

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Юрковой Марии Сергеевны «Биотехнологическое применение свойств шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

Представленная диссертационная работа посвящена разработке новых белковых платформ для биосинтетического получения рекомбинантных терапевтических и биологически активных полипептидов методами клеточной биотехнологии. Такие полипептиды сами по себе при продукции в бактериальных системах часто образуют нефункциональные агрегаты, подвергаются протеолизу или оказывают токсическое воздействие на клетку-продуцент. Эти нежелательные явления в существенной степени могут быть снижены включением целевого полипептида в состав хорошо растворимой высокостабильной белковой платформы. В этой связи, разработка новых эффективных белковых платформ для биосинтетического производства рекомбинантных белков, безусловно, актуальна для развития современных направлений белковой инженерии, биомедицины и биотехнологии. В диссертационной работе Юрковой Марии Сергеевны разработана новая белковая платформа для широкомасштабного получения рекомбинантных белков и полипептидов методами клеточной биотехнологии на базе молекулярного шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*. При этом, диссертант удачно использовал основные структурно-функциональные свойства новой платформы, такие как высокую термостабильность, хорошую растворимость в нейтральных pH, большой размер и наличие обширной внутренней полости, хорошо выраженную доменную структуру субъединиц и наличие гидрофобной субстрат-связывающей поверхности, а также высокий уровень экспрессии гена, кодирующего эту платформу, в клетках *E. coli*.

Все это позволило диссертанту грамотно выбрать места введения целевых полипептидов, модифицировать аминокислотную последовательность GroEL, провести дизайн и получение инженерных вариантов апикального домена, что продемонстрировало высокий уровень владения современными методами белковой инженерии и структурных исследований белков.

Отличительной чертой представленной работы является последовательное развитие исследований: от разработки инженерных конструкций до демонстрации их эффективности на получении практически значимых объектов – антимикробного пептида полифемузина 1, терапевтического пептида энфувиртида, а также плохо растворимых вирусных белков.

Особого внимания заслуживает работа по разработке полигистидиновых вставок в полипептидную цепь белковой платформы, обеспечивающих эффективное выделение целевого полипептида в составе платформы методом аффинной Ni-NTA хроматографии. Замена остатков метионина на остатки лейцина в полипептидной цепи платформы представляется очень элегантным решением проблемы дальнейшего отделения целевого полипептида от платформы под действием бромциана только по остаткам метионина, фланкирующим целевой пептид и введенным при вставке полипептида в состав платформы.

Одной из наиболее сильных сторон диссертации является ее концептуальная целостность. Несмотря на разнообразие экспериментальных моделей, все разделы объединены единой научной идеей — созданием нового поколения биотехнологических инструментов на основе рационально модифицированного шаперона GroEL. Именно эта идея определяет высокий уровень научной новизны выполненного исследования.

Полученные результаты обладают несомненной практической значимостью. Разработанные системы потенциально могут использоваться при получении широкого спектра рекомбинантных белков и пептидов, представляющих сложности для

традиционных экспрессионных платформ вследствие токсичности, склонности к агрегации или протеолитической нестабильности. Не менее перспективной представляется разработка внутренних полигистидиновых меток, существенно расширяющая существующие возможности белковой инженерии.

Автореферат хорошо структурирован, написан грамотным научным языком и полностью отражает содержание выполненной работы. Представленные результаты опубликованы в высокорейтинговых международных журналах и прошли необходимую апробацию на российских и международных конференциях, что подтверждает их научную достоверность и востребованность.

Вместе с тем, автореферат вызывает ряд вопросов дискуссионного характера. Во-первых, представляется интересным выяснить, насколько универсальна разработанная платформа и существует ли верхний предел размеров целевых белков и пептидов, при котором использование модифицированного GroEL остается эффективным.

Во-вторых, в работе убедительно показана возможность получения ряда модельных объектов. Планируется ли дальнейшее исследование применимости предложенной системы для продукции сложных ферментов промышленного назначения либо многодоменных белков? В третьих, в тексте автореферата часто употребляются слова стабильность и стабилизация целевого полипептида. Однако не расшифровано, что это означает и к каким воздействиям это относится. Вместе с тем, высказанные замечания никоим образом не снижают высокой научной ценности представленного исследования.

В целом диссертационная работа Юрковой Марии Сергеевны является законченным научно-квалификационным исследованием, содержащим решение крупной научной проблемы, имеющей существенное значение для развития современной биотехнологии, белковой инженерии и молекулярной биологии. По объему, научной новизне, теоретической и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям согласно пунктам 9-11, 13-14 Положения о присуждении учёных степеней, утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (в современной редакции), а ее автор, Юркова Мария Сергеевна, безусловно заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Семисотнов Геннадий Васильевич,
д.ф.-м.н., профессор, главный научный
сотрудник Института белка РАН, заве-
дующий лабораторией Эксперименталь-
ных исследований белковых олигомерных
структур

ПОДПИСЬ
УДОСТОВЕРЯЮ
Зав. канцелярии
ИБ РАН
АКСЕНОВА Г.Н.

16.09.2022



Семисотнов контактные данные:
142290 ул. Институтская, 4, Пушкино,
Московская область
8 (495) 514-02-18
protres@vega.protres.ru

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки Институт
белка Российской академии наук