



UNIWERSYTET  
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Prof. dr hab. Wiktor Koźmiński,

Wydział Chemii UW

[kozmin@chem.uw.edu.pl](mailto:kozmin@chem.uw.edu.pl),

tel: 22 5526519

Warszawa, 5 stycznia 2026

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Nikoli Sozańskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Nikoli Sozańskiej pod tytułem: „*Strukturalne nieuporządkowanie i separacja faz ciecz-ciecz jako molekularne podstawy funkcjonowania regulatorów transkrypcji na przykładzie TCF4*”, w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, została wykonana w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej. Promotorem przedstawionej rozprawy doktorskiej byli: prof. dr hab. inż. Andrzej Ożyhar oraz jako promotor pomocniczy dr Aneta Tarczewska.

Recenzowana praca dotyczy zjawiska rozdziału fazowego w roztworach białek (Liquid-Liquid Phase Separation - LLPS), czyli procesu, w którym białka (a także kwasy nukleinowe) tworzą płynne kondensaty, dostrzegalne jako kropelki. Temat ten jest bardzo ciekawy ze względu na wiele znanych i wiele wciąż nieznanych procesów biologicznych, w których zjawisko LLPS ma swój udział. Zjawisko to, odkryte w ostatnich latach, ma duże znaczenie w procesach biologicznych zachodzących w żywych komórkach i jest przedmiotem zainteresowania wielu grup badawczych. Skłonność do rozdziału fazowego silnie zależy od stężeń i rodzaju jonów metali zawartych w roztworze, stopnia fosforylacji, a także oddziaływań

wewnątrz i międzycząsteczkowych, często z udziałem dynamicznych i nieuporządkowanych fragmentów białek (Intrinsically Disordered Regions – IDR). W przedstawionej rozprawie doktorskiej badanym białkiem jest ludzki czynnik transkrypcyjny 4 (TCF4) o pełnej długości łańcucha.

Praca zawiera łącznie 166 stron i została podzielona na dziewięć głównych rozdziałów, które zostały poprzedzone dwujęzycznym streszczeniem i (co pomocne w lekturze) spisem używanych skrótów. Na koniec rozprawy następują: „Podsumowanie i perspektywy dalszych badań” (rozdział 9), załącznik zawierający między innymi sekwencję aminokwasową badanego białka TCF4, spis rysunków i tabel, opis dorobku naukowego Autorki, oraz zawierający aż 565 pozycji spis cytowanej literatury. Moim zdaniem praca napisana jest bardzo dobrze i klarownie, dając możliwość zrozumienia także czytelnikom reprezentującym inne specjalności. Nie dostrzegłem także istotnych uchybień redakcyjnych i stylistycznych. Na pochwałę zasługuje czytelny podział na część literaturową i wyniki własne Doktorantki. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pięciu artykułach (Doktorantka jest pierwszym autorem trzech z tych prac), w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (indeksowanymi w bazie Web of Science), a także prezentowane były w czterech wystąpieniach na konferencjach naukowych.

W wyczerpującym i interesująco napisanym wprowadzeniu Autorka zaczyna od omówienia funkcji rodziny białek bHLH, do której należy czynnik transkrypcyjny TCF4 i jego budowy. Z kolei omawia ważne zagadnienie białek inherentnie nieuporządkowanych (ang. IDP), lub zawierających takie fragmenty (IDR) oraz ich udziału w oddziaływaniach białko-białko. Natywne nieuporządkowanie i plastyczność IDP lub IDR są obecnie przyjmowane jako kluczowe własności dla ich funkcji biologicznych. IDP charakteryzują się brakiem stabilnej struktury, a ich zmienność konformacyjna stanowi wyzwanie dla obowiązującego jeszcze do niedawna paradygmatu łączącego strukturę z funkcją. Obecnie wiadomo, że IDP odgrywają kluczową rolę w wielu ważnych procesach komórkowych organizmów eukariotycznych. Strukturalna zmienność IDP wymaga zastosowania odpowiednich metod eksperymentalnych. Podstawowym problemem opisu cząsteczek IDP jest zdefiniowanie przestrzeni konformacyjnej

próbkowanej przez łańcuch polipeptydowy, a także charakterystyka jego równowag konformacyjnych opisywanych często jako „preferencje konformacyjne”. W dalszym ciągu wprowadzenia Autorka dokonuje przeglądu wiadomości na temat tworzenia LLPS i procesów biologicznych, w których to zjawisko zachodzi.

Po dającym Czytelnikowi rozeznanie w problemach dotyczących tematyki pracy wstępie, Autorka formułuje w krótkim rozdziale czwartym cel pracy. Jak do tej pory, badania biochemiczne białek z rodziny bHLH skupiały się głównie na ich izolowanych domenach, a struktura i własności TCF4 o pełnej długości nie była znana. W związku z tym, najważniejszym celem pracy doktorskiej mgr inż. Nikoli Sozańskiej było poznanie właściwości molekularnych TCF4, a także zbadanie jego zdolności do rozdziału fazowego oraz identyfikacja czynników chemicznych i fizycznych regulujących ten proces.

Wymagało to przede wszystkim opracowania niezbędnej do dalszych prac procedury ekspresji i oczyszczania badanego białka, a następnie ich biochemiczną i spektroskopową charakteryzację, analizę struktury, identyfikację i analizę regionów dostępnych dla rozpuszczalnika, analizę oddziaływań z DNA i z jonami metali. Uważam, że cel pracy doktorskiej mgr inż. Nikoli Sozańskiej był ambitny i z powodzeniem został zrealizowany.

W rozdziałach 5 „Materiały” oraz 6 „Metody”, Doktorantka szczegółowo opisuje zastosowane w pracy liczne techniki eksperymentalne. Od biochemicznych technik oczyszczania DNA po techniki spektroskopowe i biofizyczne. Opis jest kompletny i kompetentny, nie wymaga więc dalszego komentarza.

Największą część pracy, (co dobitnie świadczy o ilości pracy włożonej w projekt doktorski), (rozdział 7) zajmuje opis wyników. Rozpoczyna się on od szczegółowego opisu procedur ekspresji w bakteriiach *E.coli*, oczyszczania próbek rekombinowanego białka TCF4 oraz jego powinowactwa do cząsteczek DNA. Na kolejnych stronach opisana jest analiza bioinformatyczna mająca na celu ustalenie struktury drugorzędowej oraz określenie udziału IDRs w strukturze TCF4. Analiza wykazała, że znaczna część łańcucha TCF4 wykazuje cechy inherentnie nieuporządkowanych fragmentów (IDR). Wniosek ten potwierdziły opisane

następnie badania za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego, wskazując także na zmiany strukturalne pod wpływem wiązania DNA. Wnioski te zostały potwierdzone za pomocą badania wymiany izotopowej H/D techniką spektroskopii mas HDX-MS. Wykazały one, że poza domeną bHLH wykazującą strukturę drugorzędową, wymiana była bardzo szybka (co wskazuje na ekspozycję protonów amidowych na rozpuszczalnik, a co za tym idzie znaczny stopień nieuporządkowania). Natomiast po związaniu TCF4 z DNA pojawia się dodatkowy fragment dla którego wydajność wymiany izotopowej spada co świadczy o jego uporządkowaniu. Opisane dalej badania promienia hydrodynamicznego świadczą o anomalnie dużym promieniu hydrodynamicznym, charakterystycznym dla obecności nieuporządkowanych fragmentów białek, a także sugerują występowanie TCF4 w formie dimerycznej. Analiza bioinformatyczna wskazała także na skłonności TCF4 do rozdziału fazowego LLPS w czym odgrywa ważną rolę długi fragment IDR.


Badania anizotropii fluorescencji użyciem wysokocząsteczkowego glikolu polietylenowego (PEG 8000, brak w zestawieniu skrótów), wykazały wzrost tendencji do LLPS wraz ze stężeniem PEG, a co za tym idzie ze wzrostem zatłoczenia molekularnego (albo zmianą przenikalności elektrycznej?). Podobnie badania zmętnienia i anizotropii fluorescencji posłużyły do zbadania wpływu stężenia jonów sodu. Wraz ze wzrostem siły jonowej rosła tendencja do separacji faz ale także do agregacji. Z kolei dla kompleksu TCF4 z DNA separacja faz nie zachodziła co prowadzi do wniosku, że użycie DNA zapobiega LLPS przy wzroście stężenia sodu. Interesujące są także badania wpływu utlenienia TCF4 prowadzącego do powstania dimerów z wiązaniem kowalencyjnym. Okazało się, że zdolność wiązania DNA nie zmienia się istotnie.

W rozdziale 8 Doktorantka przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników, a w rozdziale 9, zostało przedstawione podsumowanie i perspektywa dalszych badań. Do najważniejszych wniosków należy wykazanie, że istotną rolę w mechanizmie LLPS odgrywają regiony nieuporządkowane, że wpływ na LLPS ma i zatłoczenie molekularne i siła jonowa, a wiązanie DNA zapobiega LLPS. Mam nadzieję, że prace będą kontynuowane i przyniosą wiele nowych informacji związanych z mechanizmami rozdziału fazowego białek LLPS.

Moim zdaniem plany dalszych badań powinny także uwzględnić zbadanie wpływu innych metali (na przykład  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), mogą mieć one bardzo istotny udział w separacji faz. Podobnie ciekawe byłoby zbadanie wpływu fosforylacji in vitro, badane białko zawiera wiele reszt seryny. Choć Doktorantka wykonała wielką pracę eksperymentalną stosując bardzo wiele różnorodnych technik biochemicznych i biofizycznych, nie mogę jednak powstrzymać się od komentarza, (niczym nie umniejszającego jakości niniejszej pracy), że bardzo ciekawym mogłoby okazać się użycie spektroskopii NMR. Z opisu wynika, że możliwe jest uzyskanie białek w ilościach rzędu miligramów, po dalszej optymalizacji (zwłaszcza dla ubogiej pożywki) mogłoby być możliwe otrzymanie istotnych ilości białek znaczonych izotopowo. Spektroskopia NMR umożliwia badania białek na poziomie atomowym, na przykład pozwala przypisać szybkość wymiany protonów amidowych do konkretnych jednostek aminokwasowych, ustalić miejsca wiązania jonów metali lub innych cząsteczek, a także na przykład wzajemne oddziaływania regionów IDR.

Podsumowując, chciałbym z pełnym przekonaniem stwierdzić, że przedłożona praca spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej - Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Nikoli Sozańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uważam także, że znaczenie prowadzonych badań, uzyskane nowe wyniki i wkład pracy Doktorantki uzasadniają wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Elektronicznie  
podpisany przez  
Wiktor Koźmiński;  
Uniwersytet  
Warszawski  
Data: 2026.01.06  
14:48:24 +01'00'