

Leńcze, 17 Stycznia 2026 roku



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Nikoli Sozańskiej zatytułowanej:

„Strukturalne nieuporządkowanie i separacja faz ciecz-ciecz jako molekularne podstawy funkcjonowania regulatorów transkrypcji na przykładzie TCF4”

Rozprawa doktorska pani mgr inż. Nikoli Sozańskiej opisuje prace badawcze podjęte w celu zrozumienia molekularnych podstaw funkcjonowania ludzkiego białka TCF4. Białko to może zostać z powodzeniem uznane za białko modelowe, gdyż zawierając charakterystyczną dla czynników transkrypcyjnych domenę odpowiedzialną za swoiste oddziaływanie z DNA posiada także rozległy rejon inherentnie nieuporządkowany typowy dla eukariotycznych regulatorów transkrypcji. To właśnie obecność tego rejonu czyni go atrakcyjnym do badania w grupie profesora dr hab. inż. Andrzej Ożyhara, który od lat z powodzeniem zajmuje się białkami wykazującymi tę, wciąż słabo poznaną, własność. Białko TCF4 jest nie tylko bardzo interesującym modelem badawczym, ale także białkiem niezwykle istotnym, a wręcz kluczowym w rozwoju organizmu, w szczególności w rozwoju układu nerwowego człowieka. Zaburzenia jego sekwencji prowadzą do ciężkiego i rzadkiego zespołu neurorozwojowego określanego jako zespół Pitt–Hopkins (Pitt-Hopkins syndrome, PTHS). Białko to jest także niezwykle intrygujące pod względem funkcjonalnym, gdyż w zależności od kontekstu molekularnego może pełnić role zarówno represora jak i aktywatora transkrypcji.

Praca doktorska przygotowana została pod opieką promotora, prof. dr hab. Andrzeja Ożyhara, który dzielił obowiązki z promotorem pomocniczym, dr Anetą Tarczewską. Prace badawcze wykonane zostały w jednostce rodzimej, Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, a także we współpracy z dr Barbarą Klepką oraz dr hab. Anną Niedźwiecką, prof. IF PAN, z Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk (IF PAN) w Warszawie, w zakresie analiz bioinformatycznych, analizy danych z ultrawiarowania analitycznego oraz technik konfokalnych. Ponadto, we współpracy z dr Lilią Żukową oraz prof. dr hab. Michałem Dadlezem ze Środowiskowej Pracowni Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (IBB PAN) w Warszawie, wykonano eksperymenty wymiany izotopowej wodoru z deuterem monitorowanej spektrometrią mas (HDX-MS).

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biochemii Fizycznej

dr hab.
Andrzej Górecki

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. 12 664 61 51

e-mail: andrzej.gorecki@uj.edu.pl

Współprowadzenie badań z osobami biegłymi w zaawansowanych technikach eksperymentalnych i analizach danych jest w pełni typowe i właściwe dla współczesnych badań prowadzonych w naukach przyrodniczych.

Prace badawcze obejmowały szeroki zestaw technik z pogranicza biologii molekularnej, biotechnologii, biochemii i biofizyki. Doktorantka zoptymalizowała sekwencję plazmidu ekspresyjnego kodującego białko chimeryczne, składające się z sekwencji ludzkiego czynnika transkrypcyjnego TCF4, domeny SUMO oraz metki histydynowej; opracowała procedurę ekspresji tego białka w bakteryjnym systemie ekspresyjnym oraz jego oczyszczania z wykorzystaniem technik chromatograficznych; określiła powinowactwo uzyskanego białka do dwuniciowego oligonukleotydu DNA o sekwencji specyficznej dla TCF4; przeprowadziła analizy sekwencji białka prowadzące do predykcji jego własności strukturalnych oraz zweryfikowała te predykcje z wykorzystaniem technik dichroizmu kołowego, wymiany izotopowej wodoru z deuterem monitorowanej spektrometrią mas, sączenia molekularnego, technik elektroforetycznych, ultrawierowania analitycznego, technik fluorescencyjnych oraz konfokalnych. Te ostatnie posłużyły do zbadania zdolności białka TCF4 do tworzenia układów supramolekularnych oraz określenia ich dynamiki, ewolucji czasowej i stabilności.

Przeprowadzone badania dotyczą zagadnień niezwykle istotnych dla współczesnej biochemii strukturalnej białek. Brak stabilnej struktury przestrzennej w przypadku białek inherentnie nieuporządkowanych jest zagadnieniem wciąż słabo poznanym, zarówno pod względem ich własności fizykochemicznych, jak i konsekwencji biologicznych. Badania tej klasy białek wymykają się klasycznym technikom strukturalnym, a poznanie ich własności opiera się na integracji wyników uzyskiwanych przy użyciu wielu różnorodnych technik badawczych, zazwyczaj o ograniczonej rozdzielczości przestrzennej. Dużą trudność w badaniach białek inherentnie nieuporządkowanych stanowi ich naturalna skłonność do funkcjonowania w rozbudowanych sieciach oddziaływań z licznymi białkami partnerskimi, których różnorodność oraz często występująca heterogenność stanowią wyzwanie, któremu obecnie nie jesteśmy w stanie sprostać w pełni satysfakcjonujący sposób. Z tego względu badanie układów supramolekularnych o jednorodnej budowie podjednostkowej jest obecnie podejściem dominującym i metodologicznie uzasadnionym. Badania prowadzone przez panią mgr inż. Nikolę Sozańską wpisują się więc doskonale we współczesny nurt nowatorskich prac, które w istotny sposób poszerzają naszą wiedzę na temat zachowania i funkcjonowania białek.

Wyniki prowadzonych badań zostały opisane w obszernej, liczącej 162 strony maszynopisu rozprawie doktorskiej, napisanej w języku polskim. Praca została przygotowana w sposób bardzo staranny pod względem językowym i redakcyjnym, w układzie typowym dla prac z zakresu nauk przyrodniczych. Rozprawę otwierają streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz wstęp, który w sposób klarowny i komfortowy wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z białkiem TCF4, umieszczając je w kontekście

innych białek z rodziny bHLH oraz ukazując aktualny stan wiedzy na temat jego struktury, funkcji oraz znaczenia biologicznego, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych.

W dalszej części wstępu autorka koncentruje się na opisie właściwości białek inherentnie nieuporządkowanych oraz procesu separacji faz ciecz–ciecz, któremu podlega część z nich. Bardzo wysoko oceniam wstęp teoretyczny recenzowanej pracy. Stanowi on dobrze i przystępnie podane kompendium wiedzy, która jeszcze kilka lat temu była nieoczywista, a miejscami wręcz sprzeczna z panującymi dogmatami. Dodatkowo rozdział ten oparty jest na bardzo bogatej i trafnie dobranej literaturze przedmiotu. Został on napisany w sposób lapidarny, lecz nie skrótowy. Kolejny rozdział w sposób naturalny wynika ze wstępu i, akcentując deficyty obecnego stanu wiedzy, prezentuje cel prowadzonych badań, który jest istotny, sformułowany jasno i wystarczająco konkretnie. W dalszych częściach opisano materiały wykorzystane w trakcie badań oraz zastosowane metody. Rozdziały te zostały przygotowane zgodnie z przyjętymi standardami i pozwalają na zrozumienie szczegółów eksperymentów w znakomitej większości przypadków z wystarczającą precyzją.

Zasadniczą częścią rozprawy jest rozdział „Wyniki”, który prezentuje rezultaty prowadzonych badań w sposób metodyczny, choć – jak sama autorka zaznacza w dyskusji – niepełny, gdyż pominięto szereg dodatkowych eksperymentów pomocniczych lub takich, które nie doprowadziły do uzyskania satysfakcjonujących rezultatów. Rozdział ten został napisany w sposób systematyczny i interesujący, choć w moim przekonaniu koncentruje się miejscami zbyt silnie na interpretacji wyników kosztem ich szczegółowego opisu i analizy. Do większości omawianych zagadnień nie zgłaszam jednak istotnych zastrzeżeń. Jedyne niektóre aspekty dotyczące oddziaływania TCF4 z DNA zostały, moim zdaniem, omówione w sposób niewystarczająco krytyczny, co zostanie wskazane w dalszej części recenzji.

Bardzo wysoko oceniam natomiast opis zagadnień dotyczących tworzenia kondensatów, które zostały przedyskutowane w sposób kompleksowy i interesujący, z wyraźnym zaakcentowaniem ich potencjalnego znaczenia biologicznego oraz możliwego wpływu mutacji chorobotwórczych na ten proces. Doceniam również krytycyzm, z jakim doktorantka podchodzi do analizy wyników dotyczących stłoczenia molekularnego, oraz umiejętne osadzenie własnych interpretacji w aktualnej literaturze naukowej. Interesująca jest sugestia, że mutacje chorobotwórcze mogą wpływać na szereg – mniej lub bardziej oczywistych – procesów molekularnych, które bezpośrednio prowadzą do zwiększonej zdolności białka do tworzenia kondensatów lub do przyspieszonego „starzenia się” tych układów, skutkującą zmniejszeniem wymiany cząsteczek TCF4 pomiędzy kondensatem a frakcją rozpuszczalną, a w konsekwencji obniżeniem biodostępności funkcjonalnej białka. Alternatywnie, mutacje te mogą prowadzić do obniżenia powinowactwa TCF4 do DNA, co zmniejsza jego zdolność do efektywnego oddziaływania z DNA, skutkując ograniczoną możliwością rozbijania struktur supramolekularnych, a w efekcie zwiększoną stabilnością tych układów.

Końcowym etapem pracy jest wskazanie dalszych interesujących kierunków badań, które – mam nadzieję – zostaną podjęte przez zespół badawczy. Praca zawiera także liczne załączniki, do których odniesiono się w treści rozprawy, opis osiągnięć doktorantki oraz spis literatury, który jest wyjątkowo obszerny i obejmuje imponującą liczbę 565 pozycji. Obejmuje on zarówno najnowsze publikacje z zakresu tematyki pracy, jak i starsze, fundamentalne prace konstytuujące rozwój biochemii i biologii strukturalnej, spośród których najstarsza, zidentyfikowana przeze mnie pozycja, pochodzi z roku 1894.

Moim zdaniem najważniejszym osiągnięciem pracy jest zaproponowanie spójnego modelu funkcjonowania białka TCF4, integrującego regiony inherentnie nieuporządkowane (IDR), separację faz ciecz–ciecz (LLPS) oraz rozpoznawanie DNA. W szczególności doceniam wykazanie istnienia układów supramolekularnych tworzonych przez białko TCF4 w postaci dynamicznych, bezbłonowych struktur. Ich powstawanie jest indukowane stłoczeniem molekularnym, wywoływanym obecnością PEG 8000, a także zwiększoną siłą jonową, wynikającą z obecności chlorku sodu w stężeniach przekraczających wartości fizjologiczne. Struktury te zostały scharakteryzowane pod względem biofizycznym, co pozwoliło na ich jednoznaczne sklasyfikowanie jako kondensaty powstające w wyniku LLPS, zgodnie z dobrze ugruntowanymi kryteriami Hymana, umożliwiającymi odróżnienie ich od agregatów i osadów (sferyczny kształt, zdolność do koalescencji, mobilność cząsteczek w obrębie kondensatu w skali minutowej oraz zależność procesu tworzenia od stężenia białka). Za szczególnie ważne odkrycie uznaję identyfikację zdolności tych struktur do dynamicznych interakcji z DNA, prowadzących do utraty spójności tychże struktur. Bardzo interesującym aspektem badań tych układów jest również określenie ich ewolucji czasowej, opisaną jako proces starzenia lub dojrzewania kondensatów.

Ze względu na pełnioną funkcję jestem zobowiązany wskazać zauważone mankamenty pracy oraz nieliczne niezgrabności językowe:

1. Str. 13: zgodnie ze Słownikiem języka polskiego (SJP) słowo *konserwatywny* oznacza: „przywiązany do tradycji, istniejących instytucji i systemu wartości, wyrażający niechętny lub wrogi stosunek do poważniejszych zmian, sprzeciwiający się nowościom; tradycjonalistyczny, zachowawczy, ortodoksyjny, niepostępowy”, co wiąże się z intencjonalnym działaniem i raczej nie odnosi się do zachowania białek. Dlatego sformułowanie „wysoce konserwatywną grupę białek” należałoby zastąpić określeniem „wysoce konserwowaną ewolucyjnie grupę białek”.
2. Str. 25: określenie „kąt Ramachandrana szkieletu” jest niejednoznaczne. Z kontekstu można wnioskować, że chodzi o dwa kąty torsyjne (ϕ i ψ) charakteryzujące konformację łańcucha głównego białka.
3. Str 18. Zdanie: „Chociaż TCF4 nie jest niezbędny do rozwoju limfocytów B, to myszy z wyciszonym *Tcf4* wykazują zmniejszoną liczbę limfocytów pro-B, wskazując na rolę TCF4 we wczesnym rozwoju

limfocytów B, aczkolwiek w komórkach o obniżonym poziomie innych białek E [59]” jest niespójne gramatycznie, tym samym niezrozumiałe.

4. W eksperymentach elektroforezy natywnej, sączenia molekularnego oraz ultrawierowania analitycznego analizowano wpływ obecności dwuniciowego DNA o sekwencji specyficznej dla TCF4 (dsE-box) na zachowanie białka. W pierwszym przypadku stosowano 10-krotny nadmiar dsDNA, natomiast w dwóch pozostałych jedynie 2-krotny. Skąd wynika ta różnica? Czy faktycznie była ona podyktowana dążeniem do uzyskania wysokiego stopnia wysycenia białka kwasem nukleinowym, o którym mowa w dyskusji?
5. Str. 68: Równanie 8 opisuje wartość anizotropii fluorescencji jako funkcję intensywności emitowanego światła o polaryzacjach równoległej i prostopadłej względem światła wzbudzającego. W tekście pojawia się jednak informacja o współczynniku G, który – będąc parametrem aparaturowym – występuje we wzorze na anizotropię fluorescencji opartym na sygnałach rejestrowanych dla wszystkich kombinacji ustawień polaryzatorów wzbudzających i analizujących. Sądzę zatem, że do obliczeń zastosowano inny, metodologicznie poprawny wzór, który nie został jednoznacznie przedstawiony.
6. Uzyskany wynik badania oddziaływania dsE-box z białkiem TCF4 przy użyciu metody EMSA nie odpowiada spodziewanej izotermie wiązania dla stechiometrii 1:1. Taka krzywa wiązania powinna bowiem wykazywać zmianę stopnia wysycenia od około 5 do 95% przy około 80-krotnej zmianie stężenia liganda, co obserwuje się w przypadku pomiarów polaryzacji fluorescencji dla tego samego układu, jak również analizy zmian czasu dyfuzji w metodzie FCS. Analogiczną zmienność stopnia wysycenia uzyskano jednak w przypadku EMSA już dla zaledwie kilkukrotnej zmiany stężenia, co może wynikać z dynamicznego charakteru kompleksu prowadzącej do niespełnienia kryteriów równowagi podczas elektroforezy, prowadzącej w konsekwencji do rezultatu charakterystycznego dla efektów dodatniej kooperatywności. Efekty takie nie powinny jednak występować w przypadku oddziaływania o zakładanej stechiometrii 1:1. Z tej perspektywy nie dziwi fakt, że w analizie tych danych nie zastosowano klasycznego podejścia opisanego równaniem 4, lecz równanie 5, stanowiące najprostszy model opisu zjawisk kooperatywnych. Uzyskanego w ten sposób wyniku nie można jednak traktować jako wartości reprezentatywnej dla ilościowego określenia powinowactwa. Sądzę ponadto, że niepodany w pracy wykładnik kooperatywności n z równania 5 znacząco odbiega od wartości jednostkowej, charakterystycznej dla braku efektu kooperatywności. Ograniczenia metody EMSA nie podważają jednak ogólnego wniosku o zdolności białka TCF4 do oddziaływania z DNA.
7. Str. 75, rycina 7.3: opis metodyki analizy danych FCS jest zbyt lakoniczna i nie pozwala jednoznacznie ustalić, jaki model dopasowania został zastosowany ani w jaki sposób zdefiniowano parametr określany jako „pozorny czas dyfuzji”. Na podstawie samego opisu analizy nie wynika, czy zastosowano model jednoskładnikowy, czy też bardziej złożony model wieloskładnikowy.

Jednocześnie wzrokowa analiza przedstawionych funkcji autokorelacji oraz ich dopasowań sugeruje obecność co najmniej dwóch skal czasowych, co wskazywałoby na zastosowanie modelu złożonego. Jeżeli tak było w istocie, konieczne jest jednoznaczne określenie zarówno postaci zastosowanego modelu, jak i sposobu wyznaczenia parametru raportowanego jako „pozorny czas dyfuzji”, gdyż w obecnej formie analiza ta nie jest w pełni przejrzysta.

8. W tekście rozprawy nie udało mi się odnaleźć informacji dotyczącej stałej równowagi dimeryzacji białka TCF4. Czy została ona określona? Jeżeli tak, jej podanie znacząco ułatwiłoby jednoznaczną interpretację większości uzyskanych rezultatów, gdyż stosowanie w eksperymentach stężeń białka porównywalnych z wartością stałej dysocjacji dimeryzacji prowadziłoby do współwystępowania dwóch frakcji: monomerycznej i dimerycznej, co może mieć istotne konsekwencje dla analizy oddziaływań TCF4 z DNA.
9. Str. 77: określenie „zwiększenie sztywności fragmentu TCF4” w odniesieniu do rezultatów działania predyktora jest nieprecyzyjne, gdyż program ten nie analizuje faktycznej sztywności białka, lecz jedynie przewiduje predyspozycje danego fragmentu łańcucha polipeptydowego do takiego zachowania. W kontekście dalszych, trafnych i precyzyjnych sformułowań zastosowanych w pracy, fragment ten traktuję jako niezręczność językową, a nie jako błąd w zrozumieniu zastosowanej metody.
10. Str. 78: szacowanie zawartości struktur drugorzędowych białka TCF4 wykonano w oparciu o widma dichroizmu kołowego zmierzone dla samego białka oraz dla tegoż białka w obecności specyficznego DNA (dsE-box). O ile taka analiza w przypadku białka w formie apo jest rutynowa i nie nastrocza istotnych trudności, o tyle jej przeprowadzenie dla nukleoproteiny jest nietrywialne, ze względu na aktywność optyczną DNA w zakresie spektralnym, który w całości pokrywa się z zakresem absorpcji wiązania peptydowego, wykorzystywanego w tej analizie. Autorka słusznie zauważa ten efekt, wskazując na obecność sygnału przy długości fali 280 nm, pochodzącego od DNA, nie odnosi się jednak do spodziewanego wkładu sygnału DNA w innych zakresach spektralnych, w tym również w zakresie długości fali 222 nm, dla którego zarejestrowano różnice pomiędzy porównywanymi widmami. Należy podkreślić, że amplituda sygnału DNA w tych zakresach może być porównywalna, co utrudnia jednoznaczną interpretację obserwowanych zmian.
Fakt ten, w mojej ocenie, uniemożliwia poprawną analizę zawartości struktur drugorzędowych białka bez *explicite* uwzględnienia wkładu sygnału pochodzącego od DNA. Prosta substrakcja widma DNA, zmierzonego przy tym samym stężeniu, nie stanowi wystarczającej korekty, ze względu na spodziewany wpływ oddziaływań z białkiem na widmo CD DNA. Uprzejmie proszę o odniesienie się do tego zagadnienia w trakcie obrony.
11. Str. 78: analiza widm dichroizmu kołowego z wykorzystaniem programu BeStSel nie jest oparta na dekonwolucji, która stanowi konsekwencję splotu funkcji, lecz na dekompozycji, rozumianej jako

reprezentacja widma eksperymentalnego jako sumy widm składowych. Zastosowanie terminu „dekonwolucja” w tym kontekście jest zatem nieprecyzyjne i może prowadzić do nieporozumień interpretacyjnych.

12. Str. 81: autorka sugeruje, że obserwowana różnica szybkości migracji apo-TCF4 oraz kompleksu TCF4:dsDNA może wynikać ze zmiany kształtu dimeru białka lub dodatkowego ładunku wprowadzonego przez DNA. Wydaje się jednak, że obecność DNA jako składnika kompleksu może mieć istotny wpływ na migrację elektroforetyczną, potencjalnie większy niż sama zmiana kształtu białka. W elektroforezie natywnej mobilność kompleksów zależy przede wszystkim od relacji pomiędzy ładunkiem elektrycznym, masą molową oraz efektywnym współczynnikiem tarcia hydrodynamicznego. Dla warunków pH, w których prowadzono eksperymenty, pierwsze dwa parametry wynoszą dla dimeru TCF4 w formie apo: $-26 e^-$ i 96,5 kDa, natomiast dla nukleoproteiny: $-64 e^-$ i 106,4 kDa. W świetle tych danych relatywnie niewielka różnica w szybkości migracji obu form zasługuje na dodatkowy komentarz. Uprzejmie proszę o odniesienie się do tego zagadnienia podczas obrony rozprawy, a także o informację, czy w trakcie elektroforezy natywnej wizualizowano obecność DNA, co pozwoliłoby jednoznacznie potwierdzić skład migrujących form.
13. Str. 82: zgodnie z informacją przedstawioną w rozdziale 6.5.5, badania analitycznego sączenia molekularnego prowadzono dla różnych ilości białka TCF4 (25–75 μg). Chromatogram przedstawiony na rycinie 7.7 prezentuje typowe profile elucji, przy czym zawarto informację, że krzywa odpowiadająca białku w formie apo została przemnożona przez czynnik 4,5. Brak jednoznacznej informacji o zastosowanych w tym przypadku stężeniach białka oraz dsDNA nie pozwala na ocenę przyczyny obserwowanej różnicy ani jej znaczenia interpretacyjnego. W opisie metody znaleźć można informację, że oprócz absorpcji przy 280 nm mierzono również absorpcję przy 260 nm, jednak wyniki te nie zostały zaprezentowane. Czy dostępność tych dodatkowych danych, w połączeniu z informacją o rzeczywiście zastosowanych stężeniach białka i DNA, pozwalałaby na jednoznaczną interpretację zaobserwowanej różnicy pomiędzy profilami elucji?
14. Str. 88: interpretacja nieodwracalności procesu denaturacji białka TCF4 w obecności dsDNA opiera się na założeniu destabilizacji białka wynikającej ze zmiany pH buforu wraz ze wzrostem temperatury oraz wzmożonej agregacji w pobliżu punktu izoelektrycznego białka. Szkoda, że autorka nie podjęła próby weryfikacji tej hipotezy poprzez zmianę wyjściowego pH przy niezmienionej soli buforującej (TRIS), co prowadziłoby do osiągnięcia potencjalnie krytycznego zakresu pH w innej temperaturze. Dyskusja uzyskanych rezultatów nie uwzględnia również obecności DNA, które także wykazuje eliptyczność w zakresie około 220 nm oraz posiada własną temperaturę topnienia, która dla dsDNA o sekwencji dsE-box wynosi około 65 °C. O ile można założyć, że oddziaływanie z białkiem prowadziłoby do stabilizacji DNA, to przy zakładanej stechiometrii oddziaływania 1:1 oraz wartości Kd rzędu 0,3 μM , ponad 50% obecnego w próbce DNA powinno pozostawać w stanie wolnym. Aspekt

ten mógłby istotnie wpływać na interpretację obserwowanej nieodwracalności procesu denaturacji. Uprzejmie proszę o odniesienie się do tej kwestii podczas obrony rozprawy.

15. Str. 99, Jak pokazuje rysunek 7.23, zmiany mobilności TCF4 wewnątrz kondensatów wzrastają wraz ze wzrostem stężenia NaCl. Zależność tej zmiany przybliżono krzywą nie podano jednak jakiego rodzaju jest ta krzywa i dlaczego ją wybrano jako charakterystyczną dla tej zależności. Proszę o wyjaśnienia.
16. Str. 103: autorka pracy opisuje test rozpuszczania kondensatów z zastosowaniem powszechnie używanego w tym celu związku 1,6-heksanodiolu. Nie podaje jednak szczegółów przebiegu tego eksperymentu, w szczególności czasu jego wykonania względem momentu utworzenia kondensatów, co może mieć istotne znaczenie w kontekście opisanego wcześniej procesu dojrzewania (starzenia) tych struktur. Czy określano stężenie graniczne 1,6-heksanodiolu niezbędne do rozpuszczenia kondensatów, a także czy badano zależność skuteczności tego procesu od czasu inkubacji kondensatów przed dodaniem związku?
17. Str. 107: badanie możliwości tworzenia kompleksów TCF4 z DNA przy różnych siłach jonowych prowadzono metodą elektroforezy natywnej w buforze o sile jonowej poniżej 100 mM (bufor 0,5× TBE). Nie jest jednak oczywiste, czy sama preinkubacja próbek w buforze o wyższej sile jonowej jest wystarczająca, aby uznać obserwowany kompleks za trwały w tych warunkach. W trakcie elektroforezy dochodzi bowiem do szybkiej wymiany buforu, a kinetyka tworzenia kompleksów białko–DNA jest zazwyczaj znacznie szybsza niż czas trwania rozdziału elektroforetycznego. W konsekwencji nie można wykluczyć, że obserwowane kompleksy powstają już w warunkach obniżonej siły jonowej panującej w żelu, a nie odzwierciedlają stanu równowagi przy wyższej sile jonowej podczas procesu preinkubacji. Uprzejmie proszę o odniesienie się do tego aspektu podczas obrony rozprawy.
18. Str. 109: lektura dyskusji rozprawy pozwala docenić znaczny nakład pracy doktorantki związany z optymalizacją preparatyki białka, który w badaniach tego typu jest zazwyczaj bardzo wysoki i stanowi istotną część czasu poświęconego na realizację badań eksperymentalnych. Szkoda jednak, że te istotne aspekty prac przygotowawczych nie zostały w większym stopniu przedstawione w rozdziale „Wyniki”, co pozwoliłoby lepiej oddać skalę i złożoność wykonanych prac eksperymentalnych.
19. Str. 109: w dyskusji zawarto stwierdzenie, że fosforylacja białka TCF4 wpływa na jego powinowactwo do dwuniciowego DNA (dsDNA) o sekwencji specyficznej. Szkoda, że nie podano w tym miejscu bardziej szczegółowych informacji, w szczególności lokalizacji tej modyfikacji w obrębie sekwencji białka oraz kierunku jej wpływu na oddziaływanie z DNA (wzmacniającego bądź osłabiającego). Nie jest również jasne, czy są to wyniki własne autorki, które nie zostały zaprezentowane w części wynikowej, czy też informacje pochodzące z literatury.

20. Str. 114: w dyskusji dotyczącej tworzenia kondensatów doktorantka stwierdza, że rozmiary kondensatów są proporcjonalne do zastosowanego stężenia PEG 8000. Nie jest jednak jasne, czy użyte w tym miejscu określenie „proporcjonalne” odnosi się do ścisłej zależności proporcjonalnej, czy też jedynie do obserwowanej tendencji wzrostowej rozmiarów kondensatów wraz ze wzrostem stężenia PEG 8000. W pracy nie przedstawiono bowiem wykresu zależności rozmiaru kondensatów od stężenia PEG 8000, który pozwalałby jednoznacznie ocenić charakter tej relacji i potwierdzić występowanie proporcjonalności.
21. W pracy pojawia się teza, że oddziaływanie białka TCF4 z DNA o sekwencji niespecyficzej zachodzi za pośrednictwem nieuporządkowanego fragmentu C-końcowego białka. Szkoda, że teza ta pozostała w sferze przypuszczeń, a autorka nie zdecydowała się na zaprezentowanie wyników badań oddziaływania TCF4 pozbawionego domeny bHLH z DNA, które mogłyby ją bezpośrednio zweryfikować. Obraz mechanizmu oddziaływania byłby pełniejszy, gdyby przeprowadzono ilościową analizę wiązania DNA o sekwencji niespecyficzej z białkiem pełnej długości, prowadzącą do określenia stałej równowagi tego procesu. Jest to istotne, ponieważ rejony odpowiedzialne za oddziaływanie specyficzne z DNA są często również zdolne do oddziaływań niespecyficzych, co mogłoby w istotny sposób wpłynąć na interpretację molekularnego mechanizmu działania białka TCF4.

Wymienione powyżej zastrzeżenia nie wpływają na bardzo pozytywną ocenę przeprowadzonych eksperymentów oraz sposobu ich przedstawienia w recenzowanej rozprawie doktorskiej. Stwierdzam, że rozprawa opisuje oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, a autorka wykazała się zarówno odpowiednią wiedzą teoretyczną, jak i gotowością do samodzielnego prowadzenia badań naukowych. W związku z powyższym uznaję, że recenzowana rozprawa spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Wnoszę o dopuszczenie pani mgr inż. Nikoli Sozańskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z poważaniem,



Podpisany elektronicznie przez
Andrzej Górecki
18.01.2026
22-56:06 +0100'

Andrzej Górecki