



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii  
Instytut Zoologii, Zakład Embriologii  
dr hab. Anna Ajduk



Warszawa, 14.10.2019 r.

## **Recenzja osiągnięcia habilitacyjnego oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr Anny Piliszek w związku z postępowaniem habilitacyjnym**

### **Sylwetka habilitantki**

Dr Anna Piliszek od początku swojej kariery naukowej związana jest z tematyką wczesnego rozwoju zarodkowego ssaków. Pracę magisterską z biologii w zakresie biologii ogólnej obroniła na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w 2001 r. Praca ta została wykonana opieką prof. A. K. Tarkowskiego i dotyczyła roli acetylacji histonów w regulacji transkrypcji w pierwszym cyklu komórkowym mysich zarodków. Następnie, rozpoczęła studia doktoranckie w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN (IGiHZ PAN) w Jastrzębcu, gdzie w 2006 r. uzyskała stopień doktora nauk rolniczych w zakresie zootechniki za rozprawę pt. „Możliwości powstawania chimeryzmu pomiędzy bruzdkującymi zarodkami myszy a komórkami płodowymi”. Promotorem tej pracy był prof. Jacek A. Modliński. Ponieważ mobilność międzynarodowa wciąż nie jest regułą, nawet w karierze młodych naukowców, szczególnie warty podkreślenia i pochwały jest podoktorski staż habilitantki wykonany w Sloan Kettering Institute w Nowym Jorku (USA). Dr Piliszek pracowała tam w świetnej grupie kierowanej przez prof. A.-K. Hadjantonakis, gdzie kontynuowała badania związane z przedimplantacyjnym rozwojem zarodków ssaków (na modelu mysim) ze szczególnym uwzględnieniem molekularnych mechanizmów różnicowania pierwotnej endodermy, jednej z pierwszych powstających w zarodku linii komórkowych. 3 z 5 prac zgłoszonych do osiągnięcia habilitacyjnego pochodzą właśnie z tego okresu. Po ukończeniu stażu, dr Piliszek wróciła do IGiHZ PAN, gdzie pracuje jako adiunkt w Zakładzie Embriologii Doświadczalnej. Po powrocie zdecydowała się na rozszerzenie swoich badań o mechanizmy rządzące różnicowaniem pierwszych linii zarodkowych w przedimplantacyjnych zarodkach królika. Zmiana organizmu modelowego była krokiem odważnym, gdyż procedury hodowli i manipulacji zarodkami królika są znacznie słabiej dopracowane niż w przypadku myszy, ale tym bardziej godnym uznania. Poszerzenie naszej wiedzy o mechanizmy kierujące rozwojem zarodka u ssaków innych niż mysz

jest szalenie ważne, ponieważ coraz więcej danych wskazuje, że rozwój zarodkowy myszy pod wieloma względami różni się od rozwoju zarodkowego innych gatunków, w tym zwierząt hodowlanych i człowieka.

### **Ocena osiągnięcia habilitacyjnego**

W zakres osiągnięcia habilitacyjnego wchodzi 5 prac: 3 oryginalne opublikowane w bardzo dobrych czasopiśmie zajmujących się tematyką biologii rozwoju (*Development*, *Developmental Biology*) oraz 2 przeglądowe (w tym jedna w formie rozdziału w książce). Łączny IF tych publikacji wynosi ok. 19.4, łączna liczba punktów MNiSW – 155, a łączna liczba cytowań (na dzień złożenia dokumentacji): 398 (w tym jedna z prac jest cytowana 269 razy). Habilitantka we wszystkich tych pracach jest pierwszym autorem (lub współautorem), dodatkowo w 3 pełni też funkcje autora korespondencyjnego. Jej wkład w powstanie tych prac waha się od 30 do 90% i polegał na zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń (lub ich części), analizie ich wyników i przygotowaniu manuskryptu (w przypadku prac oryginalnych) lub opracowaniu koncepcji pracy i przygotowaniu manuskryptu (w przypadku prac przeglądowych). W przypadku jednej z prac, badania zostały sfinansowane z grantu uzyskanego przez habilitantkę.

W autoreferacie habilitantka poprzedziła opisy poszczególnych prac osiągnięcia krótkim wstępem, a następnie każdą z prac przedstawiła osobno, w kolejności chronologicznej. Streszczenia poszczególnych prac były bardzo obszerne i wyczerpujące, ale zabrakło mi przedyskutowania wyników opisanych w poszczególnych pracach w kontekście współczesnej literatury – niektóre z publikacji zaliczonych do osiągnięcia pochodzą sprzed 8-11 lat i jestem ciekawa, jak habilitantka ocenia przedstawione w nich wyniki z perspektywy czasu, czy zostały jej zdaniem pozytywnie zweryfikowane. czy / jak jej zdaniem przyczyniły się one do późniejszych odkryć. Myślę, że takie przedstawienie osiągnięcia podkreśliłoby dojrzałość naukową habilitantki. Uwaga ta nie zmienia jednak mojej wysokiej i pozytywnej oceny poszczególnych prac wchodzących w skład osiągnięcia.

W pierwszej pracy (Plusa *et al.*, 2008) habilitantka wraz ze współautorami przeanalizowała za pomocą barwień immunofluorescencyjnych oraz filmowania poklatkowego żywych zarodków sposób, w jaki dochodzi do wyróżnicowania w mysich blastocystach linii epiblastu i endodermy pierwotnej. Po raz pierwszy pokazała, że na stadium moruli i wczesnej blastocysty poszczególne blastomery często ekspresują jednocześnie molekularne markery epiblastu i endodermy pierwotnej i dopiero wraz z rozwojem blastocysty komórki podtrzymują syntezę markerów jedynie jednej linii, wyciszając ekspresję markerów drugiego typu. Dodatkowo, opisała jakie mechanizmy (np. bierne i czynne przemieszczanie się komórek, apoptoza) biorą udział w ostatecznej segregacji komórek epiblastu i endodermy pierwotnej. Żałuję, że w analizie danych autorzy zdecydowali się na

obliczanie częstości ekspresji badanych genów czy występowania badanych zjawisk poprzez stosunek wszystkich komórek pozytywnych pod danym względem do wszystkich komórek przebadanych. To zbyt uproszczenie niepokazujące ewentualnego zróżnicowania między zarodkami. Częstość ekspresji/zjawiska powinna być obliczana osobno dla każdego zarodka, a następnie uśredniana z podaniem odchylenia standardowego (lub mediany i Q1, Q3). Ta sama uwaga dotyczy też pracy trzeciej (Artus *et al.*, 2011) i piątej (Piliszek *et al.*, 2017), więc nie będę jej już powtarzać przy ich omawianiu. Nie zmienia to jednak faktu, że praca Plusa *et al.* (2008) jest bardzo ciekawa. Oprócz niewątpliwych wartości poznawczych, ma ona także ważny wymiar praktyczny. Wprowadza bowiem nowe narzędzie badawcze – myszy transgeniczne ekspresujące histon H2 skoniugowany z GFP pod promotorem *Pdgfra*. Myszy te są do tej pory wykorzystywane w badaniach dotyczących endodermy pierwotnej przez wiele grup. Osobiście uważam, że zademonstrowanie przydatności tej linii myszy było znacznie ważniejsze od „faworyzowanej” przez habilitantkę metody oznaczania stadium rozwojowego zarodków myszy w odniesieniu do liczby ich komórek. Wiele zespołów zaobserwowało, że zarodki izolowane w tym samym czasie *post coitum* różnią się od siebie stadium rozwojowym, i równolegle zaczęło posługiwać się liczbą komórek zarodka do dokładnego określenia stadium zarodka. Nie wykluczam jednak, że to właśnie w pracy habilitantki metoda ta po raz pierwszy została opisana i opublikowana. Podkreślić też należy, że była to jedna z pierwszych prac stosująca, jako kluczową część metodyki, filmowanie poklatkowe żywych zarodków myszy ekspresujących wyznakowane fluorescencyjnie białka. Wtedy było to wciąż pionierskie podejście, dziś ta technika to podstawa badań nad wczesnym rozwojem zarodkowym zwierząt.

Druga praca (Piliszek *et al.*, 2011) ma charakter metodologiczny i zawiera dokładny opis procedur izolowania, hodowli *in vitro* i obrazowania przyżyciowego przed- i poimplantacyjnych zarodków myszy. To cenna publikacja, gdyż przekazuje praktyczną wiedzę wraz ze zwykle pilnie strzeżonymi tajnikami metodyki eksperymentalnej szerokiemu kręgowi czytelników i pozwala innym zespołom na rozszerzenie ich warsztatu doświadczalnego. Nie jest jednak dla mnie jasne, jaki był udział habilitantki w opracowywaniu opisanych metod wizualizacji.

Trzecia praca (Artus *et al.*, 2011) zawiera dane dotyczące profilu ekspresji czynników transkrypcyjnych SOX17 i SOX 7 oraz ich funkcji w różnicowaniu endodermy pierwotnej w blastocystach myszy. Habilitantka wraz ze współautorami demonstruje, że SOX 17 jest dość późno pojawiającym się w różnicowaniu pierwotnej endodermy markerem; podobnie SOX 7, który pojawia się tylko w całkowicie zróżnicowanych i wysegregowanych komórkach pierwotnej endodermy. Ponadto, autorzy udowadniają, że SOX 17 nie jest niezbędny do prawidłowego uformowania w zarodku endodermy pierwotnej. Praca jest ciekawa i pokazuje jak skomplikowane

są mechanizmy regulujące różnicowanie pierwszych linii komórkowych w zarodku – nawet białko (jak SOX 17), którego ekspresja świetnie koreluje z pojawieniem się różnicujących w stronę endodermy pierwotnej komórek, nie musi być koniecznym elementem tego mechanizmu. Co więcej, praca ta dodała do listy potencjalnych markerów pierwotnej endodermy dwa nowe białka, z których szczególnie SOX 17 jest obecnie chętnie używane przez zespoły zajmujące się podobną tematyką.

W czwartej pracy (Piliszek *et al.*, 2017) habilitantka „porzuca” model myszy i po raz pierwszy pokazuje, jak przebiega różnicowanie linii endodermy pierwotnej i epiblastu w zarodkach królika, oraz analizuje różnice w regulacji i przebiegu tego procesu w stosunku do zarodków myszy. To jest naprawdę pionierska praca, zasługująca na uznanie. Odejście od „bezpiecznego” modelu myszy to odważna decyzja, pokazująca, że habilitantka nie boi się stawiania trudnych pytań i obierania ryzykownych ścieżek badawczych. Nie chodzi tu tylko o to, że procedury pracy z zarodkami królika są słabiej dopracowane niż w przypadku myszy, ale i o fakt, że niezwykle trudno jest przekonać wpierw grantodawców a następnie redaktorów czasopism naukowych o potrzebie badania mechanizmów poznanych już dla myszy w innych ssaczych organizmach modelowych. Habilitantce udało się ich przekonać – dostała grant NCN na realizację przedstawionych w pracy badań, a następnie opublikowała ww. pracę w bardzo dobrym czasopiśmie. Dzięki temu możemy się dowiedzieć, że oprócz wielu podobieństw istnieją i znaczące różnice między sposobem regulacji powstawania pierwotnej endodermy w zarodkach królika i myszy. Np. zaobserwowano, że we wczesnych etapach różnicowania linii epiblastu i pierwotnej endodermy w zarodkach królika nie bierze udziału mechanizm wzajemnej inhibicji ekspresji białek NANOG i GATA6. Dodatkowo wykazano, że w zarodkach królika, aktywność ścieżki ERK jest niezbędna do prawidłowego różnicowania w kierunku pierwotnej endodermy (jak u myszy), ale jej zablokowanie jest niewystarczające do wywołania różnicowania w kierunku epiblastu (inaczej niż u myszy). Praca ta ma także ważny aspekt metodologiczny: habilitantka proponuje w niej system opisujący kolejne stadia rozwojowe zarodka królika oparty na liczbie komórek zarodka (rundach podziałowych).

Piąta praca (Piliszek i Madeja, 2018) stanowi bardzo ciekawy i obszerny przegląd obecnej wiedzy na temat mechanizmów regulujących przedimplantacyjny rozwój zarodków różnych gatunków ssaków – myszy, królików, zwierząt hodowlanych. Habilitantka wraz ze współautorką porusza temat aktywacji genomu zarodkowego, metabolizmu zarodka i różnicowania pierwszych linii komórkowych. Autorki analizują podobieństwa i różnice w przebiegu tych procesów u różnych gatunków i starają się je powiązać z rozmiarami zarodków, typem implantacji czy długością okresu przedimplantacyjnego.

Reasumując, uważam, że prace tworzące osiągnięcie habilitacyjne dr Piliszek tworzą spójny tematycznie cykl, który wnosi oryginalny i wartościowy wkład w rozwój naszej wiedzy na temat wczesnego rozwoju zarodkowego ssaków. Oprócz niewątpliwych wartości poznawczych, prace te mają też istotny aspekt praktyczny: powiększyły warsztat badawczy biologii rozwoju o nową linię reporterową myszy, nowe markery endodermy pierwotnej czy nowy system klasyfikowania poszczególnych stadiów rozwojowych zarodka królika. Osiągnięcie habilitacyjne dr Piliszek przyczyniło się nie tylko do postępu naukowego w biologii rozwoju, ale i w zootechnice. Jej prace pozwalają lepiej zrozumieć rozwój zarodkowy ssaków, co jest niezbędne do opracowania skutecznych metod wspomaganego rozrodu zwierząt. W tym kontekście na podkreślenie zasługuje zmiana modelu badawczego stosowanego przez habilitantkę, z myszy na królika, którego rozwój zarodkowy bardziej przypomina rozwój innych zwierząt hodowlanych. Podsumowując, oceniam osiągnięcie habilitacyjne dr Anny Piliszek bardzo wysoko i uważam, że spełnia ono wszystkie wymogi dzieła stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika.

### **Ocena dorobku naukowego habilitantki**

Na dorobek naukowy habilitantki składa się, oprócz 5 prac wymienionych w osiągnięciu habilitacyjnym, 9 prac oryginalnych i 5 przeglądowych opublikowanych w czasopismach z listy JCR o zróżnicowanej randze w reprezentowanej dyscyplinie (IF wahającym się od 0.285 do ok. 6.2, czasopisma z Q1-Q3). W 2 pracach jest ona pierwszym autorem, w jednej – korespondencyjnym. Dodatkowo, dr Piliszek jest też współautorką 2 prac przeglądowych i 2 oryginalnych opublikowanych w czasopismach spoza listy JCR (wszystkie przed uzyskaniem stopnia doktora) oraz 2 prac przeglądowych opublikowanych w formie rozdziału w książce. Jej wkład w publikacje niewchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego polegał zazwyczaj na wykonaniu części doświadczeń (prace oryginalne) lub współudziale w opracowaniu koncepcji pracy (prace przeglądowe) oraz w współudziale w przygotowaniu manuskryptów. Łączny IF prac niewchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego wynosi ok. 48.5 (wszystkich prac wraz z osiągnięciem: ok. 67.9), i były one cytowane 425 razy (wszystkie prace wraz z osiągnięciem: 823), co daje habilitantce indeks Hirscha równy 10. Wszystkie prace habilitantki dotyczą wczesnego rozwoju zarodkowego ssaków, mechanizmów nim rządzących oraz sposobów jego badania. Zagadnienia te są kluczowe nie tylko dla biologii rozwoju, ale i dla zootechniki, jako nauki zajmującej się m.in. optymalizacją technik rozrodu zwierząt. Wskaźniki bibliometryczne kolejnych publikacji w dorobku habilitantki wydatnie świadczą o jej rozwoju naukowym – publikuje ona w

coraz lepszych czasopismach. Praca habilitantki została doceniona w 2009 r. I nagrodą (zespołową) Wydziału Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAN.

Dr Piliszek w czasie swojego doktoratu i stażu podoktorskiego uczestniczyła jako wykonawca w 5 grantach. Należy podkreślić i pochwalić, że po zakończeniu stażu samodzielnie zdobywała fundusze na swoje badania – kierowała/kieruje 2 grantami NCN: Sonata i Sonata Bis. Świadczy to o jej naukowej dojrzałości.

Analizując dorobek naukowy dr Piliszek nie można nie zauważyć, że ma ona wyjątkową zdolność do zadzierzganiania i podtrzymywania współpracy naukowej, zarówno z ośrodkami krajowymi (np. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), jak i zagranicznymi (np. University of Manchester).

Warto również zaznaczyć, że dr Piliszek bardzo aktywnie uczestniczy w międzynarodowym obiegu naukowym: wygłaszała referaty na 5 i prezentowała plakaty na 10 międzynarodowych konferencjach, dodatkowo była współautorką 19 doniesień na konferencje międzynarodowe prezentowanych przez jej kolegów. Co rzadko się zdarza, z dokumentacji habilitantki wynika, że częściej prezentuje ona swoją pracę na spotkaniach międzynarodowych niż krajowych. W czasach, gdy nauka przestała być sprawą lokalną, a stała się globalna, zasługuje to na uznanie. Zaangażowanie habilitantki w umiędzynarodowienie jej wyników badawczych potwierdza fakt, że jest ona członkiem 3 międzynarodowych towarzystw naukowych. Nie oznacza to jednak, że habilitantka pomija w swojej aktywności upowszechniającej wyniki badań środowisko krajowe. Jest ona aktywnym członkiem Towarzystwa Biologii Rozrodu, uczestniczy w zjazdach Towarzystwa, a także działa w jego warszawskim oddziale.

Podsumowując, uważam, że dorobek naukowy dr Anny Piliszek z nawiązką spełnia wymogi stawiane kandydatowi do stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika. Na szczególne uznanie zasługuje fakt, że jest ona naukowcem rozpoznawalnym międzynarodowo – w czasie stażu podoktorskiego pracowała w bardzo dobrym ośrodku zagranicznym, prowadzi aktywną współpracę międzynarodową, często uczestniczy w konferencjach międzynarodowych, publikuje w uznanych czasopismach z listy JCR.

### **Ocena dorobku dydaktycznego, popularyzatorskiego i organizacyjnego habilitantki**

Jak na osobę pracującą w instytucie PAN, a zatem nieposiadającą obowiązków dydaktycznych typowych dla pracowników uczelni, dr Piliszek bardzo aktywnie angażuje się w działalność szkoleniową. Wielokrotnie prowadziła różnego typu warsztaty dotyczące technik pracy z zarodkami ssaków, a także przygotowywała i prowadziła wykłady dla studentów wybranych uczelni rolniczych dotyczące rozwoju zarodkowego ssaków. Dodatkowo przygotowała oraz

prowadziła zajęcia dotyczące technik pracy z zarodkami ssaków dla słuchaczy studium doktoranckiego KNOW „Zdrowe zwierzę – bezpieczna żywność”. Habilitantka opiekowała się również 9 stażystami (studentami i absolwentami różnych uczelni wyższych) i pełniła/pełni rolę promotora pomocniczego w 4 przewodach doktorskich.

Habilitantka chętnie zajmuje się również popularyzacją nauki. Tu na szczególne uznanie zasługuje jej zaangażowanie w prowadzenie różnorodnych zajęć, w tym praktycznych, dla uczniów szkół średnich. W dokumentacji habilitacyjnej wyliczono 13 takich wydarzeń w ostatnich 7 latach.

Habilitantka wykazała się także osiągnięciami organizacyjnymi. Brała czynny udział w powstaniu Visegrad Group Society for Developmental Biology (V4SDB) oraz w organizacji pierwszej konferencji tego towarzystwa (Brno, 2018 r.). Od 2016 r. kieruje Laboratorium Mikroskopii Fluorescencyjnej i Konfokalnej w IGiHZ PAN. Także od 2016 r. jest członkiem Zespołu Doradczego ds. Dobrostanu Zwierząt w IGiHZ PAN. Już drugą kadencję reprezentuje niesamodzielnych pracowników naukowych w Radzie Naukowej IGiHZ PAN.

Podsumowując, uważam, że dorobek dydaktyczny, popularyzatorski i organizacyjny dr Anny Piliszek w zupełności spełnia wymogi stawiane kandydatowi do stopnia doktora habilitowanego. Na szczególną pochwałę zasługuje tu fakt ogromnego zaangażowania habilitantki w działalność szkoleniowo-popularyzacyjną: przygotowywanie zajęć dla studentów i uczniów szkół średnich. Moim zdaniem, bardzo ważnym wkładem w integrację środowiska naukowego zajmującego się rozwojem zarodkowym zwierząt jest też zaangażowanie habilitantki w powstanie V4SDB i organizacja założycielskiej konferencji tego towarzystwa.

### **Wniosek końcowy**

Reasumując, wysoko oceniam zarówno osiągnięcie habilitacyjne, jak i dorobek naukowy, dydaktyczny, popularyzatorski i organizacyjny dr Anny Piliszek. Biorąc pod uwagę wszystkie przytoczone przeze mnie argumenty uważam, że spełnia ona wymogi stawiane kandydatom do otrzymania stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika w świetle Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. Ust. nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i popieram wniosek o nadanie jej stopnia doktora habilitowanego. Jednocześnie wnoszę o nagrodzenie jej osiągnięcia stosownym wyróżnieniem.

