



Prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski
Kierownik Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Ul. Dębinki 7, bud. 27, II piętro, 80 -211 Gdańsk
Tel. 58 3491590, 1593 fax 58 3491591
e-mail: piotr.trzonkowski@gumed.edu.pl

Gdańsk 10.01.2025

**Recenzja rozprawy doktorskiej magistra inżyniera Michała Mikitiuka:
„Opracowanie multispecyficznych, fuzyjnych białek indukujących
ukierunkowaną, lizosomalną degradację receptorów hamujących aktywność
układu immunologicznego”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska to praca doświadczalna, której celem była synteza fuzyjnych białek z tropizmem do lizosomów (LYTAC) indukujących ukierunkowaną lizosomalną degradację receptorów hamujących aktywność układu immunologicznego. Białka takie mają powinowactwo do wybranego celu molekularnego przeznaczonego do degradacji i receptora indukującego degradację lizosomalną, np. IGF2R. W pracy wykazano powinowactwo takich białek do ligandu receptora – punktu kontrolnego PD-L1. Zasadniczą zaletą opracowanych cząsteczek LYTAC była możliwość izolacji z komórek bez potrzeby modyfikacji chemicznych oraz specyficzność wyrażająca się brakiem powinowactwa do innych pokrewnych receptorów np. IGF1R. W testach funkcjonalnych wykazano, że opracowane białka LYTAC zwiększają aktywność cytotoksyczną komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) wobec komórek linii nowotworowych. W tym aspekcie efekt białek LYTAC był nawet wyższy niż efekt dopuszczonych do leczenia przeciwciał hamujących receptory punktów kontrolnych limfocytów.

Głównymi wnioskami pracy jest potwierdzenie mechanizmu zwiększającego aktywność układu odpornościowego poprzez zastosowanie białek LYTAC. Mechanizm ten może znaleźć zastosowanie w immunoterapii nowotworów oraz innych chorób, w których wiodącym mechanizmem są zaburzenia modyfikacji białek, np. w chorobie Alzheimera.



Prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski
Kierownik Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Ul. Dębinki 7, bud. 27, II piętro, 80 -211 Gdańsk
Tel. 58 3491590, 1593 fax 58 3491591
e-mail: piotr.trzonkowski@gumed.edu.pl

Praca ma układ klasycznej monografii. Rozpoczyna się wstępem, w którym Doktorant przedstawia istotne dla pracy fakty naukowe opisując ogólną biologię komórki nowotworowej, odpowiedź układu odpornościowego na nowotwór i zasady immunoterapii. Następnie przechodzi do opisu biologii insulinopodobnego czynnika wzrostu oraz technologii ukierunkowanej degradacji białek. Rozdział zawiera informacje istotne dla zrozumienia idei pracy, napisany jest przystępnie i wprowadza do zasadniczej części.

Doktorant przedstawia najpierw szczegółowo cele pracy, tj. sposoby syntezy i analizy funkcjonalnej otrzymanych bispecyficznych chimerycznych fuzyjnych białek LYTAC indukujących ukierunkowaną lizosomalną degradację receptorów transmembranowego i rozpuszczalnego ligandu receptora PD-1.

Kolejną częścią są „Materiały i Metody”, w której Doktorant opisuje szczegółowo użyte odczynniki i materiały oraz użyte metody, w szczególności modelowanie molekularne białek, projektowanie konstruktów genetycznych, hodowle komórkowe bakteryjne i ssące, praca z plazmidami i enzymami restrykcyjnymi oraz DNA, ligacja, techniki PCR, westrn blot, ELISA, praca z systemami produkcji białek, ocena mechanizmów działania wyprodukowanych białek oraz testy funkcjonalne cytotoksyczności. Opisy technik zawierają niezbędne elementy potrzebne dla oceny wiarygodności testów i poprawności ich wykonania.

Kolejny rozdział to „Wyniki”. Doktorant opisuje w nim tj. syntezę cząsteczek referencyjnych, opracowanie bispecyficznych chimerycznych fuzyjnych białek LYTAC indukujących ukierunkowaną lizosomalną degradację receptorów transmembranowego i rozpuszczalnego ligandu receptora PD-1, wyprowadzenie linii komórkowej zdolnej syntetyzować zaprojektowany konstrukt LYTAC, określenie zdolności wiązania celu molekularnego przez LYTAC in vitro, analizę zdolności cząsteczki LYTAC do indukcji internalizacji celu molekularnego, określenie zależności internalizacji od czasu i stężenia cząsteczki i w końcu określenie wpływu opracowanej cząsteczki na aktywność cytotoksyczna PBMC wobec komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki są szczegółowe i przekonujące. Doktorant we właściwej sekwencji opisał najpierw sposoby tworzenia warsztatu pracy, wyniki



Prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski
Kierownik Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Ul. Dębinki 7, bud. 27, II piętro, 80 -211 Gdańsk
Tel. 58 3491590, 1593 fax 58 3491591
e-mail: piotr.trzonkowski@gumed.edu.pl

syntezy właściwych cząsteczek LYTAK oraz analizę ich właściwości wobec celu molekularnego oraz układu odpornościowego.

Dwa kolejne rozdziały to „Dyskusja” i „Wnioski”, w których Doktorant krytycznie omawia uzyskane wyniki w kontekście dostępnej wiedzy z literatury. Ta część jest logiczna i dobrze uzasadniona, literatura dobrze dobrana i bieżąca. Najważniejsze wnioski pracy to potwierdzenie, iż wyprodukowane białka LYTEC indukują internalizację celu molekularnego i jest to zależne od ich stężenia i czasu. Dzięki opisanemu mechanizmowi działania cząsteczki aktywują cytotoksyczność komórek układu odpornościowego wobec komórek nowotworowych, najprawdopodobniej dzięki powinowactwu do receptora IGF2. Całokształt tych wyników pozwala mieć nadzieję, że opracowane cząsteczki mogą stać się kandydatami na leki przeciwnowotworowe do dalszego rozwoju w badaniach klinicznych, a w przyszłości skutecznymi lekami stosowanymi w immunoterapii nowotworów.

Układ doświadczeń w pracach jest właściwy i adekwatny do stawianych hipotez. Wnioski są poparte uzyskanymi wynikami. Nie znalazłem istotnych pomyłek lub błędów. W konkluzji uważam wyniki za oryginalne, w szczególności ich potencjalny praktyczny aspekt, który może dać asumpt do stworzenia zupełnie nowej formy immunoterapii. Na uwagę zasługuje bardzo duży wkład pracy Autora w przeprowadzenie tych eksperymentów.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2021 poz. 478, 619, 1630) i wnioskuję o dopuszczenie magistra inżyniera Michała Mikitiuka do dalszych części przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Biotechnologia Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie pracy ze względu na istotną wartość aplikacyjną wyników. Praca jest znakomitą przykładem bardzo sprawnego



Prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski
Kierownik Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Ul. Dębinki 7, bud. 27, II piętro, 80 -211 Gdańsk
Tel. 58 3491590, 1593 fax 58 3491591
e-mail: piotr.trzonkowski@gumed.edu.pl

zaprojektowania cząsteczki terapeutycznej oraz weryfikacji jej aktywności w kontekście działania leczniczego. Powiązanie wiedzy i wyników z nauk podstawowych z implikacjami klinicznymi to świetny przykład translacyjnego podejścia, jakiego powinniśmy sobie życzyć w każdej wdrożeniowej pracy doktorskiej z zakresu biotechnologii medycznej.