



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

№	_____
На №	от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Зам. директора
ФИЦ Биотехнологии РАН
г.с.н. Рахим И.В.
2025 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» на диссертационную работу Юрковой М.С. «Биотехнологическое применение свойств шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*»

Диссертация «Биотехнологическое применение свойств шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*» выполнена Марией Сергеевной Юрковой в лаборатории молекулярной биотехнологии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. Научный консультант по диссертации – д.б.н. Федоров А.Н. (директор ФИЦ Биотехнологии РАН).

М.С. Юркова в 1982 г. окончила Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по специальности «Биохимия». Окончила очную аспирантуру на кафедре биохимии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова в 1988 году. С 1982 по 2008 гг. работала н.с. в Проблемной лаборатории Химии ферментов Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. С 2008 по 2017 г. работала в НИЦ Курчатовский институт в должности научного сотрудника.

Поступила на работу в Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН в 2017 г., в настоящий момент является старшим научным сотрудником лаборатории молекулярной биотехнологии Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, а также заведует этой лабораторией.

В 1991 г. Юрковой М.С. присуждена ученая степень кандидата биологических наук по результатам защиты кандидатской диссертации на тему «Изучение процесса диссоциации Gs-белка из мембран» по специальности 03.00.04. Биохимия.

Слушали:

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

Вопросы задавали:

д.б.н., зав. лаб. А.А. Пометун, д.б.н., в.н.с. А.Л. Мулюкин, д.б.н., проф., зав. лаб. Н.В. Равин, рук. гр., в.н.с., д.б.н. В.М. Терёшина, зав. лаб., г.н.с., д.б.н. Т.В. Хижняк, д.б.н., проф., зав. лаб. А.В. Марданов.

В дискуссии приняли участие:

д.б.н., проф., зав. лаб. Н.В. Равин, д.б.н., зав. лаб. В.В. Кушников, д.б.н., зав. лаб. А.А. Пометун, д.б.н., зав. лаб. Н.В. Пименов, д.б.н., зав. лаб. С.Н. Дедыш, д.б.н., директор ФИЦ Биотехнологии РАН А.Н. Федоров.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертационная работа М.С. Юрковой представляет собой завершённое целостное научное исследование, выполненное на современном методическом уровне, и решает актуальную проблему современной биотехнологии и микробиологии.

Актуальность проблемы

Многие процессы в биотехнологии связаны с биосинтетическим получением рекомбинантных белков и пептидов из различных источников в микробных экспрессионных системах, что часто бывает сопряжено с трудностями по причинам лабильности, гидрофобности, склонности к агрегации или токсичности экзогенных полипептидов в гетерологических системах. В связи с развитием биотехнологических

производств существует растущая потребность в способах поддержания различных рекомбинантных полипептидов в стабильном состоянии как в клетках экспрессионной системы, так и впоследствии в процессе их очистки и дальнейшего использования. Одним из подходов к решению данной проблемы является создание слитых конструкторов с различными белками-носителями, как для повышения уровня экспрессии, так и для повышения стабильности полипептидов. Тем не менее, универсальных белков-лидеров для использования в системах слитых белков не существует, что неудивительно, принимая во внимание разнообразие свойств потенциальных целевых белков. Шапероны, или белки теплового шока, также рассматривались с точки зрения их использования в качестве белков-лидеров, учитывая их фундаментальные функции – связывать гидрофобные и неправильно свернутые белки и способствовать сворачиванию и поддержанию стабильности белков; однако примеры успешного применения шаперонов в составе систем слитых белков немногочисленны. Объяснить это можно сложной организацией самих шаперонов – присоединение к их последовательностям других белков с большой вероятностью нарушает их собственную третичную и четвертичную структуру, лишая их функциональности. Тем не менее, поиски практических приложений в биотехнологии свойственных шаперонам функций не теряют своей актуальности именно по причине универсального участия шаперонов в поддержании клеточного протеостаза и их способности взаимодействовать с самым широким спектром белков.

Научная новизна

Научная новизна работы заключается в первую очередь во внесении методами белковой инженерии целенаправленных изменений в молекулы шаперона и получение функциональных конструкторов, применимых в биотехнологии. Продемонстрированы возможности биотехнологического применения полученных конструкторов на примере получения практически значимых полипептидов и проведена оптимизация последующего использования разработанных систем. Кроме этого, научная новизна работы заключается в создании функциональных пермутированных форм апикального домена модифицированного шаперона GroEL *Thermus thermophilus* и изучении их практически применимых свойств. Также разработаны инновационные полигистидиновые метки для встраивания в

полипептидную цепь и получены два различных белка-носителя для слитых белковых конструкторов со встроенными полигистидиновыми метками, полностью сохранившей функциональностью и свободными N- и C-концами для создания конструкторов.

Теоретическая и практическая значимость работы:

Впервые с помощью белковой инженерии получены функциональные практически применимые модифицированные формы шаперона GroEL *Thermus thermophilus*. Полученные формы шаперона GroEL *Thermus thermophilus* использованы в составе двух различных систем слитых белков, предназначенных для биосинтетического получения и последующей очистки сложных в работе белков и пептидов. Предложена концептуально новая стратегия биосинтетического получения востребованных пептидов, в том числе антимикробных, в бактериальной системе экспрессии. В составе слитых конструкторов с модифицированным апикальным доменом шаперона GroEL *Thermus thermophilus* в стабильной растворимой форме получены два исходно нерастворимых вирусных белка, оба кандидаты для создания соответствующих вакцин. Показана перспективность и широкая применимость разработанных систем для биосинтеза сложных в работе белков и пептидов на основе шаперона GroEL *Thermus thermophilus*.

Конкретное участие автора в получении результатов

Во всех опубликованных работах вклад автора был значительным. Соискатель принимал непосредственное участие в планировании, постановке задач, экспериментах, обобщении и анализе результатов исследований, написании статей.

Степень обоснованности научных положений, рекомендаций и выводов, полученных соискателем

Достоверность полученных данных и сделанных выводов обеспечена использованием современных микробиологических, биохимических, молекулярно-биологических, аналитических и статистических методов.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем научной степени. Апробация работы.

Соискатель имеет 17 экспериментальных, 2 обзорные статьи и 1 патент РФ по теме диссертации, что соответствует требованиям п. 13 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от

24.09.2013 (в современной редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук.

Материалы исследований по теме диссертации были представлены в виде стендовых и устных докладов на российских и международных конференциях.

Основные публикации, по теме диссертации:

1. Tarabarova A., Lopukhov A., Fedorov A.N., **Yurkova M.S.** Novel His-tag variants for insertion inside polypeptide chain // ACS Omega. – 2024. – V. 9. – P. 858–865. DOI: 10.1021/acsomega.3c06682
2. Тарабарова А.Г., **Юркова М.С.**, Федоров А.Н. Новый Ni²⁺-аффинный вариант eGFP со свободными С- и N-концами // Прикладная биохимия и микробиология. – 2023. – Т. 59. – № 6. – С. 614-621 DOI: 10.31857/S0555109923060193
3. Zenin V., Tsedilin A., **Yurkova M.**, Siniavin A., Fedorov A. Thermostable chaperone-based polypeptide biosynthesis: enfuvirtide model product quality and protocol-related impurities // PloS One. – 2023. – V. 18. – № 6. – art. e0286752. DOI: 10.1371/journal.pone.0286752
4. Zenin V.A., **Yurkova M.S.**, Tsedilin A.M., Fedorov A.N. Enfuvirtide biosynthesis in thermostable chaperone-based fusion // Biotechnol. Rep. Amst. Neth. – 2022. – V. 35. – art. e00734. DOI: 10.1016/j.btre.2022.e00734
5. **Yurkova M.S.**, Fedorov A.N. GroEL—a versatile chaperone for engineering and a plethora of applications // Biomolecules. – 2022. – V. 12. – № 5. – art. 607. DOI: 10.3390/biom12050607
6. **Yurkova M.S.**, Sadykhov E.G., Fedorov A.N. Production of a toxic polypeptide as a fusion inside GroEL cavity // Sci. Rep. – 2020. – V. 10. – № 1. – art. 21024. DOI: 10.1038/s41598-020-78094-8
7. **Юркова М.С.**, Саввин О.И., Зенин В.А., **Федоров А.Н.** Получение и характеристика безметионинового варианта термостабильного шаперона GroEL из *Thermus thermophilus* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. – №. 2. – С. 138-143. DOI: 10.1134/S0555109919020156
8. **Юркова М.С.**, Зенин В. А., Садыхов Э.Г., **Федоров А. Н.** Димеризация антимикробного пептида полифемузина I в единую полипептидную цепь: теоретические и практические следствия // Биотехнология. – 2019. – Т. 35. – №. 5. – С. 36-41. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-36-41
9. Зенин В.А., Новикова Л.А., **Юркова М.С.**, Саввин О.И., Куров К.А., Федоров А.Н. Химическая модификация слитого белка на основе шаперона GroEL из *Thermus thermophilus* ингибитором протеаз AEBSF // Прикладная Биохимия и Микробиология. – 2019. – Т. 55. – № 6. – С. 553–558. DOI: 10.1134/S0555109919060163

10. **Yurkova M.S.**, Zenin V.A., Nagibina G.S., Melnik B.S., Fedorov A.N. Physico-chemical characterization of permuted variants of chaperone GroEL apical domain // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019. – V. 55. – № 6. – P. 588–595. DOI: 10.1134/S0003683819130027
11. **Yurkova M.S.**, Sharapova O.A., Zenin V.A., Fedorov A.N. Versatile format of minichaperone-based protein fusion system // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 1–11. DOI: 10.1038/s41598-019-51015-0
12. Куров К.А., Саввин О.И., **Юркова М.С.**, Зенин В.А., Нагибина Г.С., Мельник Б.С., Федоров А.Н. Физико-химическая характеристика варианта апикального домена шаперона GroEL для повышения уровня биосинтеза и увеличения стабильности целевых белков // *Биотехнология*. – 2018. – Т. 34. – № 6. – С. 43-50. DOI:10.21519/0234-2758-2018-34-6-43-50
13. Fedorov A.N., **Yurkova M.S.** Molecular chaperone GroEL – toward a nano toolkit in protein engineering, production and pharmacy // *NanoWorld J.* – 2018. – V. 4. – № 1. – P. 8–15. DOI:10.17756/nwj.2018-053
14. Sharapova O.A., **Yurkova M.S.**, Fedorov A.N. A minichaperone-based fusion system for producing insoluble proteins in soluble stable forms // *Protein Engineering, Design & Selection PEDS*. – 2016. – V. 29. – № 2. – P. 57–64. DOI: 10.1093/protein/gzv060
15. Зенин В.А., Куров К.А., Саввин О.И., Шаропова О.А., **Юркова М.С.** Федоров А.Н. Подходы к эффективной стабилизации белков с помощью молекулярных шаперонов и их производных // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. – 2016. – Т. 1. – № 1. – С. 225–229.
16. Федоров А.Н., **Юркова М.С.**, Лауринавичюте Д.К. Начальный структурный и функциональный анализ иммобилизованного гесЕ2, белка оболочки вируса гепатита С // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2007. – Т. 3. – С. 20–26.
17. **Юркова М.С.**, Лауринавичюте Д.К., Федоров А.Н. Экспрессия, выделение и характеристика функционального негликозолированного структурного белка Е2 вируса гепатита С // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2006. – Т. 4. – С. 32–37.
18. **Yurkova M.S.**, Patel A.H., Fedorov A.N. Characterisation of bacterially expressed structural protein E2 of hepatitis C virus // *Protein Expression and Purification*. – 2004. – V. 37. – № 1. – P. 119–125. DOI: 10.1016/j.pep.2004.05.016
19. Федоров А.Н., **Юркова М.С.**, Гудим Е.А, Тоневицкий А.Г. Создание и характеристика рибосомных комплексов, несущих вновь синтезированный белок Е2 вируса гепатита С // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*. – 2003. – Т. 7. – С. 41–44.

Конференции:

20. Юркова М.С., Князева К.Э., Зенин В.А., Федоров А.Н. Исследование свойств системы биосинтеза пептидов // III Объединенный научный форум ♦ VII Съезд физиологов СНГ ♦ Научная сессия физиологического общества им. И.П. Павлова ♦ VII Съезд биохимиков России ♦ X Российский симпозиум «Белки и пептиды». – Сочи, 3–7 октября 2022.

21. Yurkova M., Sharapova O., Zenin V., Fedorov A. Minichaperone-based fusion system for stabilization of hydrophobic proteins in stably soluble forms // FEBS Open Bio. – 2019. – V. 9. – P-27-078. DOI:10.1002/2211-5463.12675

Патент:

22. Зенин В.А., Юркова М.С., Садыхов Э.Г., Федоров А.Н., Суровцев В.В. Патент на изобретение РФ 27318952731895. Белок GroEL микроорганизма *Thermus thermophilus* с измененной аминокислотной последовательностью. Дата приоритета 28.11.2018, дата публикации 09.09.2020.

В результате обсуждения участники совместного заседания пришли к выводу о том, что диссертация Юрковой М.С. «Биотехнологическое применение свойств шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*» является завершенным научным-квалификационным исследованием, выполненным на современном методическом уровне, и имеет важное значение в области микробиологии и биотехнологии. Диссертация соответствует п. 1. Молекулярная биотехнология, генетическая и метаболическая инженерия, п. 4. Синтетическая биотехнология, п 7. Прикладная энзимология, включая ферментные системы, технологии очистки белков, прикладные аспекты белковой инженерии, п. 9. Медицинские биотехнологии. Создание лекарственных форм, комбинированных препаратов и биологически активных препаратов. Технологии производства вакцин. Средства диагностики вирусных, бактериальных и грибных болезней. п. 25 Технологии биологически-активных соединений и биопрепаратов. Паспорта специальности 1.5.6. Биотехнология, отрасль науки – Биологические науки.

Диссертация соответствует пп. 9-11, 13-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24.09.2013 г. №842 (в современной редакции) и может быть представлена к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Заключение принято на совместном заседании лабораторий Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»: лаборатории молекулярной биотехнологии, лаборатории молекулярной инженерии, лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов, лаборатории реликтовых микробных сообществ, группы экспериментальной микологии, отдела биологии экстремофильных микроорганизмов, лаборатории нефтяной микробиологии, лаборатории молекулярной экологии и филогеномики бактерий, лаборатории разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов, группы инженерии эукариотических систем, лаборатории геномики микроорганизмов и метагеномики, отдела молекулярной биологии микроорганизмов, лаборатории биотехнологии ферментов, лаборатории выживаемости микроорганизмов, лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов. ЦКП Коллекция Uniqem, ЦКП Промышленные биотехнологии.

Присутствовало на заседании 35 человек. Результаты голосования: «за» - 35, «против» 0, «воздержалось» - 0. Протокол №1 от 20 ноября 2025 года.

Председатель заседания

д.б.н., зав. лаб. А.А. Пометун

Рецензенты

д.б.н., зав. лаб. А.А. Пометун

д.б.н., проф., зав. лаб. А.В. Марданов

д.б.н., зав. лаб. В.В. Кушников

Секретарь заседания

к.б.н., м.н.с. Н.С. Плеханова