

# Autoreferat

## 1. Imię i nazwisko

Marcin Gołębiowski

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

magister biologii, specjalność biologia molekularna – Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Warszawa, 1999

doktor nauk biologicznych, specjalność biochemia - Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa, 2005. Tytuł rozprawy: „*Complete nucleotide sequence of pCTX-M3 plasmid and analysis of its genes responsible for conjugational transfer*”. Promotor: doc. dr hab. Piotr Ceglowski, po Jego śmierci prof. dr hab. Jacek Bardowski

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

03/2006 – obecnie – Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Toruń, adiunkt

01-12/2011 – Instytut Oceanologii PAN, Sopot, bioinformatyk

01/2005-03/2006 – Zakład Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, asystent

09-12/1999 – Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa, biolog

## 4. Wskazanie osiągnięcia 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:

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

### Masywne sekwencjonowanie amplikonów genów małej podjednostki rybosomu jako metoda analizy zbiorowisk mikroorganizmów w środowisku

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

Prezentowane osiągnięcie naukowe składa się z cyklu trzech publikacji eksperymentalnych i jednej przeglądowej opublikowanych w czasopismach z listy JCR. Ich sumaryczny Impact Factor z roku opublikowania wynosi **12,152**, natomiast liczba cytowań wg Web of Science wynosi **100** (stan na 6 września 2019). Liczba punktów MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **240**, natomiast zgodnie z rokiem opublikowania, ale bez uwzględnienia nowej punktacji 135.

**Gołębiowski M**, Deja-Sikora E, Cichosz M, Tretyn A, Wróbel B. 2014. 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy-metals polluted soils. *Microb Ecol*, 67(3): 635-647. doi: 10.1007/s00248-013-0344-7. IF<sub>2014</sub>=2,973, punkty MNiSW<sub>2014</sub>: 35, liczba cytowań wg WoS: 94.

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu większości eksperymentów, całości analiz bioinformatycznych i

statystycznych oraz przygotowaniu manuskryptu. Swój udział szacuję na 80%.

**Gołębiewski M**, Całkiewicz J, Creer S, Piwosz K. 2017. Tideless estuaries in brackish seas as a possible freshwater-marine transition zones for bacteria – the case study of the Vistula estuary. *Env Microbiol Rep*, 9(2): 129-143. doi: 10.1111/1758-2229.12509. IF<sub>2016</sub>=2,885, punkty MNISW<sub>2016</sub>: 35, liczba cytowań wg WoS: 5.

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu analiz bioinformatycznych i statystycznych, interpretacji wyników oraz spisaniu manuskryptu. Swój udział szacuję na 45%.

**Gołębiewski M**, Tarasek A, Sikora M, Deja-Sikora E, Tretyn A, Niklińska M. 2019. Rapid successional changes during initial stages of pine litter decomposition. *Microb Ecol*, 77(1): 56-75. doi: 10.1007/s00248-018-1209-x. IF<sub>2016</sub>=3,611, punkty MNiSW<sub>2016</sub>: 35, MNiSW<sub>2019</sub>: 100, liczba cytowań wg WoS: 1.

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, koordynacji wykonania eksperymentów, wykonaniu analiz qPCR oraz analiz bioinformatycznych i statystycznych, interpretacji wyników oraz spisaniu manuskryptu. Swój udział szacuję na 65%.

**Gołębiewski M**, Tretyn A. 2019. Generating amplicon reads for microbial community assessment with next generation sequencing. *J Appl Microbiol*, doi: 10.1111/jam.14380. IF<sub>2016</sub>=2,683, punkty MNiSW<sub>2016</sub>: 30, MNiSW<sub>2019</sub>: 70, liczba cytowań wg WoS: 0.

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy przeglądowej, dokonaniu przeglądu literatury i spisaniu manuskryptu. Swój udział szacuję na 90%.

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

## Wstęp

W swojej działalności naukowej zajmuję się zastosowaniem technik „omicznych” do badania zbiorowisk mikroorganizmów w środowisku oraz zmian ekspresji genów holobiontów w odpowiedzi na bodźce środowiskowe. Cykl publikacji stanowiący osiągnięcie naukowe poświęcony jest zastosowaniu sekwencjonowania ampliconów genów małej podjednostki rybosomu (16S i 18S rRNA) do analizy zbiorowisk mikroorganizmów w środowisku. **Celem osiągnięcia było z jednej strony opracowanie metodologii umożliwiającej badanie mikroorganizmów środowiskowych, a z drugiej odpowiedź na pytanie jakie czynniki środowiskowe wpływają na zbiorowiska mikroorganizmów w różnych środowiskach.**

Szacuje się, że tylko 0,1-50% mikroorganizmów z danego środowiska daje się hodować w warunkach laboratoryjnych, a co za tym idzie, możliwe jest badanie ich metodami tradycyjnej mikrobiologii (np. Steele i Streit, 2005). Z tego względu, możliwość badania organizmów nie dających się hodować jest niezwykle ważna. Analizę organizmów niehodowalnych umożliwia

zespół metod nazywanych metagenomiką (Handelsman i wsp. 1998) metatranskryptomiką (Bashiardes i wsp., 2016) oraz metaproteomiką (Klaassens i wsp., 2007). Opierają się one o analizy molekularne kwasów nukleinowych i białek izolowanych bezpośrednio ze środowiska, bez uprzedniej hodowli mikroorganizmów. Pojawienie się metod sekwencjonowania następnej generacji (NGS – Next Generation Sequencing), dzięki obniżeniu cen, umożliwiło badania mikroorganizmów niehodowalnych (ang. ‘unculturable’) na niespotykaną dotąd skalę. Szybki rozwój metod sekwencjonowania następował równoległe z opracowywaniem metodologii analiz bioinformatycznych. Z jednej strony pojawiały się nowe algorytmy, z drugiej algorytmy te łączono, jak klocki, w zestawy umożliwiające pełne analizy (ang. ‘pipelines’).

Centralne pytania ekologii mikroorganizmów: 'Kto tam jest?' i 'Jaką funkcję pełni?' wymagają innych podejść doświadczalnych. Bezpośrednią odpowiedź na pierwsze pytanie można uzyskać badając fragmenty genów markerowych, takich jak geny RNA małej podjednostki rybosomu (16S i 18S rRNA), natomiast odpowiedź na drugie z pytań wymaga analizy wszystkich genów kodowanych przez organizmy bytujące w badanym środowisku, przy czym na poziomie DNA uzyskujemy informację o potencjalnych funkcjach, natomiast badanie RNA umożliwia stwierdzenie które z nich uległy ekspresji. Inaczej mówiąc, sekwencjonowanie amplikonów genów markerowych jest dobrą metodą do stwierdzenia jakie organizmy żyją w danej próbce, natomiast określenie jakie funkcje mogą one pełnić wymaga zastosowania sekwencjonowania losowych fragmentów DNA (ang. ‘shotgun sequencing’), natomiast określenie, które z nich rzeczywiście zostały wyrażone wymaga z kolei sekwencjonowania losowych fragmentów RNA izolowanego ze środowiska bądź badania białek.

Analiza zbiorowisk mikroorganizmów za pomocą sekwencjonowania amplikonów genów markerowych wymaga wzięcia pod uwagę wielu czynników mogących zaburzyć jej wyniki. Z jednej strony są to kwestie doświadczalne, wymienione powyżej, a z drugiej analiza bioinformatyczna. Niezwykle istotny jest dobór odpowiedniej metodologii do analizowanego problemu – wybór genu markerowego i pary primerów, oraz technologii sekwencjonowania (Gołębiewski i Tretyn, 2019). Poza powyższymi kwestiami, bardzo ważna jest również optymalizacja planowanych eksperymentów.

Wśród czynników eksperymentalnych najbardziej istotne to:

i) projekt eksperymentu - randomizacja, poziom replikacji, długość gradientu badanej zmiennej – wpływają na moc statystyczną, wybór metody sekwencjonowania – determinuje maksymalną długość sekwencjonowanego amplikonu i liczbę otrzymywanych odczytów, a także powoduje konieczność wyboru dopasowanej metodologii obróbki odczytów,

ii) pobranie prób – nieodpowiedni rozmiar próby może spowodować niereprezentatywność, nieprzestrzeganie reżimu czystości może dać w wyniku zanieczyszczone próbki (zanieczyszczenie krzyżowe, ang. ‘cross-contamination’ i zanieczyszczenie zewnętrznymi mikroorganizmami – ang. ‘bioburden’), transport i przechowywanie mogą wywołać zmiany w badanych zbiorowiskach,

iii) izolacja kwasów nukleinowych – niekompletna liza komórek powoduje zmniejszenie proporcji DNA trudnych do zlizowania organizmów, bądź całkowity jego brak,

iv) dobór polimerazy i warunków PCR – wpływa na częstość błędów (substytucji i indeli) i chimer oraz na proporcje poszczególnych wariantów amplikonów (ang. ‘bias’),

v) metodologia przygotowania bibliotek – jeżeli używany jest PCR, możliwe problemy są takie same, jak w punkcie powyżej; inne procedury (np. ligacja adapterów) również mogą powodować powstawanie artefaktów i zmianę proporcji amplikonów w stosunku do proporcji matryc.

Metodologia analiz bioinformatycznych częściowo jest determinowana przez technologię sekwencjonowania i wybór genu markerowego. Ogólnie można analizę bioinformatyczną podzielić na następujące etapy:

- i) odszumianie (ang. 'denoising') i ewentualne składanie odczytów – wpływa na redukcję liczby błędów, dzięki czemu prowadzi do bliższych prawdzie oszacowań różnorodności, zarówno alfa, jak i beta
- ii) dopasowanie sekwencji (ang. 'alignment') – wpływa na konstrukcję Operacyjnych Jednostek Taksonomicznych (Operational Taxonomical Units - OTUs), a co za tym idzie na szacunki różnorodności
- iii) usuwanie chimer – usunięcie artefaktów skutkuje urealnieniem szacunków różnorodności
- iv) konstrukcja OTU – wpływa na obserwowaną różnorodność
- v) klasyfikację sekwencji – przypisanie im najbardziej prawdopodobnej pozycji taksonomicznej, umożliwia rekonstrukcję składu badanych zbiorowisk

W środowisku ekologów molekularnych zajmujących się mikroorganizmami istnieje coraz większa świadomość konieczności prowadzenia analiz w sposób z jednej strony minimalizujący ryzyko uzyskania zafałszowanych wyników, a z drugiej, umożliwiający porównywanie wyników wygenerowanych w różnych laboratoriach. Ze świadomości tej wynika rosnący nacisk na standaryzację procedur, zarówno laboratoryjnych, jak i bioinformatycznych oraz na umieszczanie w publicznych bazach danych nie tylko sekwencji, ale również metadanych obejmujących wszystkie aspekty eksperymentu, od pobierania prób, przez izolację kwasów nukleinowych, przygotowanie bibliotek, do sekwencjonowania.

Wiadomym jest, że sekwencjonowanie amplikonów genów markerowych może być stosowane do badania mikroorganizmów z dowolnego środowiska w którym one występują. Jednak każde z nich (środowisk) ma swoje cechy szczególne, które powodują, że niezbędna jest optymalizacja zarówno procedur eksperymentalnych (przede wszystkim izolacji kwasów nukleinowych i przygotowania biblioteki do sekwencjonowania), jak i bioinformatycznych. Chodzi tu o różne właściwości fizykochemiczne środowiska oraz różnice w gęstości zasiedlenia (liczbie komórek na jednostkę masy/objętości środowiska) i składzie zbiorowisk mikroorganizmów. Dlatego też osiągnięcie założonego celu naukowego wymagało przebadania różnorodnych środowisk. W prezentowanym cyklu publikacji badano glebę w różnym stopniu zanieczyszczoną metalami ciężkimi, wody rzeczne i słonawe oraz ściółkę leśną.

## **Omówienie wyników**

### **1. Publikacja „16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy-metals polluted soils”**

Jest to pierwsza publikacja, w której zająłem się badaniem wpływu czynników środowiskowych (metali ciężkich) na różnorodność mikroorganizmów. W badaniach użyto technologii pirosekwencjonowania firmy 454 (przejętej przez Roche) do badania zbiorowisk bakterii w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi z okolic Olkusza i Alwerni. Sekwencjonowano fragment V3-V4 bakteryjnego genu 16S rRNA (para primerów B356f, B786r) amplifikowany na matrycy DNA metagenomowego izolowanego z próbek gleb. Dzięki opracowaniu ulepszonej wersji primera B786r udało się stworzyć system, który, jak wskazują

analizy bioinformatyczne, powinien efektywnie namnażać sekwencje powyżej 90% bakterii których 16S rRNA obecne jest w najnowszej wersji bazy SILVA i obejmuje badany region. Opracowano również metodologię analiz bioinformatycznych umożliwiającą obróbkę wyników pirosekwencjonowania. Chciałbym podkreślić, że w metodologii tej po raz pierwszy wzięto pod uwagę problem możliwego zafałszowania wartości estymatorów różnorodności z powodu jednokrotnego próbkowania (ang. 'rarefying'/'subsampling'), koniecznego do ich porównywania. Opracowałem metodologię uśredniania macierzy OTU, co umożliwia lepsze oszacowanie różnorodności, dzięki uśrednieniu losowych fluktuacji liczebności poszczególnych OTU. Zbliżoną metodologię niezależnie i w tym samym czasie opracował również zespół dra Patricka Schlossa z Uniwersytetu Stanu Michigan, została ona później włączona do popularnego programu MOTHUR. Opracowałem również ulepszoną definicję tzw. "podstawowego mikrobiomu" (ang. 'core microbiome'), czyli zestawu organizmów, o których sądzimy na podstawie ich powszechności, że pełnią najistotniejszą rolę w badanych zbiorowiskach. Definicja ta zakłada, że oprócz powszechności, ze względu na możliwość wystąpienia błędnego przypisania odczytów do próbek i innych artefaktów, należy zaliczać do podstawowego mikrobiomu te OTU, które stanowią mniej więcej taką samą frakcję zbiorowiska we wszystkich próbkach. Ma to szczególne znaczenie w przypadku, kiedy liczba sekwencji na próbkę nie jest wysoka.

Stwierdzono, że w badanych glebach stężenie cynku było najistotniejszym czynnikiem determinującym zarówno różnorodność bakterii jak i skład zbiorowiska, podczas gdy inne metale (przede wszystkim ołów i kadm) nie wpływały istotnie na te parametry. Prawdopodobnie wynik ten spowodowany był różnicą stężeń i toksyczności analizowanych metali. Nie zaobserwowano również korelacji między różnorodnością zbiorowiska roślinnego, a bakteryjnego. Oba powyższe fakty mogły być spowodowane zbyt małą mocą statystyczną, dlatego wyniki te należy traktować z ostrożnością. Niestety, nie było w owym czasie możliwości zbadania większej liczby próbek.

W glebie o najwyższym stężeniu Zn alfa różnorodność bakterii była najniższa, obserwowano również znacząco mniej promieniowców i alfa proteobakterii, natomiast liczba odczytów gamma proteobakterijnych była najwyższa. Prawdopodobnie stężenia innych metali (Cd i Pb) były zbyt niskie, aby można było stwierdzić ich wpływ przy niewielkiej liczbie prób. Zidentyfikowano tzw. podstawowy mikrobiom badanych próbek. Dla poziomu 97% podobieństwa były to cztery OTU, dwa z nich należały do Alphaproteobacteria (Holospora i Sphingomonas), jedno do Chloroflexi KD4-96, jedno natomiast do Acidobacteria. Dla OTU skonstruowanych przy 90% podobieństwie 'core microbiome' obejmował 21 OTU, w większości należących do Proteobacteria. Pod względem liczby odczytów dominowały natomiast OTU należące do Sphingobacteriales. Fakt, że najliczniejsze OTU nie występują w obu glebach i 'core' OTU są mało liczne, można uznać za przemawiający przeciwko słynnej frazie Beijerincka i Baas Beckinga - "alles is overall, maar het milieu selectert" (wszystko jest wszędzie, ale środowisko selekcjonuje). Należy podkreślić, że w omawianej pracy po raz pierwszy stwierdzono istnienie podstawowego mikrobiomu w próbkach gleby. Z perspektywy czasu, uważam ten wynik za najistotniejszy w tej publikacji. Mimo ograniczeń technologicznych i niedużej liczby badanych próbek, uzyskane wyniki były bardzo ciekawe, co zainspirowało mnie do dalszego zajmowania się tym tematem. Ponieważ była to jedna z pierwszych publikacji przedstawiających kwestię wpływu metali ciężkich na zbiorowiska mikroorganizmów glebowych przy pomocy sekwencjonowania następnej generacji, została ona do dzisiaj zacytowana ponad 90 razy (wg. WoS, stan na 9 września 2019 r.).

Przeprowadzenie badań, których wyniki zostały zamieszczone w opisywanej publikacji pozwoliło mi na opanowanie podstaw warsztatu, zarówno od strony eksperymentalnej, jak i bioinformatycznej, włączając opanowanie języka R i metod ekologii numerycznej. Umiejętności te, później pogłębiane, pozwoliły na stworzenie zespołu zajmującego się molekularną ekologią mikroorganizmów, co zaowocowało współpracą zarówno w obrębie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UMK, jak również z jednostkami zewnętrznymi (UJ, AGH, Morski Instytut Rybacki), wieloma wnioskami o granty (i przyznanymi grantami) oraz publikacjami. Rozwój technik

sekwencjonowania i bioinformatyki wymusił pogłębienie znajomości tematyki, co pozwoliło na kontynuowanie badań i eksplorację innych środowisk.

**Podsumowanie:**

- opracowano własną metodologię analiz bioinformatycznych, umożliwiającą szybką i prostą obróbkę odczytów uzyskanych w technologii pirosekwencjonowania (454) – skrypt w języku bash wywołujący odpowiednie narzędzia z odpowiednimi parametrami,
- cynk, ale nie kadm, czy ołów, jest czynnikiem, który wpływa na różnorodność i strukturę taksonomiczną zbiorowisk bakterii w badanych glebach,
- po raz pierwszy zidentyfikowano mikrobiom podstawowy w zestawie próbek gleb.

**2. Publikacja “Tideless estuaries in brackish seas as a possible freshwater-marine transition zones for bacteria – the case study of the Vistula estuary”**

Kolejnym czynnikiem środowiskowym, którego wpływ na zbiorowiska bakterii badałem było zasolenie. We współpracy z Morskim Instytutem Rybackim w Gdyni zająłem się wpływem zasolenia na zbiorowiska bakterii w środowisku słonawowodnym – estuarium Wisły. Badania obejmowały cztery pory roku i trzy strefy zasolenia: wody rzeczne (0 PSU), strefę mieszania (3-4 PSU) oraz wody Zatoki Gdańskiej (7-8 PSU). Dzięki oparciu analiz na amplifikacji 16S rRNA z cDNA uzyskanego z całkowitego RNA izolowanego z pobranych prób, badano aktywne części zbiorowisk. Amplikony zostały zsekwencjonowane przy użyciu GS-FLX (454, Roche). Metodologia obróbki bioinformatycznej uzyskanych odczytów była rozwinięciem używanej poprzednio. Modyfikacje polegały na dodaniu dodatkowego etapu 'odszumiania' (denoising) oraz trzystopniowym usuwaniu chimer przy pomocy dwóch algorytmów *de novo* (UCHIME i PERSEUS) oraz jednego używającego bazy sekwencji zaufanych (Chimera Slayer). Oprócz tego z danych usunięte zostały sekwencje występujące tylko jedno- i dwukrotnie (tzw. singletony i dubletony), co pozwoliło obniżyć częstość błędów do  $6,28 \times 10^{-5}$  błędu/zasadę. Dzięki niskiej częstości błędów możliwa była konstrukcja tzw. subOTU (konstruowanych przy użyciu progu podobieństwa 99%) z sekwencji składających się na standardowe OTU konstruowane przy użyciu progu podobieństwa 97%.

Stwierdzono, że zasolenie i sezonowość są istotnymi czynnikami kształtującymi zbiorowiska bakterii w badanych wodach, a wpływ zbiorowisk z wód Wisły na wody Zatoki Gdańskiej różni się w zależności od pory roku i jest największy zimą, najmniejszy natomiast latem. Zbiorowiska rzeczne różniły się istotnie od tych w wodach Zatoki, natomiast te w strefie mieszania były zdecydowanie bardziej zbliżone do zbiorowisk rzecznych - nie było między nimi istotnych różnic (PERMANOVA,  $p > 0.05$ ). Potwierdzono również, że różnorodność bakterii nie jest zgodna z krzywą Remane, tj. nie jest najniższa w strefie mieszania, a wręcz odwrotnie, co sugeruje, że wzorce alfa i beta różnorodności mikroorganizmów determinowane są przez inne czynniki, niż w przypadku makroorganizmów. Zastosowanie subOTU pozwoliło stwierdzić, że niektóre populacje bakterii składają się z subpopulacji specyficznych dla określonych warunków (temperatury i zasolenia) niosących różne warianty 16S rRNA, które mogą być sprzężone z cechami umożliwiającymi dostosowanie do konkretnych warunków środowiskowych - można więc powiedzieć, że przyłapałiśmy ewolucję na gorącym uczynku. Zaobserwowano, że do 15% liczby słodkowodnych OTU daje się zaobserwować w próbkach z Zatoki Gdańskiej, co wskazuje na możliwość ich przystosowania się do warunków słonawowodnych. Z drugiej strony, niewielkie podobieństwo zbiorowisk rzecznych i słonawowodnych wskazuje na niską częstość tego typu przystosowań.

Badania, których wyniki przedstawiono w omawianej publikacji pozwoliły mi rozwinąć metodologię bioinformatycznej obróbki odczytów z sekwencjonowania oraz spowodowały konieczność głębszego zrozumienia zagadnień ekologii mikroorganizmów i opanowania nowych technik obliczeniowych stosowanych w tej dziedzinie. Utwierdziły mnie również w przekonaniu, że

dopiero badanie różnorodnych środowisk pozwala z jednej strony rozwinąć warsztat, a z drugiej umożliwia szersze spojrzenie na zjawiska zachodzące w zbiorowiskach mikroorganizmów.

#### **Podsumowanie:**

- udało się opracować metodologię pozwalającą na wykrywanie jednonukleotydowych różnic między sekwencjami odczytów z pirosekwencjonowania,
- czynnikiem determinującym różnorodność i strukturę taksonomiczną zbiorowisk bakteryjnych w estuarium Wisły jest zasolenie oraz sezonowość,
- różnorodność bakterii nie jest zgodna z krzywą Remane, tj. nie jest najniższa w strefie mieszania,
- przypadki przystosowania organizmów słodkowodnych do środowiska słonawowodnego zdarzają się, ale są rzadkie, jednak częstsze, niż przystosowania organizmów słonawowodnych do środowiska rzecznoego,
- niektóre populacje bakterii składają się z subpopulacji specyficznych dla określonych warunków (temperatury i zasolenia) niosących różne warianty 16S rRNA,
- wpływ zbiorowisk rzecznych na zbiorowiska słonawowodne jest największy zimą, a najmniejszy latem.

### **3. Publikacja "Rapid successional changes during initial stages of pine litter decomposition"**

Środowisko leśne jest jednym z najciekawszych i najważniejszych środowisk lądowych – lasy zajmują ok. 30% powierzchni lądów. Dekompozycja zachodząca w ściółce leśnej jest zatem niezwykle istotnym procesem umożliwiającym domknięcie cykli biogeochemicznych i wpływającym na równowagę między węglem uwalnianym do atmosfery, a immobilizowanym, a co za tym idzie, na temperaturę Ziemi. Od strony metodologicznej ściółka, szczególnie z drzew iglastych, stanowi wyzwanie dla metod izolacji DNA, ze względu na dużą zawartość związków polifenolowych, które utrudniają uzyskanie czystych preparatów DNA. Z tego też względu, pierwszym celem badań było opracowanie zoptymalizowanej metodologii izolacji i zbadanie, czy wstępne trawienie enzymami atakującymi ściany komórkowe mikroorganizmów (lizozym, achromopeptydaza, chitynaza) spowoduje zwiększenie ilości izolowanego DNA i różnorodności organizmów obserwowanych w wynikach sekwencjonowania. Drugim celem było zbadanie jak wygląda i jak zmienia się w czasie skład zbiorowisk mikroorganizmów (archeonów, bakterii i eukaryontów) w pierwszych stadiach rozkładu ściółki sosnowej.

Próbki wystandaryzowanej ściółki sosnowej były pakowane w woreczki o 1 mm oczkach siatki (metoda 'litterbags') i inkubowane w lesie, z którego pochodziły przez 3 bądź 8 miesięcy. Z próbek ściółki ( $t_0$  – nieinkubowana,  $t_1$  – 3 miesiące inkubacji,  $t_2$  – 8 miesięcy) izolowano DNA i amplifikowano fragmenty bakteryjnego i archaealnego genu 16S rRNA oraz 18S rRNA. Ponownie zastosowano pirosekwencjonowanie. Wyniki sekwencjonowania uzupełniono o analizy przy użyciu techniki qPCR, pokazujące dynamikę liczebności bakterii i grzybów. Metodologia analiz bioinformatycznych była bardzo podobna, jak w poprzednio omawianej publikacji.

Stwierdzono, że enzymatyczne trawienie ścian komórkowych przed izolacją DNA nie zwiększa ani jego ilości, ani różnorodności genów 16S/18S rRNA, a co za tym idzie nie ma potrzeby uzupełniania procedury o ten etap. DNA sosny jest praktycznie nieobecne już po trzech miesiącach dekompozycji, liczba kopii bakteryjnego genu 16S rRNA jest większa po trzech miesiącach, niż w próbkach nieinkubowanych w lesie, a później się nie zmienia, natomiast liczba kopii grzybowych sekwencji ITS jest wyższa dopiero po ośmiu miesiącach inkubacji. Co interesujące, nie stwierdzono obecności Archaea w badanych próbkach. Zmiany zachodzące w ściółce były bardzo wyraźne, zarówno na poziomie alfa różnorodności (indeks Shannona, równomierność, miary bogactwa gatunkowego), jak i struktury taksonomicznej zbiorowisk, przy czym bakterie zachowywały się inaczej niż eukaryonty. Alfa różnorodność bakterii ( $H'$ ) i

równomierność (E) nie różniły się istotnie w próbkach o różnym stopniu dekompozycji, natomiast miary bogactwa gatunkowego (obserwowana liczba OTU i indeks Chao1) były najwyższe w próbkach t<sub>2</sub>. W przypadku zbiorowisk eukaryotycznych, widoczny był odwrotny trend, tj. bogactwo gatunkowe, równomierność i różnorodność w próbkach ośmiomiesięcznych były najniższe. W zbiorowiskach bakteryjnych dominowały proteobakterie, a eukaryotyczne były zdominowane przez grzyby, jednak w próbkach t<sub>2</sub> znaczący udział miały nicienie z gromady Chromadorea. W obu przypadkach zbiorowiska w nierozłożonej ściółce przypominały te z fyllosfery sosny (Carrell i Frank, 2014; Millberg i wsp., 2015), inkubacja zmieniała jednak ich skład – organizmy typowe dla fyllosfery były zastępowane innymi, typowymi dla danego stadium dekompozycji. Świadczy to o istotnym wpływie składu chemicznego ściółki na zbiorowiska mikroorganizmów, gdyż wiadomo, że skład ten zmienia się w czasie. Bezpośrednio udało się wykryć wpływ cynku i sodu na zbiorowiska bakterii oraz C/N, Zn i Mn na eukaryoty. Bardzo ciekawym wynikiem było stwierdzenie (za pomocą analizy ko-korespondencji - CoCA), że istotnym czynnikiem kształtującym zbiorowiska było oddziaływanie między zbiorowiskami bakteryjnymi a eukaryotycznymi.

Analiza przy pomocy pakietu PICRUST (Langille i wsp., 2013) umożliwiła porównanie potencjalnych możliwości metabolicznych badanych zbiorowisk bakteryjnych. Zaobserwowane zmiany możliwości metabolicznych badanych zbiorowisk są zgodne z powszechnie przyjętym modelem dekompozycji (Berg i Matzner, 1997): najpierw zużywane są drobnocząsteczkowe, łatwo rozpuszczalne związki i łatwo degradowalne polimery takie jak np. amyloza, później zachodzi degradacja celulozy, a po jej wyczerpaniu degradowana jest lignina.

Omawiana publikacja prezentuje wyniki powstałe w (kontynuowanej) współpracy z Instytutem Nauk o Środowisku UJ. Zastosowana metodologia obróbki odczytów jest ostatnim punktem rozwoju technik stosowanych do opracowywania odczytów wygenerowanych w technologii pirosekwencjonowania (454). W omawianej pracy rozwinięta została metodologia analiz ekologicznych, po raz pierwszy zastosowałem metodę analizy ko-korespondencji (Co-Correspondence Analysis; Ter Braak i Schaffers, 2004) do zademonstrowania wpływu zbiorowiska bakteryjnego na eukaryotyczne i vice versa.

#### **Podsumowanie:**

- **Enzymatyczne trawienie ścian komórkowych bakterii i grzybów w trakcie izolacji DNA nie powoduje zwiększenia ilości izolowanego materiału, ani spektrum organizmów, z których ono pochodzi – a zatem nie jest konieczne,**
- **Zmiany zbiorowisk bakteryjnych i eukaryotycznych są szybkie i zgodne z powszechnie przyjętym modelem rozkładu ściółki – organizmy bytujące w fyllosferze są szybko zastępowane przystosowanymi do kolejnych etapów rozkładu,**
- **Stężenia Zn i Na istotnie wpływają na zbiorowiska bakterii, natomiast C/N, Zn i Mn są czynnikami istotnie wpływającymi na zbiorowiska eukaryotów,**
- **Oddziaływania między zbiorowiskami bakterii i eukaryotów wpływają na ich strukturę taksonomiczną.**

#### **4. Publikacja “Generating amplicon reads for microbial community assessment with next generation sequencing”**

Omawiana publikacja jest przeglądem metodologii doświadczalnych stosowanych w sekwencjonowaniu ampliconów genów markerowych. Podsumowuje ona moją wiedzę o tej technice i opisuje jej możliwości oraz możliwe problemy, które często napotyka się w trakcie planowania i wykonywania tego typu badań. Artykuł ten został ograniczony do aspektów doświadczalnych, gdyż objętość pracy obejmującej również kwestie bioinformatyki byłaby tak duża, że nie byłoby możliwości jej opublikowania w żadnym czasopiśmie.

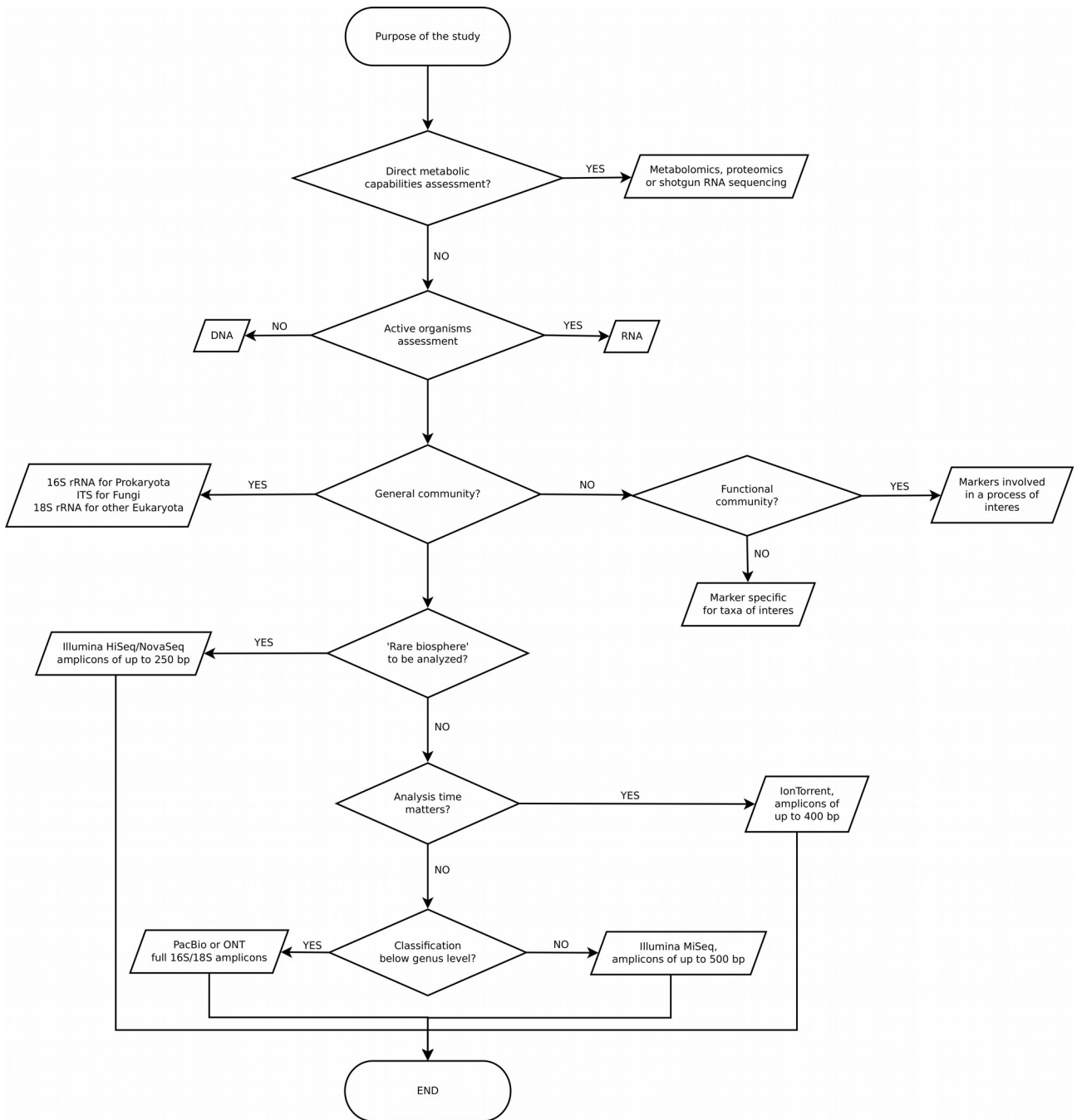


Opracowano schemat umożliwiający racjonalny wybór kluczowych aspektów metodologii (gen markerowy, kwas nukleinowy (DNA czy RNA), technologia sekwencjonowania) na podstawie celu badań (Rys. 1). Podkreślona została istotność poprawnego zaprojektowania całości badania, jako warunku uzyskania sensownych wyników. W szczególności ważna jest tu kwestia poprawnego zdefiniowania powtórzeń biologicznych i technicznych oraz zaplanowania stosownej ich liczby umożliwiającej uzyskanie mocy statystycznej adekwatnej do celu badań. Omówiono również kwestię wyboru odpowiedniej technologii sekwencjonowania w zależności od celu, zwracając uwagę na kwestię długości odczytów, ich liczby oraz kosztu. Obecnie sekwencjonowanie w technologii firmy Illumina na aparacie MiSeq jest optymalne w przypadku projektów obejmujących kilkaset próbek, natomiast większe projekty można bardziej efektywnie zrealizować przy pomocy większych sekwencjatorów tej samej firmy.

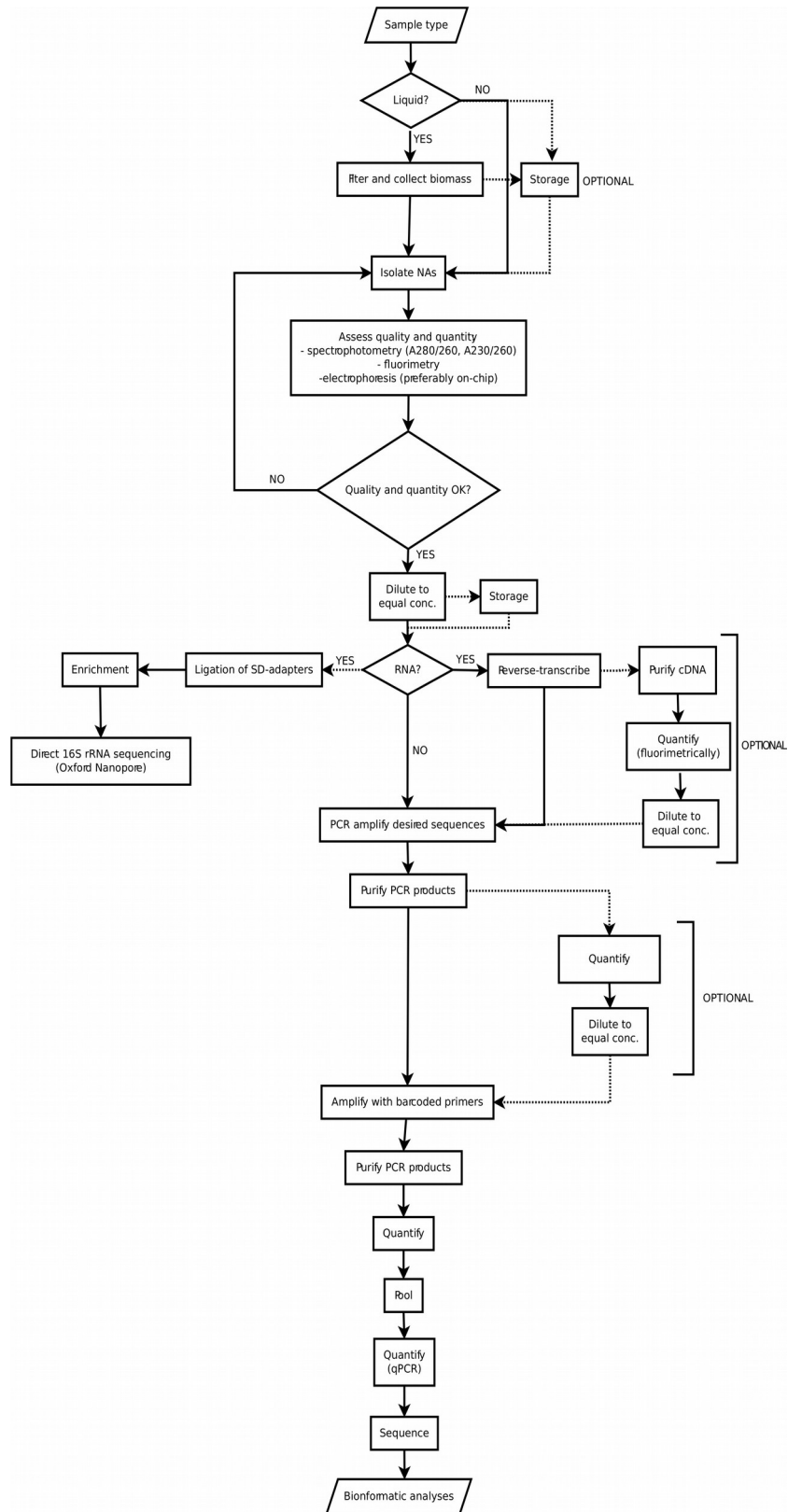
Przedstawiony został ogólny schemat doświadczenia polegającego na analizie zbiorowiska mikroorganizmów w próbkach środowiskowych (Rys. 2) przy pomocy sekwencjonowania amplikonów wraz z informacjami umożliwiającymi optymalizację poszczególnych etapów doświadczenia. Szczególną uwagę poświęcono tutaj możliwym błędom generowanym w trakcie przygotowywania biblioteki: mutacjom punktowym (substytucjom i indelom), chimerym oraz kwestii migracji znaczników umożliwiającym przypisanie odczytów do próbek (ang. 'tag hopping') oraz optymalizacji reakcji PCR, co pozwala ograniczyć ich liczbę. Ograniczenie liczby cykli, dobór właściwego stosunku matrycy do polimerazy i użycie właściwego enzymu (obecnie wydaje się, że KAPA HiFi jest najlepszym wyborem) są kluczowymi czynnikami pozwalającymi kontrolować częstość błędów generowanych w reakcji.

Omówiono kwestię sekwencjonowania wielu bibliotek w jednej reakcji, co wymaga wprowadzenia do bibliotek odpowiednich sekwencji (barkodów, inaczej zwanych MIDami – Molecular Identifiers), które muszą być unikalne dla każdej sekwencjonowanej biblioteki. Przygotowano również schemat prezentujący wybrane metody generowania bibliotek amplikonów (Rys. 3). Obecnie, w dobie powszechnego wykorzystania technologii Illumina, najbardziej ekonomiczną metodą przygotowania bibliotek jest zastosowanie dwóch etapów PCR, co umożliwi analizę tysięcy próbek przy pomocy niewielkiego zestawu primerów barkodujących. Co więcej, ten sam zestaw primerów może być wykorzystywany do wprowadzania barkodów (barkodowania) do wielu rodzajów bibliotek. Metoda ta, uzupełniona o indeksy odczytywane razem z sekwencją badanego genu (ang. 'inline') pozwala na wygenerowanie do miliona bibliotek przy użyciu zestawu 96 barkodów.

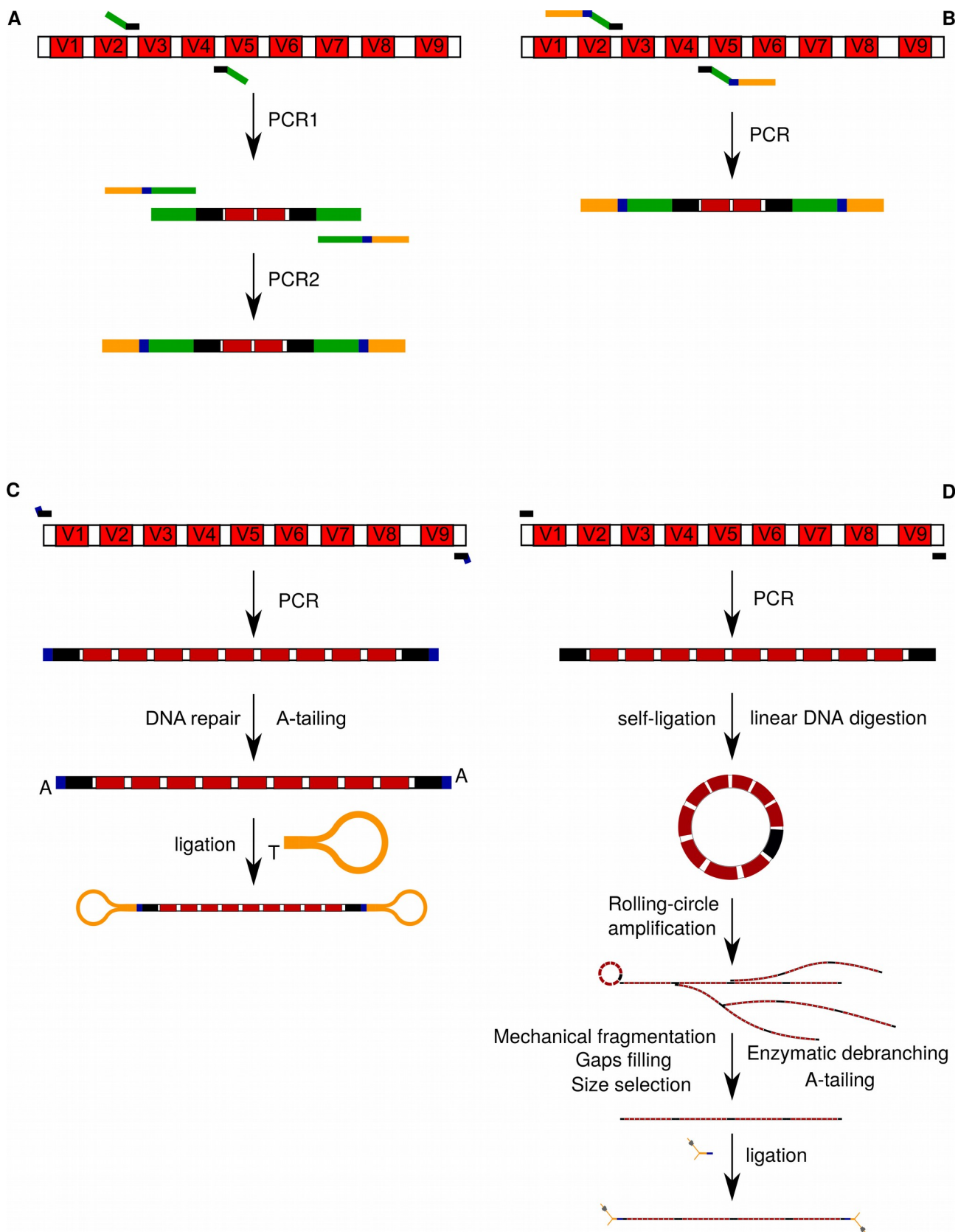
Nakreślone zostały perspektywy rozwoju omawianej techniki, z uwzględnieniem nowych technik sekwencjonowania (Oxford Nanopore - ONT, Pacific Biosciences – PacBio). Wydaje się, że ze względu na obniżenie cen sekwencjonowania przyszłość ekologii mikroorganizmów należy do sekwencjonowania losowych fragmentów metagenomu/metatranskryptomu, jednak jeszcze przez najbliższych kilka lat sekwencjonowanie amplikonów genów markerowych będzie metodą wybieraną w przypadku badań obejmujących bardzo dużą liczbę próbek, czy też kiedy zasoby finansowe są niewielkie. Rozwój technologii sekwencjonowania trzeciej generacji, w szczególności ONT, może spowodować w niedalekiej przyszłości zmianę podejścia z sekwencjonowania krótkich fragmentów (300-500 bp) na całe geny, czy nawet operony.



Rysunek 1. Schemat pozwalający wybrać podejście (sekwencjonowanie typu shotgun vs amplicony), kwas nukleinowy (RNA vs DNA), typ genu markerowego oraz technologię sekwencjonowania i sekwenator. Wybór następuje na podstawie celu badania



Rysunek 2. Schemat doświadczenia polegającego na sekwencjonowaniu ampliconów genu markerowego. Przerwane strzałki wskazują etapy opcjonalne.



Rysunek 3. Schemat wybranych metod konstrukcji bibliotek ampliconów. A) Dwie rundy PCR. B) Jedna runda PCR. C) Ligacja adapterów. D) NanoAmpliSeq, zaadaptowane z Całus i wsp., 2018.

### **Podsumowanie:**

- Opracowano schemat umożliwiający racjonalny wybór kluczowych aspektów metodologii na podstawie celu badań,
- Sekwencjonowanie w technologii firmy Illumina na aparacie MiSeq jest optymalne w przypadku projektów obejmujących kilkaset próbek,
- Najbardziej ekonomiczną metodą przygotowania bibliotek jest zastosowanie dwóch etapów PCR,
- Ograniczenie liczby cykli, dobór właściwego stosunku matrycy do polimerazy i użycie właściwego enzymu (KAPA HiFi) są kluczowymi czynnikami pozwalającymi kontrolować częstość błędów
- Rozwój technologii sekwencjonowania trzeciej generacji, w szczególności ONT, może spowodować w niedalekiej przyszłości zmianę podejścia z sekwencjonowania krótkich fragmentów na całe geny bądź operony.

Podsumowując, chciałbym podkreślić, że udało mi się stworzyć kompletny warsztat umożliwiający badanie mikroorganizmów w różnego typu środowiskach. Warsztat ten obejmuje zarówno techniki laboratoryjne (od poboru prób, przez izolację kwasów nukleinowych i konstrukcję bibliotek do sekwencjonowania), jak i bioinformatyczną obróbkę danych i analizy ekologiczne. Opracowana metodologia posłużyła do zbadania zależności między zbiorowiskami mikroorganizmów a czynnikami mogącymi na nie wpływać w różnorodnych środowiskach. Przedstawione osiągnięcie pokazuje, że mój warsztat badawczy może z powodzeniem być wykorzystywany do badania wielu środowisk, takich jak gleby, wody, czy ściółka leśna. Doświadczenie zgromadzone w trakcie wykonywania doświadczeń zaprezentowanych w osiągnięciu umożliwiło zmianę technologii sekwencjonowania i zwiększenie skali działalności. Kolejne publikacje (nie będące częścią prezentowanego osiągnięcia, krótko opisane niżej) powstały już przy użyciu sekwencjonowania w technologii firmy Illumina.

### **Literatura**

- Steele HL, Streit WR (2005) Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. FEMS Microbiol Lett 247:105–111.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chem Biol 5(10):R245-R249.
- Bashiardes S, Zilberman-Schapira G, Elinav, E (2016) Use of metatranscriptomics in microbiome research. Bioinform Biol Insights 10:19-25.
- Klaassens ES, de Vos W, Vaughan EE (2007) Metaproteomics approach to study the functionality of the microbiota in the human infant gastrointestinal tract. Appl Environ Microbiol 73(4):1388-1392.
- Carrell AA, Frank AC (2014) *Pinus flexilis* and *Picea engelmannii* share a simple and consistent needle endophyte microbiota with a potential role in nitrogen fixation. Front Microbiol 5,

doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00333>

Millberg H, Boberg J, Stenlid J (2015) Changes in fungal community of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles along a latitudinal gradient in Sweden. *Fungal Ecol* 17:126-139.

Ter Braak CJF, Schaffers AP (2004) Co-correspondence analysis: a new ordination method to relate two community compositions. *Ecology* 85(3):834-846.

Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepille DE, Thurber RLV, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C (2013) Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnol* 31: 814-821.

Berg B, Matzner E (1997) Effect of N deposition on decomposition of plant litter and soil organic matter in forest systems. *Environ Rev* 5: 1-25.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych).**

W kręgu moich zainteresowań, oprócz analizy zbiorowisk mikroorganizmów w środowisku, pozostaje również wpływ czynników środowiskowych na transkryptom roślin. Z racji znajomości bioinformatyki i statystyki byłem proszony o pomoc i uczestniczyłem również w powstawaniu publikacji na inne tematy, jednak większość artykułów poświęcona jest pierwszemu z wymienionych zagadnień. Chciałbym podkreślić, że miałem przywilej zaprojektowania wyposażenia większości laboratoriów Zespołu Genomiki Funkcjonalnej w Badaniach Biomedycznych ICNT UMK, dzięki czemu zostałem kierownikiem Laboratorium Metagenomiki działającego w ramach tego Zespołu i mam możliwość korzystania ze sprzętu będącego na wyposażeniu ICNT. Fakt ten pozwala na prowadzenie badań w większości własnymi środkami, dzięki czemu możliwe jest głębsze poznanie stosowanych technik, m. in. sekwencjonowania w technologiach 454 i Illumina, qPCR, cytometrii przepływowej i sortowania komórek, czy mikrodysekcji.

Staram się również zmniejszać koszty badań odtwarzając komercyjne zestawy na podstawie patentów, co jest legalne pod warunkiem niestosowania ich do działalności komercyjnej (Urząd Patentowy RP). W ten sposób np. ograniczyłem koszty izolacji DNA i RNA z próbek środowiskowych o ok. 75%, czy koszty oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych o ok. 90%, również kwantyfikacja bibliotek do sekwencjonowania może być wykonana ponad 50% taniej bez straty dokładności pomiaru. Pracuję obecnie nad optymalizacją protokołu konstrukcji w bibliotek do RNASeq, wydaje się, że czterokrotne zmniejszenie kosztów w stosunku do standardowego protokołu TruSeq RNA Stranded jest możliwe.

Przyszłość swoją wiąże z interdyscyplinarnymi, wielopoziomowymi badaniami środowiskowymi integrującymi metody molekularne (sekwencjonowanie amplikonów, RNA-seq, sekwencjonowanie genomów, proteomikę, qPCR/dPCR, cytometrię przepływową) oraz fizykochemiczne, biochemiczne, fizjologiczne i cytologiczne w poszukiwaniu odpowiedzi na pytania o wpływ czynników środowiskowych na holobiomy, czyli układy złożone z wielokomórkowego organizmu eukaryotycznego i zasiedlających go mikroorganizmów. Pierwszym krokiem na tej drodze było zdobycie finansowania projektu „BETAMIKRO – mikrobiom buraka zwyczajnego i jego interakcje z rośliną”, którego jestem kierownikiem. Jestem również wykonawcą

we wpisującym się w tę tematykę projekcie „Grzyby arbuskularne jako wektory wirusów roślinnych (MYCOVIR)”, którego kierownikiem jest prof. dr hab. Katarzyna Hryniewicz.

Jestem współautorem osiemnastu prac nie stanowiących części cyklu przedstawionego do oceny. Przedstawiam je pokrótce podzielone na trzy obszary tematyczne: i) analiza zbiorowisk mikroorganizmów, ii) wpływ czynników środowiskowych na transkryptom roślin oraz iii) pozostałe. Sumaryczny Impact Factor tych prac (zgodnie z ich rokiem opublikowania) wynosi 54,398, liczba punktów MNiSW wg punktacji z roku wydania, ale bez uwzględnienia zmiany skali w 2019 r. to 573, zgodnie z rokiem opublikowania natomiast 798, a liczba cytowań (wg WoS, stan na 6 września 2019) to 368 (353 bez autocytowań). Liczby te z pewnością nie będą już aktualne w trakcie oceny mojego osiągnięcia, przedstawiam je tutaj ze względu na to, że oficjalna ocena bibliometryczna została wykonana właśnie 6 września 2019 r.

## 1. Analiza zbiorowisk mikroorganizmów w środowisku

Większość publikacji spoza cyklu dotycząca tego tematu powstała już przy użyciu udoskonalonego warsztatu, opracowałem zestaw primerów umożliwiający szybkie, łatwe i tanie przygotowanie setek bibliotek amplikonów do sekwencjonowania w technologii Illumina na aparacie MiSeq (Thiem i wsp. 2018). Do tej pory opracowałem układy pozwalające na sekwencjonowanie fragmentów genów 16S (Deja-Sikora i wsp. 2019) i 18S rRNA (publikacja w recenzjach), oraz regionu ITS (Thiem i wsp. 2018). W opracowaniu jest system umożliwiający sekwencjonowanie amplikonów genów *amoA* i *nrxB* zaangażowanych w utlenianie jonów amonowych. Analizy bioinformatyczne prowadzone są przy użyciu pakietów języka R (dada2, phyloseq, vegan) i programu Mothur (Schloss i wsp., 2009) oraz pisanych ad hoc skryptów w języku Perl albo powłoki bash.

1. Furtado BU, **Gołębiewski M**, Skorupa M, Hulisz P, Hryniewicz K. 2019. Bacterial and fungal endophytic microbiomes of *Salicornia europaea*. *Appl Environ Microbiol*, doi: 10.1128/AEM.00305-19, IF<sub>2019</sub>=4,077, punkty MNiSW<sub>2016</sub>: 40, MNiSW<sub>2019</sub>: 100, liczba cytowań wg WoS: 0

Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 18%, polegał on na opracowaniu koncepcji eksperymentów, wykonaniu analiz bioinformatycznych i statystycznych oraz udziale w spisaniu manuskryptu.

2. Deja-Sikora E, **Gołębiewski M**, Kalwasińska A, Krawiec A, Kosobucki P, Walczak M. 2019. *Comamonadaceae* OTU as a remnant of ancient microbial community in sulfidic waters. *Microb Ecol*, 78: 56, doi: 10.1007/s00248-018-1270-5, IF<sub>2018</sub>=3,611, punkty MNiSW<sub>2016</sub>: 35, MNiSW<sub>2019</sub>: 100, liczba cytowań wg WoS: 1.

Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 10%, polegał on na opracowaniu metodologii przygotowania bibliotek do sekwencjonowania i udziale w analizach bioinformatycznych oraz pomocy w spisywaniu manuskryptu.

3. Piwosz K, Całkiewicz J, **Gołębiewski M**, Creer S. 2018. Diversity and community composition of pico- and nanoplanktonic protists in the Vistula River estuary (Gulf of Gdańsk, Baltic Sea). *Estuar Coast Shelf Sci*, 207: 242, IF<sub>2018</sub>=2,611, punkty MNiSW<sub>2016</sub>: 35, liczba cytowań wg WoS: 2.

Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 25%, polegał on na udziale w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu analiz bioinformatycznych oraz udziale w spisywaniu manuskryptu.

4. Thiem D, **Gołębiewski M**, Hulisz P, Piernik A, Hryniewicz K. 2018. How does salinity shape bacterial and fungal microbiomes of *Alnus glutinosa* roots? *Front Microbiol*, doi: 10.3389/fmicb.2018.00651, IF<sub>2018</sub>=4,259, punkty MNiSW<sub>2016</sub>=35, liczba cytowań wg WoS: 6. Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 30%. Polegał on na udziale w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu analiz bioinformatycznych i statystycznych oraz udziale w spisaniu manuskryptu.
5. Chodak M, **Gołębiewski M**, Morawska-Płoskonka J, Kuduk K, Niklińska M. 2015. Soil chemical properties affect the reaction of forest soil bacteria to drought and rewetting stress. *Annals Microbiol*, 65(3): 1627-1637, DOI: 10.1007/s13213-014-1002-0. IF<sub>2015</sub>=1,232, punkty MNiSW<sub>2015</sub>: 15, liczba cytowań wg WoS: 17. Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 15%. Polegał on na wykonaniu analiz bioinformatycznych.
6. Chodak M, **Gołębiewski M**, Morawska-Płoskonka J, Kuduk K, Niklińska M. 2013. Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Appl Soil Ecol*, 64: 7-14. IF<sub>2013</sub>=2,206, punkty MNiSW<sub>2013</sub>: 35, liczba cytowań wg WoS: 111. Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 15%. Polegał on na wykonaniu analiz bioinformatycznych.
7. Larmonier CB, Laubitz D, Hill FM, Shehab KW, Lipiński L, Midura-Kiela MT, McFadden R-MT, Ramalingam R, Hassan KA, **Gołębiewski M**, Besselsen DG, Ghishan FK, Kiela PR. 2013. Reduced colonic microbial diversity is associated with colitis in NHE3-deficient mice. *Am J Physiol – Gastroint Liver Physiol*, 305(10): G667:G677. IF<sub>2013</sub>=3,737, punkty MNiSW<sub>2013</sub>: 35, liczba cytowań wg WoS: 40. Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 10%. Polegał on na wykonaniu analiz bioinformatycznych i statystycznych.

## 2. Wpływ czynników środowiskowych na transkryptom roślin.

Publikacje przedstawione w tej sekcji dotyczą wpływu zasolenia na ekspresję genów buraka zwyczajnego (*Beta vulgaris*). Jest to doskonały model do badania tego wpływu, ponieważ porównanie buraków uprawnych (*B. vulgaris* ssp. *vulgaris*) i ich dziko żyjącego przodka – halofita, buraka morskiego (*B. vulgaris* ssp. *maritima*) umożliwia łatwą identyfikację genów zaangażowanych w odpowiedź na stres. Co więcej, możliwa jest również identyfikacja cech utraconych i nabytych w trakcie udomowienia. W publikacjach wykorzystano technikę RNASeq, a analizy wyników sekwencjonowania wykonano przy użyciu pakietów Tuxedo Suit, CummeRbund oraz TopGO.

1. Skorupa M, **Gołębiewski M**, Krzyżyńska K, Niedojadło J, Kęsy J, Klamkowski K, Wójcik K, Treder W, Tretyn A, Tyburski J. 2019. Salt stress vs. salt shock – the case of sugar beet and its halophytic ancestor. *BMC Plant Biol*, 19(1): 57, IF<sub>2018</sub>=3,670, punkty MNiSW<sub>2016</sub>: 40, MNiSW<sub>2019</sub>: 140, liczba cytowań wg WoS: 0. Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 25%, polegał on na udziale w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu analiz bioinformatycznych i statystycznych oraz udziale w spisaniu manuskryptu.
2. Skorupa M, **Gołębiewski M**, Domagalski K, Kurnik K, Abu Nahia K, Zloch M, Tretyn A, Tyburski J. 2016. Transcriptomic profiling of the salt stress response in excised leaves of the



halophyte *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *Plant Sci*, 243(2): 56-70, IF<sub>2016</sub>=3,437, punkty MNISW<sub>2016</sub>: 35, liczba cytowań wg WoS: 11.

Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 25%. Polegał on na udziale w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu analiz bioinformatycznych i statystycznych oraz udziale w spisaniu manuskryptu.

### 3. Pozostałe publikacje

1. Dmowski M, **Gołębiowski M**, Kern-Zdanowicz I. 2018. Characteristics of the conjugative transfer system of the IncM plasmid pCTX-M3 and identification of its putative regulators. *J Bacteriol*, 200(18): JB.00234-18, IF<sub>2018</sub>=3,234, punkty MNISW<sub>2018</sub>: 35, liczba cytowań wg WoS: 2.  
Mój udział w publikacji szacuję na 5%, polegał on na skonstruowaniu niektórych wariantów delecyjnych pCTX-M3 i opracowaniu primerów do usuwania pozostałych genów.
2. Kamińska M, **Gołębiowski M**, Tretyn A, Trejgell A. 2018. Efficient long-term conservation of *Taraxacum pienicum* synthetic seeds in slow growth conditions. *Plant Cell Tiss Org*, 132(3): 469-478, <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1343-z>, IF<sub>2018</sub>=2,200, punkty MNISW<sub>2016</sub>: 30, liczba cytowań wg WoS: 3.  
Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 5%. Polegał on na wykonaniu analiz ploidalności komórek przy pomocy cytometru przepływowego.
3. Borkowska A, Bielinski M, Szczesny W, Szwed K, Tomaszewska M, Kalwa A, Lesiewska N, Junik R, **Gołębiowski M**, Sikora M, Tretyn A, Akiskal K, Akiskal H. 2015. Effect of the 5-HTTLPR polymorphism on affective temperament, depression and body mass index in obesity. *J Affect Disorders*, 184(6): 193-197, IF<sub>2015</sub>=3,570, punkty MNISW<sub>2015</sub>: 35, liczba cytowań wg WoS: 10.  
Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 5%. Polegał on na udziale w opracowaniu metodologii badań genetycznych i udziale w wykonaniu analiz statystycznych.
4. Pareek CS, Michno J, Smoczyński R, Tyburski J, **Gołębiowski M**, Piechocki K, Średzińska M, Pierzchała M, Czarnik U, Ponsuksili S, Wimmers K. 2013. Identification of predicted genes expressed differentially in pituitary gland tissue of young growing bulls revealed by cDNA-AFLP technique. *Czech J Animal Sci*, 58(4): 147-158. IF<sub>2013</sub>=0,871, punkty MNiSW<sub>2013</sub>: 25, liczba cytowań wg WoS: 3.  
Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 5%. Polegał on na wykonaniu analiz bioinformatycznych.
5. Pareek CS, Pierzchała M, Michno J, Szymańska S, Smoczyński R, Jasik N, **Gołębiowski M**, Tyburski J, Urbański P, Goluch D, Oprządek J, Zwierzchowski L, Siriluck P, Wimmers K. 2012. Gene expression profiling by cDNA-AFLP and identification of differentially expressed transcripts of bovine pituitary gland in growing bulls of dairy breeds. *Animal Sci Pap Rep*, 30(2): 103-119. IF<sub>2012</sub>=0,918, punkty MNiSW<sub>2012</sub>: 20, liczba cytowań wg WoS: 2.  
Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 5%. Polegał on na wykonaniu analiz bioinformatycznych.
6. Górecki RK, Koryszewska-Bagińska A, **Gołębiowski M**, Żylińska J, Grynberg M, Bardowski JK. 2011. Adaptive potential of the *Lactococcus lactis* IL594 strain encoded in

its 7 plasmids. *PLOS ONE*, 6(7): e22238. IF<sub>2011</sub>=4,092, punkty MNiSW<sub>2011</sub>: 40, liczba cytowań wg WoS: 28.

Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 10%. Polegał on na wykonaniu analiz bioinformatycznych.

7. Hejnowicz MS, **Gołębiewski M**, Bardowski J. 2009. Analysis of the complete genome sequence of the lactococcal bacteriophage BIBB29. *Int J Food Microbiol*, 131(1): 52-61. IF<sub>2009</sub>=3,011, punkty MNiSW<sub>2009</sub>: 24, liczba cytowań wg WoS: 18.  
Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 20%. Polegał on na wykonaniu analiz bioinformatycznych.
8. Deja-Sikora E, Sikora M, **Gołębiewski M**, Tretyn A. 2007. Biblioteki metagenomowe jako źródło genów przydatnych w biotechnologii. *Biotechnologia*, 4(79): 125-139. Punkty MNiSW<sub>2007</sub>: 6, liczba cytowań wg GoogleScholar: 5.  
Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 30%. Polegał on na udziale w spisaniu manuskryptu.
9. Zienkiewicz M, Kern-Zdanowicz I, **Gołębiewski M**, Żylińska J, Mieczkowski P, Gniadkowski M, Bardowski J, Cegłowski P. 2007. Mosaic structure of p1658/97, a 125-kilobase plasmid harboring an active amplicon with the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>SHV-5</sub>. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(4): 1164-1171. IF<sub>2007</sub>=4,390, punkty MNiSW<sub>2007</sub>: 24, liczba cytowań wg WoS: 26.  
Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 5%. Polegał on na wykonaniu analiz bioinformatycznych oraz części doświadczeń. Publikacja ta jest efektem badań prowadzonych w trakcie studiów doktoranckich.
10. **Gołębiewski M**, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Żylińska J, Baraniak A, Gniadkowski M, Bardowski J, Cegłowski P. 2007. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>CTX-M-3</sub>. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(11): 3789-3795. IF<sub>2007</sub>=4,390, punkty MNiSW<sub>2007</sub>: 24, liczba cytowań wg WoS: 90.  
Mój udział w powstaniu publikacji szacuję na 45%. Polegał on na wykonaniu większości doświadczeń, całości analiz bioinformatycznych oraz spisaniu manuskryptu. Publikacja ta jest efektem badań prowadzonych w trakcie studiów doktoranckich.

Marcin Gołębiewski