

# AUTOREFERAT

Opis osiągnięć naukowych, zawodowych i dydaktycznych



**Dr. Joanna Jacków, PhD**

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa,  
Kwiecień, 2020

**1. DANE OSOBOWE**

Imię i Nazwisko	Joanna Katarzyna Jacków, PhD
Miejsce zatrudnienia/ dane teledadresowe	Department of Dermatology Columbia University, Medical Center 1150 St. Nicholas Av. 10032 New York, NY, USA Tel: + 917-664-3423 email: joannajackowparis@gmail.com

**2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA**

2009 r.	Tytuł biologa Ukończenie wydziału Biologie na Albert-Ludwigs-University of Freiburg, Germany
2013 r.	Stopień doktora nauk biologicznych  Department of Dermatology, Medical Center, Biology Faculty – Albert-Ludwigs-University of Freiburg, Germany  Obrona pracy (Magna cum laude): „Fizjologiczna rola zrzucania kolagenu XVII” Promotor: Prof. Leena Bruckner-Tuderman, MD Dziekan fakultetu biologicznego: Prof. Ad Aerten, PhD

**3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH**

2009 – 2013	Zatrudnienie podczas doktoratu jako naukowiec w Katedrze Kliniki Dermatologicznej Uniwersytetu we Freiburg, pod kierownictwem Prof. Leena Bruckner-Tuderman, MD
2013 - 2016	Zatrudnienie po doktoracie jako naukowiec (pierwszy post doc), w Instytucie Imagine w Paryżu, w laboratorium genetycznym od spraw skóry pod kierownictwem Prof. Alain Hovnanian, MD, PhD
2016 - 2018	Zatrudnienie po doktoracie jako naukowiec (drugi post doc), w Katedrze Dermatologicznej Uniwersytetu Columbia w New York, pod kierownictwem Prof. Angela Christiano, PhD
2018 – 06/2020	Zatrudnienie jako pracownik naukowy, w Katedrze Dermatologicznej Uniwersytetu Columbia w New York, pod kierownictwem Prof. Angela Christiano, PhD
07/2020 -	Adiunkt profesor w Katedrze i Klinice Dermatologicznej Guy's Hospital w King's College London, London, Anglia

**4. WSKAZANE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCE Z ART. 219 UST. 1 PKT 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM (DZ. U. Z 2018 R., POZ. 1669 ZE ZM.):**

**4.1 Tytuły osiągnięcia naukowego**

Cykl 4 publikacji oryginalnych, zrealizowanych w obszarze badawczym zatytułowany „**Gojenie zmian nadżerkowych i owrzodzeń związanych z pęcherzowym oddzielaniem się naskórka: Od zrozumienia patogenezы do leczenia**”. Wszystkie badania zostały wykonane po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych.

**Praca nr 1. Jacków J.**, Schlosser A., Sormunen R., Nyström A., Sitaru C., Tasanen K., Bruckner-Tuderman L. and Franzke C.W. 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. IF=6,287; MNiSW=50

**Praca nr 2. Jacków J. [autor korespondencyjny]**, Löffek S., Nyström A., Tasanen K., Bruckner-Tuderman L. and Franzke C.W. Collagen XVII shedding suppresses re-epithelialization by directing keratinocyte migration and dampening mTOR Signaling. J Invest Dermatol. 2016; 136, 1031-1041. IF=6,287; MNiSW=50

**Praca nr 3. Jacków J.**, Titeux M., Portier 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. IF=6,287; MNiSW=50

**Praca nr 4. Jacków J.**, Guo Z., Hansen C., Abaci H.E., Doucet Y., Shin J., Ryota H., DeLorenzo D., Yudai K., Shinkuma S., Salas-Alanis J.C. and Christiano A. “CRISPR/Cas9-based targeted genome editing for correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa using iPS cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2019; **116**, 26846-26852. IF=9,580; MNiSW=200

Sumaryczny Impact Factor cyklu publikacji wynosi: **28,442**.

Sumaryczna punktacja MNiSW cyklu publikacji: **350**.

Mój udział procentowy w powstawaniu w/w publikacji opisałam w **załączniku nr 4**.

Analiza bibliometryczna publikacji poświadczona przez Bibliotekę Główną warszawskiego Uniwersytetu Medycznego znajduje się w **załączniku nr 5**.

Oswiadczenie o wkładzie co-autorów w/w publikacje opisałam w **załączniku nr 6**.

## **4.2 Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich wykorzystania.**

### **a) Wprowadzenie**

**Pęcherzowe oddzielanie się naskórka (EB)** to wrodzona choroba naskórka charakteryzująca się spontanicznym powstawaniem pęcherzy lub powstawaniem pęcherzy w odpowiedzi na uszkodzenia mechaniczne. EB może powodować bolesne rany i erozje w skórze, oczach i tkankach błony śluzowej, może mieć łagodny lub ciężki przebieg, może goić się z ciężkimi bliznami lub bez blizn. Wyróżnia się cztery główne typy EB w zależności od poziomu tworzenia się pęcherzy w skórze: EB simplex (EBS), junctional EB (JEB), dystroficzny EB (DEB) i zespół Kindlera (KS). Kluczowe znaczenie dla zrozumienia molekularnych podstaw EB jest rozpoznanie kompleksów adhezyjnych składających się z oddziaływujących białek, które tworzą sieć odpowiedzialną za adhezję komórek keratynocytów, stabilne połączenie naskórka i leżącej pod nim skóry właściwej. Obecnie istnieje 21 różnych genów, w których wykazano mutacje w różnych formach EB. Lokalizacja topograficzna zmutowanych genów w naskórku w strefie błony podstawnej skóry, rodzaje i kombinacje mutacji, a także ich konsekwencje na poziomie białka RNA łącznie wyjaśniają fenotypową zmienność w różnych formach EB.

Mutacje w genie *COL17A1* są powiązane z JEB. W skórze kolagen typu XVII jest niezbędnym i funkcjonalnym składnikiem hemidesmosomu, wykryto go również w rogowce, zębach, błonach śluzowych przetyku, mózgu i nerkach. Jego działanie jako cząsteczki przylegania do naskórka przejawiają się w dwóch pęcherzykowych chorobach skóry: dziedzicznym JEB spowodowanym mutacjami w *COL17A1* oraz w chorobie autoimmunologicznej pęcherzowej pęcherzycy, która charakteryzuje się pęcherzami na skórze spowodowanymi przez autoprzeciwciała skierowane przeciwko kolagenowi typu XVII. Wytwarzanie niefunkcjonalnego kolagenu typu XVII lub całkowity brak produkcji białka jest wynikiem różnych mutacji w genie *COL17A1*. Charakterystyczne fenotypy wykazują pęcherze, nadżerki, rany skóry i błon śluzowych, łysienie, dystrofię paznokci i nieprawidłowości zębów.

Jedną z najcięższych postaci EB jest recesywna postać DEB (RDEB), w której najcięższe przypadki objawiają się rozległymi pęcherzami podatnymi na pęknięcie, niegojącymi się ranami skóry, które powodują rozległe blizny. Zmiany te często wiążą się z rozwojem raka płaskonabłonkowego o wysokiej śmiertelności w starszej grupie wiekowej. RDEB wykazuje nieprawidłowości także poza skórą, w tym powstawanie pęcherzy i nadżerki przewodu pokarmowego, głównie przełyku i rogowki. RDEB jest wywoływana przez bialleliczne mutacje, takie jak małe insercje lub delecje w genie *COL7A1*, kodującym kolagen typu VII (C7), główny opisany składnik włókien kotwiczących. Istnieje również dominująca dziedziczna postać dystroficznej EB związanej z mutacjami podstawienia glicyny, które zakłócają gromadzenie się C7 w kotwiczących włóknach poprzez dominujący negatywny sposób działania.

Fizjologiczne leczenie zranionej skóry jest złożonym procesem, w którym nakładające się reakcje zapewniają skuteczne przywrócenie integralności tkanek. Ten procesy obejmują krzepnięcie krwi, napływ komórek immunologicznych, migracje komórek nabłonkowych i proliferacja keratynocytów w celu odzyskania uszkodzonej bariery skórnej, następnie tworzenia się nowej ziarniny i przebudowy zrębu. Jednak, jak opisano powyżej, w najcięższych i wyłączeniach typach EB, mutacje w genach kodujących określone składniki połączenia naskórkowo-skórnego zaburzają proces gojenia ran i pęcherze przekształcają się w przewlekłe niegojące się rany, z aktywnym stanem zapalnym oraz włóknieniem. W postaci RDEB zdarzenia te są odpowiedzialne za wystąpienie wtórnych powikłań, takich jak zwężenie przełyku, deformacja rąk i stóp oraz złośliwe zmiany nowotworowe wywodzące się z komórek nabłonkowych.

Biorąc pod uwagę kliniczne nasilenie RDEB oraz fakt, że obecnie nie ma konkretnych ani skutecznych metod leczenia poza ochroną przed urazem, rozległym bandażowaniem i zapobieganiem infekcjom, kilka ostatnich badań skupiło się na opracowaniu nowych terapii tej obecnie nieuleczalnej choroby.

### **b) Wyniki osiągnięć naukowych**

To naukowe osiągnięcie jest kontynuacją i rozwinięciem badań prowadzonych podczas mojej pracy doktorskiej zatytułowanej „Fizjologiczna rola „zrzucania” kolagenu XVII”. Praca ta została częściowo opublikowana w dwóch artykułach naukowych. Publikacje zawarte w rozprawie przedstawiają strategię wykrywania miejsc cięcia w kolagenu XVII w celu zrozumienia wzoru cięcia, zwanego „zrzucaniem” tej cząsteczki. W oparciu o to badanie stworzyłam nową mysz typu

knock-in o nazwie „nie zrzucający” kolagen XVII ( $Col17^{ANS/\Delta NS}$ ) w celu zbadania regeneracji tkanek i gojenia się ran w EB.

W szeregu publikacji tematycznych związanych z tym osiągnięciem akademickim zrozumienie biologii molekularnej „zrzucania” kolagenu XVII w gojeniu się ran dostarczyło niezbędnych podstaw do opracowania sprawdzonych koncepcji terapii opartych na komórkach i genach w celu leczenia problemów gojenia się ran u pacjentów z RDEB. Ta serie badań wykazały znaczenie mojego mysiego modelu jako narzędzia lepszego zrozumienia procesu gojenia się ran, a także wykazały, że terapie komórkowe i genowe są zarówno bezpieczne, jak i skuteczne, z możliwością leczenia ran niegojących się u pacjentów z EB.

**Publikacja nr 1.** „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.” odnosi się do myszy knock-in, które mają funkcjonalnie „niezrzucający” mutant kolagenu XVII, z delecją 41 aminokwasów w domenie linkera obejmującej wszystkie miejsca cięcia ADAM. Jest to pierwszy artykuł na temat specyficznego dla rozszczepiania modelu wbijania kolagenu typu XVII i znaczenia zrzucania kolagenu typu XVII w gojeniu się ran.

Myszy „niezrzucające” kolagenu XVII ( $Col17a1^{ANS/\Delta NS}$ ), które produkują wyłącznie zmutowany delta 41( $\Delta 41$ ) kolagen XVII, wytworzono stosując strategię knock-in polegającą na wprowadzeniu delecji 123 bp do eksonu 18 genu *Col17a1*. Myszy  $Col17a1^{ANS/\Delta NS}$  były nie do odróżnienia od swoich miotów *Col17a1*, hodowane normalnie i nie wykazywały żadnych różnic w masie ciała i długości życia. Myszy te nie rozwinęły ani pęcherzy skórnych na łapach i wokół genitaliów, ani utraty włosów lub paznokci spowodowanych wybiciem kolagenu XVII u normalnych myszy. Analiza histologiczna nie ujawniła żadnych oczywistych zmian w architekturze skóry myszy  $Col17a1^{ANS/\Delta NS}$ . Ponadto analiza ultrastrukturalnej lokalizacji kolagenu  $\Delta 41$  XVII w skórze wykazała podobny rozkład i częstotliwość w BM i HD w porównaniu z kolagenem typu dzikiego XVII. Jednak analiza ultrastrukturalna skórnej strefy połączenia naskórka ujawniła znacznie zwiększoną grubość BM u myszy  $Col17a1^{ANS/\Delta NS}$ , zwłaszcza blaszki lucida.

Aby potwierdzić udział „zrzucania” kolagenu XVII we wczesnej epitelializacji rany, skrawki skórne zabarwiono przeciwciałami rozpoznającymi zrzuconą ektodomenę lub postać

pełnej długości. Barwienie selektywne wobec ektodomen było ograniczone do BM i zwiększało się wzdłuż wiodącego języka nabłonka, podczas barwienia BM kolagenu XVII związanego z błoną nie było zwiększone. Wyniki te sugerują, że ekspresja i zrzucanie kolagenu XVII spełniają określone funkcje podczas ponownego nabłonkowania rany. Na podstawie wcześniej opisanych dowodów badano 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.

Tutaj zaobserwowałam regulacyjną rolę proteolizy powierzchni komórek kolagenu XVII podczas gojenia się ran skóry, kiedy kolagen XVII jest mobilizowany z HD w odpowiedzi na czynniki wzrostu lub cytokiny. Pomyślnie wygenerowany funkcjonalny „niezrzucający” mysi model kolagenu XVII który, stanowi dobre narzędzie do badania patofizjologicznego znaczenia „zrzucania” ektodomen podczas regeneracji ran i inwazji raka.

**Publikacja nr 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” przedstawia wyniki, które odzwierciedlają kontynuację badań w dziedzinie „zrzucania” kolagenu typu XVII podczas gojenia się ran. W pierwszej pracy z tej serii odkryłam fizjologiczne znaczenie „zrzucania” kolagenu XVII *in vivo* przy użyciu „niezrzucających” myszy kolagenu XVII (*Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*) jako modelu. W tym badaniu myszy *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* wykorzystano do zbadania mechanizmu molekularnego, za pomocą którego zrzucanie ektodomeny kolagenu XVII reguluje nabłonek rany.

Zgodnie z szybszym gojeniem opisanym w pierwszym artykule z tego cyklu, znacznie wydłużone języki nabłonkowe zaobserwowano u myszy *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* zarówno 3, jak i 6 dni po zranieniu. Było to związane ze zwiększoną szybkością proliferacji keratynocytów, co pokazano przez podwyższoną liczbę komórek dodatnich Ki-67 w językach nabłonkowych badanych za pomocą analizy histologicznej.

Aby wesprzeć moją hipotezę, że przyspieszone nabłonkowanie u myszy *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* było napędzane przez mechanizmy wewnętrzne komórki, pierwotne keratynocyty poddano

analizom biochemicznym i funkcjonalnym. Mikroskopia wideo ujawniła, że keratynocyty *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* pokrywają obszar szybciej niż kontrole, wykazując ich przyspieszoną prędkość. Towarzystwo temu wyraźne tworzenie się włókien stresowych aktyny, cecha zwiększonej aktywności migracyjnej. Te eksperymenty doprowadziły mnie do wniosku, że „zrzucanie” kolagenu XVII zmniejsza prędkość i moduluje utrzymywanie się migracji keratynocytów. Aby dalej ocenić, czy indukowana proliferacja naskórka na krawędziach ran myszy *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* była również niezależna od komórek, określiłam liczbę mitotycznie aktywnych keratynocytów w subkonfluentnych hodowlach monowarstwowych po 2 godzinach włączenia BrdU. Znacząco zwiększoną liczbę komórek dodatnich pod względem BrdU zaobserwowałam w keratynocytach *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*.

Ponieważ zmiany ruchliwości komórek mogą być wywołane przez wewnętrzną ekspresję białek ECM, takich jak integryny, przeanalizowałam ekspresję genów tych cząsteczek w migrujących keratynocytach *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*. Ilościowa PCR z odwrotną transkryptazą ujawniła znacznie zwiększoną transkrypcję podjednostek integryny α6 i β4, ale nie integryny α2, α3, α5, αv i β1, ani cząsteczek lamininy-332, fibronektyny i kolagenu VII. Wzrost podjednostek integryny α6 i β4 zaobserwowano również na poziomie produkcji białka.

Aby zbadać mechanizmy, za pomocą których zwiększona ekspresja integryny α6β4 pośredniczy w fenotypie aktywowanych keratynocytów *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*, zbadalam fosfoinozytid 3-kinaza (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 inhibitora PI3K LY294002, co sugeruje, że Akt jest aktywowany wyłącznie przez PI3K. Sygnalizacja PI3K/Akt jest silnie zaangażowana w regulację proliferacji i przeżycia komórek, podczas gdy regulacja w górę szlaku Akt/mTOR została powiązana ze wzmocnioną migracją komórek, jak pokazano we wcześniejszych publikacjach. Odpowiednio, poziom aktywacji dolnej kinazy p70S6 mTOR był znacznie zwiększony w komórkach *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*.

Podsumowując, do tych badań wykorzystałam wcześniej wygenerowane myszy knock-in, aby zbadać rolę kolagenu XVII i jego „zrzucania” podczas regeneracji skóry. Podczas zranienia, myszy te wykazały przyspieszoną migrację z podwyższoną ekspresją integryny α6β4 na czołowych frontach. Mechanizmy wewnętrzne leżące u podstaw obejmowały zaburzoną



polaryzację od przodu do tyłu oraz zwiększały proliferację i prędkość aktywowanych keratynocytów rannych. Wskazuje to, że miejscowe zmniejszenie „zrzucania” kolagenu XVII, na przykład poprzez selektywne hamowanie sheddaz kolagenu XVII, ADAM9 lub ADAM10, może mieć korzystne skutki i ułatwić i przyspieszyć gojenie się przewlekłych niegojących się ran u pacjentów z RDEB. Ekspresja i „zrzucanie” kolagenu XVII są silnie zwiększone u pacjentów z rakiem naskórka, dlatego lokalne hamowanie „zrzucania” kolagenu XVII mogłoby stanowić sposób zapobiegania progresji rozwoju raka skóry.

W następujących dwóch publikacjach z tej serii tematycznej przedstawiam moje dwie prace pokazujące skuteczność i bezpieczeństwo dwóch terapii, które zostały opracowane do leczenia niegojących się ran u pacjentów z RDEB.

**Publikacja nr 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” odnosi się do próby przedklinicznej, która polegała na śródskórnym wstrzyknięciu skorygowanych fibroblastów pochodzących od Pacjenta przy użyciu GMP (Good Manufacturing Practices grade) wektora samo-inaktywującego (SIN) COLVAA1 (pCMS- (Psi) .) - EF1a-COL7A1-SIN) pokazuje potencjał terapeutyczny w leczeniu niegojących się ran u pacjentów z RDEB. Badanie to potwierdziło 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 i naskórka 2 miesiące po wstrzyknięciu oraz że wstrzyknięte fibroblasty mogą utrzymywać się do 8 tygodni po wstrzyknięciu. Fakt, że ten wektor retrowirusowy GMP SIN uzyskał certyfikat GMP, pozwala na zaadaptowanie tej strategii w jako terapia kliniczna.

Najpierw fibroblasty Pacjenta RDEB (RDEBF) hodowano, namnażano i transdukowano za pomocą GMP wektora retrowirusowego pCMS- (Psi) - EF1a-COL7A1-SIN. Poziomy ekspresji i wydzielania C7 były wyższe w genetycznie skorygowanych komórkach w porównaniu do normalnych ludzkich fibroblastów (NHF) na poziomie mRNA i białka. Wyniki te wykazały, że genetycznie skorygowane fibroblasty ludzkie są dobrymi komórkami pierwotnego producenta C7.

Następnie oceniono zdolność tych komórek do syntezy i osadzania C7 *in vivo* po śródskórnym wstrzyknięciu pod RDEB SE 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 korekcji funkcjonalnej w badaniach przedklinicznych. Liczbę wstrzykniętych komórek została oparta na wcześniej publikowanych danych z literatury. Do iniekcji śródskórnych zastosowano trzy różne populacje fibroblastów, mianowicie 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) na myszy. Iniekcje podzielono na dwie iniekcje o pojemności 75 ul, aby zapobiec powstawaniu pęcherzy SE na skutek naprężeni mechanicznych. Próbki biopsji skóry zebrano 2 miesiące po wstrzyknięciu i poddano dalszej analizie. Analiza hemotoksyny i eozyny nie wykazała oderwania skórno-naskórkowego w SE leczonej RDEB w porównaniu z nieleczoną RDEB SE z separacją skórno-naskórkową. Immunofluorescencja skrawków SE przy użyciu króliczego przeciwciała poliklonalnego RC1 przeciw domenie NC1 ludzkiego C7 wykazała silne barwienie liniowe.

Potencjał genotoksyczności związany z wektorami integracyjnymi z rodziny Retroviridae poprzez mutagenезę insercyjną jest głównym problemem bezpieczeństwa dotyczącym metod terapii genowej. Niemniej jednak wektory retrowirusowe SIN mają bardzo niskie ryzyko powstawania nowotworów, co wykazano w badaniach przedklinicznych i klinicznych. Moje badania i inne wykazały już brak zdarzeń nowotworowych *in vivo* po podskórnym wstrzyknięciu skorygowanych genowo keratynocytów i fibroblastów podobnym wektorem retrowirusowym SIN pCMS-EF1a-COL7A1 SIN u myszy bez systemu odpornościowego, co dowodzi bezpieczeństwa tego podejścia. Ponadto, nie wykryto ludzkiej sekwencji COL7A1 w wątrobie, płucach i jajnikach mysz, którym wstrzyknięto NHF i RDEBF, podczas gdy ludzką sekwencję COL7A1 wykryto zgodnie z oczekiwaniami w próbkach wstrzykniętej skóry, nie potwierdzając wykrywalnego potencjału rozprzestrzeniania się wstrzykniętych komórek w tych narządach.

W celu oceny proliferacji i apoptozy wstrzykniętych komórek,  $3 \times 10^6$  fibroblastów RDEB z korekcją genu, które transdukowano za pomocą wirusa kinazy pRRL-fosfoglicerynian-eGFP-zapalenie wątroby typu post-transkrypcyjnego regulatorowy wektor lentiwirusowy wyrażający GFP podskórnym wstrzyknięto poniżej RDEB SE na nagie myszy. Próbki z biopsji pobierano z miejsc wstrzykniętych 1, 2, 4, 6 i 8 tygodni po wstrzyknięciu. Nie stwierdzono barwienia

immunofluorescencyjnego aktywnej kaspazy-3, markera apoptozy, co sugeruje, że fibroblasty dodatkowo pod względem GFP nie uległy apoptozie w ciągu 8 tygodni po wstrzyknięciu.

To badanie potwierdza, że miejscowe wstrzyknięcie genetycznie skorygowanych fibroblastów ma potencjał terapeutyczny do poprawy RDEB w skórze i jest ważnym krokiem w kierunku wdrożenia klinicznego. Fibroblasty z korekcją genu wyrażają duże ilości funkcjonalnego białka C7 w porównaniu z NHF. Może być to korzystne, gdy zostanie wdrożone do codziennej praktyki klinicznej, umożliwiając tym samym zmniejszenie częstotliwości wstrzyknięć i/ lub liczby komórek wstrzykiwanych. Niedawne 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. Takie podejście byłoby komplementarne do szczepienia skorygowanych genowo naskórka lub ekwiwalentów skóry o pełnej grubości. Uważam, że miejscowe wstrzyknięcie genetycznie skorygowanych fibroblastów może potencjalnie leczyć obszary skóry trudne do przeszczepu, takie jak stawy i palce, a także otwiera możliwość leczenia zmian błon śluzowych przez miejscowe wstrzyknięcie, zapobiegając powstawaniu pęcherzy, cofaniu się i gojeniu małych otwartych ran.

**Publikacja nr 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" donosi o szeroko zakrojonych badaniach, w których zastosowano korektę regularnych krótkich powtórzeń palindromowych (CRISPR) związanych z nukleazą / korektą opartą na nukleazie / 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 wygenerowałam 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 potwierdziłam poprzez bezpośrednie sekwencjonowanie produktów PCR wytworzonych wokół

docelowego regionu korektury. Wyniki ujawniły, że ~ 10% klonów zostało poddanych korekcji biallelicznej, a 40% z nich mono-równoległej korekcji mutacji *COL7A1* w eksonie 19.

Następnie iPSC z korekcją genu różnicowałam na keratynocyty, które okazały się funkcjonalnie dojrzałe w około 60 dni, i fibroblasty, które po 31 d przyjęły charakterystyczną morfologię i wyrażały markery różnicowania mezodermalnego i fibroblastycznego, w tym typu I i typu III kolagen, 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 potwierdza wykonalność korekcji genów za pośrednictwem CRISPR/Cas9 w celu opracowania autologicznych terapii komórkowych dla RDEB w postaci przeszczepów skóry w celu wymiany skóry lub miejscowego leczenia ran nie gojących się.

Ostatecznym celem moich badań jest kliniczne wdrożenie wyżej wymienionych terapii genowych, dlatego w tego typu eksperymentach od samego początku ważne jest zachowanie regulacyjnych parametrów zdefiniowanych przez agencje medyczna. Chociaż nie można przewidzieć wszystkich potencjalnych problemów regulacyjnych związanych z terapiami opartymi na edycji genów i iPSC, obecnie najważniejsze problemy to bezpieczeństwo, skuteczność i kontrola jakości. Aby rozwiązać te problemy, w pracy opisałam kilka ulepszeń i podejść, które stanowią ważne kroki w kierunku tłumaczenia klinicznego. Takie ulepszenia obejmują wysoce skuteczną metodę korekcji genów wspomaganą przez nukleazę Cas9 (SpyFicas9) o wysokiej wierności, która, jak wykazano, ma niewiele, jeśli w ogóle, wykrywalne efekty poza celem genomu z chemicznie zmodyfikowanym syntetycznym przewodnikiem RNA i pojedynczą nicią DNA jako szablon dawcy naprawy do wydajnej edycji genów. Kolejną innowacyjną cechą mojej pracy było przyjęcie warunków hodowli komórkowej pozbawionych produktów pochodzenia zwierzęcego, a zamiast tego stosowanie niezawierających ksenonów, chemicznie zdefiniowanych pożywek hodowlanych. Opracowałam protokół, który spowodował znacznie wyższą wydajność, a także

zwiększenie bezpieczeństwa poprzez wyeliminowanie niezdefiniowanych składników pochodzenia zwierzęcego.

W moich badaniach wykazano, iż zdolność do skonstruowania w pełni autologicznych odpowiedników skóry wykonanych z keratynocytów i fibroblastów z korekcją genów w odróżnieniu od iPSC minimalizuje ryzyko odrzucenia immunologicznego, przyczyniając się w ten sposób do utrzymania funkcjonalnej macierzy zewnątrzkomórkowej i zapewniając długotrwałe przeżycie. Podsumowując, moja praca znacznie przyspiesza potencjalne wdrożenia tych metod do codziennej praktyki klinicznej, zapewniając wydajną i bezpieczną metodę.

### **c) Podsumowanie wyników prezentowanych w pracach stanowiących jednorodny cykl publikacji:**

Podsumowując, ostatnie postępy w opracowywaniu metod leczenia EB dają nadzieję Pacjentom, ich Rodzicom i Opiekunom na poprawę jakości życia. Celowanie genów za pośrednictwem CRISPR/Cas9 jest jednym z podejść, które pokazują wyraźną obietnicę potencjalnych przełomów. Moje badania zawarte w tej serii publikacji tematycznych wykazały systematyczną ścieżkę, zaczynając od badania podstawowej kwestii gojenia się ran przy użyciu modelu myszy do rozwoju terapii takie jak iniekcje fibroblastów z korekcją genów lub tworzenie funkcjonalnych odpowiedników skóry, które można zastosować u Pacjentów cierpiących na RDEB. Patrząc w przyszłość, podobne metody mogłyby mieć zastosowanie do innych form EB z mutacjami w różnych genach, które chciałabym nadal rozwijać i ulepszać.

## **5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH**

### **a) Dane bibliometryczne**

Uwzględniając publikacje przedstawione w opisanych wyżej przedstawionych, jestem także współautorem 8 pełnych tekstów oryginalnych prac (wszystkie 8 z Impact Factor, gdzie w 4 jestem pierwszymi autorem) i 2 prace przeglądowe po uzyskaniu tytułu doktora nauk przyrodniczych.

Podsumowanie moich osiągnięć naukowych przedstawiono poniżej:

Łączna liczba, w tym prace przed i po doktoracie: IF = 74.203; MNiSW = 772

Indeks Hirscha według danych z platformy Scopus: 9

Liczba cytowań według danych ze Scopus: 188

	PRZED DOKTOREM		PO DOKTORACIE	
	IF	MNiSW	IF	MNiSW
Oryginalne pełno tekstowe prace naukowe	10,396	67	54,479	625
Opisy przypadków	-	-	-	-
Prace poglądowe	-	-	9,328	80
<b>TOTAL</b>	<b>10,396</b>	<b>67</b>	<b>63,807</b>	<b>705</b>

#### **b) Opis i tematyka głównych kierunków pozostałych badań naukowych**

Oprócz czterech serii publikacji [Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego = 350 punktów; IF 28.242, które są podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, moje osiągnięcia naukowe obejmują także publikacje na temat:

#### **Nieprzetworzone nowe funkcje cząsteczki transmembranowego kolagenu XVII w skórze**

opisano w tych 2 następujących artykułach:

**Publikacja nr 5** . Löffek S., Hurskainen T., **Jacków J.**, Sigloch F.Ch., Schilling O., Tasanen K., Bruckner-Tuderman L., Franzke C.W. Transmembrane Collagen XVII Modulates Integrin Dependent Keratinocyte Migration via PI3K/Rac1 Signaling. PLoS ONE 9; **2014**: e87263. IF=3.234; MNiSW=40

To badanie odnosi się do nowego projektu, na temat regulacji adhezji kolagenu typu XVII, z nim związanej migracji komórek typu keratynocyty. Nasze dane ujawniły nieoczekiwaną aktywację sygnalizacji 3-kinazy fosfatydoinozytolu (PI3K) przez podjednostkę integryny b4 i kinazę ogniskowej adhezji (FAK) pod nieobecność Col XVII, co spowodowało aktywację Rac1 i mniej ukierunkowaną migrację komórek. Ponadto został wykazany związek między ekspresją Col

XVII a liniową migracją komórek. Ponieważ nad ekspresja Col XVII w mysich komórkach z nokautem dała znacznie zwiększoną kierunkowość. Rola cząsteczki adhezyjnej naskórka Col XVII w migracji komórek została początkowo opisana w pierwotnych keratynocytach pochodzących od pacjentów z JEB, wykazując, że niska obfitość lub całkowity brak Col XVII na powierzchni komórki powodował zwiększoną, ale niekierowaną ruchliwość. W zgodzie, nasze badania *in vitro* na mysich keratynocytach *Col17a1* wykazały tę samą ujemną korelację między ekspresją Col XVII a prędkością / kierunkiem migracji komórek. W przeciwieństwie do tego, wirusowe znoszenie Col XVII w nabłonkowych liniach komórkowych metodami siRNA lub shRNA ujawniło dodatnią korelację między ekspresją Col XVII a prędkością migracji.

Na podstawie powyższych obserwacji wnioskuje się, że wzmocniona sygnalizacja PI3K najprawdopodobniej determinuje szybkość migracji keratynocytów z knock-outem *Col17a*. Jednak nasze dane sugerują, że kierunkowość keratynocytów silnie zależy od obecności Col XVII. Wyjaśnia to również znaczenie zwiększonej ekspresji Col XVII w keratynocytach podczas ponownego nabłonka ostrych ran i na inwazyjnym przodzie raka płaskonabłonkowego. Obecne dane wspierają działający model Tsuruty i współpracowników, co sugeruje, że tylko obecność integryny  $\alpha 6\beta 4$  wraz z Col XVII/BP230 i cytoszkieletem aktynowym może stabilizować rozszerzający się lamellipodium i wspierać ukierunkowaną migrację komórek. Podsumowując, wyniki te dostarczają dowodów, że Col XVII odpowiada za adhezję keratynocytów i ich ukierunkowaną ruchliwość poprzez tłumienie zależnej od integryny aktywacji PI3K i stabilizuje lamellipodia. Efekty te mogą przyczyniać się do tworzenia najnowocześniejszych form w ostrych ranach i inwazyjnym raku płaskonabłonkowym.

**Publikacja nr 6** . Hurskainen T., Kokkonen N., Sormunen R., **Jackow J.**, Loffek S., Soininen R., Franzke C.W., Bruckner-Tuderman L., Tasanen K. Deletion of The Major Bullous Pemphigoid Epitope Region of Collagen XVII Induces Blistering, Autoimmunization and Itching in Mice. *J Invest Dermatol.* **2015**;135 (5): 1303-10. IF=6,915; MNiSW=50

To drugie badanie dotyczące nowej funkcji Col XVII w celu lepszego zrozumienia ludzkiej niekolagenowej domeny 16A (NC16A) Col XVII w genetycznie zmodyfikowanych mysich modelach z delecją w odpowiednim regionie NC14A mysiego Col XVII. Pemfigoid pęcherzowy (BP) jest najczęstszą autoimmunologiczną podskórną pęcherzową chorobą skóry przebiegająca ze świądem i tworzeniem się pęcherzy. Pacjenci z BP wytwarzają autoprzeciwciała wywołujące zapalenie przeciwko kolagenowi XVII (ColXVII, znanemu również jako BP180), pozakomórkowej zewnątrzkomórkowej domeny NC16A zaangażowanej w „zrzucanie” ektodomen. Usunięcie

odpowiedniego regionu NC14A w genetycznie zmodyfikowanym mysim modelu (Del NC14A) zmniejszyło ilość Col XVII w skórze, ale nie zapobiegło „zrzucaniu” ektodomen.

Generowane tutaj myszy Del NC14A są modelem myszy związanym z BP, w którym głównym objawem jest świąd, jak u większości pacjentów z BP. W odróżnieniu od niektórych modeli opisanych w piśmiennictwie, myszy Del NC14A są immunokompetentne i dojrzałe, co umożliwia długoterminowe monitorowanie naturalnych odpowiedzi immunologicznych. Ponadto nie jest wymagane wstrzykiwanie substancji ani inne wywołujące stres procedury eksperymentalne, ponieważ objawy rozwijają się spontanicznie. Zatem, Del NC14A myszy stanowią doskonały model do badania załamania autotolerancji, a także wczesnych stadiów i rozwoju autoimmunologicznej pęcherzowej choroby skóry. Świąd, pęcherze podnaskórkowe, eozynofilia, naciek eozynofilowy i podwyższone poziomy IgE ściśle przypominają kluczowe cechy pacjentów z BP. Obecność autoprzeciwciał IgG i IgA o reaktywności podnaskórkowej, a zwłaszcza rozpoznanie polipeptydu wrażliwego na kolagenazę o masie 180 kDa sugeruje silnie, że autoprzeciwciała są swoiste dla Col XVII. Naszym zdaniem Del NC14A myszy stanowią obiecującego kandydata spośród istniejących modeli myszy BP.

**Konstrukcje skóry trójwymiarowe (3D): nowe narzędzie do badań leków i inżynierii tkankowej** opisano w tych 3 następujących artykułach:

**Publikacja nr 7.** Abaci H.E., Guo Z., Doucet Y., **Jacków J.**, and Christiano A. Next generation human skin constructs as advanced tools for drug development. Minireview. Exp. Biol. Med 2017; 0: 1-12. IF=2,413; MNiSN=30

Ten artykuł przeglądowy odnosi się do obecnych zmian i dominujących wyzwań związanych z wytwarzaniem konstruktów skóry za pomocą naczyń krwionośnych, przydatków skóry, takich jak mieszki włosowe, pigmentacja, odpowiedź immunologiczna, unerwienie i podskórne. Ponadto omówione tu zostały postępy oferowane przez technologię iPSC w celu wygenerowania modeli genetycznych chorób skóry *in vitro*, takich jak pęcherzyca naskórka i łuszczyca. Omówione zostały zagadnienia dotyczące przyszłych konstruktów ludzkiej skóry z platformami mikroprzepływowymi wraz z innymi tkankami. Może to zrewolucjonizować wczesne etapy opracowywania leków, tworząc wiarygodną ocenę specyficznych dla Pacjenta efektów działania środków farmaceutycznych.



**Publikacja nr 8.** Abaci H.E., Coffman A., Doucet Y., Chen J., **Jacków J.**, Wang E., Guo Z. and A.M. Christiano. Synthetic developmental tissue engineering of human hair follicles Nat.Commun 2018; 13;9(1): 5301. IF=11,878; MNiSN=45

Ta ważna publikacja odnosi się do wytwarzania ludzkich mieszków włosowych (HF) w konstrukcjach ludzkiej skóry (HSC) poprzez podsumowanie fizjologicznej organizacji 3D komórek w mikrośrodowisku HF za pomocą form drukowanych w 3D. HSC, mogą potencjalnie zapewnić skuteczną terapię dla pacjentów ze znacznymi obrażeniami skóry i umożliwić badanie przesiewowe leków pod kątem chorób skóry u ludzi. W tym artykule wykazano jednak, że do HSC wprowadzono zmodyfikowane dodatki skórne, takie jak mieszki włosowe (HF), które długo pozostawały głównym wyzwaniem. Wykazano, że nad ekspresja Lef-1 w skórnym komórkach brodawki zwiększa skuteczność różnicowania HF w HSC. Ponadto unaczynienie HSC noszących włosy przed wszczęciem pozwala na skuteczny wzrost ludzkich włosów u myszy z niedoborem odporności. Zdolność do regeneracji całego HF z hodowanych komórek ludzkich będzie miała transformacyjny wpływ na zarządzanie medyczne różnego rodzaju łysieniem, a także przewlekłe rany, które reprezentują główne niezaspokojone potrzeby medyczne.

**Publikacja nr 9.** Shin J.U., Abaci H.E., Herron L., Guo Z., Sallee B., Pappalardo A., **Jackow J.**, Wang E.Ch., Doucet Y. and Christiano A.M. Recapitulating T cell infiltration in 3D psoriatic skin models for patient-specific drug testing. Sci Rep. 2020; 10: 4123. IF= 4,011; MNiSN= 140

Inny artykuł, który odnosi się do użyteczności trójwymiarowych (3D) konstrukcji skóry jako nowego narzędzia do modelowania chorób i badań leków, zawiera strategię inżynierii polegającą na włączeniu specyficznych dla choroby i pacjenta składników immunologicznych do HSC w celu modelowania łuszczycy w kontekście istotnym dla człowieka. Łuszczycy jest przewlekłą zapalną chorobą skóry o złożonej patofizjologii przypisywanej różnym czynnikom genetycznym i środowiskowym. Chociaż ostatnie osiągnięcia i sukces w stosowaniu terapii biologicznych podkreślają, że regulacja odporności odgrywa istotną rolę w rozwoju łuszczycy, różne grupy badawcze wykazują również kumulatywne dowody, że interakcja między czynnikami naskórka i układem odpornościowym odgrywa synergistyczną rolę w inicjacji i utrzymanie choroby.

Ponieważ badania kliniczne mają praktyczne i etyczne ograniczenia, powszechnie stosuje się konwencjonalną kulturę 2D i modele zwierzęce. Obecnie konstrukty skóry 3D

generowane ze zdrowych keratynocytów i fibroblastów pochodzących od pacjentów z łuszczycą są dostępne w handlu od dostawców. Chociaż poprzednie modele mogą podsumować niektóre aspekty łuszczycowego zapalenia, brak złożonego środowiska immunologicznego i ograniczona dostępność komórek pochodzących od pacjenta ogranicza ich użyteczność. Badanie to przedstawia nową strategię włączania komórek T do ludzkich konstrukcji 3D, która pozwoliła nam ściśle monitorować i oceniać ilościowo odpowiedzi komórek T. Zostało stwierdzone, że naskórek sprzyja aktywacji i infiltracji komórek T do skóry i zapewnia kierunkowe wskazówki dla ich selektywnej migracji w kierunku naskórka. Badanie to pozwoliło na ustalenie łuszczycowej HSC (pHSC) poprzez włączenie do konstruktów spolaryzowanych komórek Th1/Th17 lub komórek T CCR6 + CLA + pochodzących od Pacjentów z łuszczycą. Te pHSC wykazały fenotyp łuszczycowy naskórka i charakterystyczne profile cytokin i odpowiadały na różne klasy leków na łuszczycę, podkreślając potencjalną użyteczność naszego modelu jako platformy do badań *in vitro* leków. Podsumowując, ta praca, opracowany został tu zaawansowany immunokompetentny model skóry 3D w celu zbadania interakcji naskórka z komórkami T, zrozumienia patofizjologii zapalnych chorób skóry w kontekście istotnym dla człowieka i specyficznym dla Pacjenta.

**Śledzenie pochodzenia linii jak to funkcjonuje:** praca jest zaprezentowana w następującym artykule przeglądowym:

**Publikacja nr 10.** Vorhagen S., Jackow J., Mohor S.G., Tanghe G., Tanrikulu L., Skazik-Vogt C., Tellkamp F. Lineage tracing mediated by Cre-recombinase activity. *J Invest Dermatol.* 2015 Jan; 135 (1):e28. IF=6,915; MNiSN=50

Niniejsza praca odnosi się do metody śledzenia linii komórkowej, która pozwala nam badać procesy dynamiczne poprzez wizualizację linii komórkowej w organizmie. Linia komórkowa opisuje pojedynczą komórkę macierzystą lub progenitorową, która daje potomstwo i może przyjąć różne formy. Ten los komórkowy jest reprezentowany przez zróżnicowane właściwości komórek lub migrację do określonych regionów w narządzie lub organizmie. W tym artykule przeglądowym omówione zostało w jaki sposób system Cre – loxP może obejść problem rozcieńczenia znaczników poprzez indukcję ekspresji genu reporterowego w określonych populacjach komórek oraz jak te geny reporterowe można wykorzystać do wizualizacji linii komórkowych i analizy ich zachowania *in vivo*.

Wszystkie powyższe publikacje i pozostałe zostały wymienione i certyfikowane w analizie bibliometrycznej (**załącznik nr 5**).

### **c) Nagrody**

1. Stypendium redaktora sekcji JID dla artykułu „Lineage tracing mediated by Cre-recombinase activity” by Vorhagen S., Jackow J., Mohor S.G., Tanghe G., Tanrikulu L., Skazik-Vogt C., Tellkamp F. (2015) J Invest Dermatol. 2015 Jan; 135 (1): e28.
2. Zdobycie 1-ego miejsce na sesji plakatowej za najbardziej innowacyjny projekt “Development of liposomes encapsulating CRISPR/Cas9 gene-editing RNPs for *in vivo* delivery to the skin of recessive dystrophic epidermolysis bullosa” podczas Innovations in Dermatological Science „Future of Dermatologicals & Cosmeceuticals” Rutgers University z New Jersey 8-9 października 2018 r.
3. Stypendium podróżnicze na Europejski Kongres Dermatologiczny (ESDR) w Wenecji 2012.
4. Stypendium podróżnicze na Amerykański Kongres Dermatologiczny (SID) w Atlancie, 2015.
5. ESDR / Japońskie Towarzystwo Badań Dermatologicznych (JSID) Young Fellow Collegiality Award – stypendium podróżnicze dla młodych naukowców na Japoński Kongres Dermatologiczny w Okayama, 11-13 grudnia 2015 r.). Wizyta w Klinice Dermatologii, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japonia. Zaproszenie poparte przez prof. Hirishi Shimizu i starszego współpracownika prof. Wataru Nishie.
6. SID / ESDR Young Fellow Collegiality Award – stypendium podróżnicze na Europejski kongres Dermatologiczny ESDR w Salzburgu w dniach 27–30 września 2017 r.
7. Stypendium podróżnicze na Międzynarodowe Spotkanie Dermatologiczne na Florydzie, May, 2018.

**d) Granty na wsparcie moich badań naukowych**

1. Stypendium naukowe Dr. Ines Mandl dla Dr. Joanny Jacków na rzecz początkujących naukowców prowadzących obiecujące prace w dziedzinie badań tkanki łącznej, Columbia University Medical Center dla projektu zatytułowanego: "Generation of gene corrected iPSC therapy for dystrophic epidermolysis bullosa". Moja rola w grantzie była jako Principle Investigator. To był 2-letni grant, roczna kwota była 30 000 USD. Grant realizowałam od lipca 2017 r. do czerwca 2019 r.

2. Grant badawczy z Epidermolysis Bullosa Research Partnership i Epidermolysis Bullosa Medical Research Foundation w Nowym Jorku dla Dr. Joanny Jacków na projekt zatytułowany: "Development of drug testing platform for recessive dystrophic epidermolysis bullosa squamous cell carcinoma using induced pluripotent cancer cells". Moja rola w tym grantzie jest jako Principle Investigator. Dotacja jest udzielana na 3 lata i wynosi 175 000 USD rocznie od września 2019 r. do września 2022 r. <https://www.ebresearch.org/funded-projects.html>

**e) Wykłady i prezentacje na zaproszenie**

1. Zostałam zaproszona na wykład w Katedrze Dermatologii, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japonia, grudzień 2016 r. Zaproszenie poparł prof. Hirishi Shimizu i starszy współpracownik prof. Wataru Nishie. Przeprowadziłam ustną prezentację na temat badań nad kolagenem XVII i VII.

2. Zostałam zaproszona na wykład do Wydziału Terapii Komórkami Macierzystymi, Graduate School of Medicine, Osaka University, Japonia (15 grudnia 2016 r.) u prof. Katsuto Tamai. Wygłosiłam ustną prezentację na temat „Autologous gene-corrected fibroblasts therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa”.

3. Zostałam wybrana do Akademii ESDR dla przyszłych liderów dermatologii, 10-12 listopada 2016 r., Madryt, Hiszpania.

4. Zostałam zaproszona do prezentacji mojej pracy w Ruthers 'Center for Dermal Research (CDR) Seminarium Series, na uniwersytecie w New Jersey, 15 lutego 2017 r. Zaproszenie było od prof. Bożeny Michniak-Kohn. Wygłosiłam ustną prezentację na temat „Gene-corrected fibroblasts therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using a SIN COL7A1 retroviral vector”.

5. Zostałam zaproszona jako wykładowca na Międzynarodowa Konferencje o badaniach nad Epiderlysis Bullosa, która odbyła się w Salzburgu w Austrii w dniach 24–26 września 2017 r. Moje wystąpienie dotyczyło „Edycji genów w iPSC dla DEB”.
6. Zostałam zaproszona do Wydziału Biologii biofizyki membranowej, Technische Universität Darmstadt, Niemcy, 5 października 2017 r. Zaproszenie było od prof. Gerharda Thiela i wygłosiłam wykład na temat “From basic to translation science: Lessons from two collagens type VII and XVII in the skin”.
7. Byłam zaproszonym gościem na sympozjum o EB podczas Japońskiego Towarzystwa Dermatologii w Kochi, Japonia, 15 grudnia 2017 r. Moje wystąpienie dotyczyło „Edycji genów w iPSC dla DEB”.
8. Zostałam zaproszona do wykładu na Wydziale Dermatologii, Uniwersytetu Niigata Japonia, 21 grudnia 2017 r. Zaproszenie było od prof. Satoru Shinkuma. Moje ustne wystąpienie dotyczyło „W kierunku autologicznego leczenia DEB opartego na komórkach macierzystych”.
9. Zostałam zaproszona przez prof. Jouniego Uitto na Jefferson Matrix Symposium Molecular Genetic of Epidermolysis Bullosa 30 Years of Research Excellence organizowany przez Department of Dermatology and Cutaneous Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA, 13-15 maja, 2018. Wykładałam na sesji: Przełomy w badaniach EB: Young Investigators Forum. Moje wystąpienie dotyczyło: “Novel therapeutic approaches for DEB aimed at causes and consequences: CRISPR-based genome editing in iPSCs and targeting the JAK-STAT pathway in EB-SCC tumors”.
10. Zostałam zaproszona do bycia liderem dyskusji na seminarium Gordon Research Seminar on Collagen, które odbyło się w dniach 13-14 lipca 2019 r. W Colby-Sawyer College w Nowym Londynie, NH, Stany Zjednoczone.
11. Zostałam zaproszona do Zakładu Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka, aby poprowadzić seminarium na temat „Edycji genomu opartej na CRISPR w iPSC w leczeniu epidermolizy pęcherzowej” 3 września 2019 r., Warszawa, Polska.
12. Zostałam zaproszona przez prof. Marię M. Sasiadek na Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wydział Genetyki, na wykład na temat „Efektywnej edycji genomu opartej na CRISPR w iPSC dla RDEB”, 13 grudnia 2019 r., Wrocław, Polska.

**f) Wystąpienia na kongresach naukowych**

1. **Jacków J.**, M. Titeux, S. Charbonnier and A. Hovnanian (2015). Autologous fibroblasts therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Prezentacja ustna at the 74<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, May 6-9, 2015 Atlanta, USA. Gene Therapy & Clinical Therapeutic Minisymposium. Abstract publish in J Invest Dermatol, Supplement Vol 135, S 70.
2. **Jacków J.**, L. Anton-Louis Talà' M. Titeux and A. Hovnanian (2015). Gene editing of *COL7A1* genomic sequence to generate a new mouse model for RDEB using two steps counter selection method based on HR. Prezentacja na plakacie at the 40<sup>th</sup> Annual of the Japanese Society for Investigative Dermatology, JSID, December 11-13, 2015 Okayama. Abstract published in JSID 2015.
3. **Jacków J.**, L.Talà, M. Titeux, A.Izmiryan, J. Mejia and A. Hovnanian (2016). BAC clone modification strategy to generate a new mouse model for RDEB suitable for gene-editing. Prezentacja ustna at the 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the of Society for Investigative Dermatology, May 11-14, 2016 Scottsdale, USA. Abstract publish in J Invest Dermatol, Supplement Vol 136, 5S. Late-Breaking Abstracts.
4. **Jacków J.**, Titeux M., Portier S., S. Charbonnier, C. Ganier, Gaucher S., Hovnanian A (2016) Gene-corrected fibroblast therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using a SIN *COL7A1* retroviral vector. Prezentacja ustna as invited speaker from Imagine Institut, Paris, France to 10th annual graduate student Symposium at the MRC Laboratory of Molecular Biology, July 14-15, 2016 Cambridge, UK.
5. **Jacków J.**, M. Titeux, S. Portier, S. Charbonnier, C. Ganier, S. Gaucher, A. Hovnanian (2016) Gene-corrected fibroblast therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using a SIN *COL7A1* retroviral vector. Prezentacja ustna at the New York City Skin Club, December 8, 2016 Rockefeller University.
6. **Jackow J.**, Z. Guo, H. Wobma, E.H. Abaci, Y.S. Doucet, G. Vunjak-Novakovic and A.M. Christiano (2017) iPSC derived keratinocytes differentiation from reprogrammed blood cells. Prezentacja ustna at the debra of American EB Symposium during the 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Investigative Dermatology, Portland, OR.
7. **Jackow J.**, Z. Guo, H. Wobma, E.H. Abaci, Y.S. Doucet, J. Shin, C. Hansen, J.C. Salas-Alanis and A.M. Christiano (2018) Biallelic *COL7A1* editing in iPSCs via CRISPR/Cas9 for recessive dystrophic epidermolysis bullosa mutations. Come to see my poster short oral presentation at the International Investigative Dermatology Meeting, May 16-19, 2018

Orlando, Florida, USA. Abstract publish in J Invest Dermatol, Supplement Vol 138, Number 5S, Supplement 1, May 2018.

8. **Jackow J.**, R. Perez-Lorenzo, C. Hansen, D.M. Owens and A.M. Christiano (2018) The JAK1/2 inhibitor ruxolitinib induces cell cycle arrest and apoptosis through inhibiting STAT3 phosphorylation in squamous cell carcinoma. Prezentacja na plakacie at the International Investigative Dermatology Meeting, May 16-19, 2018 Orlando, Florida, USA. Abstract publish in J Invest Dermatol, Supplement Vol 138, Number 5S, Supplement 1, May 2018.

9. Work-in-Progress Talks for Columbia Stem Cell Initiative, (Prezentacja ustna) May 2018, Columbia University. My talk was entitled: "Novel therapeutic approach for dystrophic epidermolysis bullosa: CRISPR-based genome editing in iPSCs".

10. **Jacków J.**, Corey Hansen, David M. Owens, Rolando Perez-Lorenzo, Ryota Hayashi, Dom DeLorenzo, Zongyou Guo and Angela M. Christiano (2019) Ruxolitinib reverses accelerated tumor growth of RDEB-cSCCs in a xenograft mouse model. Prezentacja ustna at the SID 2019 Annual Meeting in Chicago, May 9, 2019.

11. **J. Jacków**, Z. Guo, C. Hansen, H.E. Abaci, Y. Doucet, J. Shin, H. Ryota, D. DeLorenzo, K. Yudai, S. Shinkuma, J.C. Salas-Alanis, and A.M. Christiano. "Efficient genome editing using CRISPR/Cas9 RiboNucleoProtein (RNP) approach in iPS cells for recessive dystrophic epidermolysis bullosa". Prezentacja ustna at the Gordon Research Seminar on Collagen held July 13-14, 2019 at Colby-Sawyer College in New London, NH United States.

12. **J. Jacków**, R. Hayashi, D. Owens, R. Perez-Lorenzo, C. Hansen, D. DeLorenzo, Z. Guo and A. Christiano. "Targeting the JAK/STAT3 pathway with Ruxolitinib for RDEB-cSCC therapy". Prezentacja ustna at the 49<sup>th</sup> ESDR Annual Meeting, Bordeaux, France 18-21 September 2019 at the Melanoma and Other Skin Cancer session.

13. **Jacków J.**, Guo Z., Hansen C., Abaci H.E., Doucet Y., Shin J., Ryota H., DeLorenzo D., Yudai K., Shinkuma S., Salas-Alanis J.C. and Christiano A. "CRISPR/Cas9-based genome editing in iPSCs for correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa". Prezentacja ustna at the EB2020, Word conference in London, January 19-23, 2020.

14. **Jacków J.**, Guo Z., Hansen C., Abaci H.E., Doucet Y., Shin J., Ryota H., DeLorenzo D., Yudai K., Shinkuma S., Salas-Alanis J.C. and Christiano A. "Efficient genome editing for correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa in iPS cells using CRISPR/Cas9 RiboNucleoProtein complexes". Prezentacja na plakacie at the Gene- and Cell-Based Therapies CRISPR, Stem Cells, and Beyond, March 2-4, 2020, San Francisco, CA, USA.

15. **Jacków J.**, Rami A., Hayashi R., Hansen C., Guo Z., DeLorenzo D., Pappalardo A., L. Kim A., Perez-Lorenzo R., Owens D.M. and Christiano A.M. "Targeting the JAK/STAT3 pathway

with Ruxolitinib for RDEB-cSCC therapy". Prezentacja ustna at the Transdisciplinary Cancer Interception: Leveraging Biology to Improve Prevention and Detection, March 9-11, 2020, Huntsman Cancer Institute at the University of Utah, Salt Lake City, UT, USA.

## 6. OSIAGNIĘCIA DYDAKTYCZNE, WSPOLPRACA I DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA

### a) Osiągnięcia dydaktyczne

1. Nadzór nad głównym projektem Lorenza Tali, studenta z Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (EPFL) w laboratorium genetycznym choroby skóry pod kierownictwem profesora Alain Hovnanian w Instytucie Imagine w Paryżu. Tytuł projektu: „Badanie sygnatury stanu zapalnego i gojenia się ran z ciężką RDEB” (luty 2016-czerwiec 2016).
2. Nadzór nad letnim programem badawczym na Uniwersytecie Columbia w New York pani Emily Hollyday w laboratorium prof. Angeli Christiano, Columbia University, Nowy Jork, Nowy Jork. Tytuł projektu: „Optymalizacja etapu selekcji dojrzałych pochodnych keratynocytów za pomocą technologii MACS” (lipiec-sierpień 2018).
3. Nadzór nad projektem współpracy z Centrum Badań Skórnych kierowanym przez prof. Bożenę Michniak-Kohn, Rutgers w New Jersey. Projekt ma na celu dostarczenie opracowania metody na wprowadzanie CRISPR / Cas9 *in vivo* do edycji genów (sierpień 2018-lipiec 2019).
4. Nauczanie technicznego personelu do pracy w laboratorium, szkolenie studentów, doktorantów i post doktorantów, którzy dołączają się do naszego laboratorium (sierpień 2016-obecnie).

### b) Współpraca i działania organizacyjne

1. Brałam udział we współpracy między laboratorium genetycznej choroby skóry prof. Alaina Hovnaniana w Institute Imagine, Paryż, Francja i prof. John McGrath z St John's Institute of Dermatology w King's College London, Londyn, Wielka Brytania nad projektem: Pre-clinical mouse study for the preparation of a clinical trial using intravenous injection of gene-modified autologous fibroblasts in adults with RDEB (styczeń 2016 r. - sierpień 2016 r.). Moja rola polegała na planowaniu, przeprowadzaniu, analizowaniu danych i raportowaniu wyników między grupami w Paryżu i Londynie.
2. Byłam kluczową osobą w konsorcjum iPS Cell EBRP, które było nawiązanym partnerstwem obejmującym zespoły badawcze kierowane przez Dr. Angelę Christiano z Columbia University w Nowym Jorku, Dr. Anthony Oro z Uniwersytetu Stanforda i Dr. Denisa Roopa z Uniwersytetu



Colorado Anschutz Medical Campus, maj 2016-maj 2017. Prowadziłem badania na Columbia University.

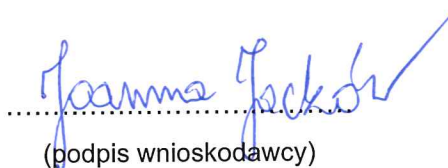
3. Jestem aktywnym kluczowym naukowcem w finansowanym projekcie Kalifornijskiego Instytutu Medycyny Regeneracyjnej (CIRM). Projekt ma na celu dostarczenie pilotażowych danych dotyczących skuteczności i bezpieczeństwa dla autologicznego arkusza keratynocytów pochodzącego z komórki iPSC z korekcją genetyczną COL7A1 dla dystroficznej epidermolizy Bullosa (DEB), o nazwie DEBCT (maj 2017-styczeń 2021). Byłam i nadal jestem zaangażowana w opracowanie nowego protokołu do generowania keratynocytów z iPSC od pacjentów z EB, stosując metody zgodne ze standardami klinicznymi. W ciągu ostatnich dwóch lat kierowałem grupą Columbia w laboratorium prof. Angeli Christiano, aby opracować innowacyjne testy toksykologiczne. W ramach tego projektu opracowałam testy qPCR do wykrywania krążących komórek ludzkich oraz test SCC, który umożliwia wykrycie ludzkiego guza w przeszczepach skóry. Powtórzyłem również skuteczność testów różnicowania, aby umożliwić skalowanie do poziomów produkcji klinicznej.

4. Przy moich indywidualnych projektach w grupie Dr. Christiano współpracowałem z Dr Julio Cesar Salas-Alanis, który dostarczył nam biopsje skóry ze swojej kliniki EB oraz dr Andrew South z Uniwersytetu Thomasa Jeffersona, który uprzejmie dostarczył mi linie RDEB-SCC dla mój projekt na badania raka.

5. Jestem zaangażowana w interdyscyplinarne projekty, takie jak National Center for Advanced Translational Sciences (NCATS) z National Institute of Health (NIH) z prof. Markiem Ferrerem oraz w projekt Organs-on-a-Chip we współpracy z prof. Gordaną Vunjak- Novakovic z Wydziału Inżynierii Biomedycznej na Columbia University w Nowym Jorku. Projekty te mają na celu opracowanie nowych trójwymiarowych (3D) modeli skórnych w celu wydajnego testowania nowych leków. W ramach tej współpracy nauczyłem się i rozwijałem pomysły dotyczące rozwiązywania nieadresowanych problemów medycznych i biomedycznych poprzez łączenie naukowców z różnych dziedzin. Moja rola polegała na planowaniu, przeprowadzaniu, analizowaniu danych i raportowaniu wyników między grupami współpracującymi.

## 7. INNA DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA

1. Udział w letnim kursie badawczym EADV / ESDR na temat modelu myszy w badaniach skóry, Kolonia, Niemcy 2013.
2. Uczestnictwo w FELASA (Federalnym Europejskim Stowarzyszeniu Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych), kurs kategorii B na temat „Nauk o zwierzętach laboratoryjnych i metod eksperymentowania na zwierzętach”. Zdaj egzamin certyfikowany.
3. Jestem członkiem Europejskiego Stowarzyszenia Dermatologicznego (ESDR) od 2011 r. Do chwili obecnej
4. Jestem członkiem Amerykańskiego Towarzystwa Dermatologii (SID) od 2017 r. Do chwili obecnej
5. Recenzuje artykuły naukowe dla następujących czasopism:
  - Journal of Dermatological Science
  - Journal of Molecular Medicine

  
.....  
(podpis wnioskodawcy)

23/04/2020

# AUTOREFERAT

## THE SUMMARY OF SCIENTIFIC ACCOMPLISHMENT



**Dr. Joanna Jacków, PhD**

Medical University of Warsaw

Warsaw,  
April, 2020

**1. PERSONAL DATA**

Name and surname	Joanna Katarzyna Jacków, PhD
1. Address of employment	Department of Dermatology Columbia University, Medical Center 1150 St. Nicholas Ave. 10032 New York, NY USA Tel: + 917-664-3423 email: joannajackowparis@gmail.com

**2. EDUCATION-DIPLOMAS AND ACADEMIC DEGREES**

2009	Diploma in Biology (equivalent to Magister degree) Albert-Ludwigs-University of Freiburg, Germany
2013	Doctoral Degree in Molecular Biology Department of Dermatology, Medical Center, Biology Faculty – Albert-Ludwigs-University of Freiburg, Germany Doctoral thesis entitled: "Physiological role of collagen XVII shedding" Promotor: Prof. Leena Bruckner-Tuderman, MD Dean of Biology Faculty: Prof. Ad Aerten, PhD

**3. INFORMATION ON EMPLOYMENT IN RESEARCH INSTITUTIONS**

2009 – 2013	Pre-doctoral Researcher, Molecular Dermatology, University Medical Center, Freiburg, directed by Prof. Leena Bruckner-Tuderman, MD
2013 - 2016	Postdoctoral Research Fellow, Laboratory of Genetic Skin Diseases, Imagine Institute, Paris, France, directed by Prof. Alain Hovnanian, MD, PhD
2016 - 2018	Postdoctoral Research Fellow, Department of Dermatology, Columbia University, New York, NY, directed by Prof. Angela Christiano, PhD
2018 – 06/2020	Associate Research Scientist, Department of Dermatology, Columbia University, New York, NY, directed by Prof. Angela Christiano, PhD
07/2020-	Lecturer position at King's College London, Principle Investigator (PI), London, UK

**4. THE SCIENTIFIC ACHIEVEMENTS IN ACCORDANCE WITH THE ART. 219 PARAGRAPH 1 OF THE 2 ACT OF JUNE 20<sup>TH</sup> 2018, CONCERNING THE ACADEMIC DEGREES AND TITLES (OFFICIAL JOURNAL OF LOAW OF 2018, ITEM 1669, AS AMENDED):**

**4.1 The title of academic achievement:**

The cycle of publications includes 4 original papers conducted in the area of research entitled: **“Epidermolysis Bullosa-Associated Wound Healing: From understanding the pathogenesis to therapeutic treatments”**.

**Publication nr 1. Jacków J.**, Schlosser A., Sormunen R., Nyström A., Sitaru C., Tasanen K., Bruckner-Tuderman L. and Franzke C.W. 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. IF=6,287; MNiSW=50

**Publication nr 2. Jacków J. [corresponding author]**, Löffek S., Nyström A., Tasanen K., Bruckner-Tuderman L. and Franzke C.W. Collagen XVII shedding suppresses re-epithelialization by directing keratinocyte migration and dampening mTOR Signaling. *J Invest Dermatol.* 2016; 136, 1031-1041. IF=6,287; MNiSW=50

**Publication nr 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. IF=6,287; MNiSW=50

**Publication nr 4. Jacków J.**, Guo Z., Hansen C., Abaci H.E., Doucet Y., Shin J., Ryota H., DeLorenzo D., Yudai K., Shinkuma S., Salas-Alanis J.C. and Christiano A.M. “CRISPR/Cas9-based targeted genome editing for correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa using iPS cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019; **116**, 26846-26852. IF=9,580; MNiSW=200

**Impact Factor** of presented cycle of publications equals **28,442**.

**MNiSW points** of presented cycle of publications equals **350**.

The percentage share in the creation of the above publications are in the attachment **(Appendix 4)**.

The merit-related input is described in bibliometric analysis in attachment **(Appendix 5)**.

The merit-related input of all co-authors is described in attachment **(Appendix 6)**.

## **4.2 The summary of the main objectives and the results of the scientific achievement**

### **a) Introduction**

Epidermolysis bullosa (EB) is a family of inherited diseases is characterized by spontaneous blistering in response to mechanical damage. EB can produce painful wounds and erosions in skin, eyes, and mucosal tissues, it can be mild or severe, and the skin heal with severe scarring or no scarring at all. Four major EB types are distinguished based on the level of blister formation within the skin: EB simplex (EBS), junctional EB (JEB), dystrophic EB (DEB), and Kindler syndrome (KS). Critical to understanding the molecular basis of EB is the recognition of the adhesion complex, consisting of interacting proteins, that form a network responsible for keratinocyte cell-to-cell adhesion and stable association of the epidermis and the underlying dermis. Currently, there are 21 distinct genes that harbor mutations in different forms of EB. The topographic location of the resulting proteins within the epidermis and the cutaneous basement membrane zone, the types and combinations of the mutations, and their consequences at the RNA and protein levels, collectively explain the phenotypic variability within the different forms of EB.

Mutations in the *COL17A1* gene are linked to JEB. In the skin, type XVII collagen is an essential and functional component of the hemidesmosome but has also been detected in the cornea, teeth, esophageal mucous membranes, brain and kidney. Its function as an epidermal adhesion molecule is advanced by two blistering skin diseases, the hereditary formed of JEB caused by mutations in *COL17A1*, and the autoimmune disease bullous pemphigoid, which is characterized by skin blistering caused by autoantibodies directed against type XVII collagen. Production of non-functional type XVII collagen or a complete lack of protein production is the

result of different mutations in the *COL17A1* gene. The characteristic phenotypes include blisters, erosions and wounds of the skin and mucous membranes, alopecia, nail dystrophy, and dental abnormalities.

One of the most severe forms of EB is the recessive form of DEB (RDEB), in which the affected individuals manifest in extensive fragility with blistering and non-healing wounds of the skin, resulting in extensive scarring. RDEB patients also develop rapidly metastasizing cutaneous squamous cell carcinoma, which leads to a high degree of mortality at an early age. RDEB shows extracutaneous abnormalities, including blistering and erosions of the gastrointestinal tract, esophagus and cornea. RDEB is caused by biallelic mutations such as nonsense, small insertions or deletions in the *COL7A1* gene encoding type VII collagen (C7), the major component of the anchoring fibrils. There is also a dominantly inherited form of dystrophic EB associated with glycine substitution mutations, which interfere with C7 assembly into anchoring fibrils through a dominant-negative mechanism.

Physiological healing of wounded skin is a complex process in which overlapping events assure efficient restoration of tissue integrity. These events include blood coagulation, infiltration of the wound bed by inflammatory cells, re-epithelialization with migration and proliferation of keratinocytes to repair the damaged skin barrier, formation of granulation tissue, and finally stroma and tissue remodeling. However, as described above, in the most severe and disabling subtypes of EB, mutations in genes encoding specific components of the epidermal-dermal junction impair the healing process and in turn, skin erosions and blisters develop into chronic non-healing wounds, together with inflammation and fibrosis. In RDEB, these events are responsible for the onset of highly disabling and life-threatening disease complications, such as esophageal strictures, deformities of the hands and feet, and aggressive epithelial cancer.

Considering the clinical severity of RDEB, and the fact that there are no effective treatments beyond protection from trauma, extensive bandaging, and prevention of infections, several recent studies focused on the development of new therapies for this devastating, currently intractable disease.

**b) Results of the scientific achievements**

This academic achievement is a continuation and development of research conducted for my doctoral dissertation entitled “Physiological role of collagen XVII shedding.” This work was partially published in two scientific papers. The publications included in the dissertation reported on a novel detection strategy to identify cleavage sites within collagen XVII to understand the cleavage pattern, called “shedding”, of this molecule. Based on this achievement, a new knock-in mouse called non-shedding collagen XVII (*Col17<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*) was generated to study tissue regeneration and wound healing in EB.

In a series of thematic publications related to this academic achievement, understanding the mechanisms of collagen XVII shedding in wound healing provided the necessary foundation for developing proof-of-concept studies for cell- and gene-based therapies to treat wounds in EB patients. These studies demonstrated the importance of a mouse models as tools to better understand the wound healing process. Such models enable demonstration that cell- and gene-based therapies are both safe and effective, with the potential for future development toward treatment of non-healing wounds in EB patients.

**Publication nr 1.** “Jacków J., Schlosser A., Sormunen R., Nyström A., Sitaru C., Tasanen K., Bruckner-Tuderman L. and Franzke C.W. 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.” This paper describes knock-in mice, that express a functional non-shedding collagen XVII mutant, with a 41-amino acid deletion ( $\Delta 41$ ) in the linker domain spanning all ADAM cleavage sites. This is the first paper reporting a cleavage-specific knock-in model for type XVII collagen and demonstrated the relevance of type XVII collagen shedding in wound healing.

The collagen XVII non-shedding mice (*Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*), which exclusively produce mutant  $\Delta 41$  collagen XVII, were generated using a knock-in strategy that introduced a 123 bp deletion into exon 18 of the *Col17a1* gene. *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* mice were indistinguishable from their *Col17a1* littermates, they bred normally, and showed no differences in their body mass and had a normal lifespan. These mice developed neither skin blisters on the paws and around the genitals nor loss of hair or nails, which were known phenotypes of collagen XVII knockout mice. Histologic analysis



revealed no obvious changes in the skin architecture of *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* mice. Furthermore, analysis of the ultrastructural localization of Δ41 collagen XVII in the skin revealed a similar distribution and frequency in the BM and HDs compared to wild-type collagen XVII. However, ultrastructural analysis of the dermal epidermal junction revealed significantly increased thickness of the BM in *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* mice, especially in the lamina lucida region.

To validate the involvement of collagen XVII shedding in early wound re-epithelialization, sections of human wounded skin were stained with selective antibodies recognizing either the shed ectodomain or the full-length form. The shed ectodomain-specific staining was restricted to the BM and was increased along the leading epithelial tongue, whereas the BM staining of the membrane-associated collagen XVII was not increased. These results suggest that collagen XVII expression and shedding fulfill distinct functions during wound re-epithelialization. Based on this evidence, the role of collagen XVII shedding in wound regeneration was investigated by analyzing the healing process of 8-mm full thickness wounds on mouse dorsal back skin. Wound closure in *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* mice was significantly accelerated between day 1 and 6 compared with wild-type littermates, whereas there were no significant differences during the later phases of wound healing.

Here, I uncovered a regulatory role of collagen XVII cell surface proteolysis during cutaneous wound healing, when collagen XVII is mobilized from the HDs in response to growth factors or cytokines. The non-shedding collagen XVII mouse model developed in this work represents a powerful tool to investigate the pathophysiologic relevance of ectodomain shedding during wound regeneration and cancer invasion.

**Publication nr 2.** “**Jacków J. [corresponding author]**, Löffek S., Nyström A., Tasanen K., Bruckner-Tuderman L. and Franzke C.W. Collagen XVII shedding suppresses re-epithelialization by directing keratinocyte migration and dampening mTOR Signaling. *J Invest Dermatol.* 2016; 136, 1031-1041” presents results which reflects a continuation of research in the field on type XVII collagen shedding during wound healing. In the first paper of this series, the physiological relevance of collagen XVII shedding *in vivo* was uncovered using non-shedding collagen XVII mice (*Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>*) as model. In this study, *Col17a1<sup>ΔNS/ΔNS</sup>* mice were used to investigate the molecular mechanism by which the collagen XVII ectodomain shedding regulates wound re-epithelialization.

Consistent with faster wound healing reported in the first paper, here I found that significantly-extended epithelial tongues were observed in *Col17a1*<sup>ANS/ΔNS</sup> mice both 3 and 6 days after wounding. This was associated with an enhanced keratinocyte proliferation rate, as evidenced by elevated numbers of Ki-67 positive cells in the epithelial tongues examined by histological analysis.

To test the hypothesis that the accelerated re-epithelialization in *Col17a1*<sup>ANS/ΔNS</sup> mice was driven by cell-intrinsic mechanisms, I next subjected primary keratinocytes to biochemical and functional analyses. Time-lapse video microscopy revealed that *Col17a1*<sup>ANS/ΔNS</sup> keratinocytes migrated in a scratch assay culture dish area more rapidly than controls, demonstrating their accelerated motility enhanced velocity. This was accompanied by pronounced actin stress fiber formation, a characteristic feature of increased migratory activity. These experiments showed that collagen XVII shedding decreased the speed and modulated the persistence of keratinocyte migration. To further assess whether the induced epidermal proliferation at the wound edges of *Col17a1*<sup>ANS/ΔNS</sup> mice was also cell-autonomous, we measured the number of mitotically-active keratinocytes in sub-confluent monolayer cultures after 2 hours of BrdU incorporation. I noted a significantly increased numbers of BrdU positive cells in the *Col17a1*<sup>ANS/ΔNS</sup> keratinocytes.

Since cell motility alterations can be triggered by cell intrinsic expression of ECM proteins such as integrins, I analyzed the level of gene expression of these molecules in migrating *Col17a1*<sup>ANS/ΔNS</sup> keratinocytes. Quantitative reverse transcriptase-PCR revealed significantly-increased transcription of the integrin subunits a6 and b4, but not of integrin a2, a3, a5, av, and b1, or the ECM molecules laminin-332, fibronectin, and collagen VII. The increased of integrin expression subunits a6 and b4 was corroborated at the protein level.

To define the mechanisms by which increased a6b4 integrin expression mediated the phenotype of activated *Col17a1*<sup>ANS/ΔNS</sup> keratinocytes, I investigated the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)- Protein Kinase B (Akt) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways that support cell proliferation and motility once triggered by adhesion to the ECM. Only the Akt pathway was increased in migrating *Col17a1*<sup>ANS/ΔNS</sup> keratinocyte in WB analysis. This was completely inhibited by 50 mM of the PI3K inhibitor LY294002, suggesting that Akt is exclusively activated via PI3K. It is known that PI3K-Akt signaling is involved in the regulation of cell proliferation and survival, whereas the upregulation of the Akt-mTOR pathway has been linked to enhanced re-epithelialization and cell migration, as shown in earlier publications. Accordingly,

the activation level of the mTOR downstream target, p70S6 kinase, was significantly increased in *Col17a1*<sup>ΔNS/ΔNS</sup> cells.

In summary, for this study I used our previously-generated knock-in mice expressing a functional, normally-regulated non-shedding collagen XVII mutant allele to assess the regulatory role of collagen XVII cell surface proteolysis during skin regeneration. Upon wounding, these mice exhibited accelerated re-epithelialization with an elevated α6β4 integrin expression at the leading edge. The underlying intrinsic mechanisms encompassed disturbed front-to-rear polarization and increased the proliferation and migration of activated wound keratinocytes.

Prevention of collagen XVII shedding in our knock-in mouse model resulted in accelerated re-epithelialization. This indicated that a transient local decrease of collagen XVII shedding, (for example, by selective inhibition of the collagen XVII sheddases, ADAM9 or ADAM10), could have beneficial effects and facilitate re-epithelialization of chronic skin wounds. On other hand, prevention of collagen XVII shedding can be used as a strategy to enhance healing of chronic, non-healing wounds, such as those in RDEB patients. Similarly, because collagen XVII expression and shedding are strongly increased in the invasive front of squamous cell carcinomas, local inhibition of collagen XVII shedding may offer a novel method to prevent its progression.

In the next two publications of this thematic series, I will present data which showed the efficacy and safety of two therapies that to treat non-healing wounds in RDEB patients.

**Publication nr 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” refers to the pre-clinical demonstration that intradermal injections of genetically-corrected patient-derived fibroblasts using a Good Manufacturing Practices grade (GMP) batch of a self-inactivating (SIN) *COL7A1* retroviral vector (pCMS-(Psi.)-EF1a-COL7A1-SIN) shows therapeutic potential for clinical translation to treat non-healing wounds in RDEB patients. My study tested the hypothesis that a single *in vivo* intradermal injection of  $3 \times 10^6$  fibroblasts was sufficient to restore the C7 expression and anchoring fibrils (AF) formation at the DEJ and to recover dermal-epidermal adherence 2 months after injection. Notably, injected fibroblasts persisted up to 8 weeks after

injection. The fact that this GMP SIN retroviral vector has been GMP-certified allows for rapid clinical translation.

First, RDEB patient fibroblasts (RDEBF) were cultured, expanded, and transduced with a GMP batch of the pCMS- (Psi.)-EF1a-COL7A1-SIN retroviral vector. The expression and secretion levels of C7 were higher in genetically corrected cells versus normal human fibroblast (NHF) at the mRNA and protein levels. These results showed that genetically-corrected human fibroblasts are efficient C7 primary producer cells.

Next, I assessed the capability of these cells to synthesize and deposit C7 *in vivo* after intradermal injection beneath RDEB skin equivalents (SE) grafted onto immunodeficient mice. This xenograft model recapitulated the RDEB skin phenotype *in vivo* and has often been used in the past to show functional correction in pre-clinical studies. The number of injected cells was based on previous fibroblast-based therapeutic approaches reported in mice. Three different fibroblast populations, namely NHF (positive control), RDEBF (negative control), and RDEBF+C7 were used for intradermal injections. Three million cells of each fibroblast type were resuspended in 150 ul of sterile saline and were intradermally injected into grafted RDEB patient SE covering an area of approximately 1 cm<sup>2</sup>. Injections were divided into two doses of 75 ul each to prevent blistering of the SE from mechanical stress. The skin biopsy samples were collected 2 months after injection and were subjected to further analysis. Hematoxylin and eosin analysis showed no dermal-epidermal detachment in RDEB-treated SE compared with untreated RDEB SE with dermal-epidermal separation. Immunofluorescence of the SE sections using a rabbit polyclonal antibody against the NC1 domain of human C7 RC1 showed strong linear staining.

The genotoxic potential associated with integrative vectors of the Retroviridae family through insertional mutagenesis is a major safety issue concerning gene therapy approaches. Nevertheless, SIN retroviral vectors have a very low risk of tumor formation, as shown in preclinical and clinical studies. My study and others have already shown the lack of tumorigenic events *in vivo* after subcutaneous injection of gene-corrected keratinocytes and fibroblasts with a similar pCMS-EF1a-COL7A1 SIN retroviral vector in nude mice, demonstrating the safety of this approach. Moreover, no human *COL7A1* sequence was detected in the liver, lungs, and ovaries of mice injected with NHF and RDEBF, whereas the human *COL7A1* sequence was detected in injected skin samples as expected, consistent with no detectable dissemination of injected cells in these organs.

To assess the survival, proliferation, and apoptosis of injected cells,  $3 \times 10^6$  gene-corrected RDEB fibroblasts that were transduced with lentiviral vector expressing GFP were intradermally beneath RDEB SEs grafted onto nude mice as described above. Biopsy samples were taken from injected areas at 1, 2, 4, 6, and 8 weeks after injection. There was no immunofluorescence staining of active caspase-3 observed (a marker for apoptosis), suggesting that GFP-positive fibroblasts did not undergo apoptosis within 8 weeks after injection.

This proof-of-principle study supported the notion that the local injection of genetically-corrected fibroblasts had the therapeutic potential to improve RDEB and is an important step towards clinical implementation. The gene-corrected fibroblasts expressed high amounts of functional C7 protein compared with NHF. This would be advantageous when translated to patient treatment, allowing for a reduction of the frequency of injections and/or cell number per injection. The recent GMP certification of the SIN *COL7A1* retroviral vector allows for the preparation a phase I/II clinical trial to treat chronic, non-healing wounds in RDEB patients. This approach is complementary to the grafting of gene-corrected epidermal sheets or full thickness skin equivalents. I believe that the local injection of genetically corrected fibroblasts has the potential to treat skin areas that are difficult to graft, such as joints and fingers, and opens the possibility of treating mucosal lesions by local injection to prevent blistering, and promote healing of small open wounds.

**Publication nr 4.** “Jacków J., Guo Z., Hansen C., Abaci H.E., Doucet Y., Shin J., Ryota H., DeLorenzo D., Yudai K., Shinkuma S., Salas-Alanis J.C. and Christiano A.M. “CRISPR/Cas9-based targeted genome editing for correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa using iPS cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2019; **116**, 26846-26852” reports extensive studies employing clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated nuclease/Cas9 (CRISPR/Cas9)-based correction of *COL7A1* mutations in cells from 2 patients with RDEB. One of the patients had a homozygous frameshift mutation in exon 19 (c.2470insG), while the second patient was compound heterozygote for frameshift mutations in exons 19 and 32 (c.2470insG/c.3948insT).

At the first step of this project, patient-specific inducible pluripotent stem cells (iPSCs) were generated. These cells were then subjected to CRISPR/Cas9 homology-directed repair (HDR) of the pathogenic mutations. I demonstrated that the CRISPR/Cas9-mediated HDR

introduced a corrected homologous sequence in the targeted area of the gene and restored the normal gene sequence, which was confirmed by direct sequencing. The results revealed that ~10% of the clones underwent biallelic correction, and 40% of clones underwent monoallelic correction of the *COL7A1* mutation in exon 19. Sequencing also revealed that the area around the target sequence was free of off-target mutations.

Next, the gene-corrected iPSCs were differentiated into either keratinocytes (KCs), which became functionally mature in ~60 days, or fibroblasts (FB) after 31 days. FBs assumed characteristic morphology and expressed markers of mesodermal and fibroblastic differentiation, including type I and type III collagen as well as fibroblast-associated surface markers in a pattern similar to that of normal human FBs. Importantly, the gene-edited FBs derived from RDEB patients' iPSCs synthesized and secreted type VII collagen, which assumed its characteristic stable triple-helical conformation.

Finally, 3-dimensional (3D) skin equivalents from gene-corrected KCs and FBs were built, and were then grafted onto immunocompromised mice. Analysis at 2 months post-grafting demonstrated robust expression of type VII collagen in the xenografts in a pattern resembling wild-type mouse skin. Importantly, transmission electron microscopy revealed the formation of anchoring fibrils (AF). Thus, this work attests to the feasibility of a CRISPR/Cas9-mediated gene correction to develop autologous cell therapies for RDEB in the form of skin grafts for local treatment of non-healing wounds.

With the eventual goal of clinical translation of this approach, there are regulatory concerns that must to be addressed as treatment development moves forward. Although it is not possible to anticipate all of the potential regulatory concerns relevant to gene-editing-based therapeutics and iPSCs, the major issues at the present time include safety, efficacy, and quality control. To address these issues, this work describes several improvements and approaches that represent important steps toward clinical translation. Such improvements include a highly efficient method for gene correction assisted by high-fidelity Cas9 (SpyFicas9) nuclease. This specialized nuclease introduced few, if any, detectable genome-wide off-target effects with a chemically-modified synthetic guide RNA and single strand DNA as a repair donor template for efficient gene editing. Another innovative feature of my work was the adoption of cell culture conditions devoid of animal products, and instead, I utilized xeno-free, chemically-defined culture media. The

protocol developed in my study resulted in a significantly higher reprogramming efficiency than has been reported previously, associated with enhanced safety by eliminating the undefined animal-derived components when developing cell-containing products for treatment of human diseases.

The ability shown by my study to construct fully autologous skin equivalents made from gene-corrected KCs and FBs differentiated from iPSCs minimizes the risk of immune rejection. Thus, autologous grafts have the potential to contribute to the maintenance of a functional extracellular matrix and long-lasting survival of the graft. Collectively, my work significantly advances potential translation of these approaches towards clinical reality by providing an efficient and safe method for clinical application.

### **c) The summary of the main results of the scientific achievements**

In summary, recent progress in the development of treatments for EB offers new hope to EB patients, their parents, and their caregivers for future improvement in their quality of life. CRISPR/Cas9-mediated gene targeting is one of the approaches that shows clear promise for potential breakthroughs. My studies included in this thematic publication series defined a systematic pathway starting from studying a fundamental question of wound healing using a mouse model, to therapeutic development, such as gene-corrected fibroblasts injections or the formation of functional skin equivalents that can be applied to patients with RDEB. Looking forward, similar approaches could be applicable to other forms of EB with mutations in different genes that I would like to continue to develop.

## **5. OVERVIEW OF OTHER RESEARCH AND ACADEMIC ACHIEVEMENT**

### **a) Bibliometric data**

Including the publications presented in the academic achievements described above, I have authored or co-authored 8 full text original papers (all 8 with Impact Factor, 4 being the first author) and 2 review papers following my PhD.

The summary of my scientific achievements is summarized below:

Total number including prior and post-PhD work: IF=74,203; MNiSW= 772

Hirsch Index according to data from Scopus platform: 9

Number of citations according to data from Scopus: 188

	PRIOR TO PhD		POST-PhD	
	IF	MNiSW	IF	MNiSW
<b>Full-text original papers</b>	<b>10,396</b>	<b>67</b>	<b>54,479</b>	<b>625</b>
<b>Case reports</b>	-	-	-	-
<b>Review papers</b>	-	-	<b>9,328</b>	<b>80</b>
<b>TOTAL</b>	<b>10,396</b>	<b>67</b>	<b>63,807</b>	<b>705</b>

#### b) Description and subject of other main academic research

Apart from the four-publication series [Ministry of Science and Higher Education = 350 points; IF 28,442, which is the basis for applying for a postdoctoral degree, my academic achievements post-PhD also include publications on related topic, as described below:

**New functions of Transmembrane Collagen XVII molecule in the skin** are described in these 2 following papers:

**Publication nr 5** . Löffek S., Hurskainen T., **Jacków J.**, Sigloch F.Ch., Schilling O., Tasanen K., Bruckner-Tuderman L., Franzke C.W. Transmembrane Collagen XVII Modulates Integrin Dependent Keratinocyte Migration via PI3K/Rac1 Signaling. PLoS ONE 9; **2014**: e87263. IF=3.234; MNiSW=40

This study refers to the new investigation on how type XVII collagen regulates cell adhesion, spreading and migration in normal human keratinocytes. Our data revealed an unexpected activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling via the  $\beta 4$  integrin subunit and the focal adhesion kinase (FAK) in the absence of Col XVII that resulted in Rac1 activation and less directed cell migration. Moreover, we demonstrated a link between Col XVII expression and linear cell migration, as overexpression of Col XVII in knockout murine



cells yielded significantly increased directionality. The role of the epidermal adhesion molecule Col XVII in cell migration was initially described in primary keratinocytes derived from JEB patients, demonstrating that a low abundance or complete absence of Col XVII on the cell surface resulted in increased, albeit non-directed cell motility. Our *in vitro* investigation of murine *Col17a1* knock-out keratinocytes demonstrated the same negative correlation between the expression of Col XVII and the speed/directionality of cell migration. In contrast, knockdown of Col XVII in epithelial cell lines by siRNA or shRNA approaches disclosed a positive correlation between Col XVII expression and migration speed.

Based on these observations, we concluded that enhanced PI3K signaling most likely determined the speed of migrating *Col17a* knock-out keratinocytes. However, our data suggested that the directionality of keratinocyte movement strongly depended on the presence of Col XVII. This mechanism has relevance to the enhanced expression of Col XVII in keratinocytes during re-epithelialization of acute wounds and at the invasive front of squamous cell carcinoma. These findings support the working model of Tsuruta and colleagues, which suggests that the presence of  $\alpha 6 \beta 4$  integrin, together with Col XVII and the actin cytoskeleton, can stabilize an extending lamellipodium and support directed cell migration. In summary, our findings provide mechanistic evidence that Col XVII is an important regulator of keratinocyte adhesion and directed motility by dampening integrin-dependent PI3K activation and by stabilizing lamellipodia. These properties may contribute to the leading-edge formation in acute wounds and invasive squamous cell carcinoma.

**Publication nr 6** . Hurskainen T., Kokkonen N., Sormunen R., **Jackow J.**, Loffek S., Soininen R., Franzke C.W., Bruckner-Tuderman L., Tasanen K. Deletion of The Major Bullous Pemphigoid Epitope Region of Collagen XVII Induces Blistering, Autoimmunization and Itching in Mice. *J Invest Dermatol.* **2015**;135 (5): 1303-10. IF=6,915; MNiSW=50

This is the second study regarding the new function of Col XVII to better understand the multiple functions of the human non-collagenous 16A (NC16A) domain of Col XVII in genetically-modified mouse models carrying a deletion in the corresponding NC14A region of murine Col XVII. Bullous pemphigoid (BP) is the most common autoimmune sub-epidermal blistering skin disease with clinical characteristics of pruritus and blistering. BP patients carry autoantibodies against the juxtamembraneous extracellular (NC16A) domain of collagen XVII (ColXVII, also known as BP180) that is involved in ectodomain shedding. Deletion of the corresponding NC14A

region in a genetically-modified mouse model (Del NC14A) decreased the amount of Col XVII in skin, but it did not prevent ectodomain shedding.

The Del NC14A BP-related mouse model is characterized by a primary symptom of pruritus, similar to the majority of human BP patients. Different from some previous models published by others in the past, Del NC14A mice are immunocompetent and live to adulthood, which enables long-term monitoring of natural immune responses. In addition, no injection of pruritogenic substances or other stress-causing experimental procedures are required to induce itching, because the symptoms develop spontaneously. Thus, Del NC14A mice represent an excellent model to study the breakdown of self-tolerance, as well as the early stages and development of an autoimmune blistering skin disease. Itching, sub-epidermal blistering, eosinophilia, eosinophilic infiltration, and elevated IgE levels in the Del NC14A model closely resemble the key features of BP patients. The presence of IgG and IgA autoantibodies with sub-epidermal reactivity and especially, recognition of a 180-kDa collagenase-sensitive polypeptide suggest strongly that autoantibodies are Col XVII-specific. Taken together, Del NC14A mice represent a promising BP mouse models of the human disease counterpart.

**3D skin constructs: Emerging tools for drug screening and tissue engineering** are described in these 3 following papers:

**Publication nr 7.** Abaci H.E., Guo Z., Doucet Y., **Jacków J.**, and Christiano A.M. Next generation human skin constructs as advanced tools for drug development. Minireview. *Exp. Biol. Med* 2017; 242: 1657-1668. IF=2,413; MNiSN=30

This minireview refers to the current developments and prevailing challenges in generating skin constructs with vasculature, skin appendages such as hair follicles, pigmentation, immune response, innervation, and hypodermis. Furthermore, we discussed the promising advances that iPSC technology offers in order to generate *in vitro* models of genetic skin diseases, such as epidermolysis bullosa and psoriasis. We also discussed how future integration of the next generation human skin constructs onto microfluidic platforms along with other tissues could revolutionize the early stages of drug development by creating a reliable evaluation of patient-specific effects of pharmaceutical agents.

**Publication nr 8.** Abaci H.E., Coffman A., Doucet Y., Chen J., **Jacków J.**, Wang E., Guo Z. and A.M. Christiano. Synthetic developmental tissue engineering of human hair follicles Nat. Commun 2018; 13;9(1): 5301. IF=11,878; MNiSN=45

This important publication describes an approach for generation of human hair follicles (HFs) within human skin constructs (HSCs) by recapitulating the physiological 3D organization of cells in the HF microenvironment using 3D-printed molds. HSCs have the potential to provide an effective therapy for patients with significant skin injuries and to enable human-relevant drug screening for skin diseases. This paper demonstrated the incorporation of engineered skin appendages into HSCs such as hair follicles (HFs), which remained a major challenge for the field. We demonstrated that overexpression of Lef-1 in dermal papilla cells enhances the efficiency of HF differentiation in HSCs. Furthermore, vascularization of hair-bearing HSCs prior to engraftment allows for efficient human hair growth in immune-deficient mice. The ability to regenerate an entire HF from cultured human cells will have a transformative impact on the medical management of different types of alopecia, as well as chronic wounds, which represent major unmet medical needs.

**Publication nr 9.** Shin J.U., Abaci H.E., Herron L., Guo Z., Sallee B., Pappalardo A., **Jackow J.**, Wang E.Ch., Doucet Y. and Christiano A.M. Recapitulating T cell infiltration in 3D psoriatic skin models for patient-specific drug testing. Sci Rep. 2020; 10: 4123. IF= 4,011; MNiSN= 140

This paper demonstrates the utility of 3D skin constructs as an emerging tool for disease modeling and drug screening using a tissue engineering strategy to incorporate disease- and patient- specific immune components into HSCs in a human-relevant context. Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease with a complex pathophysiology attributed to various genetic and environmental factors. Although recent developments and success in the use of biologic therapies highlight that immune regulation plays a vital role in the development of psoriasis, there is also cumulative evidence demonstrated by different research groups that the interaction between epidermal factors and the immune system plays a synergistic role in the initiation and maintenance of disease.

Since clinical studies have practical and ethical limitations, conventional 2D culture and animal models have been widely utilized. Currently, 3D skin constructs generated from healthy keratinocytes and psoriasis patient-derived fibroblasts are commercially available from vendors.

Although previous models can recapitulate some aspects of psoriatic inflammation, the lack of a complex immunologic milieu and limited availability of patient-derived cells precludes their widespread utility. This study presented a new strategy to incorporate T cells into human 3D constructs, which enabled us to closely monitor and quantitate T cell responses. We found that the epidermis promotes the activation and infiltration of T cells into the skin and provides a directional cue for their migration towards the epidermis. In this paper, we established a psoriatic HSC (pHSC) by incorporating polarized Th1/Th17 cells or CCR6+CLA+ T cells derived from psoriasis patients into the constructs. These pHSCs showed a psoriatic epidermal phenotype and characteristic cytokine profiles, and responded to various classes of psoriasis drugs, highlighting the potential utility of our model as a drug screening platform. Taken together, we developed an advanced immunocompetent 3D skin model to investigate epidermal-T cell interactions and to understand the pathophysiology of inflammatory skin diseases in a human-relevant and patient-specific context.

**Lineage tracing** is present in the following paper:

**Publication nr 10.** Vorhagen S., **Jackow J.**, Mohor S.G., Tanghe G., Tanrikulu L., Skazik-Vogt C., Tellkamp F. Lineage tracing mediated by Cre-recombinase activity. *J Invest Dermatol.* 2015 Jan; 135 (1):e28. IF=6,915; MNiSN=50

This paper describes a development of a cell lineage tracing method which enabled the study of dynamic processes through visualization of cell lineages within an organism. Cell lineage describes a single stem or progenitor cell that gives rise to progeny that can adopt differential cell fates. This cellular fate is represented through differential cell properties or migration to specific regions within an organ or the organism. In this review paper, we discussed how the Cre-loxP system can circumvent the problem of label dilution through the induction of reporter gene expression in specific cell populations and how these reporter genes can be used to visualize cell lineages and analyze their behavior *in vivo*.

All of the above mentioned and other publications have been listed and certified in bibliometric analysis (**Appendix 5**).

**c) Awards**

1. JID-Section Editor's Stipendium for the article "Lineage tracing mediated by Cre-recombinase activity" by Vorhangen S., Jackow J., Mohor S.G., Tanghe G., Tanrikulu L., Skazik-Vogt C., Tellkamp F. (2015) J Invest Dermatol. 2015 Jan; 135 (1): e28.
2. 1<sup>st</sup> Place at Poster Session for most innovative project "Development of liposomes encapsulating CRISPR/Cas9 gene-editing RNPs for *in vivo* delivery to the skin of recessive dystrophic epidermolysis bullosa" at Innovations in Dermatological Sciences "Future of Dermatologicals & Cosmeceuticals" Rutgers University of New Jersey Oct 8-9, 2018.
3. Travel fellowship to European Society for Dermatology Research (ESDR) in Venice 2012.
4. Travel fellowship to Society of Investigate Dermatology (SID) in Atlanta, 2015.
5. ESDR/Japanese Society of Investigate Dermatology (JSID) Young Fellow Collegiality Award (40<sup>th</sup> JSID Annual Meeting in Okayama, 11-13 Dec, 2015). Visit of the Department of Dermatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan. Invitation supported by Prof. Hirishi Shimizu and Senior Associate Prof. Wataru Nishie.
6. SID/ESDR Young Fellow Collegiality Award to attend the 47<sup>th</sup> ESDR Annual Meeting in Salzburg, 27-30 September, 2017.
7. Travel fellowship to International Investigative Dermatology Meeting in Florida, 2018.

**d) Research support**

1. Dr. Ines Mandl Research Fellowship from Columbia University Medical Center awarded to Dr. Joanna Jackow in support of early career scientists conducting promising work in the field of connective tissue research. The project was entitled: "Generation of gene corrected iPSC therapy for dystrophic epidermolysis bullosa". My role in the grant was Principal Investigator. This was 2 years' grant with \$30,000 per year from July 2017-June2019. Completed.
2. Research grant from Epidermolysis Bullosa Research Partnership and the Epidermolysis Bullosa Medical Research Foundation awarded to Dr. Joanna Jackow for a project entitled: "Development of drug testing platform for recessive dystrophic epidermolysis bullosa squamous cell carcinoma using induced pluripotent cancer cells". My role in this

grant is a Principal Investigator. This grant is for 3 years with \$175,000 per year from September 2019- September 2022. <https://www.ebresearch.org/funded-projects.html>

#### **e) Lectures and invitations**

1. I was invited for lecture to the Department of Dermatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan, December 2016. Invitation was supported by Prof. Hirishi Shimizu and Senior Associate Prof. Wataru Nishie. I gave an oral presentation about Collagen XVII and VII research.
2. I was invited for lecture to the Department of Stem Cell Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, Japan (15 of Dec. 2016) from Prof. Katsuto Tamai. I gave an oral presentation about "Autologous gene-corrected fibroblasts therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa".
3. I was selected for ESDR Academy for future Leaders in Dermatology, 10-12 November 2016, Madrid, Spain.
4. I was invited for presenting my work at Center for Dermal Research (CDR) Seminar Series, Rutgers' The State University of New Jersey, February 15, 2017 from Prof. Bozena Michniak-Kohn. I gave an oral presentation about "Gene-corrected fibroblasts therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using a SIN COL7A1 retroviral vector".
5. I was invited speaker at the DEBRA International's EB2017- 5<sup>th</sup> World Conference of EB Research, held in Salzburg, Austria on September 24-26, 2017. My talk was on "Gene editing in iPSC for DEB".
6. I was invited to Department of Biology membrane biophysics, Technische Universität Darmstadt, Germany, October 5, 2017 from Prof. Gerhard Thiel and gave lecture about "From basic to translation science: Lessons from two collagens type VII and XVII in the skin".
7. I was a guest speaker at the EB Symposium of the 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kochi, Japan, December 15, 2017. My talk was about "Gene editing in iPSC for DEB".
8. I was invited to lecture at Department of Dermatology, Niigata Universität, Japan, December 21, 2017 from Prof. Satoru Shinkuma. My oral presentation was about "Towards an autologous stem cell based therapy for DEB".

9. I was invited by Prof. Jouni Uitto to the Jefferson Matrix Symposium Molecular Genetics of Epidermolysis Bullosa 30 Years of Research Excellence organized by the Department of Dermatology and Cutaneous Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA, May 13-15, 2018. I lectured in the session: Breakthroughs in EB research: Young Investigators Forum. My talk was about: "Novel therapeutic approaches for DEB aimed at causes and consequences: CRISPR-based genome editing in iPSCs and targeting the JAK-STAT pathway in EB-SCC tumors".
10. I was invited for being a Discussion Leader at the Gordon Research Seminar on Collagen held July 13 -14, 2019 at Colby-Sawyer College in New London, NH United States.
11. I was invited to Department of Medical Genetics of Institute of Mother and Child to give a seminar about "CRISPR-based genome editing in iPSC in Epidermolysis Bullosa treatment" September 3, 2019, Warsaw, Poland.
12. I was invited by Prof. Maria M. Sasiadek to Wroclaw Medical University, Department of Genetics for lecture about "Efficient CRISPR-based genome editing in iPSC for RDEB", December 13, 2019, Wroclaw, Poland.

#### f) Scientific presentations

1. **Jacków J.**, M. Titeux, S. Charbonnier and A. Hovnanian (2015). Autologous fibroblasts therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Oral presentation at the 74<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, May 6-9, 2015 Atlanta, USA. Gene Therapy & Clinical Therapeutic Minisymposium. Abstract publish in J Invest Dermatol, Supplement Vol 135, S 70.
2. **Jacków J.**, L. Anton-Louis Talà, M. Titeux and A. Hovnanian (2015). Gene editing of *COL7A1* genomic sequence to generate a new mouse model for RDEB using a two steps counter selection method based on HR. Poster presentation at the 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, JSID, December 11-13, 2015 Okayama. Abstract published in JSID 2015.
3. **Jacków J.**, L.Talà, M. Titeux, A.Izmiryan, J. Mejia and A. Hovnanian (2016). BAC clone modification strategy to generate a new mouse model for RDEB suitable for gene-editing. Poster presentation at the 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the of Society for Investigative Dermatology, May 11-14, 2016 Scottsdale, USA. Abstract publish in J Invest Dermatol, Supplement Vol 136, 5S. Late-Breaking Abstracts.

4. **Jacków J.**, Titeux M., Portier S., S. Charbonnier, C. Ganier, Gaucher S., Hovnanian A (2016) Gene-corrected fibroblast therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using a SIN *COL7A1* retroviral vector. Oral presentation as invited speaker from Imagine Institut, Paris, France to 10th annual graduate student Symposium at the MRC Laboratory of Molecular Biology, July 14-15, 2016 Cambridge, UK.
5. **Jacków J.**, M. Titeux, S. Portier, S. Charbonnier, C. Ganier, S. Gaucher, A. Hovnanian (2016) Gene-corrected fibroblast therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using a SIN *COL7A1* retroviral vector. Oral presentation at the New York City Skin Club, December 8, 2016 Rockefeller University.
6. **Jackow J.**, Z. Guo, H. Wobma, E.H. Abaci, Y.S. Doucet, G. Vunjak-Novakovic and A.M. Christiano (2017) iPSC derived keratinocytes differentiation from reprogrammed blood cells. Oral presentation at the debra of American EB Symposium during the 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Investigative Dermatology, Portland, OR.
7. **Jackow J.**, Z. Guo, H. Wobma, E.H. Abaci, Y.S. Doucet, J. Shin, C. Hansen, J.C. Salas-Alanis and A.M. Christiano (2018) Biallelic *COL7A1* editing in iPSCs via CRISPR/Cas9 for recessive dystrophic epidermolysis bullosa mutations. Come to see my poster short oral presentation at the International Investigative Dermatology Meeting, May 16-19, 2018 Orlando, Florida, USA. Abstract publish in J Invest Dermatol, Supplement Vol 138, Number 5S, Supplement 1, May 2018.
8. **Jackow J.**, R. Perez-Lorenzo, C. Hansen, D.M. Owens and A.M. Christiano (2018) The JAK1/2 inhibitor ruxolitinib induces cell cycle arrest and apoptosis through inhibiting STAT3 phosphorylation in squamous cell carcinoma. Poster presentation at the International Investigative Dermatology Meeting, May 16-19, 2018 Orlando, Florida, USA. Abstract publish in J Invest Dermatol, Supplement Vol 138, Number 5S, Supplement 1, May 2018.
9. Work-in-Progress Talks for Columbia Stem Cell Initiative, May 2018, Columbia University. My talk was entitled: "Novel therapeutic approach for dystrophic epidermolysis bullosa: CRISPR-based genome editing in iPSCs".
10. **J. Jacków**, Hansen C., Owens D., Perez-Lorenzo R., Hayashi R., DeLorenzo D., Guo Z. and Angela M. Christiano (2019) Ruxolitinib reverses accelerated tumor growth of RDEB-cSCCs in a xenograft mouse model. Oral presentation at the SID 2019 Annual Meeting in Chicago, May 9, 2019.
11. **J. Jacków**, Z. Guo, C. Hansen, H.E. Abaci, Y. Doucet, J. Shin, H. Ryota, D. DeLorenzo, K. Yudai, S. Shinkuma, J.C. Salas-Alanis, and A.M. Christiano. "Efficient genome editing using CRISPR/Cas9 RiboNucleoProtein (RNP) approach in iPS cells for recessive



- dystrophic epidermolysis bullosa”. Oral Presentation at the Gordon Research Seminar on Collagen held July 13-14, 2019 at Colby-Sawyer College in New London, NH United States.
12. **J. Jacków**, R. Hayashi, D. Owens, R. Perez-Lorenzo, C. Hansen, D. Delorenzo, Z. Guo and A. Christiano. “Targeting the JAK/STAT3 pathway with Ruxolitinib for RDEB-cSCC therapy”. Oral Presentation at the 49<sup>th</sup> ESDR Annual Meeting, Bordeaux, France 18-21 September 2019 at the Melanoma and Other Skin Cancer Session.
  13. **Jacków J.**, Guo Z., Hansen C., Abaci H.E., Doucet Y., Shin J., Ryota H., DeLorenzo D., Yudai K., Shinkuma S., Salas-Alanis J.C. and Christiano A. “CRISPR/Cas9-based genome editing in iPSCs for correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa”. Oral presentation at the EB2020, World conference in London, January 19-23, 2020.
  14. **Jacków J.**, Guo Z., Hansen C., Abaci H.E., Doucet Y., Shin J., Ryota H., DeLorenzo D., Yudai K., Shinkuma S., Salas-Alanis J.C. and Christiano A. “Efficient genome editing for correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa in iPS cells using CRISPR/Cas9 RiboNucleoProtein complexes”. Poster presentation at the Gene- and Cell-Based Therapies CRISPR, Stem Cells, and Beyond, March 2-4, 2020, San Francisco, CA, USA.
  15. **Jacków J.**, Rami A., Hayashi R., Hansen C., Guo Z., DeLorenzo D., Pappalardo A., L. Kim A., Perez-Lorenzo R., Owens D.M. and Christiano A.M. “Targeting the JAK/STAT3 pathway with Ruxolitinib for RDEB-cSCC therapy”. Oral presentation at the Transdisciplinary Cancer Interception: Leveraging Biology to Improve Prevention and Detection, March 9-11, 2020, Huntsman Cancer Institute at the University of Utah, Salt Lake City, UT, USA.

## 6. DIDACTIC ACHIEVEMENTS, COLLABORATIONS AND ORGANIZATIONAL ACTIVITY

### a) Didactic achievements

1. Supervision of Master project of Lorenzo Tala, a student from Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (EPFL) in the laboratory of Genetic Skin Disease of Prof. Alain Hovnanian at the Institute Imagine, Paris under the direction of Prof. Yann Barrandon from EPFL. Project title: “Investigation of inflammatory and wound healing signature in severe RDEB” (February 2016-June 2016).
2. Supervision of Columbia Summer Research Program for Teachers of Emily Hollyday in the laboratory of Prof. Angela Christiano, Columbia University, New York, NY. Project title:

“Optimizing selection step of mature derived keratinocytes using MACS Technology” (July-August 2018).

3. Supervision of collaboration project with Center for Dermal Research directed by Prof. Bozena Michniak-Kohn, Rutgers the State University of New Jersey. Project aimed at *in vivo* delivery of CRISPR/Cas9 for gene-editing (August 2018-July 2019).
4. Teaching of laboratory techniques to technicians, students and post docs who join our laboratory (August 2016-present).

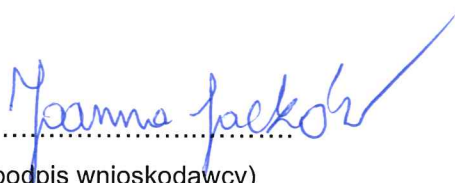
#### **b) Collaborations and organizational activities**

1. I participated in collaborative work between the laboratory of Genetic skin disease of Prof. Alain Hovnanian at the Institute Imagine, Paris, France and Prof. John McGrath of St John's Institute of Dermatology at King's College London, London, UK on project: Pre-clinical mouse study for the preparation of a clinical trial using intravenous injection of gene-modified autologous fibroblasts in adults with RDEB (January 2016-August 2016). My role was planning, conducting, analyzing the data and reporting the results between Paris and London groups.
2. I was key personal in EBRP iPS Cell Consortium, which was an established partnership that includes research teams led by Dr. Angela Christiano at Columbia University in New York, Dr. Anthony Oro from Stanford University, and Dr. Dennis Roop from the University of Colorado Anschutz Medical Campus, May 2016-May 2017. I was conducting research at Columbia University.
3. I am active key personal on funded project from California Institute for Regenerative Medicine (CIRM). Project aims at providing pilot efficacy and safety data for Autologous COL7A1-genetically corrected iPSC-cell derived keratinocytes sheet for Dystrophic Epidermolysis Bullosa (DEB), called DEBCT (May 2017-January 2021). I was involved in establishing new protocol for generating keratinocytes from iPSCs from patients with EB using methods which are at clinical standards. Over the past two years, I led the Columbia group in Prof. Angela Christiano lab to develop innovative toxicology assays that will allow the development of a safe first-in-human iPSC derived cell product for EB. These include highly sensitive qPCR assays to detect circulating human cells and a SCC assay that enables of detection human tumor in skin grafts. I also replicated the efficacy of the differentiation assays to allow scaling it to clinical production levels.

4. For my individual projects in Dr. Christiano group, I collaborated with Dr. Julio Cesar Salas-Alanis who provided us with skin biopsies from his EB clinic and Dr. Andrew South from Thomas Jefferson University who kindly provided me RDEB-SCC lines for my cancer project.
5. I am involved in multidisciplinary projects such as National Center for Advanced Translational Sciences (NCATS) from National Institute of Healthy (NIH) with Prof. Marc Ferrer and on Organs-on-a-Chip project in collaboration with Prof. Gordana Vunjak-Novakovic from Department of Biomedical Engineering at Columbia University in New York. These projects aim on developing new drug screening models for efficient drug development. In these collaborations, I learned and developed ideas on how to tackle unaddressed medical and biomedical challenges by connecting researchers from different fields. My role was planning, conducting, analyzing the data and reporting the results between the collaborative groups.

## 7. OTHERS SCIENTIFIC ACTIVITIES

1. Participated in EADV/ESDR Summer Research Course on Mouse Models in Skin Research, Cologne, Germany 2013.
2. Participating in FELASA (Federal of European Laboratory Animal Science Associations), category B course on "Laboratory Animal Science and Methods of Animal Experimentation". Passed a certification exam.
3. Member of European Society of Dermatology Research (ESDR) (2011-present).
4. Member of Society for Investigative Dermatology (SID) (2017-present).
5. Review for scientific papers for the following journals:
  - Journal of Dermatological Science
  - Journal of Molecular Medicine

  
.....  
(podpis wnioskodawcy)  
23/04/2020