

ОТЗЫВ

официального оппонента Муронца Владимира Израилевича,

доктора биологических наук, профессора, заведующего отделом биохимии
животной клетки НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

МГУ имени М.В. Ломоносова

на диссертацию Юрковой Марии Сергеевны

«Биотехнологическое применение свойств шаперона GroEL из *Thermus
thermophilus*»,

представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 1.5.6. Биотехнология

Диссертационная работа Юрковой М.С. посвящена разработке нового направления в применении бактериального шаперона GroEL из *Thermus thermophilus* в качестве инструмента белковой инженерии и биотехнологии. Работа выполнена в Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН и представляет собой крупное завершённое научное исследование, направленное на решение актуальной научной проблемы, связанной с созданием новых платформ для получения рекомбинантных белков и пептидов, обладающих особыми свойствами, которые не позволяют выделить их обычными тривиальными способами.

Актуальность темы очевидна как фундаментальном, так и в прикладном аспекте. Десятилетия, прошедшие с начала получения рекомбинантных белков, показали, что эйфория первых лет была преждевременной. Оказалось, что далеко не все белки удастся получить с помощью стандартных подходов. Введение дополнительных мотивов в структуру выделяемых белков для облегчения их очистки, прежде всего гистидиновых «тэгов», только усугубило проблему. С помощью таких меток можно легко выделить рекомбинантный белок, но практически невозможно отделить его от неправильно свернутых неактивных форм. Образование «телец включения» при продукции целевых белков иногда облегчает выделение белков, но часто не позволяет получить их в нативном активном состоянии из-за невысокой эффективности процесса ренатурации, особенно в случае сложных белков, обладающих четвертичной структурой. Практически все упомянутые проблемы в той или иной степени были затронуты в диссертации Юрковой М.С. и во многом решены. Особое значение разработанные технологии имеют для получения токсичных, гидрофобных, нестабильных и

склонных к агрегации полипептидов. Известно, что используемые в настоящее время системы слитых белков и белки-носители не всегда обеспечивают требуемую растворимость, стабильность и выход целевых белков и пептидов. Очевидно, что разработка новых биотехнологических платформ на основе природных шаперонов является востребованным и перспективным направлением исследований.

Научная новизна работы не вызывает сомнений, поскольку практически все полученные результаты являются новыми и оригинальными. Так, автором впервые был создан ряд модифицированных форм шаперона GroEL, предназначенных для решения различных прикладных задач биотехнологии, включая оригинальную систему биосинтеза целевых пептидов (антимикробного пептида полифемузина I и противовирусного пептида энфувиртида). Новой является и разработка подхода с использованием апикального домена шаперона GroEL, позволяющая получать исходно нерастворимые белки в стабильной растворимой форме. Крайне важным и интересным является создание полигистидиновых меток для их встраивания внутрь полипептидной цепи.

Теоретическая значимость исследования определяется расширением представлений об особенностях функционирования шаперонов и о возможностях их использования шаперонов в качестве инструментов белковой инженерии. Полученные данные существенно дополняют современные представления о структурно-функциональной организации шаперона GroE и демонстрируют возможность целенаправленного конструирования производных шаперона для решения конкретных биотехнологических задач.

О практической значимости работы свидетельствует получение важных соединений, прежде всего антимикробных и антивирусных пептидов, а также вакцинных антигенов. Важно также, что разработанные подходы могут быть использованы при создании технологий получения широкого спектра других рекомбинантных продуктов, в том числе таких, получение которых обычными методами невозможно.

Достоверность результатов не вызывает сомнений. В работе использован широкий спектр современных методов молекулярной биологии, белковой инженерии, биохимии и биофизики. Полученные результаты подтверждены независимыми экспериментами, статистической обработкой данных, а также опубликованы в высокорейтинговых международных журналах. Прекрасно и подробно написанный раздел «Материалы и методы исследования» также подтверждает достоверность результатов.

Диссертационная работа Юрковой М.С. включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, 3 экспериментальных главы, посвященных результатам исследований и их обсуждению, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 234 страницах текста и хорошо иллюстрирована 53 рисунками и 7 таблицами. Список литературы включает 295 ссылок на английском и 9 ссылок на русском языках.

Обзор литературы хорошо написан и содержит всю необходимую информацию. Следует отметить, что 3 экспериментальных раздела также включают краткие мини-обзоры по конкретной теме, что облегчает понимание полученных результатов, а также позволяет лучше оценить вклад данной работы в рассматриваемое направление. В связи с этим хотелось бы отметить, что раздел обзора литературы «Проблемы и перспективы разработки белковых вакцин» сделан излишне подробно. Хотя читать его интересно, и он вполне мог бы быть опубликован. По обзору литературы есть несколько мелких замечаний. Мне кажется, что использовать словосочетание «молекулярный шанерон» не обязательно. Вероятно, раньше это было более уместно, поскольку было необходимо уточнять, что речь идет не о человеке-помощнике, а именно о белке. Сейчас уже мало кто помнит первоначальное значение этого слова. Список литературы следует начинать с русских статей. «Триаж», конечно, звучит красиво, особенно в сочетании с тоже французским словом «шанерон», но лучше бы его заменить на русский синоним.

Раздел «Материалы и методы исследования» написан очень хорошо и содержит все детали, необходимые для воспроизведения экспериментов. Формат изложения несколько необычен из-за компоновки методов в несколько подразделов, что приводит к повторному описанию нескольких методов. Но это не лишает раздел главного – точного, грамотного и детального изложения всех методов.

Результаты диссертации изложены в трех разделах, посвященных трем основным направлениям исследования. Знакомство с этими разделами очень облегчается, как уже отмечено выше, описанием состояния научных исследований в данной области. Вероятно, самыми значимыми результатами являются опыты, описанные в главе 3. Автору удалось не просто предложить подход для получения антимикробного пептида полифемузина I и противовирусного пептида энфувиртида с использованием шанерона, но довести эту работу до получения

конкретных пептидов с проверкой их структуры и оценкой биологической активности. На этом пути было сделано много интересных находок, позволивших получить отличный результат. Безусловно в этом помогло использование вместо обычного шаперона из *E. coli* термостабильного шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*. Высокая устойчивость данного белка к экстремальным условиям и наличие уникальной внутренней полости не только позволили получить конкретные целевые пептиды, но создают хорошие предпосылки для создания других биоинженерных конструкций. Хочется отметить, что выбор термостабильного шаперона значительно облегчил выделение целевых продуктов с помощью простейшего энзимологического приема — отделения термолабильных белков нагреванием.

В 4 главе автором описана разработка системы для получения в растворимой форме исходно нерастворимых белков. Поставленная задача была успешно решена с помощью получения конструкций, содержащих апикальный домен шаперона GroEL и нерастворимые N-концевой фрагмент белка E2 вируса гепатита С или нерастворимый белок E6 вируса папилломы человека. Автору удалось выделить в стабильном состоянии оба нерастворимых белка благодаря их взаимодействию с апикальным доменом шаперона. Более того, были получены так называемые пермутированные формы апикальных доменов, в которые можно вводить нужный белок в такие участки апикального домена, где два белка более эффективно взаимодействуют друг с другом. Этот подход позволяет создать более универсальную платформу для выделения нерастворимых белков, а конкретные уже полученные результаты пригодны для создания эффективных вакцинных антигенов.

И, наконец, 5 глава посвящена разработке оригинальных гистидиновых меток для введения полипептидных цепи. К сожалению, в настоящее время принято бездумно использовать стандартные гистидиновые метки для очистки рекомбинантных белков. Вместо использования довольно простых традиционных подходов, которые, кстати, были успешно применены в данной работе, вводят гистидиновые метки в белок для проведения очистки в одну стадию. Однако, такой прием часто приводит к печальным последствиям. Белки начинают агрегировать, идти в тельца включения, неправильно сворачиваться и так далее. В результате получают препараты формально гомогенные по результатам электрофореза в денатурирующих условиях, но в ненативном или агрегированном виде. Например, много статей, в которых, активность рекомбинантных ферментов на порядок ниже, чем их нативных форм, что не смущает исследователей. Все эти проблемы были

тщательно изучены авторами и предложено введение аффинных меток не только на N- или C-концы полипептидной цепи, но и внутрь полипептидной цепи. Такой подход позволяет вводить необычную гистидиновую метку в такую зону белка, где она окажет минимальное негативное воздействие на его функции. Кроме того, это полезно для прикладных задач, так как N- или C-концы полипептидной цепи в этом случае остаются доступными для создания нужных слитых конструкций, а способность к эффективной очистке на металло-аффинной смоле сохраняется.

Следует отметить, что диссертация носит не описательный, а ярко выраженный биоинженерный характер. Автором предложены и экспериментально апробированы несколько независимых технологических платформ, каждая из которых имеет самостоятельную научную и прикладную ценность.

Основные положения диссертации достаточно полно отражены в 19 научных публикациях, включая статьи в журналах Scientific Reports, Biomolecules, ACS Omega, PLoS One, Protein Engineering Design and Selection и ряде отечественных изданий, индексируемых в международных базах данных РИНЦ, Web of Science и Scopus. Кроме того, Юркова М.С. является одним из авторов российского патента. Результаты работы были также широко представлены на различных конференциях.

Вместе с тем по диссертационной работе имеются отдельные замечания и вопросы дискуссионного характера.

1. Автор подробно рассматривает продукцию энфувиртида и полифемузина I, было бы полезно провести сравнительный анализ предложенной технологии и существующих методов химического синтеза пептидов, особенно в отношении их безопасности и токсичности используемых соединений. Следовало бы обсудить иные способы вырезания пептидов из различных конструкций, например, с помощью протеолитического расщепления по специально введенным сайтам вместо использования бромциана.

2. Следовало бы обсудить возможные ограничения, связанные с иммуногенностью белков-носителей на основе шаперона GroEL при их потенциальном медицинском применении. Можно ли использовать менее иммуногенные эукариотические шапероны, например TRiC или его субъединицы? Возможно также, что шаперона GroEL может послужить своеобразным адъювантом использования слитых с ним антигенов для вакцинации.

3. При разработке внутренних полигистидиновых меток были исследованы 2 конкретных белка. Было бы интересно проверить эффективность

этих меток на слитых конструкциях. Вероятно, это будет сделано при дальнейшем развитии работы.

4. Автор не сразу объясняет необходимость получения безметионинового шаперона и заставляет читателя строить догадки. Сначала можно предположить, что это делается для предотвращения окисления остатков метионина и последующей термоденатурации белка, что позволяет проводить очистку шаперона и его производных просто нагреванием. Лишь на 64 стр. выясняется, что это нужно для вырезания целевых пептидов с помощью гидролиза бромцианом. Вероятно, для конструктов, в которых предусмотрено вырезания протеазами по специфическим сайтам, не нужны безметиониновые шапероны (стр. 140).

5. В разделе «Материалы и методы» из-за выбранной структуры изложения некоторые методы повторяются (например, круговой дихроизм).

6. Стр. 104 – для точной идентификации остатков цистеина в полифемузина лучше было бы полностью их окислить, например, надмуравьиной кислотой.

7. Рис. 14 – название плохо сформулировано, на дорожке Г2 не указано где энфувиртид.

8. Стр. 161. Жаль, что не исследовали шапероно-подобную активность пермутированных форм апикального домена.

9. Схема на 53 рисунки мало информативна, лишь запутывает читателя.

Следует подчеркнуть, что указанные замечания носят преимущественно дискуссионный характер и не снижают общей высокой оценки выполненного исследования.

Диссертационная работа Юрковой Марии Сергеевны «Биотехнологическое применение свойств шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*» представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, в которой решена крупная научная проблема биотехнологии, связанная с созданием новых биотехнологических платформ на основе модифицированных форм шаперона GroEL. Полученные результаты обладают существенной научной новизной, высокой теоретической и практической значимостью, а выводы хорошо обоснованы экспериментальным материалом.

По объёму выполненных исследований, уровню научной новизны, степени обоснованности выводов и практической значимости полученных результатов

диссертация 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 её автор, Юркова Мария Сергеевна, безусловно, заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Я, Муронец Владимир Израилевич, настоящим даю согласие на размещение моих персональных данных на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН и в Федеральной информационной системе государственной научной аттестации, включение их в аттестационное дело соискателя и дальнейшую обработку.

Официальный оппонент

Муронец Владимир Израилевич,
доктор биологических наук, профессор,
заведующий отделом биохимии
животной клетки
НИИ Физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского,
МГУ имени М.В. Ломоносова
119234 г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы
МГУ 1, стр. 40
vimuronets@belozersky.msu.ru
+7 (495) 939-41-95

_____  Муронец Владимир Израилевич,

Дата 27.08.2026

Подпись д.б.н., профессора Муронца Владимира Израилевича
ЗАВЕРЯЮ:

И.о. директора НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова, член-корреспондент РАН

Дата: 28.08.26





Сергиев П.В.