

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук
(ИОГен РАН)

ул. Губкина, д. 3, г. Москва, ГСП-1, 119991
Тел.: (499) 135-62-13, (499) 135-20-41
Факс: (499) 132-89-62

E-mail: iogen@vigg.ru
http: www.vigg.ru

14. 09. 2026

№ 92 -02-13/811

На № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук



А.В. Мисюрин

« 14 » сентября 2026 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Юрковой Марии Сергеевны

«Биотехнологическое применение свойств шаперона GroEL из *Thermus*»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 1.5.6 — «Биотехнология»

Общая характеристика и актуальность диссертационного исследования

Диссертационная работа Юрковой Марии Сергеевны посвящена разработке и экспериментальному обоснованию нового подхода к биотехнологическому использованию молекулярного шаперона GroEL из термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus* и его инженерных производных. Центральная идея исследования состоит не в традиционном использовании шаперонов лишь как вспомогательных факторов фолдинга, а в направленной модификации молекулы GroEL и ее отдельных структурных элементов с целью превращения их в самостоятельные технологические инструменты для получения, стабилизации и очистки рекомбинантных полипептидов.

Актуальность выбранного направления не вызывает сомнений. Несмотря на высокий уровень развития технологий рекомбинантного синтеза, получение токсичных, гидрофобных, лабильных, склонных к агрегации или плохо сворачивающихся белков и пептидов по-прежнему относится к числу наиболее сложных задач современной биотехнологии. Ограничения стандартных бактериальных экспрессионных систем проявляются в низком выходе целевого продукта, образовании телец включения, протеолитической деградации, токсическом воздействии на клетку-продуцент и необходимости многостадийной последующей очистки. Поэтому разработка платформенных решений, способных одновременно обеспечить защиту целевого полипептида, повышение его растворимости и стабильности, а также технологичность выделения, имеет как фундаментальное, так и выраженное прикладное значение.

Выбор GroEL *T. thermophilus* в качестве основы для таких решений представляется обоснованным. Его высокая термостабильность, хорошо изученная пространственная организация, наличие внутренней полости олигомерного комплекса, а также способность апикального домена взаимодействовать с гидрофобными участками белков-субстратов создают предпосылки для рационального инженерного использования данного шаперона. Существенным достоинством работы является то, что эти фундаментальные свойства не просто обсуждаются как потенциально полезные, а последовательно преобразуются автором в конкретные биотехнологические конструкции и проверяются на практически значимых модельных объектах.

Цель исследования сформулирована как разработка нового направления в использовании шаперонов для решения комплекса биотехнологических задач. Для ее достижения автором поставлены взаимосвязанные задачи: создание методами белковой инженерии форм шаперонов для биосинтеза нестабильных и токсичных полипептидов, стабилизации исходно нерастворимых белков и упрощения последующих стадий получения целевого продукта, а также дальнейшая оптимизация созданных форм для расширения области их применения. Поставленные задачи соответствуют заявленной цели и последовательно реализованы в диссертационной работе.

Структура и содержание диссертации

Диссертация представляет собой крупное завершенное исследование объемом 234 страницы и включает введение, пять глав, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 53 рисунками и 7 таблицами. Библиографический список включает 304 источника, из них 295 на английском и 9 на русском языке. Такая структура соответствует логике исследования и позволяет последовательно проследить переход от анализа фундаментальных свойств молекулярных шаперонов к созданию и экспериментальной проверке конкретных инженерных платформ.

Литературный обзор содержит систематизированное изложение современных представлений о молекулярных шаперонах, возможностях их практического применения, проблемах получения рекомбинантных белков и пептидов, а также об инженерных подходах к созданию белковых конструкций. Отдельное внимание уделено системам слитых белков, технологиям ренатурации, вакцинным белкам и ограничениям при введении дополнительных последовательностей в полипептидную цепь. Обзор непосредственно подводит к постановке экспериментальных задач и демонстрирует хорошее знание автором современной литературы по теме исследования.

Экспериментальная часть включает три взаимосвязанных технологических блока. Первый посвящен созданию системы биосинтеза пептидов на основе модифицированного полноразмерного GroEL/ES-комплекса; второй — разработке системы стабилизации исходно нерастворимых белков на основе модифицированного апикального домена GroEL (GrAD) и его пермутированных вариантов; третий — разработке внутренних полигистидиновых меток, позволяющих проводить металло-аффинную очистку при сохранении свободных N- и C-концов белка-носителя. Такая организация материала представляется удачной: каждый последующий раздел расширяет функциональность созданной платформы и одновременно решает самостоятельную биотехнологическую задачу.

Научная новизна и значимость полученных результатов

Научная новизна диссертации определяется прежде всего реализацией концепции направленной инженерии молекулярного шаперона для его целевого технологического использования. В отличие от широко распространенных подходов, основанных на коэкспрессии шаперонов с рекомбинантными белками, в рассматриваемой работе сама молекула GroEL и ее апикальный домен выступают объектами рационального конструирования. В результате созданы функциональные производные, свойства которых адаптированы к конкретным задачам биосинтеза, стабилизации и очистки полипептидов.

В рамках первой платформы разработана система биосинтетического получения пептидов с использованием модифицированного GroEL *T. thermophilus*. Принципиально важно, что работоспособность системы продемонстрирована не на одном модельном объекте, а на двух пептидах, резко различающихся по физико-химическим характеристикам. Полифемузин I представляет собой короткий, положительно заряженный, структурированный и выраженно токсичный для клеток-продуцентов антимикробный пептид, тогда как энфувиртид — более длинный, слабо отрицательно заряженный, практически неструктурированный терапевтический пептид. Для обеих конструкций показана эффективная экспрессия в растворимой форме, сохранение термостабильности GroEL, возможность частичной очистки прогреванием клеточного лизата, последующее выделение целевого пептида и подтверждение его идентичности и биологической активности.

Полученные количественные результаты усиливают прикладную значимость данного раздела. При лабораторных условиях культивирования выход слитого конструктора составлял порядка 200–400 мг на литр культуры. После очистки было получено 4–4,8 мг полифемузина I из 1 л культуры и 7,14–8,29 мг энфувиртида 95%-ной чистоты из 2,5 л культуры. Учитывая сложность биосинтеза токсичных и лабильных пептидов, данные результаты демонстрируют реальную технологическую состоятельность предложенного подхода и возможность его дальнейшей оптимизации при масштабировании.

Во втором технологическом блоке создана система стабилизации сложных в работе белков на основе модифицированного апикального домена GroEL — GrAD. С использованием этой системы два исходно нерастворимых вирусных белка — белок E6 вируса папилломы человека 16 типа и N-концевой фрагмент белка E2 вируса гепатита С — получены в стабильных растворимых формах. Существенно, что после ренатурации слитые конструкции сохраняли растворимость при хранении, замораживании-оттаивании и лиофилизации-перерастворении без использования дополнительных стабилизирующих агентов. Это свидетельствует не только о факте повышения растворимости, но и о формировании технологически устойчивого состояния белкового продукта.

Значимым развитием данного подхода стало создание функциональных пермутированных форм GrAD. Автором показано, что изменение положения N- и C-концов белка-носителя позволяет варьировать пространственную ориентацию присоединяемого целевого белка, сохраняя при этом способность носителя стабилизировать склонный к агрегации полипептид. Следует отметить, что разные пермутированные формы не являются полностью идентичными по физико-химическим свойствам: в частности, GrAD207 демонстрирует свойства, близкие к исходному GrAD, тогда как GrAD230 характеризуется несколько большей склонностью к агрегации. Именно такая сравнительная характеристика делает результаты особенно ценными, поскольку показывает не только преимущества, но и реальные границы структурной варибельности платформы.

Третий самостоятельный результат работы — разработка внутренних полигистидиновых меток и обоснование принципов их размещения в полипептидной цепи. Предложены варианты 3H1G3H, 3H3G3H и 7H, изученные на GrAD207 и eGFP. Показано, что введение метки может обеспечивать сродство к Ni^{2+} -содержащей металло-аффинной смоле при сохранении функциональности белка и свободных N- и C-концов. Практически важен вывод о структурной контекстности такого решения: различные варианты меток по-разному подходят для конформационно подвижных и более жестких участков белка. Таким образом, работа не ограничивается демонстрацией технической возможности внутреннего введения His-последовательности, а предлагает рациональные ориентиры для выбора ее архитектуры и места локализации.

В совокупности результаты диссертации формируют целостную систему научно обоснованных биотехнологических решений: полноразмерный GroEL используется как защищающая среда для продукции сложных пептидов; его апикальный домен и пермутированные производные — как носители для стабилизации исходно нерастворимых белков; внутренние аффинные метки — как инструмент дальнейшей технологической оптимизации очистки. Именно системность и взаимная связанность этих результатов позволяют рассматривать работу как значимое развитие направления белковой инженерии молекулярных шаперонов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в расширении представлений о структурно-функциональной пластичности GroEL и его апикального домена. Показано, что целенаправленное изменение первичной структуры шаперона, включая создание пермутированных форм и введение дополнительных функциональных последовательностей, может быть совместимо с сохранением ключевых свойств белка. Полученные данные имеют значение для понимания допустимых границ инженерных модификаций белков семейства Hsp60 и взаимосвязи между пространственной организацией белка-носителя и его способностью взаимодействовать с нестабильными или гидрофобными полипептидами.

Практическая значимость диссертации определяется созданием конкретных прототипов технологических платформ для получения рекомбинантных пептидов и белков, проблемных для стандартных систем экспрессии. Особого внимания заслуживает использование термостабильности GroEL для упрощения стадии очистки путем прогревания клеточного лизата, возможность масштабирования основных этапов процесса, сохранение стабильности целевых белков после замораживания и лиофилизации, а также возможность дальнейшей адаптации конструкций под свойства конкретного целевого продукта. Разработанные решения потенциально востребованы при создании терапевтических и антимикробных пептидов, антигенных и диагностических белков и других продуктов биотехнологии.

Важно, что автор не ограничивается лабораторной демонстрацией принципа, а рассматривает технологические параметры, определяющие дальнейшее развитие платформ. В диссертации обсуждаются возможности повышения выхода при культивировании высокой плотности, альтернативные варианты очистки, способы замены химического расщепления на ферментативное или иное управляемое высвобождение целевого пептида. Это свидетельствует о технологической ориентированности исследования и понимании автором требований, возникающих при переходе от лабораторной конструкции к производственному процессу.

Методический уровень и обоснованность результатов

Работа выполнена на высоком методическом уровне. Для решения поставленных задач использован комплекс современных молекулярно-генетических, микробиологических, биохимических, биофизических и аналитических методов. Применены методы конструирования и экспрессии рекомбинантных генов, культивирования бактериальных продуцентов, различные варианты хроматографической очистки, электрофорез и денситометрия, масс-спектрометрия, ВЭЖХ, спектроскопия кругового дихроизма, спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса, анализ флуоресцентных характеристик, функциональные тесты и молекулярное моделирование.

Достоверность основных выводов обеспечивается использованием взаимодополняющих методов, постановкой необходимых контролей и воспроизводимостью экспериментов. Особенно убедительно выглядят те части работы, где функциональное заключение подтверждается несколькими независимыми типами данных: например, идентичность и свойства полученных пептидов оцениваются хроматографически, масс-спектрометрически и в тестах биологической активности; структурная сохранность инженерных вариантов белков анализируется биофизическими методами и одновременно проверяется по их функциональным свойствам. Выводы логично следуют из представленных результатов и в целом адекватно отражают объем выполненного исследования.

Апробация результатов, публикации и личный вклад соискателя

Основные результаты диссертации прошли достаточную научную апробацию. По теме работы приведены 19 научных статей на русском и английском языках, опубликованных в журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus; среди них работы в Scientific Reports, PLOS ONE, Biotechnology Reports, Biomolecules, ACS Omega, Protein Engineering, Design & Selection и других профильных изданиях. Результаты также представлены на международных и российских научных форумах; по тематике исследования получен патент Российской Федерации.

Публикации охватывают основные экспериментальные блоки диссертации — получение токсичных пептидов внутри GroEL-комплекса, биосинтез энфувиртида, создание минишаперонной fusion-системы, физико-химическую характеристику пермутированных вариантов апикального домена и разработку внутренних His-меток. Это позволяет считать, что содержание диссертации в достаточной степени отражено в опубликованных работах.

Согласно материалам диссертации, большая часть экспериментальной работы выполнена соискателем самостоятельно либо при его непосредственном участии; автор принимал участие в подготовке публикаций, анализе и интерпретации данных и представлении результатов на научных конференциях. Характер и объем

представленного материала свидетельствуют о существенном личном вкладе Юрковой М.С. в постановку и реализацию рассматриваемого направления исследований.

Соответствие диссертации заявленной специальности

По содержанию, используемым методическим подходам и характеру полученных результатов диссертационная работа полностью соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология. В работе решаются задачи конструирования биологических систем-продуцентов, разработки способов получения и очистки биологически активных молекул, инженерии белков и создания новых биотехнологических платформ. Существенная часть результатов имеет непосредственную технологическую направленность и связана с оптимизацией процессов биосинтеза, стабилизации и выделения рекомбинантных полипептидов.

Вопросы и замечания

Диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровне. Принципиальных замечаний, способных повлиять на ее общую положительную оценку, нет. Вместе с тем при обсуждении работы представляется целесообразным обратить внимание на следующие вопросы и пожелания дискуссионного характера:

1. Разработанная система биосинтеза пептидов убедительно продемонстрирована на полифемузине I и энфувиртиде, существенно различающихся по длине, заряду, структурированности и биологическим свойствам. Было бы полезно более четко сформулировать критерии, по которым можно заранее прогнозировать пригодность конкретного пептида для размещения в модифицированном комплексе GroEL/ES, включая возможные ограничения по длине, суммарному заряду, гидрофобности, склонности к формированию вторичной структуры и особенностям взаимодействия с внутренней поверхностью шаперона.

2. Для системы на основе GrAD показана стабилизация двух исходно нерастворимых вирусных белков. В связи с этим представляет интерес вопрос о пределах применимости данного подхода к целевым белкам существенно большей молекулярной массы и более сложной доменной организации. Насколько критичны для эффективности стабилизации размер белка, число доменов, площадь экспонированной гидрофобной поверхности и положение точки присоединения к белку-носителю?

3. В предложенной схеме получения пептидов важным этапом является высвобождение целевого продукта из слитой конструкции с использованием бромциана. Автор справедливо указывает на возможность адаптации этой стадии и применения иных химических или ферментативных способов расщепления. Для дальнейшего масштабирования технологии было бы целесообразно подробнее обсудить критерии выбора альтернативного способа высвобождения целевого

пептида с учетом требований промышленной безопасности, селективности реакции, сохранения нативной структуры продукта и последующей регуляторной приемлемости процесса.

4. Разработанные внутренние полигистидиновые метки апробированы на GrAD207 и eGFP, причем показана зависимость их влияния от структурного контекста белка. Представляется важным более четко сформулировать алгоритм выбора типа His-метки и места ее введения в новый белок: какие параметры локальной вторичной структуры, конформационной подвижности, доступности растворителю и удаленности от функционально значимых участков следует считать определяющими для минимизации влияния метки на структуру и активность белка?

Указанные вопросы носят преимущественно дискуссионный и перспективный характер, не затрагивают достоверность основных экспериментальных результатов, не ставят под сомнение сформулированные автором выводы и не снижают высокой общей оценки диссертационной работы.

Заключение

Диссертация Юрковой Марии Сергеевны «Биотехнологическое применение свойств шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основе комплекса взаимосвязанных исследований разработаны и экспериментально обоснованы новые биотехнологические решения по получению, стабилизации и очистке сложных в работе рекомбинантных пептидов и белков с использованием инженерных производных молекулярного шаперона GroEL.

Совокупность полученных результатов имеет существенное значение для развития белковой инженерии и биотехнологии. Созданы две взаимодополняющие системы слитых белков на основе полноразмерного GroEL и его апикального домена, разработаны функциональные пермутированные формы белка-носителя и внутренние аффинные метки, расширяющие технологические возможности созданных конструкций. Работа характеризуется научной новизной, внутренней логической завершенностью, достаточным объемом экспериментального материала, высоким методическим уровнем, обоснованностью выводов и выраженным прикладным потенциалом.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, объему и качеству выполненных исследований, степени обоснованности научных положений и выводов диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, установленным пунктами 9–14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (с последующими изменениями), а ее автор, Юркова

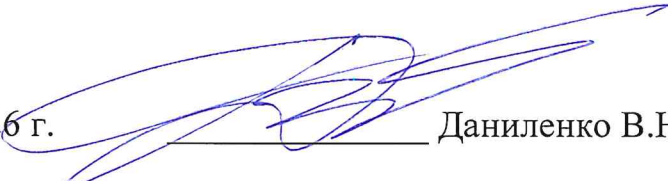
Мария Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании научного семинара лаборатории генетики микроорганизмов Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, протокол № 171 от «11» сентября 2026 г., присутствовало 14 человек, «За» — 14, «Против» — 0, «Воздержались» — 0.

Сведения о составителе отзыва:

Заведующий лабораторией генетики микроорганизмов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук,
доктор биологических наук, профессор
Адрес: 119991, Москва, ул. Губкина, 3
Телефон: +7(499)135-4194
e-mail: valerid@vigg.ru

«14» сентября 2026 г.

 Даниленко В.Н.

Подпись Даниленко Валерия Николаевича удостоверяю

Заместитель директора
по научной работе
Д.Х.Н.

Пестов Н.Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
Почтовый индекс, адрес организации: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д. 3
Адрес официального сайта: vigg.ru
Телефон: (499) 135-62-13
Адрес электронной почты: iogen@vigg.ru
E-mail: iogen@vigg.ru

