

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko:

Anna Piliszek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe– z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2006 – doktor nauk rolniczych w zakresie zootechniki. Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu. Tytuł rozprawy „Możliwości powstawania chimeryzmu pomiędzy bruzdkującymi zarodkami myszy a komórkami płodowymi”. Promotor: prof. dr hab. Jacek A. Modliński.

2001 – magister, kierunek biologia w zakresie biologii ogólnej. Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski. Tytuł rozprawy “Rola acetylacji histonów w regulacji transkrypcji w pierwszym cyklu komórkowym w oocytach mysich” Promotor: Prof. A. K. Tarkowski.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

01.03.2006 – 31.08.2006 biolog, Zakład Embriologii Doświadczalnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk

Od 01.09.2006 do teraz adiunkt, Zakład Embriologii Doświadczalnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk (w tym na bezpłatnym urlopie naukowym w latach 2006 – 2010).

2006-2010 Postdoctoral research fellow, Sloan Kettering Institute, Nowy Jork, USA

4. Wskazanie osiągnięcia¹ wynikającego 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)

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Mechanizmy różnicowania epiblastu i endodermy pierwotnej w zarodkach myszy i królika

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

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

*pierwszy autor /równy wkład współautorów

Pkt MNiSzW=40, IF= 6,812, cytowania = 269

2. **Piliszek, A.#**, Kwon, G.S. and Hadjantonakis, A.-K. (2011) Ex utero culture and live imaging of mouse embryos. W: Vertebrate Embryogenesis. Methods in Molecular Biology Embryological, Cellular and Genetic Methods. Methods in Molecular Biology. 770:243-57, Red. F. J. Pelegri.

autor korespondencyjny

Springer (wydawnictwo książkowe, brak IF), cytowania = 13

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.

*pierwszy autor /równy wkład współautorów

Pkt MNiSzW = 35, IF= 4,069, cytowania= 106

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.

autor korespondencyjny

Pkt MNiSzW = 40, IF= 5,413, cytowania = 10

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. # autor korespondencyjny

Pkt MNiSzW = 40, IF=3.11 (za rok 2017, aktualny nie jest dostępny), cytowania: 0

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wyjaśnienie: w tekście oprócz nazewnictwa polskiego pojawia się także, w nawiasach, nazewnictwo angielskie. Wynika to z faktu, że większość współczesnego piśmiennictwa dotyczącego przedstawionej tematyki, jest publikowana w języku angielskim. Starając się zachować poprawność językową w języku ojczystym chciałam jednocześnie ułatwić lekturę czytelnikowi niewątpliwie lepiej obeznanemu z nomenklaturą angielską. W związku z tym również skróty zastosowane przeze mnie pochodzą z języka angielskiego, gdyż są one powszechnie stosowane w świecie naukowym.

WPROWADZENIE

Wczesne etapy rozwoju ssaków łożyskowych to czas **różnicowania pierwszych linii komórkowych** - pluripotentnego **epiblastu** (EPI), oraz pozazarodkowych linii **endodermy pierwotnej** (ang. **Primitive Endoderm**, PrE) i **trofektodermy** (TE). Prawidłowe różnicowanie i segregacja tych linii jest warunkiem koniecznym do dalszego rozwoju, a błędy w tym procesie mogą skutkować zahamowaniem rozwoju i obumarciem zarodka już na etapie implantacji. Komórki epiblastu dają początek wszystkim tkankom płodu, a także - w hodowli- zarodkowym komórkom macierzystym. Linie pozazarodkowe - odpowiedzialna za implantację trofektoderma oraz współtworząca błony płodowe endoderma pierwotna - nie biorą udziału w tworzeniu ciała przyszłego organizmu, jednak ponieważ rozwój łożyskowców odbywa się wewnątrz organizmu matki, ich prawidłowe różnicowanie jest konieczne do podtrzymania rozwoju. Endoderma pierwotna jest również źródłem sygnałów kierujących różnicowaniem epiblastu we wczesnych stadiach poimplantacyjnych.

Rozwój osobniczy ssaków rozpoczyna się w momencie zapłodnienia, kiedy to powstaje pierwsza komórka organizmu – zygota. Komórka ta jest w pełni totipotenna, to znaczy zdolna do utworzenia wszystkich linii komórkowych i tkanek. W trakcie dalszego rozwoju zygota dzieli się dając początek kolejnym komórkom organizmu, które z czasem tracą totipotencję i ulegają różnicowaniu, zyskując właściwości specyficzne dla poszczególnych linii i tkanek.

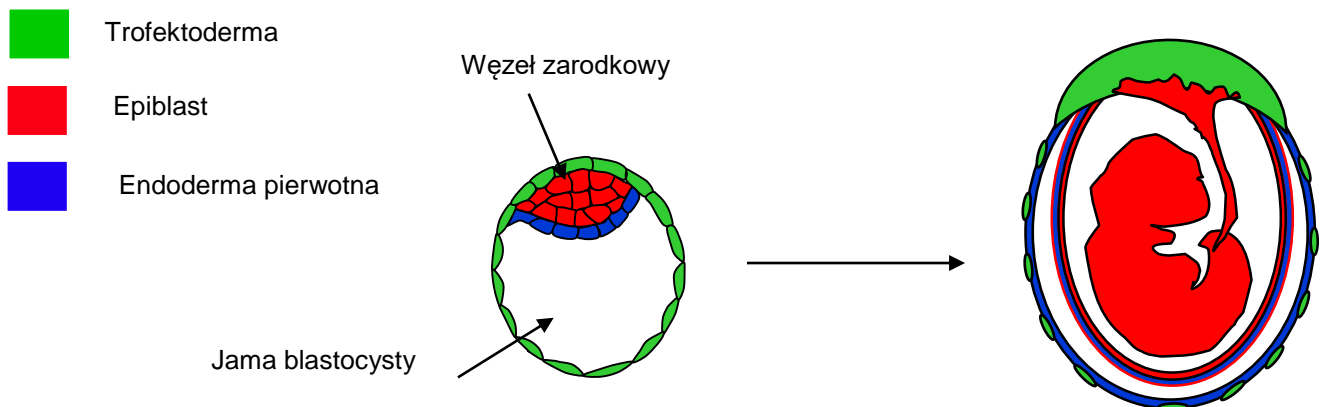


Fig. 1 Schematyczne przedstawienie blastocysty mysiej około 4.0 dnia rozwoju, wraz z przedstawieniem zależności linii zarodkowych i późniejszych tkanek płodu

Początkowo sądzono, że różnicowanie endodermy pierwotnej i epiblastu jest bezpośrednio zależne od umiejscowienia komórek w węźle zarodkowym. Rzeczywiście, na etapie implantacji zarodka mysiego (4.0-4.5 days post coitum, dpc) komórki PrE ułożone są w jedną warstwę ‘przylegającą’ do jamy blastocysty, natomiast komórki EPI tworzą agregat otoczony PrE z jednej i TE z drugiej strony (figura 1). Co więcej, na tym etapie (4.5 dpc) przeniesienie komórek pochodzących z tych dwóch warstw w inną okolicę zarodka pozwoliło dowiedzieć, że są to linie już zróżnicowane (Gardner i Rossant, 1979). Dodatkowym funkcjonalnym potwierdzeniem tej teorii był dla badaczy fakt, że kule zarodkowe (ang. embryoid bodies) powstałe wskutek agregacji zarodkowych komórek macierzystych (ang. embryonic stem cells, ESCs), spontanicznie tworzyły strukturę w której zewnętrzna warstwa różnicowała w kierunku pochodnych endodermy pierwotnej (Becker i wsp., 1992; Martin and Evans, 1975; Murray and Edgar, 2001).

Badania prowadzone przez grupę badawczą dr Janet Rossant wykazały także, że komórki prekursorowe linii EPI i PrE znajdują się w węźle zarodkowym myszy już na stadium średniej blastocysty, około 3.5 dnia rozwoju. Stwierdzono, że nie są one ułożone w dwie wyraźne warstwy, ale tworzą pozornie przypadkową mozaikę w której ekspresja czynników transkrypcyjnych *Nanog* (EPI) i *Gata6* (PrE) wzajemnie się wyklucza- takie ułożenie nazwano „sól-i-pieprz” (ang. salt-and-pepper) (Chazaud i wsp., 2006; Rossant i wsp., 2003). (figura 2). Fakt zróżnicowania komórek już na tym etapie został potwierdzony poprzez wyznakovanie pojedynczych komórek węzła zarodkowego (ang. Inner Cell Mass, ICM), a następnie analizę ich dalszych losów. Ponieważ każda komórka brała udział w tworzeniu linii EPI lub PrE, a nigdy obu linii, stwierdzono, że komórki te

już na etapie średniej blastocysty (3.5 dpc) są zróżnicowane, i dopiero później ulegają segregacji w dwie warstwy (Chazaud i wsp., 2006).

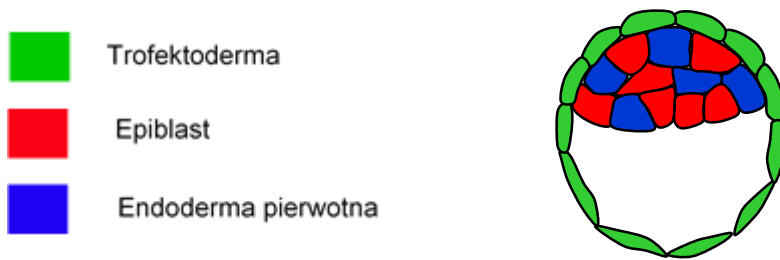


Fig. 2 Schematyczne przedstawienie blastocysty mysiej około 3.5 dnia rozwoju, w stadium sól-i-pieprz

Prace wchodzące w skład mojego osiągnięcia naukowego przedstawiają szczegółową analizę wybranych mechanizmów różnicowania linii epiblastu i endodermy pierwotnej w zarodkach ssaków- myszy i królika. Tematyką tą zainteresowałam się podczas odbywania stażu podoktorskiego w laboratorium dr Anny-Kateriny Hadjantonakis w Sloan Kettering Institute w Nowym Jorku. Przedstawione prace są w części wynikiem badań prowadzonych w czasie tego stażu. W ostatnich latach kontynuowałam badania nad tą tematyką, rozszerzając ją o badania porównawcze z użyciem innego modelowego gatunku ssaka, tj. królika

1. Płusa, B.*, Piliszek, A.*, Frankenberg, S.*, Artus, J., Hadjantonakis, A-K. (2008) Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst *Development* 135: 3081-3091, Pkt MNiSzW=40, IF= 6,812, cytowania = 269

Aby prześledzić przebieg różnicowania EPI i PrE, w pracy Płusa i wsp, 2018, zbadaliśmy zmiany w ekspresji czynników transkrypcyjnych związanych z tymi liniami w zarodkach przedimplantacyjnych myszy, na poziomie białka, a także zastosowaliśmy technikę obrazowania przyżyciowego w zarodkach mysich hodowanych *in vitro*.

Identyfikacja PDGFRA jako markera linii PrE. Analiza mikromacierzowa przedimplantacyjnych zarodków mysich (Kurimoto i wsp., 2006) wykazała, że gen kodujący **receptor alfa płytkopochodnego czynnika wzrostu** (platelet-derived growth factor receptor alpha, *Pdgfra*) wyróżniał się wśród genów związanych z PrE; jego ekspresja została również stwierdzona w komórkach XEN (ang. extraembryonic endoderm, endoderma pozazarodkowa; komórki macierzyste endodermy pierwotnej) (Kunath i wsp., 2005). Powiązanie białka PDGFRA z linią endodermy pierwotnej potwierdziliśmy za pomocą jednoczesnego barwienia immunofluorescencyjnego wykrywające białko GATA4 i białko PDGFRA - oba białka

wykrywaliśmy w tych samych komórkach w zarodku myszy na stadium późnej blastocysty (4.0 dpc).

W dalszym etapie badań wykorzystaliśmy istniejącą linię myszy *Pdgfra H2B-GFP* (Hamilton i wsp., 2003), w której sekwencja genu kodującego białko zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein, GFP) została połączona z sekwencją kodującą ludzki histon H2B. Sekwencja taka została następnie wprowadzona w locus *Pdgfra*. Dzięki temu wszystkie komórki, w których gen *Pdgfra* był ekspresjonowany, były widoczne dzięki ekspresji białka GFP. Fuzja GFP z białkiem histonowym H2B powodowała dodatkowo lokalizację GFP w aktywnej chromatynie/jądrach komórkowych (dzięki H2B), co dodatkowo pozwoliło na lepszą rozdzielczość sygnału i skuteczne śledzenie zachowania komórek.

Aby potwierdzić użyteczność tej linii jako linii markerowej, przeprowadziliśmy szczegółową analizę ekspresji reportera GFP w zarodkach przed- i okołoinplantacyjnych. Stwierdziliśmy, że w zarodkach *PdgfraH2B-GFP* białko GFP na stadium 4.0-4.5 dpc zlokalizowane jest w tych samych komórkach co natywne białko PDGF α , a jego ekspresja pokrywa się również z lokalizacją innych białek typowych dla endodermy pierwotnej (GATA4, GATA6, DAB2). Taką samą zależność zaobserwowaliśmy również w rozrostach powstałych z hodowli późnych blastocyst przez 72 godziny *in vitro*.

Zmiany w ekspresji reportera *Pdgfra*H2B-GFP są związane z etapem rozwoju zarodka

Potwierdziwszy, że linia reporterowa *Pdgfra*H2B-GFP może służyć jako marker endodermy pierwotnej, przeprowadziliśmy szczegółową analizę lokalizacji białka GFP w zarodkach tej linii (Hamilton i wsp., 2003). W tym celu zarodki uzyskiwane były na stadiach od 2.75 do 4.75 dpc co 2-3 godziny, i przyżyciowo obrazowane z użyciem mikroskopu konfokalnego. Obecność słabego sygnału GFP stwierdziliśmy w niektórych komórkach zarodka już na etapie moruli, w stadium 16-32 komórek, a w stadium 32-64 komórek sygnał ten był silniejszy i zlokalizowany zarówno w zewnętrznych, jak i w wewnętrznych komórkach. W stadium wczesnej blastocysty (29-63 komórek; ~70-84 hours post coitum (hpc)), GFP było zlokalizowane tylko w ICM mniej więcej w połowie zarodków (18/30), natomiast w pozostałych – zarówno w TE jak i w ICM. W stadium średniej blastocysty (64 ~79 komórek, ~87-96 hpc), GFP było zlokalizowane prawie wyłącznie w ICM, a ułożenie komórek GFP-pozytywnych przypominało mozaikowy rozkład typu pieprz-i-sól opisany wcześniej dla innych markerów PrE (Chazaud i wsp., 2006; Gerbe i wsp., 2008), oczywiście z tym zastrzeżeniem, że mamy tu do czynienia z wyznakowaniem tylko jednego komponentu, a nie dwóch. W większości zarodków w stadium późnej blastocysty (>80 komórek, ~96-114 hpc),

komórki GFP-pozytywne zlokalizowane były wyłącznie w warstwie PrE przylegającej do jamy blastocysty. Stwierdziliśmy również, że w zarodkach linii reporterowej na wczesnych stadiach poimplantacyjnych (5.5 dpc) GFP zlokalizowane jest w pochodnych PrE, tj. w linii endodermy proksymalnej (lub e. trzewnej, ang. Visceral Endoderm, VE) i endodermy dystalnej (lub e. ściennej, ang. Parietal Endoderm, PE).

Analiza ekspresji reportera PdgfraH2B-GFP pozwoliła nam zatem stwierdzić występowanie kilku wyraźnych faz rozwoju zarodków przedimplantacyjnych. Ponieważ czas uzyskania zarodków po zapłodnieniu nie był wyraźnie skorelowany z etapem rozwoju, zarówno morfologicznie jak i pod względem ekspresji reportera, zastosowaliśmy sposób określania stadium za pomocą liczby komórek. Metoda ta została po raz pierwszy zastosowana konsekwentnie do zarodków myszy na stadium blastocysty właśnie w tej publikacji, i od tego czasu jest powszechnie stosowana przez innych badaczy.

Zastosowanie linii reporterowych w połączeniu z techniką mikroskopii konfokalnej pozwala na analizę losu i zachowania komórek w żywych zarodkach hodowanych *in vitro*. Wykorzystanie linii reporterowej PdgfraH2B-GFP pozwoliło nam w dalszym etapie badań na prześledzenie losów komórek PrE w zarodkach hodowanych *in vitro* i obrazowanych za pomocą filmów poklatkowych. W zarodkach obrazowanych co 15 minut zaobserwowaliśmy takie same stadia, jak w naszej wcześniejszej analizie zarodków izolowanych *ex vivo* co 2-3 godziny, zatem hodowla *in vitro* i obrazowanie konfokalne nie wpłynęło na ich rozwój. Brak negatywnego wpływu na rozwój zarodkowy został dodatkowo potwierdzony przez analizę morfologii i ekspresji innych markerów w zarodkach utrwalonych po 17h hodowli z obrazowaniem, a także poprzez transfer takich zarodków do matek zastępczych, co skutkowało normalnym rozwojem i urodzeniem zdrowych zwierząt.

Szczegółowa analiza uzyskanych filmów pozwoliła nam stwierdzić, że przejście ze stadium w którym zarodki wykazują losowy, mozaikowy (typu sól-i-pieprz) rozkład komórek PrE, do stadium w którym wyróżnić możemy jedną, wyraźną warstwę PrE (GFP-pozytywną), zachodzi bardzo szybko, często w czasie zaledwie 15 min. Po wysortowaniu tej warstwy, pojedyncze komórki GFP-pozytywne pozostawały czasem w głębszych (dalszych od jamy blastocysty) warstwach ICM, jednak w późnych blastocystach (powyżej 128 komórek) komórki GFP-pozytywne nie były już widoczne poza warstwą PrE, w której jednocześnie zwiększył się w tym czasie poziom fluorescencji GFP.

Ukierunkowana zmiana lokalizacji i apoptoza komórek GFP-pozytywnych przyczynia się do sortowania komórek podczas tworzenia warstwy PrE

Wcześniejsze publikacje sugerują, że sortowanie prekursorów PrE i EPI prowadzi do powstania przestrzennie rozdzielonych linii endodermy pierwotnej i epiblastu.

(Rossant i wsp., 2003; Chazaud i wsp., 2006). Aby zbadać przebieg tego procesu, przeanalizowaliśmy zachowanie 90 GFP-pozytywnych komórek w sześciu zarodkach mysich podczas przejścia ze stadium wczesnej do średniej blastocysty (32 do 64 komórek) oraz 150 zarodków w czasie przejścia od stadium średniej do późnej blastocysty (64 do 128 komórek). Oznaczyliśmy wyjściową pozycję każdej komórki jako (a) będącą w kontakcie z jamą blastocysty (b) będącą w głębszych warstwach ICM. Następnie oznaczyliśmy w ten sam sposób pozycję komórki (lub komórek potomnych, jeśli uległy podziałowi) po zakończeniu filmu. Prawie połowa GFP-pozytywnych komórek w blastocystach ze stadium wczesnego/średniego (42/90) oraz 1/3 komórek w blastocystach ze stadium późnego (52/150) osiągnęła ostatecznie pozycję inną, niż ta którą zajmowała na początku filmu (lub inną do pozycji która zajmowały komórki rodzicielskie, jeśli zaszedł ich podział).

W filmach ze wczesnego stadium, większość komórek GFP-pozytywnych które początkowo znajdowały się w warstwie będącej w kontakcie z jamą blastocysty, utrzymała tę pozycję (72.5%, $n=40$) natomiast komórki GFP-pozytywne znajdujące się w warstwach oddalonych od jamy blastocysty tylko w 34% ($n=47$) utrzymały swą pozycję (należy zaznaczyć, że na tym wczesnym etapie nie dochodzi jeszcze do ostatecznego sortowania warstwy PrE). Oznacza to, że ruch komórek prekursorowych PrE może odbywać się w dowolnym kierunku, ale przeważa jednak ruch w kierunku jamy blastocysty, a zatem ich ostatecznej pozycji.

Na późniejszym etapie (stadium 64-128 komórek), wszystkie komórki GFP-pozytywne znajdujące się w kontakcie z jamą blastocysty (100%, $n=64$) utrzymały swoją pozycję, natomiast w przypadku komórek znajdujących się w głębszych warstwach ICM było to tylko 15.8% ($n=57$). Po wyraźnym uformowaniu warstwy PrE komórki pozostające w głębszych warstwach ICM obniżały poziom ekspresji GFP lub ulegały apoptozie.

Stwierdziliśmy także, że komórki zarodków przed stadium średniej blastocysty (mniej niż 64-komórki) nie ulegają apoptozie – we wcześniejszych zarodkach nie stwierdziliśmy ani jednej komórki apoptotycznej ($n=90$), natomiast w późniejszych stadiach liczba komórek ulegających apoptozie rosła wraz z ogólną liczbą komórek zarodka. Dodatkowo zaobserwowaliśmy, że częstotliwość apoptozy w GFP-pozytywnych komórkach w głębszych warstwach ICM była wyższa niż w warstwie będącej w kontakcie z jamą blastocysty (48.2%, $n=27$ vs 8.1%, $n=123$ cells).

Obserwacja apoptozy w żywych zarodkach była możliwa dzięki temu, iż białko fuzyjne H2BGFP zlokalizowane jest w chromatynie, i skutecznie uwidacznia fragmentację jądra komórkowego związaną z apoptozą. Obserwacje przyżyciowe potwierdziliśmy następnie testem TUNEL oraz barwieniem immunofluorescencyjnym przeciwko aktywnej kaspazie -3. Apoptoza może być więc dodatkowym mechanizmem eliminującym przede wszystkim te komórki, które nie znalazły się we właściwej lokalizacji, i przyczyniać się do ostatecznego wysortowania warstw PrE i EPI.

Zaobserwowaliśmy i wyróżniliśmy różne typy zachowań komórek GFP-pozytywnych, a następnie ustaliliśmy procentowy udział każdego z nich w tworzeniu endodermy pierwotnej. Nasze badania wskazują, że zmiana pozycji komórek w ICM podczas sortowania linii PrE i EPI może wynikać w głównej mierze z pasywnego przemieszczania się komórek spowodowanego m.in. przez zwiększanie rozmiaru jamy blastocysty i zmian w ułożeniu komórek wynikających z ich podziału.

Ekspresja czynników transkrypcyjnych specyficznych dla linii PrE i EPI nie wyklucza się wzajemnie na stadium moruli

Aby wyjaśnić znaczenie wczesnej ekspresji *PdgfraH2B-GFP*, zbadaliśmy lokalizację białek związanych z liniami epiblastu i endodermy pierwotnej. Ekspresja *Gata6* została wcześniej opisana w blastocystach mysich (Chazaud i wsp., 2006; Koutsourakis i wsp., 1999), a także na stadium późnej moruli (Rossant i wsp., 2003), natomiast ekspresja NANOG była opisana już na stadium 8-komórkowym (Dietrich and Hiiragi 2007). Zbadaliśmy również lokalizację czynnika transkrypcyjnego GATA4, którego współekspresja z innymi czynnikami PrE była wykazana za pomocą analizy mikromacierzowej (Kurimoto i wsp., 2006). W celu określenia wieku (stadium rozwojowego) zarodków użyliśmy całkowitej liczby komórek zarodka, ponieważ z naszych obserwacji wynikało, że zarodki uzyskane w tym samym czasie po zapłodnieniu, nawet z tego samego miotu, różnią się liczbą komórek jak i profilem ekspresji kluczowych czynników transkrypcyjnych.

Stwierdziliśmy obecność GATA6 w większości zarodków już w stadium 8 komórek (9/11) i w niektórych komórkach w 4-komórkowych zarodkach (2/9). Jest to najwcześniejsza ekspresja stwierdzona dla dowolnego markera specyficznego dla PrE. W zgodzie z wcześniejszymi badaniami (Dietrich i Hiiragi 2007), stwierdziliśmy obecność białka NANOG w większości zarodków 8-komórkowych (10/11). Ekspresję GFP wykryliśmy w stadium 16-komórkowym w części komórek zarodków linii *PdgfraH2B-GFP*, gdzie od samego początku pokrywała się z ekspresją GATA6 (ryc. 3A). Na etapie moruli NANOG (n=33) i GATA6 (n=12) były wykrywalne w prawie wszystkich nie dzielących się komórkach wewnętrznych i zewnętrznych (88.8% z 770 komórek było NANOG-pozytywne, a 92.2% z 380 komórek było GATA6-pozytywne), zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami (Strumpf i wsp., 2005). Co ciekawe, lokalizacja tych dwóch czynników na tych wczesnych etapach pokrywała się, a nie wykluczała się wzajemnie. Podobny wzór ekspresji tych dwóch czynników występował na stadium wczesnej blastocysty (do 33 komórek). Wcześniejsze badania prezentowały jedynie lokalizację tych czynników w mozaikowo ułożonych komórkach na późniejszych etapach rozwoju blastocysty (Chazaud i wsp., 2006; Gerbe i wsp., 2008), jest to zatem pierwsze doniesienie prezentujące współwystępowanie tych czynników w

tych samych komórkach na wcześniejszych etapach rozwoju. Aby zbadać korelację ekspresji GATA6 i NANOG w jądrach poszczególnych komórek obliczyliśmy współczynniki korelacji. W zarodkach o liczbie komórek mniejszej niż 30 nie stwierdziliśmy korelacji pomiędzy ekspresją GATA6 i NANOG. Wraz ze wzrostem liczby komórek, wzrastała częstość pozytywnej korelacji, jeśli wzięto pod uwagę wszystkie komórki zarodka. Kiedy jednak obliczenia przeprowadziliśmy tylko dla komórek o najsilniejszym sygnale (około 25% komórek), wykryliśmy silną korelację negatywną, która wzrastała wraz ze wzrostem liczby komórek w zarodku.

Można więc stwierdzić, że pozytywna korelacja w komórkach o niskim poziomie ekspresji badanych czynników może wynikać ze wzrostu poziomu ekspresji we wszystkich komórkach na tym stadium, natomiast korelacja negatywna w komórkach o wysokim poziomie ekspresji może sugerować iż efekt wzajemnej inhibicji programów różnicowania PrE i EPI wzrasta wraz ze wzrostem poziomu ekspresji tych czynników.

Zmiany w ekspresji genów podczas przejścia ze stadium 32 do 64 komórek

Zaobserwowaliśmy malejący udział komórek NANOG- i GATA6-pozytywnych (63.3% z 2303 komórek uzyskanych w 54 zarodkach) i 62.7% z 346 komórek odpowiednio w 8 zarodkach) w blastocystach, które rozpoczęły następny cykl podziałów komórkowych (od 33 do 63 komórek). Podczas tego etapu wzorzec ekspresji GATA6 i NANOG wskazywał na ich coraz silniejsze wzajemne wykluczanie (n=8). W blastocystach powyżej 36-komórek ekspresja NANOG nie była już obserwowana we wszystkich komórkach zarodka.

Początek ekspresji GATA4 zaobserwowaliśmy w zarodkach które miały przynajmniej 58 komórek. Stwierdziliśmy obecność tego czynnika w 60% (n=15) zarodków posiadających 58-63 komórek. Liczba komórek GATA4-pozytywnych w zarodkach w tym stadium była zmienna (2-13 komórek). Co ciekawe, stwierdziliśmy również, że w przeciwieństwie do GATA6, komórki GATA4-pozytywne rzadko wykazywały współekspresję NANOGu (tylko 15% komórek GATA4-pozytywnych było także NANOG-pozytywne (n=45), podczas gdy 48.5% komórek GATA6-pozytywnych było NANOG-pozytywne (n=268)).

W stadium 64-komórek w lokalizacji czynników specyficznych liniowo zaszła dramatyczna zmiana.

Liczba zarodków, w których stwierdzono komórki GATA4-pozytywne znacząco wzrosła pomiędzy stadium 64- a 80-komórek (81.5%, n=27). W zgodzie z wcześniejszymi obserwacjami innych czynników typowych dla PrE (Chazaud i wsp., 2006; Gerbe i wsp., 2008), komórki GATA4-pozytywne były ułożone w losowy, niejednorodny wzór w węźle zarodkowym.

Podobnie do zmian pomiędzy stadium 32- a 64- komórkowym, zaobserwowaliśmy jedynie niewielkie współwystępowanie sygnału GATA4 i NANOG w komórkach zarodków 58-79 komórkowych (7.8%). Można zatem stwierdzić, że GATA4 jest bardziej specyficznym markerem linii PrE niż GATA6. W związku z tym w dalszych etapach naszych badań używaliśmy przede wszystkim czynnika GATA4 do wyznakowania linii PrE.

Okolo połowa zarodków w stadium 80-100 komórek wykazywała częściowe lub całkowite wysegregowanie komórek GATA4-pozytywnych do warstwy PrE, a komórek NANOG-pozytywnych do warstwy EPI (53.1%; n=32), podczas gdy pozostałe komórki wciąż były ułożone mozaikowo (sól-i-pieprz). Jednak nawet w tych niewysortowanych komórkach ekspresja GATA4 i GFP (PdgfraH2B-GFP) prawie nigdy nie współwystępowała z ekspresją NANOG. W zarodkach w których PrE była częściowo wysegregowana (tj. w których widoczna była warstwa PrE ale pojedyncze komórki GATA4-pozytywne pozostawały w głębszych warstwach ICM) , komórki GFP-pozytywne w głębszych warstwach charakteryzowały się niższym poziomem fluorescencji. W 80.2% zarodków o liczbie komórek > 100 (n=96), komórki GATA4-pozytywne znajdowały się wyłącznie w warstwie PrE, a w zarodkach o liczbie komórek > 155 (n=8), tworzenie jednolitej warstwy PrE było już całkowicie zakończone.

Stwierdziliśmy również, że liczba komórek GFP-pozytywnych wzrastała mniej więcej liniowo. Co istotne, w zarodkach PdgfraH2B-GFP o liczbie komórek >64, GATA4 było ekspresjonowane wyłącznie w komórkach GFP-pozytywnych, chociaż jednocześnie na tym stadium występowały wciąż komórki GFP-pozytywne a GATA4-negatywne. Sugeruje to, że komórki prekursorowe PrE są rekrutowane z populacji Pdgfra-pozytywnej na stadium 64-komórek.

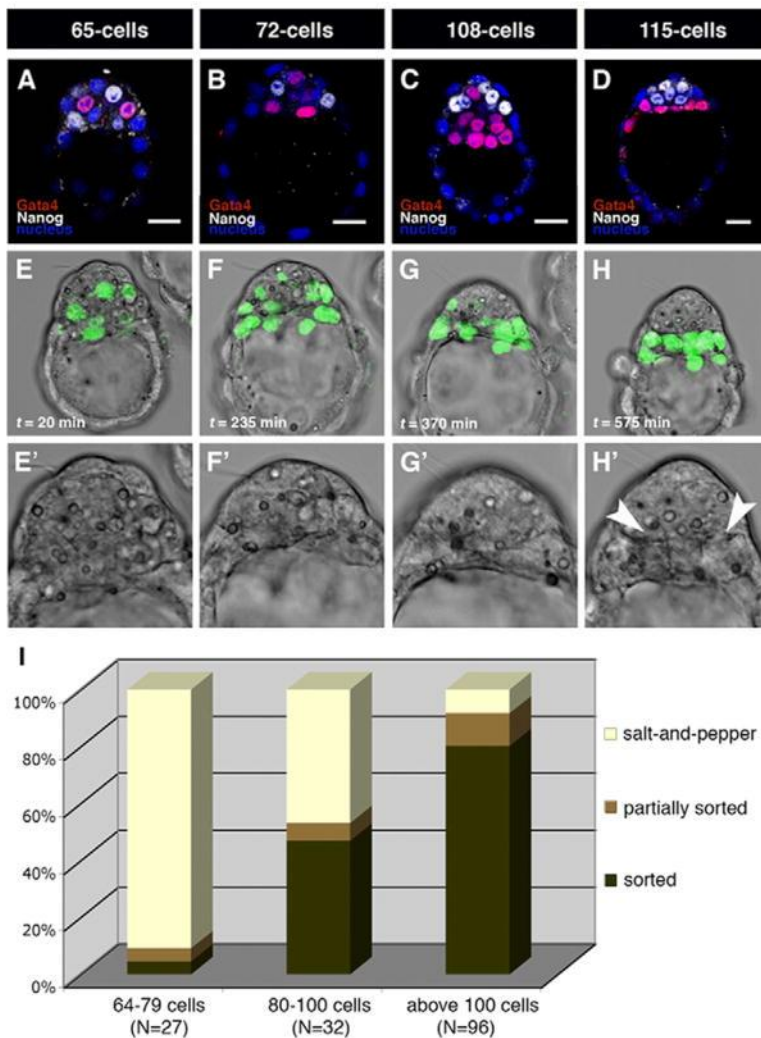


Fig. 3. A-H Kolokalizacja NANOG i GATA4 w zarodkach mysich podczas sortowania linii PrE i EPI; E-F Sortowanie linii PrE w zarodkach PdgfraH2B-GFP; I – zmiany w przestrzennym ułożeniu komórek wraz ze wzrostem liczby komórek w zarodku (Płusa i wsp., 2008)

Podsumowując, należy stwierdzić, że jest to pierwsza publikacja która szczegółowo analizuje ekspresję czynników transkrypcyjnych w fazie poprzedzającej różnicowanie prekursorów PrE i EPI, i pierwsza w której zachowanie komórek linii PrE zostało prześledzone przyżyciowo za pomocą filmów poklatkowych.

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, Red. F. J. Pelegri. Wyd. Springer (wydawnictwo książkowe, brak IF), cytowania = 13

Zastosowanie markera fluorescencyjnego w połączeniu z konfokalnym obrazowaniem przyżyciowym pozwoliło nam na odkrycie nieznanych dotąd aspektów tworzenia linii endodermy

pierwotnej w zarodkach mysich. Szczegółowy opis zastosowanych metod, jak również inne aspekty obrazowania rozwoju mysich zarodków przed- i poimplantacyjnych opisaliśmy w rozdziale “**Ex utero culture and live imaging of mouse embryos**” (Piliszek i wsp., 2011) wydanym w serii *Methods in Molecular Biology*.

Inżynieria genetyczna w połączeniu z nowymi narzędziami obrazowania przyżyciowego może zrewolucjonizować nasze obecne rozumienie biologii ssaków. Dostępność wielu różnych białek fluorescencyjnych dostarcza niezbędnych narzędzi do wizualizacji komórek w żywych organizmach. Scharakteryzowanie i sklonowanie białka zielonej fluorescencji (ang. Green Fluorescent Protein, GFP), pierwotnie pochodzącego z organizmu parzydełkowca, zostało nagrodzone Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii w 2008 r. Odkrycie i popularyzacja białek fluorescencyjnych w połączeniu z możliwościami współczesnej genetyki myszy dają nam atrakcyjne narzędzia do śledzenia komórek żywych organizmów. Obecnie możliwe jest tworzenie genetycznie zmodyfikowanych szczepów myszy eksprymujących białka fluorescencyjne w sposób specyficzny dla konkretnej tkanki czy też linii komórkowej (białka reporterowe). Zastosowanie takich szczepów umożliwia obrazowanie dynamicznych zachowań komórek w kontekście żywego zarodka. Ponieważ zarodki myszy rozwijają się w macicy, doświadczenia obejmujące obrazowanie na żywo wymagają warunków hodowli *in vitro*, które ściśle naśladują te *in vivo*. W ostatnich latach poczyniono znaczne postępy w opracowywaniu warunków hodowli zarówno zarodków ssaków w stadiach przed-, jak i poimplantacyjnych.

W przypadku obrazowania przyżyciowego istotne jest połączenie warunków, które pozwalają na rozwój zarodka (ściśle przypominających te w macicy), z konfiguracją sprzętu zapewniającą najlepszą jakość obrazu. Można to osiągnąć przez zastosowanie odpowiedniej komory środowiskowej zintegrowanej z mikroskopem odwróconym. Komora taka zapewnia wymaganą stabilną temperaturę i stężenie gazu w hodowli zarodków. W tym rozdziale szczegółowo omówiliśmy metody hodowli *ex utero* zarodków myszy w fazie przedimplantacyjnej i postimplantacyjnej. W szczególności, opisaliśmy sposoby izolowania zarodków na różnych etapach, warunki hodowli umożliwiające obrazowanie przyżyciowe i zastosowanie laserowej mikroskopii konfokalnej do przyżyciowej wizualizacji procesów zachodzących w zarodkach myszy eksprymujących reportery fluorescencyjne, w tym skład pożywek i mieszanek gazów na kolejnych etapach rozwoju, wymagania sprzętowe oraz najlepsze praktyki dotyczące przygotowania hodowli zarodków do obrazowania. Laserowa mikroskopia konfokalna wyklucza sygnał spoza płaszczyzny ogniskowania, dzięki czemu możliwe jest optyczne podzielenie próbki, która może następnie zostać zrekonstruowana w formie obrazu 3D za pomocą odpowiedniego oprogramowania.

Ekspresja fluorescencyjnych reporterów specyficznych dla linii komórkowych jest nieocenionym narzędziem do badania rozwoju myszy zarówno w zarodkach typu dzikiego, jak i tych z

wprowadzona mutacją, w szczególności pozwala na obserwację ekspresji genów *in situ* w czasie rzeczywistym. W ciągu ostatnich 100 lat genetyka myszy została rozwinięta w potężny system rozumienia biologii ssaków na poziomie molekularnym. Mysz to doskonały organizm modelowy do badania biologii ssaków ze względu na krótki okres ciąży, duży rozmiar miotu, małą wielkość ciała i odporność na infekcje. W przeciwieństwie do wielu innych organizmów modelowych, takich jak danio pręgowany (*Danio rerio*) i płatan szponiasta (*Xenopus laevis*), których zarodki są łatwo dostępne do obrazowania na żywo podczas normalnego rozwoju, zarodki myszy rozwijają się wewnątrz organizmu matki, co sprawia, że konieczne jest dokładne naśladowanie warunków w macicy podczas hodowli *ex utero*. Zestaw metod przedstawionych przez nas w tym rozdziale pozwala na osiągnięcie warunków umożliwiających rozwój zarodków myszy *in vitro* i ich jednoczesne obrazowanie.

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.

Pkt MNiSzW = 35, IF= 4,069, cytowania= 106

Kontynuując analizę mechanizmów różnicowania linii endodermy pierwotnej, w kolejnej pracy (Artus i wsp., 2011), przeanalizowaliśmy profil ekspresji i rolę czynników transkrypcyjnych SOX17 i SOX7.

Podobnie jak we wcześniej opublikowanych pracach innych badaczy (Niakan et al., 2010; Morris et al., 2010) stwierdziliśmy, że SOX17 po raz pierwszy pojawia się w przedimplantacyjnych zarodkach myszy około stadium 3.5 dpc. Dzięki szczegółowej analizie stadiów przed- i okołimplantacyjnych stwierdziliśmy, że białko SOX17 po raz pierwszy pojawia się w jądrach komórek węzła zarodkowego już na stadium 32-64 komórek, a zatem na stadium które wcześniej opisaliśmy jako wykazujące współekspresję markerów PrE (GATA6) and EPI (NANOG). SOX17 jest jednak na tym etapie wykrywane zaledwie w niewielkiej liczbie (1-3) komórek. Porównaliśmy również lokalizację SOX17 z ekspresją markera PdgfraH2B-GFP, którego użyteczność jako markera PrE opisaliśmy szczegółowo w naszej poprzedniej pracy (Płusa i wsp., 2008, pozycja 1 osiągnięcia habilitacyjnego). SOX17 od najwcześniejszych momentów w których był wykrywany, znajdował się w podgrupie komórek, które wykazywały ekspresję GFP (nie wszystkie komórki GFP-pozytywne były SOX17-pozytywne, ale wszystkie komórki SOX17-pozytywne były Pdgfra-pozytywne). W stadium powyżej 64-komórek, odpowiadającym rozkładowi komórek PrE i EPI typu sól-i-pieprz, liczba komórek SOX17-pozytywnych zwiększała

się i komórki wykazywały pełną zgodność ekspresji PdgfraH2B-GFP i SOX17. W stadium późnej blastocysty (4.5 dpc) białko SOX17 było zlokalizowane wyłącznie w komórkach PrE, znajdujących się na brzegu jamy blastocysty. Ponieważ w naszej poprzedniej pracy (Płusa et al., 2008), wykazaliśmy, że ekspresja GATA4 rozpoczyna się w momencie pojawienia się układu sól-i-pieprz, a więc na stadium 64-komórek, a ekspresja GATA6 rozpoczyna się już na stadium moruli, zatem można stwierdzić że sekwencja aktywacji poszczególnych czynników związanych z różnicowaniem linii PrE przedstawia się następująco: GATA6 > PDGFR α > SOX17 > GATA4.

Następnie zbadaliśmy lokalizację białka SOX17 w liniach pochodnych PrE, tzn. linii VE i PE, na wczesnych stadiach poimplantacyjnych (5.25–5.75 dpc). Początkowo (5.25 dpc), SOX17 wykrywany był we wszystkich komórkach VE, jednak później sygnał w części dystalnej, tzn. pokrywającej ektodermę zarodkową, tj. emVE (embryonic VE, Mesnard et al., 2006), ulegał wyciszeniu, natomiast pozostawał na wysokim poziomie w części exVE (Extraembryonic VE), czyli VE okrywającej ektodermę pozazarodkową. Poziom fluorescencji w PE pozostawał natomiast wysoki we wszystkich komórkach.

Analiza filogenetyczna genów z grupy SOX wykazała, że *Sox17* znajduje się w grupie F razem z czynnikami transkrypcyjnymi SOX7 i SOX18 (Bowles et al., 2000). Sekwencja genu *Sox7* wykazuje wysoką homologię z sekwencją *Sox17*, jednak wcześniej nie stwierdzono jego ekspresji na stadiach przedimplantacyjnych. Wcześniejsze badania wskazywały, że *Sox7* jest ekspresjonowany w komórkach PE na stadium 7.5 dpc (Murakami et al., 2004), oraz że odgrywa on rolę w różnicowaniu komórek F9 w kierunku PE *in vitro* (Futaki et al., 2004). Przeprowadzona przez nas analiza lokalizacji białka SOX7 na stadiach przedimplantacyjnych wykazała, że SOX7 jest czynnikiem specyficznym związanym z linią PrE w zarodkach mysich. Białko SOX7 wykryliśmy po raz pierwszy w zarodkach na stadium powyżej 64-komórek, w niewielkiej podgrupie komórek (1-3 komórki w zarodku, średnio 2.3 na stadium 65-89 komórek, n=7). Zlokalizowany był wyłącznie w komórkach ICM które były PdgfraH2B-GFP- pozytywne (w zarodkach reporterowych). Stwierdziliśmy dodatkowo, że SOX7 zlokalizowany jest wyłącznie w tych komórkach, które są GFP pozytywne, i jednocześnie znajdują się na brzegu ICM, w kontakcie z jamą blastocysty. Komórki w głębszych warstwach ICM, ani komórki GFP-negatywne które znajdowały się w zewnętrznej warstwie ICM nie wykazywały ekspresji SOX7. Ulegał on ekspresji później niż inne czynniki PrE-specyficzne (SOX17, GATA4). W zarodkach na stadium 4.5 dpc, kiedy warstwa PrE była już całkowicie wysortowana, SOX7 był zlokalizowany we wszystkich komórkach PrE, tak jak inne czynniki typowe dla PrE (GATA4, SOX17, PDGFRA, GATA6). Jego późna ekspresja i pozycja komórek SOX7-pozytywnych sugeruje, że czynnik ten ulega ekspresji wyłącznie w komórkach PrE które uzyskały już swoją ostateczną pozycję w warstwie PrE, jest zatem pierwszym znanym markerem komórek już wysortowanych i zdeterminowanych, i wskazuje, że różnią się one

pod względem ekspresji genów od pozostałych komórek prekursorowych które nie uległy jeszcze wysortowaniu. SOX7 może działać jako sygnał wzmacniający sygnały pozycyjne, takie jak apikalna lokalizacja DAB2 i LRP2 w niektórych komórkach na skraju ICM (Gerbe et al., 2008), i pozwalający na ostateczne różnicowanie komórek PrE. Analiza lokalizacji SOX7 we wczesnych cylindrach zarodkowych (5.5 dpc) wykazała także, że SOX7, podobnie jak SOX17, jest zlokalizowany zarówno w PE jak i w VE

Lokalizacja białka SOX7 wyłącznie w zróżnicowanych komórkach PrE, w których białko SOX17 było już obecne na wcześniejszych etapach mogłaby sugerować, że ekspresja SOX7 jest zależna od SOX17. Aby zweryfikować tę hipotezę, zbadaliśmy ekspresję SOX7 w zmodyfikowanych genetycznie zarodkach pozbawionych *Sox17*.

W tym celu użyliśmy istniejących linii myszy z warunkową delecją genu *Sox17* *Sox17^{cKO}/cKO* (Kim et al., 2007). Aby uzyskać zwierzęta KO/+, zwierzęta cKO zostały skrzyżowane z linią *Sox2::Cre* (Hayashi et al., 2002), powodującą delecję SOX17 w komórkach ICM, oraz z linią *ZP3::Cre* (Lewandoski et al., 1997) powodującą delecję w oocytach, a zatem pozwalającą na usunięcie matczyńskich transkryptów *Sox17* (mzKO).

Stwierdziliśmy, że delecja *Sox17* w zarodkach zKO, ani w zarodkach mzKO nie wpłynęła na ekspresję genu *Sox7*, ponieważ białko SOX7 znajdowane było w PrE, podobnie jak w zarodkach typu dzikiego. Potwierdziliśmy zatem, że ekspresja *Sox7* nie jest zależna od ekspresji *Sox17*. Co więcej, w zarodkach *Sox17^{-/-}* linia PrE ulega sortowaniu w sposób niezaburzony. Być może zatem zachodzi kompensacja SOX17 przez SOX7. Wcześniejsze publikacje wykazały, że w zarodkach *Sox17^{-/-}* w stadium 8.0 dpc, poziom ekspresji *Sox7* jest istotnie zwiększony (Shimoda et al., 2007). Aby poznać rolę SOX17 w różnicowaniu endodermy, zbadaliśmy różnicowanie poszczególnych linii w zarodkach *Sox17^{-/-}* w porównaniu z zarodkami *Sox17^{+/-}* oraz zarodkami typu dzikiego w tym samym stadium rozwoju. Zarodki ze wszystkich grup były morfologicznie nierozróżnialne, jednak ich genotyp został potwierdzony poprzez genotypowanie (PCR). Na stadium 4.5 dpc zarodki *Sox17^{-/-}* nie wykazywały obecności białka SOX17 (zgodnie z przewidywaniem), jednak lokalizacja GATA4 w PrE i NANOG w EPI była niezaburzona, a obie te linie były prawidłowo wysortowane. Zarodki na stadium 5.5 dpc były również morfologicznie prawidłowe. Nie stwierdziliśmy również istotnych statystycznie różnic w liczbie komórek EPI i PrE w mutantach w porównaniu z zarodkami typu dzikiego. Można zatem stwierdzić że różnicowanie i sortowanie linii PrE i Epi w zarodkach mysich nie jest zależne od SOX17.

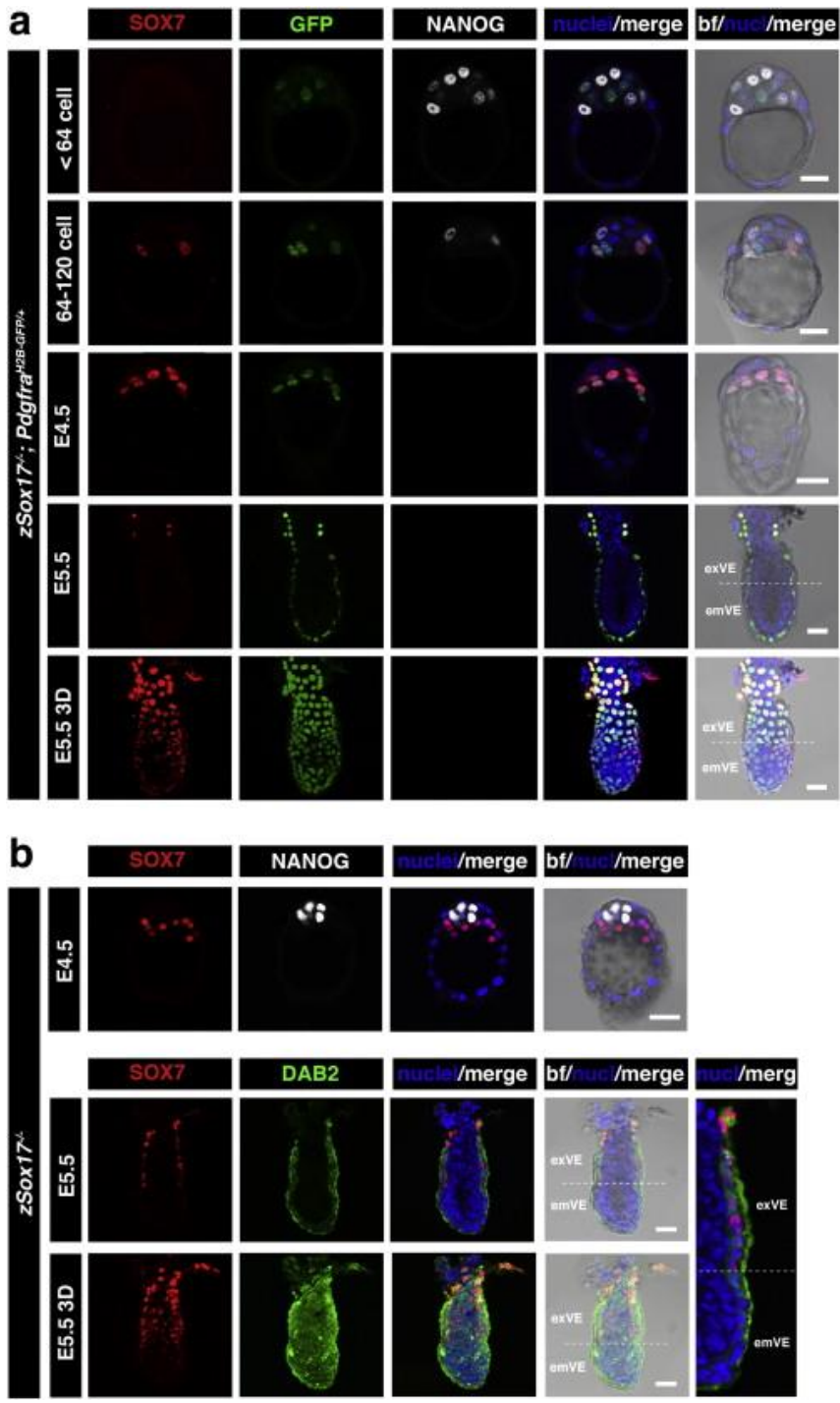


Fig. 4 Kolokalizacja SOX7, PdgfraH2BGFP i NANOG w zarodkach mysich na stadiach przed- i okołoinplantacyjnych (Artus i wsp., 2011)

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.

autor korespondencyjny

Pkt MNiSzW = 40, IF= 5,413, cytowania = 10

Wstęp

Nasza wiedza na temat procesów życiowych powiększa się w dużej mierze dzięki badaniom z użyciem organizmów modelowych. W biologii rozwoju ssaków (jak i w wielu innych dziedzinach biologii) mysz (*Mus musculus*) jest od wielu lat z powodzeniem wykorzystywana jako główny organizm modelowy. Większość badań podstawowych w embriologii doświadczalnej jest oparta na modelu mysim, i stąd pochodzi większość naszej wiedzy dotyczącej rozwoju zarodkowego ssaków. W moich wcześniejszych badaniach (pozycje 1, 2 i 3 osiągnięcia naukowego) prowadziłam badania nad różnicowaniem endodermu pierwotnej i epiblastu właśnie na modelu mysim. Jednak badania dotyczące wczesnego rozwoju zarodkowego ssaków wskazują, że część obserwowanych procesów, w tym różnicowanie pierwszych linii zarodkowych, może zachodzić odmiennie u gryzoni (mysz, szczur), niż u innych ssaków, w tym bydła (Berg i wsp., 2011) i naczelnych (Rezus; (Bosze and Houdebine, 2010)).

Aby uzyskać pełniejszy obraz rozwoju zarodkowego ssaków, podjęłam się analizy przebiegu różnicowania endodermu pierwotnej i epiblastu w zarodkach królika (*Oryctolagus cuniculus*). Badanie te były w całości finansowane z grantu NCN SONATA (nr 2011/03/D/NZ3/03992) którego byłam kierownikiem. Królik został wybrany jako obiekt moich badań, ponieważ jest organizmem modelowym stosowanym obecnie w różnorodnych badaniach biomedycznych, w tym w badaniach metabolizmu lipidów, miażdżycy, cukrzycy, oraz schorzeń układu sercowo-naczyniowego (Bosze and Houdebine, 2010). Jest też dogodnym kandydatem do badań z zakresu rozwoju, ze względu na swoje stosunkowo małe rozmiary (w porównaniu do zwierząt gospodarskich), krótki okres ciąży (31 dni), możliwość uzyskiwania zarodków w ściśle określonym stadium oraz hodowli zarodków *in vitro* (Püschel i wsp., 2010). Badania filogenetyczne sugerują ponadto bliskie pokrewieństwo ewolucyjne pomiędzy zajęczakami i naczelnymi (Allard i wsp., 1996; Graur i wsp., 1996). Wczesne etapy rozwoju zarodkowego królika bardziej przypominają rozwój innych ssaków (włączając człowieka) niż myszy, m. in. pod względem morfologii zarodka, przebiegu gastrulacji, jak również mechanizmów inaktywacji chromosomu X i in. (Okamoto i wsp., 2011). Pomimo tak dogodnego układu cech, królik do tej pory nie był szeroko stosowany w badaniu różnicowania pierwszych zarodkowych linii komórkowych, a przeprowadzone przeze mnie badania są pierwszym szczegółowym opisem przebiegu tych procesów w zarodkach króliczych.

UZYSKANE WYNIKI

Analiza różnicowania pierwszych linii komórkowych u gatunków ssaków innych niż mysz, przeprowadzana była do tej pory przede wszystkim na zarodkach uzyskanych *in vitro* (przegląd literatury w: Piliszek i wsp., 2016). Aby uzyskać wierny obraz rozwoju przedimplantacyjnego królika, poddaliśmy analizie zarodki uzyskane *ex vivo* w wyniku naturalnego pokrycia i rozwoju. Zarodki uzyskiwane były na odpowiednich stadiach a następnie utrwalane i poddawane analizie immunocytochemicznej.

Stadium blastocysty w przedimplantacyjnym rozwoju królika obejmuje zarodki od 60 do 5000 komórek, i obejmuje stadia które mogą nie mieć odpowiednika w – dobrze poznanym- rozwoju zarodkowym myszy. Aby w sposób rzetelny móc porównać ze sobą kolejne stadia rozwoju, opracowaliśmy i po raz pierwszy zastosowaliśmy nowy system określania wieku zarodka króliczego, oparty na całkowitej liczbie komórek, w którym m.in. opisano 6 stadiów na etapie blastocysty (stadia VI do XI), odpowiadających liczbie podziałów którym uległy komórki zarodka, a różniących się m.in. profilem ekspresji czynników transkrypcyjnych. System jest oparty na całkowitej liczbie komórek zarodka, podobnie jak wprowadzony przez nas dla zarodków myszy w publikacji Płusa i wsp., 2008 (pozycja 1 osiągnięcia naukowego) .

Wyróżnione przez nas stadia przedstawione są w figurze 5

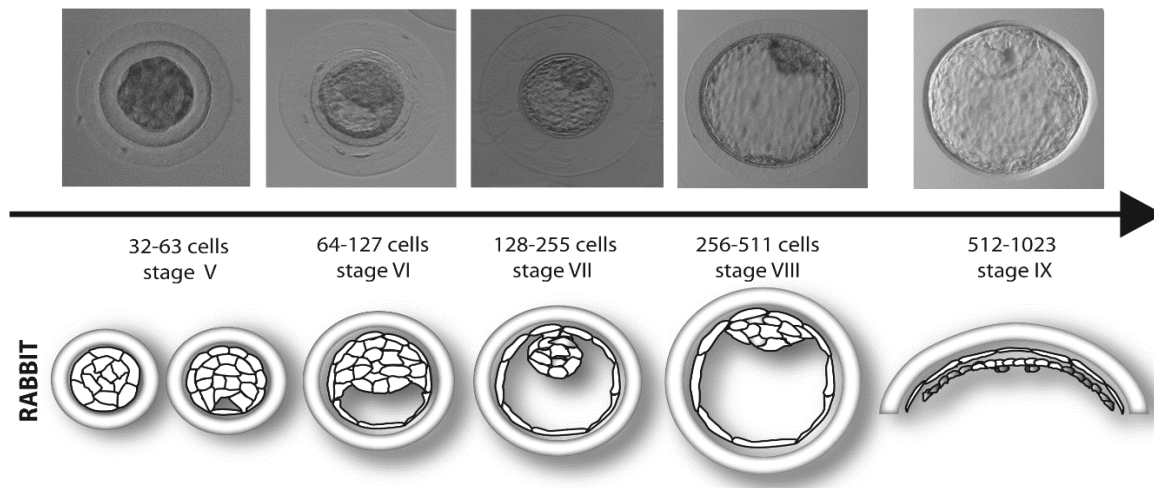


Fig. 5. System określania stadium rozwojowego zarodków króliczych oparty na całkowitej liczbie komórek. Figura przedstawia stadia podczas których zachodzi różnicowanie endodermy pierwotnej i epiblastu (Piliszek i wsp., 2017).

W wyniku badań wstępnych stwierdziliśmy, że różnicowanie PrE i EPI zachodzi w blastocystach składających się z ~100-1000 komórek, a więc w stadiach VI-IX (3-4 dpc). Niniejsza praca prezentuje szczegółową analizę stadiów IV (morula) – IX (blastocysta).

Ustalenie wzajemnie wykluczającej się ekspresji czynników transkrypcyjnych NANOG (EPI) i GATA6 (PrE) uznawane jest za kluczowy czynnik w różnicowaniu EPI i PrE w zarodkach mysich (Chazaud i Yamanaka, 2016). Utrwalone zarodki królicze poddaliśmy analizie immunocytochemicznej w celu stwierdzenia obecności tych kluczowych czynników. Stwierdziliśmy, że wczesne zarodki królicze (stadium IV i V, morula, 3 dpc) wykazują, podobnie do zarodków mysich (Plusa i wsp., 2008), ekspresję czynników GATA6 i NANOG we wszystkich komórkach. W stadiach VII i VIII większość komórek również wykazywała współekspresję tych czynników, jednak na tych stadiach pojawiły się pierwsze komórki GATA6-negatywne/NANOG-pozytywne, co może sugerować, że na tym etapie zachodzą pierwsze etapy różnicowania w kierunku epiblastu. Komórki GATA6-negatywne stanowiły na stadium VII 13.5% komórek ICM (n=19), a na stadium VIII -33.9% komórek ICM (n=21), natomiast wszystkie komórki ICM pozostawały NANOG- pozytywne. Można zatem stwierdzić, że obniżenie poziomu ekspresji GATA6 w części komórek ICM (będących prawdopodobnie prekursorami EPI) nie jest związane w obniżeniem poziomu NANOG w pozostałych komórkach. Jest to w sprzeczności ze zjawiskiem obserwowanym w zarodkach mysich, gdzie wzajemna inhibicja GATA6 i NANOG jest głównym mechanizmem różnicowania EPI i PrE (Singh i wsp., 2007; Bessonard i wsp., 2014). Obniżenie poziomu ekspresji NANOG w komórkach GATA6-pozytywnych w zarodkach króliczych zaobserwowaliśmy dopiero na stadium IX (n=7), kiedy to można było zauważyć pierwsze oznaki sortowania EPI i PrE do dwóch osobnych „przedziałów”. Zatem stadium sól-i-pieprz, charakteryzujące się w zarodkach mysich wzajemnie wykluczającą się ekspresją GATA6 i NANOG w mozaikowo ułożonych komórkach jest w przypadku zarodków króliczych bardzo krótkotrwałe. Stwierdziliśmy także, że w wyniku sortowania komórek EPI i PrE, warstwa PrE nie podściela EPI na granicy z jamą blastocysty ale tworzy pierścień okalający epiblast. Podsumowując, należy stwierdzić że wzajemna inhibicja czynników transkrypcyjnych NANOG i GATA6 być może nie bierze udziału we wstępnych etapach różnicowania EPI i PrE w zarodkach króliczych.

Czynniki GATA6 i NANOG w zarodkach króliczych są co prawda związane z – odpowiednio- linią PrE i EPI, ale wzorzec ich ekspresji nie wskazuje jednoznacznie, że inicjacja procesu różnicowania jest związana z ich ekspresją. W poszukiwaniu bardziej specyficznych markerów postanowiliśmy zbadać ekspresję czynników z grupy SOX w zarodkach króliczych. W naszej poprzedniej pracy opisaliśmy czynnik transkrypcyjny SOX17, którego ekspresja w zarodkach

mysich związana jest z linią PrE (Artus i wsp., 2011, pozycja 3 osiągnięcia naukowego). SOX2, inny czynnik transkrypcyjny z grupy SOX, jest natomiast związany u myszy z różnicowaniem linii EPI (Wicklów i wsp., 2014). Stwierdziliśmy występowanie obu tych czynników w zarodkach przedimplantacyjnych królika, jednak w późniejszych stadiach i w mniejszym odsetku komórek niż NANOG i GATA6, co wskazuje że istotnie są to czynniki bardziej specyficzne. SOX2 i SOX17 nie były wykrywane w jądrach komórek zarodka w większości blastocyst do stadium VII. Później natomiast stwierdziliśmy lokalizację tych białek w ICM w sposób bardziej przypominający rozkład sól-i-pieprz. Liczba komórek SOX2-pozytywnych i SOX-17 pozytywnych była podobna w kolejnych stadiach poczynając od VIII. Część komórek wykazywała współekspresję tych dwóch czynników, co może wskazywać na fakt, że nie były one ostatecznie zróżnicowane, jednak w większości komórek ICM ekspresja SOX2 i SOX17 wykluczała się wzajemnie. W stadium IX ekspresja tych dwóch czynników wykluczała się wzajemnie prawie we wszystkich komórkach, podobnie jak to wcześniej zaobserwowaliśmy w przypadku czynników NANOG i GATA6. Co istotne, na tym etapie wszystkie komórki SOX2-pozytywne były NANOG-pozytywne, a komórki SOX17-pozytywne były również GATA6-pozytywne. Zatem możemy stwierdzić, że, podobnie jak u myszy, SOX2 jest w zarodkach króliczych związany z linią epiblastu, a SOX17- z linią PrE. Podsumowanie analizy ekspresji badanych czynników transkrypcyjnych przedstawiono na figurze 6

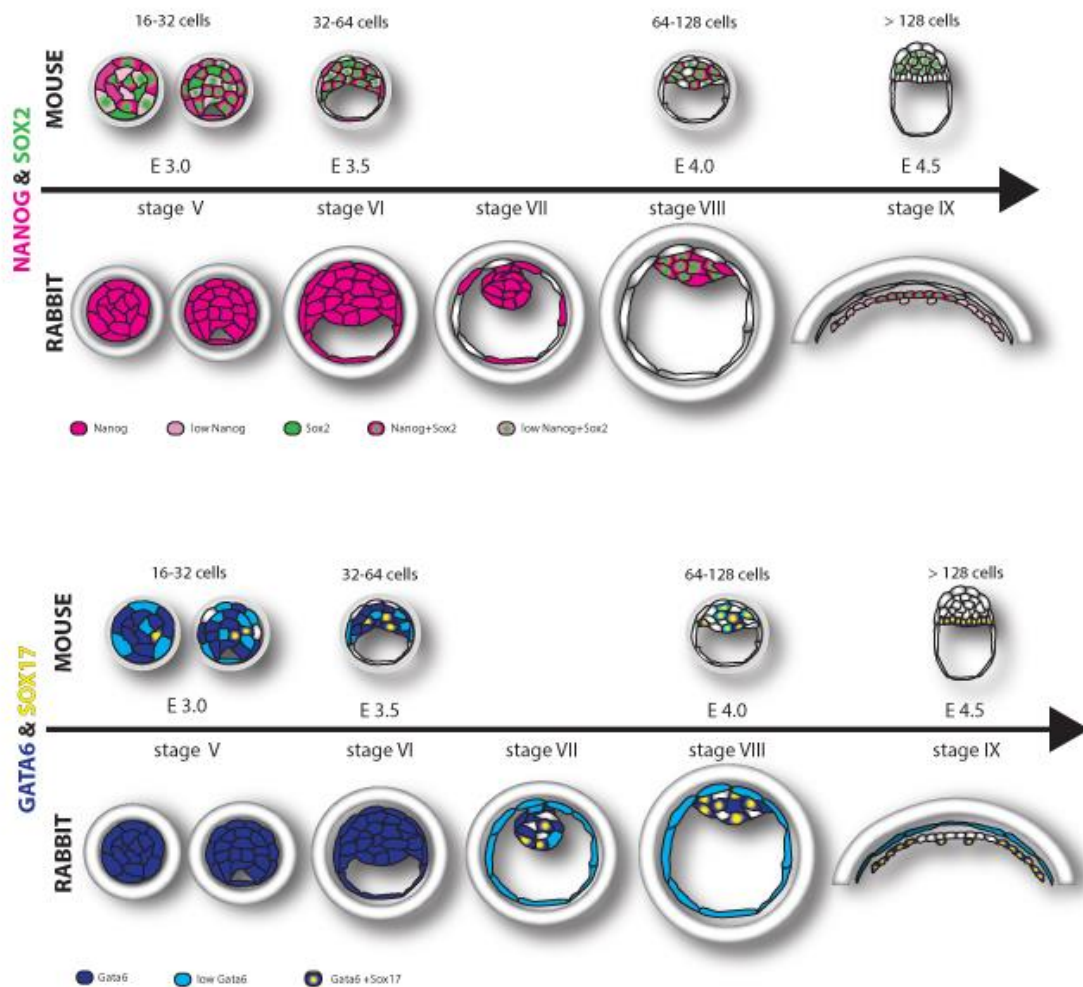


Fig 6. Schematyczne przedstawienie profilu ekspresji najważniejszych czynników transkrypcyjnych związanych z różnicowaniem epiblastu i endodermy pierwotnej w zarodkach myszy i królika (Piliszek i wsp., 2017).

Wykazano, że w zarodkach mysich, różnicowanie PrE i EPI zależne jest od aktywności ścieżki sygnałowej FGF/ERK (ang. fibroblast growth factor/kinazy MAP (mitogen-activated protein kinase) (Kang i wsp., 2013; Krawchuk i wsp., 2013). W przypadku, gdy jest ona nieaktywna, cały ICM różnicuje w kierunku EPI. Stwierdzono to m.in. przez zastosowanie inhibitorów ścieżki sygnałowej FGF/ERK – hodowla zarodków mysich w ich obecności powoduje, że zarodki te tworzą morfologicznie prawidłową blastocystę, która jednak pozbawiona jest całkowicie linii PrE (Nichols i wsp., 2009). Aby zbadać wpływ tej ścieżki sygnałowej na różnicowanie pierwszych linii komórkowych w zarodkach królika zablokowaliśmy fosforylację

ERK (a w konsekwencji aktywację ścieżki sygnałowej ERK) za pomocą inhibitora MEK PD0325901 w stężeniu 1 μ M. Zarodki hodowane były *in vitro* od stadium moruli (stadium V) w pożywce RDH (Jin i wsp., 2000) z dodatkiem inhibitora, w 38.5°C, w atmosferze 5% CO₂. W zarodkach z grupy kontrolnej, hodowanych *in vitro* w tych samych warunkach, bez dodatku inhibitora, można było stwierdzić obecność zarówno SOX2-pozytywnych komórek EPI, jak i SOX17-pozytywnych komórek PrE. W zarodkach w których aktywność ERK została zablokowana, nie stwierdzono obecności komórek PrE (SOX17-pozytywnych). Można zatem stwierdzić że podobnie jak w zarodkach mysich, aktywność ścieżki sygnałowej ERK jest niezbędna do różnicowania komórek ICM w kierunku PrE. Co jednak istotne, zablokowanie tej ścieżki sygnałowej nie zwiększyło odsetka komórek SOX2-pozytywnych w ICM (55.9%, n=547 komórek ICM w 13 zarodkach) w porównaniu z zarodkami z grupy kontrolnej (53.4%, n=670 komórek ICM w 9 zarodkach), nie wpłynęło również na odsetek komórek NANOG-pozytywnych. Stoi to w sprzeczności z danymi z zarodków mysich, gdzie odsetek komórek EPI zwiększa się niejako kosztem komórek PrE, gdyż wszystkie komórki ICM różnicują w kierunku EPI (Nichols i wsp., 2009; Chambers i wsp., 2003; Saiz i wsp., 2016). W zarodkach króliczych natomiast zaobserwowaliśmy zwiększenie odsetka komórek ICM, które nie wykazywały ekspresji ani SOX2, ani SOX17, a więc nie należały ani do linii EPI, ani PrE (w kontroli=5.4%; inhibicja ERK=44.1%). Pozwala to wyciągnąć wniosek, że aktywność ścieżki sygnałowej ERK w zarodkach królika jest niezbędna do prawidłowego różnicowania w kierunku PrE, ale jej zablokowanie jest niewystarczające do wywołania różnicowania w kierunku EPI.(Fig. 7)

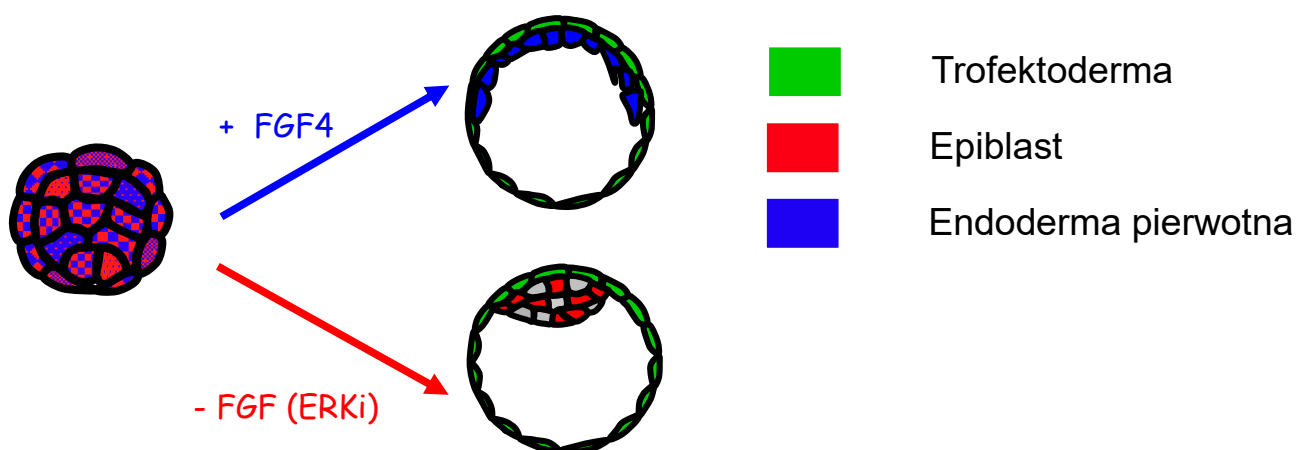


Fig. 7. Schematyczne przedstawienie wpływu zablokowania i aktywacji szlaku sygnałowego MEK/ERK w zarodkach króliczych. Aktywacja (+ FGF4) prowadzi do różnicowania wszystkich komórek węzła zarodkowego w kierunku endodermy pierwotnej oraz ich zwiększonej migracji, natomiast zablokowanie szlaku powoduje zablokowanie ekspresji czynników transkrypcyjnych związanych z endoderłą pierwotną, bez przekształcenia tych komórek w kierunku epiblastu.

Aby lepiej zrozumieć wpływ ścieżki sygnałowej FGF/ERK na różnicowanie linii

komórkowych w zarodkach królika, poddaliśmy je również wymuszonej aktywacji tej ścieżki. Zarodki hodowane były w takich samych warunkach, w pożywce z dodatkiem FGF4 w stężeniu 100ng/ml. Mysie zarodki w takich warunkach tworzą morfologicznie prawidłową blastocystę, która jednak pozbawiona jest komórek EPI. W zarodkach królika również stwierdziliśmy brak SOX2-pozytywnych komórek EPI, ale zaobserwowaliśmy także zmianę morfologii ICM. Mianowicie, komórki SOX17-pozytywne nie były ułożone w zwartą grupę podobną do ICM prawidłowych zarodków, ale tworzyły warstwę komórek podścielającą wewnętrzną stronę trofektodermy. Takie zachowanie komórek endodermy obserwowane jest w późniejszych stadiach rozwoju blastocysty, kiedy PrE różnicuje w linię VE- podścielającą ICM, i PE, która to właśnie wykazuje zdolność do migracji i podściela TE. Można zatem wnioskować, że aktywacja szlaku sygnałowego FGF/ERK spowodowała zachowanie komórek spójne z fenotypem komórek PE.

Znaczenie badań:

Badania zaprezentowane w niniejszej publikacji przedstawiają pierwszą systematyczną analizę przebiegu różnicowania pierwszych linii komórkowych (epiblastu, endodermy pierwotnej) w zarodkach królika. Wyniki naszych badań wskazują na częściowo odmienny mechanizm działania szlaku sygnałowego MEK/ERK między zarodkami króliczymi i mysimi. Potwierdzają też podobieństwa między zarodkami króliczymi i ludzkimi, i pozwalają na szersze zastosowanie modelu króliczego w badaniach z zakresu wczesnego rozwoju ssaków.

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. # autor korespondencyjny

Praca przeglądowa **Pre-implantation development of domestic animals (Piliszek i Madeja, 2018, pozycja 5 osiągnięcia habilitacyjnego)** podsumowuje obecną wiedzę na temat rozwoju przedimplantacyjnego zwierząt gospodarskich, porównując ją także z bardziej obszerną wiedzą zdobytą dzięki badaniom nad rozwojem zarodków mysich. W szczególności, przedstawiamy w niej systematyczne porównanie ram czasowych rozwoju przedimplantacyjnego wielu gatunków ssaków, oraz szczegółowych mechanizmów różnicowania pierwszych linii komórkowych – trofektodermi, epiblastu i endodermy pierwotnej. Praca ta może zatem stanowić podsumowanie badań przedstawionych w tym autoreferacie, będąc porównaniem rozwoju pierwszych etapów różnicowania zarówno zarodków mysich jak i króliczych, w porównaniu z, wciąż jeszcze ograniczoną, wiedzą na temat rozwoju innych gatunków ssaków. Zrozumienie molekularnych i komórkowych mechanizmów wczesnego rozwoju zarodkowego u gatunków ssaków innych niż gryzoni poszerza naszą wiedzę na temat podstawowych mechanizmów różnicowania i jest niezbędne do opracowania skutecznych metod wspomaganego rozrodu w rolnictwie, medycynie weterynaryjnej i badaniach biomedycznych

Kluczowe czynniki biorące udział w różnicowaniu TE, EPI i PrE, takie jak czynniki transkrypcyjne i czynniki wzrostu, mogą być wspólne dla różnych gatunków ssaków, ale ich szczegółowe zależności różnią się w zależności od gatunku. Być może każdy gatunek wykorzystuje te elementy w inny sposób, poprzez różnice w sieciach regulacyjnych i specyficzność wiązania czynników transkrypcyjnych (Kuijk i wsp., 2015), aby dostosować je do różnych potrzeb, takich jak rozmiar zarodka, typ implantacji czy długość okresu przedimplantacyjnego. Aby odkryć mechanizmy leżące u podstaw różnicowania pierwszych linii komórkowych ssaków, i rozróżnić elementy wspólne jak i te charakterystyczne dla poszczególnych gatunków, konieczne są badania porównawcze różnych modeli. Dalsze zrozumienie, które aspekty są wspólne a które rozbieżne, będzie miało zasadnicze znaczenie dla zrozumienia wczesnej embriogenezy ssaków i mechanizmów różnicowania.

Badania przeprowadzone przeze mnie na zarodkach króliczych i mysich, i zaprezentowane w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego stanowią, mam nadzieję, istotny wkład w poznanie mechanizmów rozwoju zarodkowego, a w szczególności różnicowania linii epiblastu i endodermy pierwotnej

LITERATURA

1. Allard, M.W., McNiff, B.E., Miyamoto, M.M., 1996. Support for interordinal eutherian relationships with an emphasis on primates and their archontan relatives. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 78-88. doi:10.1006/mpev.1996.0007
2. Artus, J., Piliszek, A. and Hadjantonakis, A.-K. (2011). The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Dev. Biol.* 350, 393-404.
3. Becker, S., Casanova, J. and Grabel, L. (1992). Localization of endoderm-specific mRNAs in differentiating F9 embryoid bodies. *Mech. Dev.* 37, 3-12.
4. Berg, D.K., Smith, C.S., Pearton, D.J., Wells, D.N., Broadhurst, R., Donnison, M., Pfeffer, P.L., 2011. Trophectoderm lineage determination in cattle. *Dev. Cell* 20, 244-255. doi:10.1016/j.devcel.2011.01.003
5. Bessonard, S., De Mot, L., Gonze, D., Barriol, M., Dennis, C., Goldbeter, A., Dupont, G. and Chazaud, C. (2014). Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. *Development* 141, 3637-3648.
6. Bosze, Z., Houdebine, L.M., 2010. Application of rabbits in biomedical research: A review. *World Rabbit Sci.* 14. doi:10.4995/wrs.2006.712
7. Bowles, J., Schepers, G., Koopman, P., 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* 227, 239-255.
8. Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.
9. Chazaud, C. and Yamanaka, Y. (2016). Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development* 143, 1063-1074.
10. Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T. and Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev. Cell* 10, 615-624
11. Dietrich, J. E. and Hiragi, T. (2007). Stochastic patterning in the mouse preimplantation embryo. *Development* 134, 4219-4231.
12. Futaki, S., Hayashi, Y., Emoto, T., Weber, C.N., Sekiguchi, K., 2004. Sox7 plays crucial roles in parietal endoderm differentiation in F9 embryonal carcinoma cells through regulating Gata-4 and Gata-6 expression. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10492-10503.
13. Gardner, R.L., Rossant, J. (1979) Investigation of the fate of 4-5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *J Embryol Exp Morphol.* 52:141-52.

14. Gerbe, F., Cox, B., Rossant, J. and Chazaud, C. (2008). Dynamic expression of Lrp2 pathway members reveals progressive epithelial differentiation of primitive endoderm in mouse blastocyst. *Dev. Biol.* 313, 594-602.
15. Graur, D., Duret, L., Gouy, M., 1996. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature* 379, 333-335. doi:10.1038/379333a0
16. Hamilton, T. G., Klinghoffer, R. A., Corrin, P. D. and Soriano, P. (2003). Evolutionary divergence of platelet-derived growth factor alpha receptor signaling mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4013-4025.
17. Hayashi, S., Lewis, P., Pevny, L., McMahon, A.P., 2002. Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain. *Mech. Dev.* 119 (Suppl 1), S97-S101.
18. Jin, D. I., Kim, D. K., Im, K. S. and Choi, W. S. (2000). Successful pregnancy after transfer of rabbit blastocysts grown in vitro from single-cell zygotes. *Theriogenology* 54, 1109-1116
19. Kang, M., Piliszek, A., Artus, J. and Hadjantonakis, A.-K. (2013). FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Development* 140, 267-279.
20. Kim, I., Saunders, T.L., Morrison, S.J., 2007. Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell* 130, 470-483.
21. Krawchuk, D., Honma-Yamanaka, N., Anani, S. and Yamanaka, Y. (2013). FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* 384, 65-71.
22. Kuijk, E., Geijsen, N. and Cuppen, E. (2015). Pluripotency in the light of the developmental hourglass. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 90, 428-443
23. Kunath, T., Arnaud, D., Uy, G. D., Okamoto, I., Chureau, C., Yamanaka, Y., Heard, E., Gardner, R. L., Avner, P. and Rossant, J. (2005). Imprinted X inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development* 132, 1649-1661.
24. Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Ono, Y., Uno, K. D., Yamada, R. G., Ueda, H. R. and Saitou, M. (2006). An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res.* 34, e42.
25. Lewandoski, M., Wassarman, K.M., Martin, G.R., 1997. Zp3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line. *Curr. Biol.* 7, 148-151.
26. Martin, G. R. and Evans, M. J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1441-1445.

27. Morris, S.A., Teo, R.T., Li, H., Robson, P., Glover, D.M., Zernicka-Goetz, M., 2010. Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 6364-6369
28. Murakami, A., Shen, H., Ishida, S., Dickson, C., 2004. SOX7 and GATA-4 are competitive activators of Fgf-3 transcription. *J. Biol. Chem.* 279, 28564-28573.
29. Murray, P. and Edgar, D. (2001). The regulation of embryonic stem cell differentiation by leukaemia inhibitory factor (LIF). *Differentiation* 68, 227- 234.
30. Niakan, K.K., Ji, H., Maehr, R., Vokes, S.A., Rodolfa, K.T., Sherwood, R.I., Yamaki, M., Dimos, J. T., Chen, A.E., Melton, D.A., McMahon, A.P., Eggan, K., 2010. Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *Genes Dev.* 24, 312-326.
31. Nichols, J., Silva, J., Roode, M. and Smith, A. (2009). Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development* 136, 3215-3222.
32. Okamoto II, Patrat C, Thépot D, Peynot N, Fauque P, Daniel N, Diabangouaya P, Wolf JP, Renard JP, Duranthon V, Heard E. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature*. 2011 Apr 21;472(7343):370-4.
33. Piliszek, A., Grabarek, J. B., Frankenberg, S. R. and Plusa, B. (2016). Cell fate in animal and human blastocysts and the determination of viability. *Mol. Hum. Reprod.* 22, 681-690
34. Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., Hadjantonakis, A.K., 2008. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* 135, 3081-3091.
35. Püschel, B., Daniel, N., Bitzer, E., Blum, M., Renard, J.-P., Viebahn, C., 2010. The rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): a model for mammalian reproduction and early embryology. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010, pdb.emo139. doi:10.1101/pdb.emo139
36. Rossant, J., Chazaud, C. and Yamanaka, Y. (2003). Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 358, 1341-1348.
37. Saiz, N., Williams, K. M., Seshan, V. E. and Hadjantonakis, A.-K. (2016). Asynchronous fate decisions by single cells collectively ensure consistent lineage composition in the mouse blastocyst. *Nat. Commun.* 7, 13463.
38. Singh, A. M., Hamazaki, T., Hankowski, K. E. and Terada, N. (2007). A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 2534-2542.
39. Wicklow, E., Blij, S., Frum, T., Hirate, Y., Lang, R. A., Sasaki, H. and Ralston, A. (2014). HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst. *PLoS Genet.* 10, e1004618.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

W czasie trwania studiów doktoranckich w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN brałam udział w projekcie kierowanym przez dr A. M. Duszewską, we współpracy z prof. Z. Reklewskim z IGHZ PAN oraz prof. R. Słomskim z Instytutu Genetyki Człowieka PAN. Celem badań było uzyskanie transgeniczných cieląt po transferze zarodków, do których wprowadzono konstrukcję genową z genem reporterowym GFP. Współpracę z dr Duszewską związaną z tematyką hodowli zarodków bydłęcych kontynuowałam również po ukończeniu studiów doktoranckich. Wynikiem przeprowadzonych prac są następujące publikacje:

1. Duszewska, A. M. , Wojdan, J., Gawron, W., Lipiński, D., **Piliszek, A.**, Wenta-Muchalska, E., Waś, B., Słomski, R., Reklewski, Z. (2004) Uzyskanie cieląt po transferze zarodków, do których wprowadzono konstrukcję genową [Obtaining calves after transfer of the gene construct microinjected embryos] **Medycyna Wet.** 60 (12)
 2. Duszewska, A.M. , Lipinski, D., **Piliszek, A.**, Słomski, R., Wojdan, J., Gawron, W., Wenta-Muchalska, E., Was, B., Chromik, A., Reklewski, Z. (2004) Cattle offspring after transfer of IVP GFP positive frozen/thawed embryos. **Animal Science Papers and Reports** 22: 603-610
 3. Duszewska A.M. , Lipiński D., **Piliszek A**, Słomski R, Pławski A, Wojdan J, Gawron W, Juzwa W, Zeyland J, Wenta-Muchalska E, Reklewski Z. (2004) Controversial aspect of using GFP as a marker for the production of transgenic cattle. **Pol J Vet Sci.** 7(4):241-9.
 4. Duszewska, A.M. , Rapała, L., Trzeciak, P., Dąbrowski, S., **Piliszek, A.** (2012) Obtaining farm animal embryos in vitro. **Journal of Animal and Feed Sciences**; 21: 217-233 (Praca przeglądowa)
-

Tematem mojej rozprawy doktorskiej były potencje rozwojowe komórek somatycznych ssaków. Wykazałam, że komórki somatyczne (fibroblasty) wprowadzone do środowiska bruzdkującego zarodka są w stanie podjąć podziały i uczestniczyć w rozwoju zarodkowym do stadium cylindra zarodkowego. W związku z pracami w tej tematyce powstało także kilka prac przeglądowych i rozdziałów w monografiach. Po ukończeniu studiów doktoranckich

kontynuowałam prace w tej tematyce, m.in. we współpracy z dr B. Płusą i dr K. Żyżyńską-Galeńską. Wynikiem tej współpracy jest m.in. wykazanie, że utrata plastyczności komórek wężła zarodkowego nie jest bezpośrednio powiązana z różnicowaniem w kierunku PrE i Epi w niezaburzonym rozwoju.

5. Praca przeglądowa: Modliński, J.A., **Piliszek, A.**, Karasiewicz, J. (2003) Potencje rozwojowe komórek somatycznych ssaków [Developmental potential of mammalian somatic cells]. **Biotechnologia** 2003 (1) 9-22
 6. Praca przeglądowa: **Piliszek A.** (2004) Chimerowe zarodki ssaków: powstawanie i wykorzystanie [The production and use of mammalian chimeric embryos] **Biotechnologia** 2004 (1) 142-155
 7. **Piliszek, A.**, Modliński, J.A., Pyśniak K., Karasiewicz, J. (2007) Foetal fibroblasts introduced to cleaving embryos contribute to full-term development. **Reproduction** 133(1): 207-18.
 8. Rozdział w monografii: Karasiewicz, J., **Piliszek, A.**, Sacharczuk, M., Modliński, J.A. (2008) Zarodkowo somatyczne chimery ssaków. W: **Od genomu tura po ksenotransplantacje**, Red. Z.Smorąg, R. Słomski, J.A. Modliński; OWN Poznań, 2008, p. 9-28.
 9. Grabarek, J.B., Żyżyńska, K., Saiz, N., **Piliszek, A.**, Frankenberg, S., Nichols, J., Hadjantonakis, A.-K., Płusa, B. (2012) Differential plasticity of epiblast and primitive endoderm precursors within the ICM of the early mouse embryo **Development**, Jan;139(1):129-139
 10. Praca przeglądowa: Żyżyńska-Galeńska, K., **Piliszek, A.**, Modliński, J.A. (2017) From blastomeres to somatic cells: reflections on cell developmental potential in light of chimaera studies – a review. **Animal Science Papers and Reports** vol. 35 no. 3, 225-240.
-

Transgeniczne linie reporterowe są świetnym narzędziem do analizy rozwoju ssaków. Pod kierunkiem dr A-K. Hadjantonakis analizowałam linię myszy TCF/Lef:H2B-GFP, która jest reporterem szlaku sygnałowego Wnt/ β -kateniny. Wykorzystanie fluorescencyjnych linii reporterowych zostało również omówione w przeglądowym rozdziale monografii, także przygotowanej wspólnie z zespołem dr Hadjantonakis.

11. Ferrer-Vaquer, A., **Piliszek, A.**, Tian, G., Aho, R.J., Dufort, D., Hadjantonakis, A.-K. (2010) A sensitive and bright single-cell resolution live imaging reporter of Wnt/ β -

catenin signaling in the mouse. **BMC Developmental Biology** Dec 21;10:121.

12. Nowotschin, S., Garg, V., **Piliszek, A.**, Hadjantonakis, A.K. (2019) Ex utero culture and live imaging of mouse embryos. W: Vertebrate Embryogenesis. **Methods in Molecular Biology** 1920:163-182, Ed. F.J. Pelegri.

Linia endodermy proksymalnej (lub e. trzewnej, ang. Visceral Endoderm, VE) to jedna z linii komórkowych wywodzących się bezpośrednio z endodermy pierwotnej (PrE). Badania w których brałam udział wykazały, że szlak sygnałowy BMP4 jest w stanie indukować epitelializację komórek XEN (extraembryonic endoderm), powodując fenotyp zbliżony do pozazarodkowej VE.

13. Artus, J., Douvaras, P., **Piliszek, A.**, Isern, J., Baron, M.H., Hadjantonakis A.-K. (2012) BMP4 signalling directs primitive endoderm-derived XEN cells to an extraembryonic visceral endoderm identity. **Developmental Biology**, Jan 15;361(2):245-62.

Kolejna praca wykonana w laboratorium dr Hadjantonakis prezentuje rolę Eomesoderminy w indukcji i migracji AVE (Anterior Visceral Endoderm). Wykazaliśmy, że indukcja AVE wymaga aktywności genu *Eomes*, i dodatkowo związana jest z aktywnością genu *Lhx1*.

14. Nowotschin, S., Costello, I., **Piliszek, A.**, Kwon, G.S., Mao, C.A., Klein, W.H., Robertson, E.J., Hadjantonakis, A.K. (2013) The T-box transcription factor Eomesodermin is essential for AVE induction in the mouse embryo. **Genes & Development** 27 (9), 997-1002.

Główną tematyką moich badań, przedstawionych przede wszystkim w osiągnięciu habilitacyjnych, jest różnicowanie linii endodermy pierwotnej i epiblastu w zarodkach ssaków. W pracy Kang i wsp. 2013 (niewchodzącej w skład osiągnięcia), przedstawiliśmy analizę wpływu czynnika FGF4 na rozwój zarodków mysich, poprzez analizę rozwoju zarodków *Fgf4*^{-/-}. Zarodki tej linii rozwijają się do stadium blastocysty, ale są pozbawione linii PrE, co wskazuje na niezbędność FGF4 w rozwoju PrE. Oprócz pracy badawczej, opublikowałam również kilka prac przeglądowych odnoszących się do tej tematyki

15. Kang, M., **Piliszek, A.**, Artus, J., Hadjantonakis, A.K. (2013) FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. **Development** 140 (2), 267-79.
 16. Praca przeglądowa: Schrode, N., Xenopoulos, P., **Piliszek, A.**, Frankenberg, S., Plusa, B., Hadjantonakis, A.K. (2013) Anatomy of a blastocyst: cell behaviors driving cell fate choice and morphogenesis in the early mouse embryo. **Genesis** 51 (4), 219-33.
 17. Praca przeglądowa: **Piliszek, A.**, Grabarek, J., Frankenberg, S., Plusa, B. (2016) Cell fate in animal and human blastocysts and the determination of viability" **Mol Hum Rep** 22(10):681-690.
 18. Praca przeglądowa: Madeja, Z.E , Pawlak, P., **Piliszek, A** (2019) Beyond the mice: non-rodent animal models for study of early mammalian development and biomedical research. **International Journal of Developmental Biology** 63: 187 – 201
-

Praca dotycząca potencji rozwojowych selektywnie enukleowanych zygot jest wynikiem współpracy z prof. J.A. Modlińskim i dr P. Grędą. Wykazaliśmy, że selektywnie enukleowane zygoty mogą być biorcami jąder nawet z zarodków 16-komórkowych. Zarodki takie są w stanie rozwinąć się aż do urodzenia.

19. Greda, P., Modlinski, J. A. , **Piliszek, A.** (2015) Developmental potential of selectively enucleated mouse zygotes reconstituted with embryonic cell, embryonic stem cell and somatic cell nuclei. **Animal Science Papers and Reports** 33(4), 323-336.
-

Praca Filimonow i wsp., 2019, powstała we współpracy wielu ośrodków, m.in. Uniwersytetu Warszawskiego i Uniwersytetu w Manchesterze. Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać m.in., że zmiany poziomu ekspresji kadheryny E mogą się wiązać ze zjawiskiem EMT (przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej) w pochodnych endodermy pierwotnej (PE)

20. Filimonow, K., Saiz, N., Suwińska, A., Wyszomirski, T., Grabarek, J.B., Ferretti, E., **Piliszek, A.**, Plusa, B., Maleszewski, M. (2019) No evidence of involvement of E-cadherin in cell fate specification or the segregation of Epi and PrE in mouse blastocysts. **PLoS One**. 8;14(2):e0212109.

