

### **ОТЗЫВ**

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Покровского Вадима Сергеевича на диссертационную работу Юрковой Марии Сергеевны  
**«Биотехнологическое применение свойств шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*»**, представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

#### **Актуальность темы диссертационной работы**

Разработку и производство лекарственных средств, вакцин, ферментов и биоактивных пептидов невозможно представить без получения рекомбинантных белков и пептидов с заданными свойствами. Однако нередко речь идет о токсичных, неустойчивых или плохо растворимых соединениях, эффективный биосинтез и очистка которых без потери функциональной активности представляет нетривиальную задачу.

Для повышения растворимости и стабильности целевого белка применяют системы слитых белков, где целевой полипептид продуцируется как часть более крупного белкового конструктора. В связи с разнообразием свойств потенциальных целевых белков такие системы не универсальны, и применяемые белки-носители не всегда оптимально соответствуют решению задачи достаточно высокой экспрессии полноценной функциональной формы стабильного продукта соответствующей степени чистоты. Соответственно, в современной биотехнологии актуальны поиск и разработка новых широко применимых платформ для продукции и стабилизации рекомбинантных белков.

В качестве наиболее универсальных растворимых нетоксичных белков-лидеров с высоким уровнем экспрессии, способных стабилизировать целевой белок, перспективными представляются шапероны, что обусловлено естественной ролью шаперонов в поддержании клеточного протеостаза и их способностью взаимодействовать с широким спектром белков, однако для их использования в технологических процессах необходима соответствующая биоинженерная модификация. Особенно интересны в этом отношении шапероны, относящиеся к семейству GroEL, способные не только значительно стабилизировать белки, но и увеличивать выход биологически активной формы белка. Кроме того, шаперон GroEL из термостабильных микроорганизмов отличается особенно высокой устойчивостью к температурным воздействиям, что облегчает очистку целевого белка.

Не менее важно совершенствование методов очистки и модификации рекомбинантных белков, для чего широко применяется аффинная хроматография с

использованием полигистидиновых меток. С этой точки зрения актуальное направление белковой инженерии представляет разработка новых вариантов полигистидиновых меток, пригодных для введения в состав полипептидной цепи и не нарушающих структуру белка.

Таким образом, создание и исследование новых систем продукции рекомбинантных белков и пептидов, основанных на использовании молекулярных шаперонов, а также разработка новых инструментов белковой инженерии, включая усовершенствованные аффинные метки, позволит увеличить разнообразие получаемых полипептидов, повысить эффективность их биосинтеза и очистки, что несомненно актуально для современной биотехнологии, белковой инженерии и биофармацевтики.

### **Научная новизна**

Научная новизна диссертационного исследования М.С. Юрковой заключается в создании инновационных биотехнологических платформ на основе термостабильного шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*. Разработанные системы слитых белков позволяют эффективно продуцировать, очищать и стабилизировать терапевтические, лабильные и высокотоксичные пептиды, получение которых стандартными методами экономически неэффективно или невозможно.

Целенаправленные изменения, внесенные в молекулы шаперона методами белковой инженерии, впервые предназначены именно для использования модифицированных форм шаперона в качестве инструмента в биотехнологии и получения функциональных конструкторов, применение которых также до сих пор не было описано. Автором впервые раскрыт потенциал молекулярных шаперонов как основы для получения слитых белковых конструкций. Возможности биотехнологического применения полученных конструкторов впервые продемонстрированы на примере получения практически значимых полипептидов и последующего оптимального использования разработанных систем. Среднее количество полученного конструктора GroEL/полифемузин I составило 200 мг на 1 литр культуры, что дает средний теоретический выход полифемузина I 7,6 мг на литр культуры. На практике выход полифемузина I после завершения процедуры очистки варьировал от 4,0 до 4,8 мг на литр культуры. Выход энфувиртида составил 33,5–38,9%; из 2,5 л культуры было получено около 7,14–8,29 мг пептида 95% чистоты. Следует подчеркнуть возможность очистки целевого белка путем нагревания лизата как одно из ключевых преимуществ получаемых конструкторов.

Кроме того, М.С. Юрковой впервые созданы функциональные пермутированные формы апикального домена модифицированного шаперона GroEL *Thermus thermophilus*, а их свойства изучены для расширения области практического применения. Для всех

конструктов выход ренатурированного белка составлял не менее 90%, причем не менее 80% белка находилось в растворимой фракции.

Автором разработаны также инновационные полигистидиновые метки для встраивания в полипептидную цепь. Получены два различных белка-носителя со встроенными полигистидиновыми метками и свободными N- и C-концами для создания слитых конструктов. Впервые полученные в работе белки-носители для систем слитых белков со встроенными His-метками приобрели аффинность к никелевой смоле, сохранив свои функциональные свойства.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты диссертационного исследования вносят значимый вклад в развитие белковой инженерии и биотехнологии, расширяя возможности использования молекулярных шаперонов и их производных.

Благодаря новым сведениям о структурно-функциональных свойствах шаперона GroEL и его модифицированных вариантов, включая термостабильные формы, модифицированные минишапероны и их инженерные производные, элементы системы GroEL можно рассматривать как универсальную платформу для конструирования систем продукции и стабилизации рекомбинантных полипептидов.

Практическая значимость исследований биотехнологического применения свойств шаперона GroEL (в частности, из экстремального термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus*) заключается в создании универсальных, экономичных и эффективных технологических платформ для получения сложных, нестабильных и токсичных белков, востребованных в фармакологии, медицине и промышленности. Результаты представленной работы позволяют решить практические задачи: повысить эффективность биосинтеза терапевтических и высокотоксичных пептидов. Разработаны и продемонстрированы две системы слитых белков на основе исследуемого шаперона: в качестве белка-лидера первая использует полноразмерный комплекс GroEL/ES, вторая — модифицированный апикальный домен шаперона GroEL. Использование GroEL, обладающего уникальной архитектурой с внутренней полостью, в качестве белка-носителя, во-первых, снижает токсическую нагрузку на клетки *E. coli* и резко повышает выход целевого продукта; во-вторых, предотвращает протеолиз лабильных пептидов. Автором продемонстрирована эффективность такой системы: биосинтетическим путем получен один из наиболее токсичных антибактериальных пептидов, полифемузин I. Предложенная автором модификация изолированного апикального домена шаперона (минишаперона) позволяет стабилизировать рекомбинантные белки, склонные к агрегации или исходно нерастворимые, в растворимой форме. В результате работы в стабильной растворимой форме получено два исходно нерастворимых вирусных белка,

применимые для получения соответствующих вакцин.

Кроме того, необходимо отметить практическое значение модификации структуры GroEL (или его субъединиц) путем введения внутренних полигистидиновых меток. Это позволяет осуществлять высокоэффективную аффинную очистку сложных белковых комплексов методом металло-хелатной хроматографии, избежав размещения метки на концах целевого терапевтического белка и изменения его функциональной активности.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа М.С. Юрковой, изложенная на 234 страницах, состоит из введения, основной части, включающей 5 глав, заключения и выводов. Материал исчерпывающе проиллюстрирован: работа содержит 7 таблиц и 53 рисунка. Список использованной литературы включает 304 источника, из них 295 на английском языке.

Во введении автор демонстрирует актуальность темы исследования, описывает объект исследования, цель и задачи диссертационной работы, научную новизну, ее теоретическую и практическую значимость. Здесь же кратко представлены методология и методы исследования, подтверждена достоверность полученных результатов и их апробация, сформулированы положения, выносимые на защиту, указан личный вклад автора, структура и объем диссертации, а также представлен список публикаций по теме диссертации.

Первая глава посвящена обзору литературы: подробно описаны молекулярные шапероны и возможности их практического применения на основе характерных свойств, в частности, применение GroEL и других шаперонов для ренатурации белков. Уделено внимание проблемам и перспективам разработки белковых вакцин, описаны типы таких вакцин, их иммунологические механизмы и связанные с белковыми вакцинами новые перспективные технологии. Кратко описано производство и биотехнологическая обработка белковых вакцин, их клиническая разработка и ее регуляторные аспекты, приведены примеры применения лицензированных и новых белковых вакцин. С точки зрения белковой инженерии охарактеризованы проблемы и ограничения модификации белков — введения дополнительных локусов в белковые структуры.

Во второй главе изложены материалы и методы исследования. Описано создание конструкторов для биосинтетического получения пептидов: необходимые изменения генов, контролирующих синтез целевых белков, с помощью стандартных молекулярно-биологических методов и подтверждение идентичности конструкторов ДНК-секвенированием. Для экспрессии генетических конструкторов использована бактериальная система *E. coli*. Функциональная активность полученных полипептидов продемонстрирована адекватными и разнообразными методами, в числе которых аффинная хроматография на ДНК-агарозе, определение минимальной ингибирующей

концентрации пептида, исследование биологического действия на клеточной линии человека МТ-4; спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса для комплексов белков, меченных His-метками, с ионами  $Ni^{2+}$ ; спектроскопия и оценка яркости флуоресценции для флуоресцентного белка eGFP. Вторичная структура белков изучена с использованием спектроскопии кругового дихроизма. Для подтверждения идентичности пептидов применены методы ВЭЖХ, масс-спектрометрии и определения функциональной активности.

В 3-й главе описаны две конструкции на основе модифицированного шаперона GroEL с целевыми пептидами, контрастирующими по физико-химическим свойствам. Целевые пептиды представлены мощным антибактериальным пептидом полифемузином и терапевтическим пептидом энфувиртидом, применяемым при лечении СПИДа. Обсуждена актуальность технологического биосинтеза пептидов, обоснован дизайн белка-носителя для системы биосинтеза, описано получение слитых конструкторов и их свойства. Доказана экспрессия каждой из описанных конструкций GroEL с введенным пептидом с высоким выходом и в растворимом состоянии. Поскольку конструкции сохраняют первоначальную термостабильность исходного GroEL, то возможна их очистка от белков клетки-хозяина путем прогрева клеточных лизатов. Идентичность целевых пептидов после расщепления бромцианом подтверждена с помощью хроматографии в обращенных фазах, масс-спектрометрии и тестов на биологическую активность. Таким образом, предложенная система подходит для лабильных пептидов и для пептидов с проблемами сворачивания, а также для токсичных пептидов благодаря изоляции пептида внутри полости комплекса GroEL/ES.

В 4-й главе описана система слитых белков, основанная на модифицированном апикальном домене шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*, GrAD, для стабилизации исходно нерастворимых белков в растворимой форме. Традиционно для автора показана актуальность решения задачи, обоснован выбор белка-носителя, продемонстрировано создание такого белка методами белковой инженерии, его конструкторов с исходно нерастворимыми белками на С-конце и N-конце. Подтверждена функциональная активность целевого белка в составе слитого конструктора. Разработана методика эффективной ренатурации конструктора на металло-аффинной смоле. В составе слитого конструктора с GrAD два исходно нерастворимых вирусных белка, белок Е6 вируса папилломы человека и N-концевой фрагмент белка Е2 вируса гепатита С, были получены в стабильных растворимых формах, пригодных для использования в качестве антигенов при разработке вакцин.

Глава 5 посвящена разработке гистидиновых меток для введения в состав полипептидной цепи белков. Показана актуальность разработки аффинных меток,

обоснован дизайн встраиваемых полигистидиновых меток, выбор белков и места для их введения. Описаны разработка новых вариантов His-меток и их использование в составе полипептидной цепи двух белков, принадлежащих к разным структурным классам. Первый белок, GrAD207, пермутированный вариант апикального домена шаперона GroEL *T. thermophilus*, предназначен для стабилизации в растворе склонных к агрегации белков. Второй — eGFP, зеленый флуоресцентный белок, широко применяемый для флуоресцентного мечения других белков и клеточных структур. Охарактеризованы конструкторы с введенными полигистидиновыми метками, в том числе флуоресценция eGFP.

В заключении автор подчеркивает большое практическое значение проведенных исследований, уделяя особое внимание практическому потенциалу разработанных систем слитых белков, способных существенно расширить возможности применения шаперонов в биотехнологии.

Диссертационную работу завершают обоснованные выводы, соответствующие поставленным задачам, и перечень цитируемой литературы.

#### **Полнота публикаций по теме диссертационной работы**

Результаты диссертационной работы опубликованы в 22 научных работах: 19 статей, из них 11 на английском языке, в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России, 2 тезисов в материалах научных съездов и конференций, получен патент на изобретение РФ.

Основные результаты работы были представлены для обсуждения на 44 Конгрессе FEBS, проходившем в Кракове, Польша, 6-11 июля 2019 г., на VII Съезде биохимиков России, объединенном с X Российским симпозиумом «Белки и пептиды», на конференциях ФИЦ Биотехнологии РАН в 2023 г. и 2024 г.

#### **Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации**

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

#### **Соответствие диссертационной работы паспорту научной специальности**

Диссертационная работа Юрковой М.С. соответствует паспорту научной специальности 1.5.6. Биотехнология, а именно пунктам: п. № 2; п. № 5, п. № 6.

#### **Вопросы и замечания**

Работа в целом выполнена на очень высоком методическом уровне, в процессе ознакомления возник ряд технических или дискуссионных замечаний, которые, однако, не снижают её научной ценности.

- 1) Предложенный подход к получению пептидов доказывает возможность использования биотехнологических подходов вместо химического синтеза,

однако для практических рекомендаций было бы целесообразно провести также экономические расчеты технологических процессов.

- 2) Было бы интересно описать более широко спектр белков, которые могут выигрывать от присоединения к полипептидной цепи GrAD в качестве белка-носителя в системе слитых белков для повышения растворимости, с учетом целевых биологических свойств этих белков с подтверждением их сохранения. Есть ли смысл рассмотреть эту технологию не только в контексте презентации антигенов, но и в качестве возможного инструмента доставки плохо растворимых терапевтических белков? В частности, интересно, какое количество целевого белка может высвободиться под действием энтерокиназы (для белков со встроенной последовательностью DDDDK), и как это может быть использовано при создании лекарственных препаратов (как бинарная терапия?).
- 3) В эксперименте по оценке функциональности (связывание белком E6 ДНК) было бы целесообразно в качестве активного контроля представить данные по связыванию ДНК немодифицированным вариантом E6.
- 4) В работе присутствуют некоторые незначительные неточности, касающиеся использования медицинских терминов. В частности, СПИД — терминальная стадия ВИЧ-инфекции, корректнее писать, что энфувиртид используется для терапии ВИЧ-инфекции.

### **Заключение**

Диссертационная работа Марии Сергеевны Юрковой на тему «Биотехнологическое применение свойств шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи, имеющей значение для развития микробиологии и биотехнологии: автором разработаны качественно новые подходы к конструированию слитых белков на основе молекулярных шаперонов, что ведет к созданию новых, универсальных и эффективных систем биосинтеза и позволяют преодолеть ограничения традиционных биотехнологических систем продукции полипептидов.

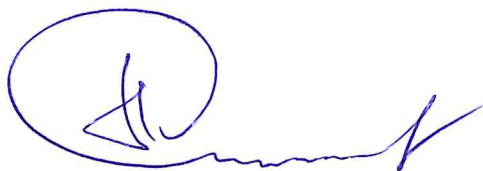
По актуальности темы, степени обоснованности положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертация полностью соответствует требованиям п. 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание

ученой степени доктора наук, а ее автор Юркова Мария Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Я, Покровский Вадим Сергеевич, 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.

Доктор медицинских наук, профессор (3.1.6 – Онкология, лучевая терапия; 1.5.4 – Биохимия),  
заведующий лабораторией биохимических основ фармакологии,  
директор НИИ экспериментальной онкологии и канцерогенеза  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Национальный медицинский исследовательский центр  
онкологии имени Н.Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации»  
115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24  
www.ronc.ru  
v.pokrovsky@ronc.ru  
+7-499-324-2274

03.09.2026



Покровский Вадим Сергеевич

Подпись доктора медицинских наук, профессора  
Покровского Вадима Сергеевича заверяю:

Ученый секретарь  
НИИ экспериментальной онкологии и канцерогенеза  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Национальный медицинский исследовательский центр  
онкологии имени Н.Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации»  
Кандидат биологических наук



Гудкова Маргарита Владимировна