

Balice, 18 październik 2019r.

dr hab. Jacek Jura prof. IZ PIB
Instytut Zootechniki
Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji
Ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

Recenzja

**osiągnięcia naukowego, dorobku naukowego oraz osiągnięć dydaktyczno-organizacyjnych
dr Anny Piliszek,
ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk rolniczych dyscyplinie zootechnika**

Materiały przygotowane przez Habilitantkę spełniają wymagania Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz odpowiednich rozporządzeń Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego i pozwalają dokonać recenzji przedstawionego wniosku.

I. Wykształcenie i przebieg pracy zawodowej Habilitantki

Dr Anna Piliszek ukończyła studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w 2001 roku, uzyskując stopień magistra na podstawie pracy magisterskiej zatytułowanej „Rola acetylacji histonów w regulacji transkrypcji w pierwszym cyklu komórkowym w oocytach myszy”. Promotorem pracy był Prof. dr hab. Andrzej K. Tarkowski.

Następnie, jak wynika z informacji zawartej w autoreferacie (nie jest podana data rozpoczęcia i zakończenia podjętych przez Habilitantkę studiów doktoranckich w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu), w 2006 roku, w tymże Instytucie, uzyskała stopień doktora nauk rolniczych w zakresie zootechnika na podstawie rozprawy pt.: „Możliwości powstawania chimeryzmu pomiędzy bruzdkującymi zarodkami myszy a komórkami płodowymi”. Promotorem pracy był Prof. dr hab. Jacek A. Modliński. Jednocześnie, od marca do września 2006 roku była zatrudniona jako biolog w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN. We wrześniu 2006 roku została zatrudniona w/w Instytucie na stanowisku adiunkta, gdzie pracuje nadal. Po doktoracie, w latach 2006-2010 przebywała na stażu w Sloan Kettering Institute, New York, USA.

II. Ocena osiągnięcia naukowego pod wspólnym tytułem: „Mechanizmy różnicowania epiblastu i endodermy pierwotnej w zarodkach myszy i królika”

Zgodnie z wymogami formalnymi wynikającymi z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz.1789), jako wyodrębnione, Habilitantka przedstawiła cykl 5 publikacji pod wspólnym tytułem: „Mechanizmy różnicowania epiblastu i endodermy pierwotnej w zarodkach myszy i królika”. W skład ocenianego osiągnięcia naukowego wchodzi opublikowane w języku angielskim: 3 oryginalne prace badawcze (w wykazie dot. osiągnięcia pozycje 1, 3, 4) oraz 2 prace przeglądowe (w wykazie dot. osiągnięcia pozycje 2 i 5) – z czego jedna (poz. 2 wykazu) stanowi rozdział w podręczniku.

1. Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., Hadjantonakis, A.-K., Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst (2008) **Development** 135: 3081-3091
2. Piliszek, A., Kwon, G.S. and Hadjantonakis, A.-K. (2011) Ex utero culture and live imaging of mouse embryos. W: Vertebrate Embryogenesis: Embryological, Cellular and Genetic Methods. **Methods in Molecular Biology**. 770:243-57, Ed. F. J. Pelegri. Wyd. Springer
3. Artus, J., Piliszek, A., Hadjantonakis, A.-K. (2011) The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. **Developmental Biology** 350(2): 393-404.
4. Piliszek, A., Madeja, Z., Plusa, B.# (2017) Suppression of Erk signalling abolishes primitive endoderm formation but does not promote pluripotency in rabbit embryo. **Development** 144(20): 3719-3730.
5. Piliszek, A., Madeja, Z.E. (2018) Pre-implantation development of domestic animals. W: Cell Fate in Mammalian Development. **Current Topics in Developmental Biology**. Vol. 128, str 267-294; Red. Hadjantonakis, A.-K., Plusa, B.

Oryginalne prace badawcze i prace przeglądowe wchodzące w skład osiągnięcia zostały opublikowane w latach 2008-2017 w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym o IF od 3,11 do 6,812.

Celem naukowym Habilitantki, prezentowanym w ocenianym osiągnięciu, było zbadanie mechanizmów związanych z różnicowaniem się pierwszych linii komórek w zarodkach myszy i królika we wczesnych etapach rozwoju, z których powstaje pluripotentny epiblast (EPI) oraz endoderma pierwotna (PrE) i trofektoderma (TE). Poznanie i opisanie procesu tworzenia pierwotnych linii komórkowych na wczesnych etapach rozwoju zarodków, ma kluczowe znaczenie w pracach związanych z wykorzystaniem pluripotentnych komórek zarodkowych ICM w badaniach nad uzyskiwaniem chimer, osobników transgenicznych, klonowaniu, jak również w hodowli *in vitro* zarodków do stadiów przed i po implantacyjnych. Jest również pomocne w wyjaśnieniu mechanizmów związanych z procesem implantacji. Prawidłowy rozwój i organizacja pierwszych linii komórkowych zarodka mają decydujący wpływ na rozwój zarodka w płód. Bardzo ważnym zagadnieniem związanym z wykorzystaniem komórek zarodkowych, jest określenie, na jakim etapie rozwoju komórki tracą totipotencję, a kiedy stają się pluripotentne lub zróżnicowane. Wyjaśnienie i zobrazowanie jak przebiega proces formowania pierwszych linii komórkowych w EPI, PrE oraz TE i precyzyjne określenie przy jakiej liczbie komórek procesy te mają miejsce, stanowi bardzo wartościowy wkład do badań nad wczesnym rozwojem zarodków ssaków.

W pierwszej pracy, opublikowanej w *Development*, składającej się na oceniane osiągnięcie (praca oryginalna poz.1) Habilitantka, stosując nowoczesne i wyrefinowane metody badawcze, potwierdziła, że obecność białko PDGFR α jest silnie powiązane z komórkami pierwotnej linii endodermy - PrE. Aby potwierdzić tą obserwację, wykorzystano linię transgeniczną myszy *Pdgfra H2B-GFP*. Komórki zarodkowe tej linii myszy emitują sygnał fluorescencji GFP tylko w przypadku wystąpienia w nich białka PDGFR α . Sygnał jest dodatkowo wzmocniony przez obecność histonu H2B, związanego z aktywną chromatyną jądrową. Przeprowadzone badania wykazały, że określony czas uzyskiwania zarodków po zapłodnieniu najczęściej nie odzwierciedla faktycznego etapu rozwoju morfologicznego pod względem ekspresji białka PDGFR α . Aby ułatwić i usystematyzować określenie konkretnego stadium rozwojowego zarodków, po raz pierwszy zastosowano system klasyfikacji stadiów

rozwojowych w oparciu o liczbę komórek. System ten jest obecnie powszechnie stosowany u myszy. Wprowadzenie do badań zarodków uzyskiwanych od myszy linii *Pdgfra H2B-GFP* pozwoliło na prześledzenia losów komórek linii PrE z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. Obrazowanie tą techniką wykazało, że przypadkowy, mozaikowy rozkład komórek PrE w obrębie epiblastu trwa bardzo krótko. Komórki PrE formują wyraźną warstwę w okolicy jamy blastocelu w zaledwie 15 minut. Tylko pojedyncze, GFP pozytywne komórki pozostają w głębszych warstwach ICM. W stadium blastocysty, powyżej 128 komórek, nie zaobserwowano w ICM komórek PrE, a sygnał fluorescencji warstwy PrE uległ nasileniu. Wcześniejsze badania wskazywały, że sortowanie komórek prekursorowych PrE i EPI powoduje zdeterminowanie warstw komórek PrE i EPI. Wyniki przedstawione w tej pracy jednoznacznie wskazują, że ruch komórek prekursorowych PrE odbywa się w dowolnym kierunku z przewagą w kierunku blastocelu. Wykazano też, że proces apoptozy komórek PrE zlokalizowanych wewnątrz ICM zachodzi powyżej stadium 64 komórek. Znaczącym osiągnięciem zawartym w tej pracy, jest ustalenie, że GATA4 jest specyficznym markerem dla linii komórek PrE oraz teza o rekrutacji komórek PrE z populacji komórek pozytywnych dla *Pdgfra* w stadium 64 komórkowym. Istotnym wynikiem tej pracy, jest również propozycja dotycząca modelu segregacji komórek zarodkowych myszy w linii PrE i EPI w obrębie ICM. Model zakłada losową ekspresję specyficznych dla danej linii komórek czynników transkrypcyjnych w stadium 16–32 komórkowym, które uruchamiają wzajemnie hamujące się szlaki regulacyjne, prowadzące do mozaikowej struktury komórek prekursorowych PrE i EPI w obrębie ICM po stadium 64-komórkowym. Sortowanie komórek odbywa się pasywnie, w wyniku ruchu komórek, adhezji i apoptozy. Podkreślić należy, że jest to pierwsza praca, w której przeanalizowano ekspresję kluczowych czynników transkrypcyjnych poprzedzających różnicowanie komórek prekursorowych PrE i EPI w ICM blastocysty mysiej. Pierwsza, w której zastosowano mikroskopię konfokalną do przyżyciowej rejestracji filmem poklatkowym zachowania się komórek PrE w blastocystyce.

Kolejna praca (praca przeglądowa, poz. 2) stanowi rozdział w podręczniku zredagowanym przez F.J. Pelegri - *Vertebrate Embryogenesis*, gdzie Habilitantka jest autorem korespondencyjnym. Pomimo braku IF, pozycja ta jest bardzo cennym osiągnięciem Habilitantki. Fakt współtworzenia podręcznika skupiającego specjalistów z różnych dziedzin, który obejmuje nie tylko metody embriologiczne, ale molekularne i genetyczne, świadczy o uznaniu Habilitantki jako osoby kompetentnej, o ugruntowanej znajomości najnowszych technik badawczych. W pracy zostały podane bardzo szczegółowe opisy metodyczne wykorzystania mikroskopii konfokalnej do przyżyciowego obrazowania i śledzenie *ex vivo* zachowania się komórek w zarodku. Wskazano na przydatność do badań z zakresu embriogenezy genetycznie zmodyfikowanych myszy, których komórki czy tkanki mogą być wyposażone w geny kodujące ekspresję białek fluorescencyjnych, ukierunkowanych precyzyjnie praktycznie na dowolną organellę komórkową. Pozwala to nie tylko na precyzyjne prześledzenie i zobrazowanie procesów związanych z dynamicznym zachowaniem się komórek w zarodku ssaków ale również określenie roli jaką pełnią. W pracy usystematyzowano wiedzę dotyczącą pozyskiwania materiału do obserwacji tj., zarodków w określonym stadium rozwojowym. Zawarto szczegółowe opisy i postępowanie związane z hodowlą *in vitro* zarodków, jak również sposób przygotowania materiału do obserwacji i jej przeprowadzenie. Rozdział w podręczniku, opracowany przez Habilitantkę, stanowi kompendium wiedzy na temat pozaustrojowej hodowli zarodków myszy i przyżyciowego obrazowania komórek w przed- i po-implantacyjnych zarodkach myszy. Stanowi źródło praktycznej wiedzy dla badaczy, którzy chcą zastosować tą metodę. Jest kontynuacją i wypadkową zainteresowań badawczych składających się na oceniane osiągnięcie.

Praca oryginalna opublikowana w *Developmental Biology* (poz. 3 osiągnięcia), w której Habilitantka figuruje na drugim miejscu i jest oznaczona jako pierwszy autor, stanowi kontynuację badań dotyczącą mechanizmów różnicowania PrE w blastocystie mysiej. Praca ta jest rozbudowana o analizę profilu ekspresji i rolę czynników transkrypcyjnych SOX17 i SOX7. Grupa czynników transkrypcyjnych SOX odgrywa decydującą rolę w procesie różnicowania komórek w trakcie rozwoju embrionalnego. Czynniki SOX17 jest uznawany za kluczowy czynnik regulujący różnicowanie komórek w kierunku endodermy. W obrębie kręgowców jest to czynnik konserwatywny. Inaktywacja SOX17 u myszy prowadzi do nieprawidłowości w rozwoju endodermy właściwej. Badania Habilitantki wykazały, że białko SOX17 pojawia się po raz pierwszy w jądrach komórek węzła zarodkowego blastocysty mysiej w stadium 32-64 komórek. Po tym etapie następuje proces sortowania. Czynniki transkrypcyjny SOX17 został wykryty w jądrach komórek potencjalnie predystynowanych jako komórki PrE. Natomiast, czynniki SOX7, specyficzny dla komórek PrE, pojawiający się w stadium blastocysty u myszy powyżej 64 komórek – może być uznany jako specyficzny marker wyróżnianych komórek PrE. Analiza posortowanych komórek PrE na powierzchni ICM, wykazała obecność unikalnej konfiguracji czynników transkrypcyjnych, odmiennej niż w komórkach nieposortowanych, zlokalizowanych w obrębie węzła zarodkowego. Wyniki te wspierają wcześniejszą hipotezę przedstawioną przez Habilitantkę w pracy opublikowanej w 2008 roku w *Development* (poz. 1 w osiągnięciu), o sekwencyjnej aktywacji czynników transkrypcyjnych podczas formowania linii komórek PrE. Z kolei, wykazanie, że obecność czynnika SOX7 w komórkach blastocyst uzyskanych od szczepu dzikiego myszy i od mutantów *Sox17*, jest na podobnym poziomie, pozwoliło na postawienie tezy, iż brak jednego z tych czynników jest kompensowany przez drugi czynnik. Co ważne, Habilitantka wykazała, że różnicowanie i sortowanie w kierunku linii PrE i EPI w zarodkach mysich nie jest zależne od czynnika SOX17. Praca zawiera bardzo dobrą i bogatą dokumentację fotograficzną.

Specyfika rozrodu myszy, głównie jej plenność i płodność, krótki cykl rozrodczy, małe rozmiary ciała, dostępność różnych linii mutantów i linii transgenicznych powoduje, że gatunek ten stał się zwierzęciem modelowym w badaniach z zakresu embriologii doświadczalnej. Wiedza na temat rozwoju zarodkowego ssaków opiera się głównie o obserwacje uzyskane w oparciu o ten model. Z wielu publikacji wynika jednak, że model myszy nie zawsze jest adekwatny, zwłaszcza w próbach transpozycji badań modelowych dotyczących np. wykorzystania totipotencjalnych czy pluripotencjalnych komórek zarodkowych w badaniach translacyjnych. Podobnie jest w badaniach biomedycznych, gdzie mysz, ze względu na dużą odmienność w przebiegu procesów fizjologicznych, znacznie mniejsze rozmiary organów czy odmienność reakcji na czynniki chorobotwórcze, nie jest odpowiednim modelem. Stąd, coraz częściej, w badaniach biomedycznych badania modelowe prowadzi się w oparciu o zwierzęta hodowlane: królika, owcę, kozę czy świnię. Rozwój zarodkowy wspomnianych gatunków jest znacznie gorzej poznany niż u myszy. Wypadkową tego są między innymi, problemy z uzyskiwaniem, hodowlą i wykorzystaniem zarodkowych komórek macierzystych.

Praca oryginalna opublikowana przez Habilitantkę w *Development* w 2017 roku (poz. 4 w osiągnięciu), której jest autorem korespondencyjnym, powstała w rezultacie badań wykonanych w ramach kierowanego przez nią grantu, finansowanego w ramach konkursu NCN SONATA (nr 2011/03/D/NZ3/03992). Badania przedstawione w tej pracy zostały wykonane na zarodkach królika. Kontynuując swoje zainteresowania badawcze, związane z przebiegiem formowania linii PrE i EPI w zarodkach mysich, Habilitantka przedstawiła jak proces ten przebiega w zarodku króliczym. Ponieważ liczba komórek w moruli czy blastocystie myszy i królika jest różna, w celu adekwatnego porównania i odzwierciedlenia podobieństw i różnic w procesie różnicowania linii PrE i EPI u obu gatunków, zastosowano system określający

wiek zarodka w oparciu o liczbę komórek. Ponadto, aby wynik przeprowadzonych analiz był bardziej wiarygodny, zarodki królika uzyskiwano *ex vivo*. Takie podejście, jest znacznie trudniejsze, natomiast znacząco podnosi wartość pracy. Autorka wykazała, że zarodki królicze i mysie w stadium moruli, stadia IV i V, wykazują podobny model ekspresji czynników NANOG i GATA6 we wszystkich komórkach. Natomiast VII i VIII stadium rozwoju zarodka królika wykazują różnice w przebiegu ekspresji czynników NANOG i GATA6, gdzie nie zaobserwowano wzajemnej inhibicji tych czynników w przeciwieństwie do wzajemnej inhibicji tych czynników w zarodkach myszy. W zarodkach myszy inhibicja NANOG/GATA6 jest kluczowym mechanizmem różnicowania się komórek w linii PrE i EPI. Mechanizm inhibicji czynnika NANOG w zarodkach królika, został zaobserwowany dopiero w stadium IX, czemu towarzyszył początek segregacji komórek w linii PrE i EPI. Badania pokazały, że mozaikowy rozkład komórek EPI i PrE u królika jest krótkotrwały, a linia wysortowanych komórek PrE tworzy pierścień dookoła EPI. Aby uściślić przebieg procesu różnicowania PrE i EPI w zarodkach królika zbadano ekspresje czynników z grupy SOX – SOX17 i SOX2. Habilitantka wykazała, że czynniki te w blastocyście królika, podobnie jak w blastocyście mysiej są markerami tych samych linii komórkowych – SOX17 linii PrE a SOX 2 linii EPI. Z kolei, rozszerzenie badań o aktywność ścieżki sygnałowej FGF/ERK, pozwoliło na stwierdzenie, że jej aktywność jest niezbędna do wyróżnicowania linii PrE w zarodkach królika. Rezultaty badań wykazały odmienną niż u myszy, drogę rekrutacji komórek EPI u królika, która nie odbywa się kosztem komórek PrE. Stwierdzono również, że odsetek komórek niewyróżnicowanych w PrE i EPI w blastocyście królika, jest znaczny, co pokazuje różnice w przebiegu wczesnych stadiów rozwojowych tych gatunków. Badania Habilitantki wykazały, że proces różnicowania komórek zarodkowych królika przebiega podobnie jak w zarodkach ludzkich. Stanowi to przesłankę do wykorzystania modelu króliczego w badaniach modelowych nad rozwojem zarodków ludzkich oraz innych ssaków.

Ostatnia z ocenianych prac (pozycja 5 w osiągnięciu) została opublikowana w *Current Topics in Developmental Biology* w 2017 roku. Jest to praca przeglądowa, której Habilitantka jest autorem korespondencyjnym. Praca ta jest podsumowaniem obszernej wiedzy jaką Habilitantka zdobyła prowadząc badania nad wczesnym rozwojem zarodków mysich i króliczych. Jest także dowodem rozległej i ugruntowanej wiedzy Habilitantki na temat embriogenezy innych gatunków zwierząt – zwłaszcza zwierząt gospodarskich. Zawarte w tym osiągnięciu informacje nie ograniczają się jedynie do przedstawienia różnic w przebiegu rozwoju przedimplantacyjnego zarodków myszy w odniesieniu do zarodków zwierząt gospodarskich, ale jest podbudowana poznanymi mechanizmami molekularnymi, które odpowiadają za wczesny rozwój zarodkowy. Praca ta jest dobrym przykładem prawidłowego rozwoju naukowego Habilitantki, która nie ogranicza się jedynie do podążania ścieżką zainteresowań badawczych, publikując wyniki prac eksperymentalnych, ale udostępnia nabyte doświadczenie i wiedzę innym zainteresowanym tą tematyką w formie artykułów przeglądowych. Innym wartościowym elementem tego osiągnięcia jest to, że ma ono wymiar praktyczny. Kompendium wiedzy zawarte w tej pracy przyczynia się do lepszego zrozumienia mechanizmów i przebiegu różnicowania pierwszych linii komórkowych zarodka. Wiedza w nim zawarta, jest pomocna w opracowywaniu bardziej skutecznych metod w rozrodzie wspomaganym stosowanym w hodowli zwierząt hodowlanych, takich jak zapłodnienie pozaustrojowe, ICSI czy klonowanie. Jak również w pracach związanych z transgenezą - uzyskiwanie zwierząt modelowych na potrzeby badań biomedycznych.

Oceniane prace są współautorskie. W pracach z pozycji 1 i 3, Habilitantka występuje na drugiej pozycji w gronie współautorów, jednak adnotacje wydawnicze informują, że jest ona równoprawnym pierwszym autorem. W pozostałych pracach (pozycje osiągnięcia 2, 4, 5) jest

autorem korespondencyjnym. W dostarczonej dokumentacji nie ma określonego udziału procentowego Habilitantki w powstaniu prac z osiągnięcia, niemniej jednak, oświadczenia współautorów oraz Habilitantki, pozwalają jednoznacznie stwierdzić, iż jej udział w ocenianych pracach był znaczący i polegał: na stworzeniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, ocenie wyników, opracowaniu dokumentacji fotograficznej, udziale w redagowaniu i pisaniu prac oraz w odpowiedziach na uwagi recenzentów. Zważywszy złożoność i trudność problematyki badawczej w ocenianym osiągnięciu, wkład Habilitantki oceniam bardzo wysoko. Łączny współczynnik oddziaływania (IF) prac wchodzących w oceniane osiągnięcie wynosi 19,404 (gdzie poz. 2 to wydanie książkowe bez IF, niemniej jednak oceniam je jako bardzo wartościowe), a ocena parametryczna według MNIŚW wynosi 155 punktów.

Reasumując, Dr Anna Piliszek przedstawiła cykl bardzo wartościowych publikacji na temat mechanizmów różnicowania epiblastu i endodermy pierwotnej w zarodkach myszy i królika, które zostały zobrazowane bardzo dobrą dokumentacją fotograficzną, przejrzystymi schematami i poparte dobrze dobranymi badaniami molekularnymi. Badania Habilitantki przyczyniły się do upowszechnienia i wprowadzenia do praktyki badawczej systemu klasyfikacji wczesnych stadiów komórkowych u myszy i królika w oparciu o liczbę komórek, co bardzo ułatwia badania porównawcze pomiędzy gatunkami. Uzyskane przez dr Piliszek wyniki wykazały odmienny niż do tej pory przyjmowano mechanizm różnicowania PrE i EPI w zarodkach myszy. Znaczącym osiągnięciem Habilitantki jest wykazanie różnic i podobieństw w procesie rekrutacji komórek zarodkowych w linii PrE i EPI w blastocystach mysich i króliczych. Habilitantka określiła jednoznacznie, które czynniki mają decydujący wpływ na różnicowanie pierwotnych linii komórkowych u wspomnianych gatunków. W oparciu o powyższe stwierdzam, że Pani dr Piliszek jest ekspertem w swojej dziedzinie.

III. Ocena pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Pozostały dorobek Habilitantki, której indeks Hirscha = 10, to 9 prac oryginalnych i 5 prac przeglądowych opublikowanych w czasopismach indeksowanych, których IF oscylował od 0,285 do 12,639. Na dorobek, spoza osiągnięcia składają się jeszcze 4 prace oryginalne i 2 przeglądowe nie indeksowane. Sumaryczny IF dla dorobku spoza osiągnięcia naukowego wynosi 48,541, a liczba punktów MNIŚW = 446. Procentowy udział dr Piliszek w powstaniu tych prac wynosi od 5-100%.

Charakteryzując osiągnięcia naukowo-badawcze dr Piliszek można wyróżnić dwa nurty: badawczy dotyczący wczesnego rozwoju zarodkowego, który jest dominujący oraz praktyczny, w którym doświadczenie zdobyte w zakresie embriologii eksperymentalnej wykorzystuje w badaniach z zakresu hodowli pozaustrojowej zarodków zwierząt hodowlanych czy klonowaniu. Spora część dorobku poświęcona jest badaniom nad plastycznością komórek wężła zarodkowego i wykorzystaniem ich do uzyskiwania chimer czy w procesie klonowania. Wynikiem tych badań było wykazanie totipotencji jąder komórkowych zarodków 16-komórkowych wprowadzanych do selektywnie enukleowanych zygot mysich. W dorobku dr Piliszek mocno akcentuje się również aspekt prac z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz transgenicznym linii myszy w badaniach szlaku sygnałowego Wnt/ β -kateniny, ważnego, konserwatywnego czynnika w embriogenezie. Jest on wyznacznikiem różnic w rozwoju wczesnych stadiów zarodkowych ssaków. W kręgu zainteresowań Habilitantki, są również badania związane z dalszymi etapami rozwoju zarodkowego, wykraczającymi poza mechanizmy formowania pierwotnych linii komórkowych. Badania te dotyczyły roli BMP4 w

powstawaniu endodermy proksymalnej czy wykazaniu, że indukcja i migracja komórek endodermy trzewnej przedniej wymaga aktywności genu *eomesoderminy*.

Mogę zatem stwierdzić, że pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze dr Anny Piliszek nawiązują i wpisują się w nurt osiągnięcia naukowego.

Podkreślić należy, że Habilitantka realizuje swoje badania naukowe w ramach środków pozyskiwanych z grantów - 7 grantów. W latach 2005-2010 była głównym wykonawcą lub wykonawcą w 5 projektach. Grant NYStem-IDEA, 2008-2010, zrealizowała po doktoracie podczas pobytu na stażu w USA. W grantcie – Grant NCN SONATA 2011/03/D/NZ3/03992 (2012-2018)- była kierownikiem. Obecnie jest kierownikiem realizowanego do 2023 roku grantu - Grant SONATA BIS 2017/26/E/NZ3/01205.

Jest laureatką nagrody zespołowej - I nagroda Wydziału Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAN (2009r.) za pracę pt. "Nowe perspektywy klonowania ssaków: zastosowania alternatywnych biorców jader komórkowych i chimer zarodkowo-somatycznych".

Dr Piliszek brała również aktywny udział w konferencjach naukowych, prezentując rezultaty prac eksperymentalnych – 5 referatów, z czego 4 prezentowane na konferencjach w USA, Wielkiej Brytanii (2) i Francji, a jeden na międzynarodowej konferencji krajowej.

Dorobek dr Anny Piliszek jest sukcesywnie powiększany. Prace publikowane są w dobrych i bardzo dobrych czasopismach naukowych. Jest to dorobek tematycznie jednorodny, ważny pod względem aplikacyjnym. Habilitantka konsekwentnie rozwija swoje zainteresowania naukowe poprzez współpracę z renomowanymi zespołami naukowymi zajmującymi się embriogenezą.

IV. Ocena osiągnięć dydaktyczno-organizacyjnych i popularyzatorskich

W latach 2013-2018, dr Anna Piliszek była promotorem pomocniczym w 4 przewodach doktorskich prowadzonych w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu. Habilitantka zaprezentowała 11 doniesień naukowych, których jest pierwszym autorem, w większości przedstawionych na konferencjach zagranicznych oraz 24 doniesienia, w których jest współautorem. Była członkiem komitetu organizacyjnego i przewodniczącą sesji na międzynarodowej konferencji w Brnie. Od 2018 roku jest członkiem założycielem oraz członkiem zarządu Towarzystwa Biologii Rozrodu Grupy Wyszehradzkiej. Pełni funkcję sekretarza oddziału TBR w Warszawie. Od 2011 roku jest członkiem British Society for Developmental Biology. W latach 2001-2010 była członkiem Society for Developmental Biology. Habilitantka wykonała 10 recenzji dla renomowanych czasopism naukowych – *PlosOne*, *Stem Cells*, *BMC Developmental Biology* i *Animal Science Papers and Reports*. W trakcie swojej kariery naukowej odbyła dwa staże w wiodących ośrodkach naukowych zajmujących się problematyką embriogenezy – 4 letni staż po doktoracie w Sloan Kettering Institute, NY, USA oraz dwumiesięczny w University of Manchester, Wielka Brytania. Wykonała jedną recenzję dla NCN – projekt wdrożeniowy.

Ważnym elementem działalności dydaktycznej dr Anny Piliszek jest udział w organizacji i prowadzenie wykładów w ramach warsztatów organizowanych przez IGHZ PAN oraz licznych wykładów dla studentów i doktorantów UJ, SGGW, UR w Krakowie czy UP w Lublinie.

Działalność popularyzatorska, to wykłady popularnonaukowe prowadzone w ramach TBR oraz godne podkreślenia, bardzo liczne wykłady, prezentacje, ćwiczenia, zajęcia terenowe organizowane i prowadzone przez Habilitantkę dla młodzieży gimnazjalnej i licealnej.

Habilitantka była również aktywnie zaangażowana w opiekę nad studentami odbywającymi praktyki oraz staże - 9 osób w latach 2011-2017.

Dr Piliszek jest Kierownikiem Laboratorium Mikroskopii Fluorescencyjnej i Konfokalnej w IGHZ PAN oraz drugą kadencję zasiada z wyboru w Radzie Naukowej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt. Jest także Członkiem Zespołu Doradczego ds. Dobrostanu Zwierząt IGHZ PAN.

Podsumowując, osiągnięcia dydaktyczno-naukowe i popularyzatorskie dr Anny Piliszek, są bardzo znaczące. Habilitantka aktywnie uczestniczy w życiu naukowym oraz aktywnie działa na rzecz środowiska naukowego. Jest osobą ambitną, świetnie radzącą sobie w pracy zespołowej. Na szczególne podkreślenie zasługuje jej udział jako promotora pomocniczego w 4 przewodach doktorskich oraz działalność na rzecz młodzieży szkolnej i studentów, ponieważ wymaga ona zaangażowania wybiegającego poza obowiązki związane z pracą naukową.

V. Wnioski końcowe

Podsumowując, osiągnięcia naukowe, pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze, działalność dydaktyczno-organizacyjną i popularyzatorską dr Anny Piliszek – oceniam bardzo wysoko. Osiągnięcia dr Anny Piliszek oraz rzetelnie i klarownie przygotowana do oceny dokumentacja, upoważniają mnie do stwierdzenia, że Kandydatka w pełni spełnia kryteria do nadania stopnia naukowego doktora habilitowanego, określone w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311) w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie zootechnika.

Osiągnięcia dr Anny Piliszek zasługują na wyróżnienie, w związku z tym wnioskuję o przyznanie Habilitantce odpowiedniej nagrody.



dr hab. Jacek Jura, prof. IZ PIB