrost liczby komórek Ki-67 dodatnich w językach nabłonkowych. W celu potwierdzenia hipotezy, że przyspieszone nabłonkowanie u myszy „niezrzucającej” *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* było napędzane przez

mechanizmy wewnętrzne komórki, pierwotne keratynocyty poddano analizom biochemicznym i funkcjonalnym. Mikroskopia wideo ujawniła, że keratynocyty od myszy „niezrzucających” *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* pokrywają obszar zranienia szybciej niż kontrola. Towarzyszyło temu zjawisko tworzenie się włókien stresowych aktyny; cecha zwiększonej aktywności migracyjnej. Habilitantka wysunęła wniosek, że „zrzucanie” kolagenu XVII zmniejsza prędkość migracji keratynocytów. Aby następnie ocenić, czy indukowana proliferacja naskórka na krawędziach ran myszy „niezrzucających” *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* była również niezależna od komórek, Autorka określiła liczbę mitotycznie aktywnych keratynocytów w subkonfluentnych hodowlach monowarstwowych po 2 godzinach włączenia BrdU. Znacząco zwiększoną liczbę komórek dodatnich pod względem BrdU zaobserwowała w keratynocytach od myszy „niezrzucających” *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*. Ponieważ zmiany ruchliwości komórek mogą być wywołane przez wewnętrzną ekspresję białek ECM, takich jak np. integryny, Autorka przeanalizowała ekspresję genów tych cząsteczek w migrujących keratynocytach od myszy „niezrzucających” *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*. Ilościowa PCR z odwrotną transkryptazą ujawniła znacznie zwiększoną transkrypcję podjednostek integryny a6 i b4, ale nie integryny a2, a3, a5, av i b1, ani cząsteczek lamininy-332, fibronektyny i kolagenu VII. Wzrost podjednostek integryny a6 i b4 zaobserwowano również na poziomie produkcji białka. Aby zbadać mechanizmy, za pomocą których zwiększona ekspresja integryny a6b4 pośredniczy w fenotypie aktywowanych keratynocytów myszy „niezrzucających” *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*, zbadała fosfoinozyd 3-kinazy (PI3K) i szlaki sygnałowe kinazy białkowej aktywowane mitogenem, które wspierają proliferację i ruchliwość komórek, i są uruchomiane przez adhezję do ECM. Tylko szlak Akt był zwiększony w migrujących keratynocytach *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* w analizie Western Blot. Zostało to całkowicie zahamowane przez 50 mM inhibitor PI3K LY294002, co sugeruje, że szlak Akt jest aktywowany wyłącznie przez fosfoinozyd 3-kinazy PI3K. Sygnalizacja PI3K/Akt jest silnie zaangażowana w regulację proliferacji i przeżycia komórek, podczas gdy pobudzenie szlaku Akt/mTOR zostało powiązane ze wzmocnioną migracją komórek, jak pokazano we wcześniejszych publikacjach. Podsumowując, do przedstawionych badań Autorka wykorzystała wcześniej opracowany model myszy knock-in, aby zbadać rolę kolagenu XVII i jego „zrzucania” podczas regeneracji skóry. W procesie gojenia ran (po wcześniejszym doświadczalnym zranieniu), u myszy, które „nie zrzucały” kolagenu XVII stwierdzono przyspieszoną migrację keratynocytów z podwyższoną ekspresją integryny a6b4. Wyniki badań wskazują, że miejscowe

zmniejszenie „zrzucania” kolagenu XVII, np. poprzez selektywne hamowanie ADAM9 lub ADAM10-odpowiedzialnych za zrzucanie kolagenu XVII, może wywierać korzystny wpływ ułatwiający i przyspieszający gojenie się przewlekłych niegojących się ran u pacjentów z RDEB. Zauważono, że u pacjentów z rakiem skóry, ekspresja i „zrzucanie” kolagenu XVII są zwiększone. Lokalne hamowanie „zrzucania” kolagenu XVII mogłoby stanowić drogę zapobiegania progresji rozwoju raka skóry.

**3.,,Jacków J., Titeux M., Portier S., S. Charbonnier, C. Ganier, Gaucher S., Hovnanian A. Gene-corrected fibroblast therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using a SIN COL7A1 retroviral vector. J Invest Dermatol. 2016; 136, 1346-1354”** przedstawia próbę przedkliniczną, która polegała na śródskórnym wstrzyknięciu pochodzących od pacjenta skorygowanych fibroblastów przy użyciu GMP (Good Manufacturing Practices grade) wektora samo-inaktywującego (SIN) COLVAA1 (pCMS- (Psi) .) - EF1a-COL7A1-SIN) - wskazując możliwości terapeutyczne w leczeniu niegojących się ran u pacjentów z RDEB.

Autorka potwierdziła hipotezę, że pojedyncze śródskórne wstrzyknięcie  $3 \times 10^6$  fibroblastów jest wystarczające do przywrócenia ekspresji C7 i tworzenia AF w DEJ oraz do przywrócenia przylegania skóry do naskórka już 2 miesiące po wstrzyknięciu oraz, że wstrzyknięte fibroblasty mogą utrzymywać się w miejscu podania do 8 tygodni. Fakt, że ten wektor retrowirusowy GMP SIN uzyskał certyfikat GMP, pozwala na zaadaptowanie tej strategii jako terapii klinicznej. Najpierw fibroblasty Pacjenta RDEB (RDEBF) hodowano, namnażano i transdukowano za pomocą GMP wektora retrowirusowego pCMS- (Psi.) - EF1a-COL7A1-SIN. Ekspresja i wydzielanie C7 były wyższe w genetycznie skorygowanych komórkach w porównaniu do normalnych ludzkich fibroblastów (NHF), zarówno dotyczyło to mRNA jak i białka. Wyniki te wykazały, że genetycznie skorygowane fibroblasty ludzkie mogą produkować C7. Następnie oceniono zdolność tych komórek do syntezy i osadzania C7 *in vivo*- po śródskórnym wstrzyknięciu, wykorzystując myszy z niedoborem odporności. Ten model ksenoprzeszczepu służył jako model RDEB do rekapitulacji fenotypu skóry RDEB *in vivo* i często był używany w przeszłości do wykazania poprawności funkcjonalnej w badaniach przedklinicznych. Do iniekcji śródskórnych zastosowano trzy różne populacje fibroblastów; NHF (kontrola pozytywna), RDEBF (kontrola negatywna) i RDEBF + C7. Trzy miliony każdego rodzaju fibroblastów były zawieszane

w 150 ul sterylnej soli fizjologicznej i wstrzyknięte do modelu RDEB (SE) myszy. Iniekcje podzielono na dwa podania o pojemności 75 ul, aby zapobiec powstawaniu pęcherzy SE na skutek naprężeń mechanicznych. Biopsje skóry pobrano 2 miesiące po wstrzyknięciu i poddano dalszej analizie. W barwieniu hemotoksylina/eozyna nie wykazano przerwania połączenia skórno-naskórkowego u myszy leczonej w porównaniu z nieleczoną RDEB SE gdzie stwierdzono przerwanie połączenia skórno-naskórkowego. Badanie immunofluorescencyjne skrawków SE przy użyciu króliczego przeciwciała poliklonalnego RC1 przeciw domenie NC1 ludzkiego C7 wykazało silne barwienie liniowe. Głównym hamulcem dotyczącym wprowadzenia terapii genowej jest problem bezpieczeństwa. Jednak w przypadku zastosowania wektorów retrowirusowe SIN obserwowano niewielkie ryzyko rozwoju nowotworów w badaniach przedklinicznych i klinicznych. Wyniki badania potwierdzają, że miejscowe wstrzyknięcie genetycznie skorygowanych fibroblastów może być ważnym krokiem w terapii RDEB. Zatwierdzenie i dopuszczenie do użytku GMP wektora retrowirusowego SIN COL7A1 pozwala na przygotowanie badania klinicznego fazy I/II w celu leczenia przewlekłych, niegojących się ran u pacjentów z RDEB. Autorka podkreśla, że miejscowe wstrzyknięcie genetycznie skorygowanych fibroblastów może być pomocne w leczeniu obszarów skóry trudnych do przeszczepu, takich jak skóra nad stawami, palce, a także otwiera możliwość leczenia zmian na błonach śluzowych.

**Praca 4.,** Jacków J., Guo Z., Hansen C., Abaci HE, Doucet Y., Shin J., Ryota H., DeLorenzo D., Yudai K., Shinkuma S., Salas-Alanis JC and Christiano A. "CRISPR/Cas9- based targeted genome editing for correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa using iPS cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2019; 116, 26846-26852" dotyczy szeroko zakrojonych badań, w których zastosowano korektę (regularnych krótkich powtórzeń palindromowych (CRISPR) związanych z nukleazą Cas9 (CRISPR / Cas9)) mutacji COL7A1 w komórkach od 2 pacjentów z RDEB.

Jeden z Pacjentów miał homozygotyczną mutację przesunięcia ramki w eksonie 19 (c.2470ins G), podczas gdy drugi miał heterozygotyczne mutacje przesunięcia ramki w eksonach 19 i 32 (c.2470ins G/c.3948insT). W pierwszym etapie tego projektu Habilitantka wygenerowała specyficzne dla danego Pacjenta indukowalne pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSC). Komórki te zostały poddane następnie naprawie ukierunkowanej na homologię CRISPR/Cas9 (HDR) mutacji

chorobotwórczych. Udało się wykazać, że HDR, w którym pośredniczy CRISPR/Cas9, może wprowadzić skorygowaną homologiczną sekwencję do docelowego genu i przywrócić normalną sekwencję genową, co potwierdziła poprzez bezpośrednie sekwencjonowanie produktów PCR wytworzonych wokół docelowego regionu korekty. Wyniki ujawniły, że ~ 10% klonów zostało poddanych korekcji biallelicznej, a 40% z nich mono-równoległej korekcji mutacji *COL7A1* w eksonie 19. Następnie pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSC) z korekcją genu różnicowała na keratynocyty, które okazały się funkcjonalnie dojrzałe w około 60 dni, i fibroblasty, które po 31 dniach przyjęły charakterystyczną morfologię i wykazywały markery różnicowania mezodermalnego i fibroblastycznego, w tym typu I i typu III kolagenu, jak również związane z fibroblastami markery powierzchniowe CD we wzorze podobnym do wzoru dla normalnych ludzkich fibroblastów. Co ważne, zmodyfikowane genowo fibroblasty pochodzące z iPSC Pacjentów z RDEB zsyntetyzowały i wydzieliły kolagen typu VII, który przyjął charakterystyczną stabilną potrójnie helikalną konformację. Na koniec został zbudowany trójwymiarowy (3D) równoważnik skóry z keratynocytów i fibroblastów z korekcją genów, które następnie zostały przeszczepione myszom z obniżoną odpornością. Analiza 2 miesiące po przeszczepie wykazała silną ekspresję kolagenu typu VII w ksenoprzeszczepach we wzorze przypominającym skórę myszy typu dzikiego, a co ważne, transmisyjna mikroskopia elektronowa ujawniła tworzenie się włókien kotwiczących. Zatem praca ta pokazuje nowe możliwości korekcji genów za pośrednictwem CRISPR/Cas9 –wskazując nowe możliwości opracowania autologicznych terapii komórkowych dla pacjentów z RDEB poprzez dokonywanie przeszczepów skóry a zatem powolnej jej wymiany lub możliwości miejscowego leczenia nie gojących się ran. Ostatecznym celem badań Habilitantki jest wdrożenie do praktyki klinicznej wyżej wymienionych terapii genowych. Niestety nie można przewidzieć wszystkich potencjalnych problemów regulacyjnych związanych z zastosowaniem terapii opartych na edycji genów i zastosowaniu pluripotencjalnych komórek macierzystych( iPSC), obecnie najważniejsze problemy to bezpieczeństwo, skuteczność i kontrola jakości. Aby chociaż częściowo wskazać możliwości ograniczenia tych problemów, Dr Jacków opisała kilka propozycji ulepszeń stosowanych technik korekcji genów - które mogą stanowić ważny krok w kierunku poprawy skuteczności terapii i bezpieczeństwa. Takim ulepszeniem było zastosowanie przez Habilitantkę wysoce skutecznej metody korekcji genów wspomaganą przez nukleazę Cas9 (SpyFicas9) o wysokiej wierności. Kolejną innowacyjną cechą pracy

Habilitantki było prowadzenie hodowli komórkowych bez zastosowania produktów pochodzenia zwierzęcego, a zamiast tego stosowanie niezawierających ksenonów, chemicznie zdefiniowanych pożywek hodowlanych. Opracowała protokół, który pozwolił na uzyskanie znacznie wyższej wydajności, a także zwiększenie bezpieczeństwa poprzez wyeliminowanie niezdefiniowanych składników pochodzenia zwierzęcego. Habilitantka wykazała, że skonstruowanie w pełni autologicznych odpowiedników skóry wykonanych z keratynocytów i fibroblastów z korekcją genów w odróżnieniu od pluripotetywnych komórek macierzystych (iPSC) minimalizuje ryzyko odrzucenia immunologicznego, przyczyniając się w ten sposób do utrzymania funkcjonalnej macierzy zewnątrzkomórkowej i zapewniając długotrwałe przeżycie. Podsumowując, wyniki badań Habilitantki dotyczące techniki korekcji genów mogą znacznie przyspieszyć wdrożenie metod skutecznej regeneracji, gojenia skóry do codziennej praktyki klinicznej, zapewniając stosowanie wydajnej i bardziej bezpiecznej metody.

Wszystkie 4 publikacje zostały pozytywnie zrecenzowane i pojawiły się w impaktowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Całkowity Impact Factor cyklu publikacji wynosi **28,442**, sumaryczna punktacja MNiSW cyklu publikacji wynosi **350**. Przed uzyskaniem stopnia doktora Habilitantka opracowała publikacje o współczynniku IF 10,396, MNiSW 67, natomiast po uzyskaniu stopnia doktora, Habilitantka była autorem i współautorem publikacji o współczynniku oddziaływania IF 54,479, MNiSW 625. Wskazuje to na znaczne rozszerzenie działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora. Poza czterema publikacjami, które są podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego osiągnięcia Doktor Jacków obejmują także publikacje na temat:

1. Nowych funkcji cząsteczek transmembranowego kolagenu XVII w skórze:

Publikacja Löffek S., Hurskainen T., Jacków J., et al. „Transmembrane Collagen XVII Modulates Integrin Dependent Keratinocyte Migration via PI3K/Rac1 Signalling. PLoS ONE 9; 2014.

Praca dotyczy regulacji adhezji kolagenu typu XVII w odniesieniu do oceny migracji keratynocytów pochodzących od pacjentów z JEB. Autorka wykazała powiązanie pomiędzy ekspresją kolagenu XVII a migracją keratynocytów. Także na wykonanych wcześniej badaniach *in vitro*, dotyczących mysich keratynocytów, autorzy pracy wykazali związek pomiędzy ekspresją Col XVII a prędkością i kierunkiem migracji komórek.



Wyniki przeprowadzonych badań, dostarczają dowodów, że Col XVII odpowiada za przyleganie keratynocytów i ich ukierunkowaną migrację.

Publikacja Hurskainen ., Kokkonen N., Surmunen R., Jacków J., et al. „Deletion of The Major BP Epitope Region of Collagen XVII Induces Blistering, Autoimmunization and Itching in Mice. *J. Invest Dermatol*, 2015.

Kolejne przeprowadzone badanie miało na celu lepsze zrozumienie znaczenia ludzkiej niekolagenowej domeny 16A (NC16A) Col XVII w genetycznie zmodyfikowanych mysich modelach z delecją w odpowiednim regionie NC14A mysiego Col XVII. Badanie może mieć dużą wartość praktyczną dla pacjentów z BP, którzy wytwarzają autoprzeciwciała przeciwko Col XVII (BP 180), pozakomórkowej domenie NC16A zaangażowanej w „zrzucanie” ektodomen. Generowane w badaniu myszy Del C14A są modelem związanym z BP, u których głównym objawem jest świąd i tworzenie pęcherzy jak u większości pacjentów z BP. W odróżnieniu od niektórych modeli opisanych wcześniej w piśmiennictwie Del NC14A są immunokompetentne i dojrzałe, co umożliwia długoterminowe monitorowanie naturalnych odpowiedzi immunologicznych. Dzięki temu, że objawy u myszy rozwijają się spontanicznie nie jest konieczne poddawanie ich inwazyjnym procedurom eksperymentalnym, co zgodne jest z rekomendacjami dotyczącymi wykorzystania zwierząt w badaniach.

Zdaniem autorów, myszy Del NC14A są obiecującym kandydatem do badań w pemfigoidzie pęcherzowym.

2. Kolejne trzy artykuły, których Habilitantka jest współautorem dotyczą modeli skóry trójwymiarowej (3D) jako nowego narzędzia do badań leków i inżynierii tkankowej.

Publikacja Abaci H.E., Guo Z., Doucet Y., Jacków J, et al., „Nxt generation human skin constructs as advanced tools for drug development. *Minireview. Exp. Biol. Med.*, 2017.

Ten artykuł przeglądowy przedstawia obecne kierunki i wyzwania dotyczące wytwarzania modeli skóry trójwymiarowej oraz postępy jakie daje użycie technologii pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) w celu wygenerowania modeli genetycznych in vitro, dla takich chorób jak pęcherzyca i łuszczyca. Może to pozwolić na ocenę wpływów nowych środków farmaceutycznych na skórę pacjenta.

Publikacja Abaci H.E., Coffman A., Doucet Y., Chen J., Jacków J., et al., Synthetic Developmental Tissue Engineering of Human Hair Follicles Nat. Commun, 2018.

Ta ważna publikacja dotyczy metod wytwarzania ludzkich mieszków włosowych w modelach ludzkiej skóry, za pomocą form drukowanych w 3D. Modele ludzkiej skóry potencjalnie mogą zapewnić skuteczną terapię dla pacjentów z rozległymi obrażeniami skóry a także umożliwić badanie przesiewowe leków u pacjentów z chorobami skóry. Autorzy wprowadzili do modelu ludzkiej skóry (HSC) zmodyfikowane dodatki w postaci mieszków włosowych (HF) – dotychczas procedura ta była dużym wyzwaniem dla badaczy.

Potwierdzenie w modelach ludzkiej skóry zdolności do wytworzenia całego mieszka włosowego, w przyszłości może mieć zastosowanie w leczeniu różnego typu łysienia a także leczenia przewlekłych owrzodzeń.

Publikacja Shin J.U., Abaci H.E., Herron L., Guo Z., Sallee B., Pappalardo A., Jacków J., et al., Recapitulating T cell infiltration in 3D psoriatic skin models for patient – specific drug testing. Sci Rep. 2020.

Powyższy artykuł dotyczy zastosowania trójwymiarowego modelu skóry, w badaniu interakcji między czynnikami naskórka i układem odpornościowym w modelu zwierzęcym łuszczycy. Obecnie modele skóry 3D generowane są ze zdrowych keratynocytów i fibroblastów pochodzących od pacjentów z łuszczycą, i dostępne są jako materiały do badań.

Badanie pozwoliło na stworzenie modelu 3D dla łuszczycy poprzez włączenie do modelu skóry spolaryzowanych komórek Th1/Th17 lub komórek T pochodzących od pacjentów z łuszczycą. Te modele skóry łuszczycowej (pHSC) wykazały fenotyp łuszczycowy naskórka z charakterystycznym profilem cytokin i odpowiadały na zastosowane eksperymentalnie różne leki stosowane w łuszczycy – wskazując na potencjalną użyteczność stworzonego przez autorów modelu jako platformy do badań in vitro leków.

Podsumowując, autorzy opracowali zaawansowany immunokompetentny model skóry 3D w celu zbadania interakcji naskórka z limfocytami T.

3. Kolejny kierunek badań Doktor Jacków przedstawia procesy śledzenia linii komórkowej w organizmie.

Publikacja Vorhagen S., Jacków J. et al., Lineage Tracing Mediated by Cre – recombinase activity. J Invest Dermatol. 2015, przedstawia metody śledzenia linii komórkowej pozwalając oceniać procesy dynamiczne poprzez wizualizację linii komórkowych w organizmie. Artykuł ma charakter przeglądowy i przedstawia współczesne możliwości wizualizacji linii komórkowych i analizy zachowania in vivo.

Habilitantka została nagrodzona, za wyniki swoich badań, licznymi stypendiami :

- Stypendium redaktora sekcji JID dla artykułu „Lineage tracing mediated by Cre-recombinase activity” by Vorhagen S., Jacków J., Mohor S.G. et al, J Invest Dermatol 2015
- Zdobyć 1-ego miejsca podczas sesji plakatowej za najbardziej innowacyjny projekt „Development of liposomes enca psulating CRISPR/Cas9 gene-editing RNP for in vivo delivery to the skin of RDEB podczas konferencji „Future of Dermatology & Cosmetics” na Uniwersytecie w New Jersey (2018).
- otrzymała także kilka stypendiów podróżniczych dla młodych naukowców na Europejski Kongres Dermatologiczny (ESDR) w Wenecji w 2012; Amerykański Kongres Dermatologiczny w Atlancie w 2015; Japońskie Towarzystwo Badań Dermatologicznych w Okayama 2015; ESDR w Salzburgu w 2017; oraz na Międzynarodowe Spotkanie Dermatologiczne na Florydzie, 2018.

Celem realizacji badań Doktor Jacków otrzymała dwa znaczące granty naukowe:

1. Stypendium Naukowe Dr Ines Mandl dla Dr Joanny Jacków na rzecz początkujących naukowców prowadzących obiecujące prace w dziedzinie badań tkanki łącznej dla projektu zatytułowanego „ Generation of gene corrected iPSC therapy for DEB.
2. Garant badawczy otrzymany z Epidermolysis Bullosa Research Partnership i EB Medical Research Foundation w Nowym Jorku dla Dr Joanny Jacków dla projektu zatytułowanego „Development of drug testing platform for RDEB squamous cell carcinoma using induced pluripotent cancer cells”.  
W obu grantach, Habilitantka była Głównym Badaczem.

Doceniając innowacyjność i wagę prowadzonych przez Habilitantkę badań, była wielokrotnie zapraszana jako wykładowca do wielu uczelni między innymi: Katedry Dermatologii w Sapporo, w Osace - Japonia; New Jersey w USA, Wydziału Biologii Biofizyki Membranowej w Darmstadt, Niemcy; Zakładu Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie oraz na Wydziału Genetyki Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Także była wykładowcą podczas 15 konferencji międzynarodowych, większość wykładów dotyczyła badań prowadzonych przez Habilitantkę w różnych postaciach EB.

*Działalność organizacyjna i dydaktyczna:*

W trakcie realizacji swoich badań, Doktor Jacków umiała pozyskać współpracowników w wielu ośrodkach międzynarodowych:

- brała udział we współpracy z laboratorium genetycznym chorób skóry Institute Imagine, Paryż, Francja; St. John`s Intitute of Dermatology w King`s College London, Londyn, przy realizacji projektu: Pre-clinical mouse study for the preparation of a clinical trial using intravenous injection of gene-modified autologous fibroblasts in adult with RDEB. Jej rola polegała na planowaniu, przeprowadzeniu badania, analizowaniu danych i raportowaniu wyników pomiędzy grupami w Paryżu i Londynie. (2017)
- była kluczową osobą w konsorcjum zajmującym się badaniami komórek macierzystych iPS Cell EBR, obejmującym zespoły badawcze z Uniwersytetem Columbia w Nowym Jorku, z Uniwersytetem Standford i Uniwersytetem Colorado – prowadząc badania na Colombia Uniwersytecie. (2017)
- jest kluczowym naukowcem w finansowanym projekcie Kalifornijskiego Instytutu Medycyny Regeneracyjnej – projekt ma na celu dostarczenie pilotażowych danych dotyczących skuteczności i bezpieczeństwa autologicznego przeszczepu keratynocytów pochodzących z komórek iPSC z korekcją genetyczną COL7A1 w dystroficznej odmianie EB, o nazwie DEBCT. (2017/2021). Nadal aktywnie współpracuje przy rozszerzeniu tego projektu.

Habilitantka posiada umiejętność podejmowania współpracy z wieloma placówkami naukowymi realizującymi badania z zakresu tworzenia trójwymiarowych modeli skórnych, korekcji genetycznej białek kolagenowych oraz zastosowania wyników tych

badan w medycynie klinicznej. Świadczy o tym np. współpraca z zespołem badaczy z Uniwersytetu Columbia w Nowym Jorku, od którego uzyskiwała biopsje skóry od chorych z EB oraz Uniwersytetu Thomasa Jeffersona.

Doktor Jacków jest członkiem Europejskiego Stowarzyszenia Dermatologicznego (ESDR) oraz jej amerykańskiego odpowiednika Amerykańskiego Towarzystwa Dermatologii (SID), a także recenzuje artykuły naukowe w:

- Journal of Dermatological Science i Journal of Molecular Medicine.

W 2013 roku uczestniczyła w letnim kursie badawczym EADV/ESDR dotyczącym modelu myszy w badaniach skóry w Kolonii a także w Federalnym Europejskim Stowarzyszeniu Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, gdzie odbyła kurs kategorii B, zakończony pozytywnie zdany egzaminem.

W zakresie osiągnięć dydaktycznych, Habilitantka nadzorowała:  
- projekt studenta w laboratorium genetycznym chorób skóry w Paryżu, pt.: „Badanie procesu zapalnego i gojenia się ran u chorych z ciężką recesywną postacią RDEB. (2016)

- program badawczy młodego naukowca na Uniwersytecie Columbia w Nowym Jorku, pt.: „Optymalizacja etapu selekcji dojrzałych keratynocytów za pomocą technologii MACS”. (2018)

- projekt, którego celem było opracowanie metody na wprowadzenie CRISPR/ Cas9 in vivo do edycji genów. (2018/2019)

Nadzorowała prace i uczyła personel techniczny pracy laboratoryjnej, prowadziła szkolenie studentów, doktorantów, którzy dołączali do zespołu laboratorium w którym Doktor Jacków pracowała.

Reasumując:

Przed uzyskaniem stopnia doktora, Habilitantka opracowała publikacje o współczynniku IF 10,396 , MNiSW 67, natomiast po uzyskaniu stopnia doktora Habilitantka była autorem i współautorem publikacji o współczynniku oddziaływania IF 54,479, MNiSW 625. Wskazuje to na znaczne rozszerzenie działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora.

Cztery publikacje, które były podstawą do starania się o uzyskanie tytułu doktora habilitowanego uzyskały IF 28, 442 oraz punktacje MNiSW 350, przekraczając wymogi określone w ustawie.

W pierwszej pracy z cyklu została przedstawiona regulacyjna rola kolagenu XVII podczas gojenia się ran na skórze. Autorka wykazała, że funkcjonalny „niezrzucający” kolagenu XVII mysi model, stanowi dobre narzędzie do badania patofizjologicznego znaczenia „zrzucania” ektodomen podczas regeneracji ran.

W kolejnej pracy, Autorka wykorzystwała wcześniej opracowany model myszy knock-in, aby zbadać rolę kolagenu XVII i jego „zrzucania” podczas regeneracji skóry. W procesie gojenia ran (po wcześniejszym doświadczalnym zranieniu), u myszy, które „nie zrzuciły” kolagenu XVII stwierdzono przyspieszoną migrację keratynocytów z podwyższoną ekspresją integryny  $\alpha 6\beta 4$ . Wyniki badań wskazują, że miejscowe zmniejszenie „zrzucania” kolagenu XVII, np. poprzez selektywne hamowanie ADAM9 lub ADAM10-odpowiedzialnych za zrzucanie kolagenu XVII, może wywierać korzystny wpływ ułatwiając i przyspieszając gojenie się przewlekłych niegojących się ran u pacjentów z RDEB. Zauważono, że u pacjentów z rakiem skóry, ekspresja i „zrzucanie” kolagenu XVII są zwiększone. Lokalne hamowanie „zrzucania” kolagenu XVII mogłoby stanowić drogę zapobiegania progresji rozwoju raka skóry.

Wyniki kolejnych badań, przedstawione w cyklu prac podkreślają, że miejscowe wstrzyknięcie genetycznie skorygowanych fibroblastów może być pomocne w leczeniu obszarów skóry trudnych do przeszczepu, takich jak skóra nad stawami, palce, a także otwiera możliwość leczenia zmian na błonach śluzowych.

Wyniki badań Habilitantki dotyczące techniki korekcji genów mogą znacznie przyspieszyć wdrożenie metod skutecznej regeneracji, gojenia skóry do codziennej praktyki klinicznej, zapewniając stosowanie wydajnej i bardziej bezpiecznej metody.

Cały dorobek naukowy Habilitantki jest spójny tematycznie a badania prowadzone są w sposób przemyślany i realizowany z zastosowaniem coraz bardziej nowoczesnych narzędzi badawczych. Do swoich badań Doktor Jacków pozyskuje współpracowników w wielu renomowanych Ośrodkach naukowych.

Godny podkreślenia jest fakt, że Doktor Jacków dysponuje interesującymi wynikami opublikowanych badań dotyczących nowej funkcji cząsteczki transmembranowego kolagenu 17 w skórze oraz prowadzi szeroko zakrojone badania obejmujące modele trójwymiarowe skóry jako nowego narzędzia do badań leków i inżynierii tkankowej. Badania te nie są uwzględnione w serii publikacji przedstawionych jako cykl do postępowania habilitacyjnego a moim zdaniem są doskonałym uzupełnieniem cyklu czterech prac.

Jak przedstawiono powyżej, Doktor Jacków jest uznanym ekspertem w dziedzinie biologii molekularnej o czym świadczą cytowane zaproszenia jako wykładowcy do wielu Ośrodków naukowych na świecie oraz liczne nagrody i stypendia naukowe.

Współpracuje z wieloma prestiżowymi Ośrodkami naukowymi w realizacji swoich badań, jest Głównym Badaczem w dwóch Grantach Naukowych o zasięgu międzynarodowym.

Zdobyte doświadczenie i wiedzę przekazuje młodym naukowcom nadzorując ich prace naukowe, prowadzi szkolenia studentów, doktorantów oraz współpracowników w laboratoriach w których prowadzi badania.

Biorąc pod uwagę analizę publikacji, ocenę bibliometryczną dorobku, dorobek organizacyjny i dydaktyczny Doktor Joanny Jacków uważam, że wartościowy dorobek spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 z późniejszymi zmianami (Dz.U.nr.65, poz. 595), jak również Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30.01.2018w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Mam więc zaszczyt przedłożyć Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego moją pozytywną ocenę dorobku naukowego, organizacyjnego i dydaktycznego Dr n. biol. Joanny Jacków.

07.06.2021

Anne Wojas-Pok

