

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук**

**СТЕНОГРАММА**

**Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН  
03 апреля 2024 года**

**Защита диссертации  
на соискание учёной степени доктора биологических наук**

**Шагина Дмитрия Алексеевича**

**По теме: «Термостабильная дезоксирибонуклеаза из *Paralithodes  
camtshaticus* – новый инструмент исследования сложных геномов»**

**Специальность 1.5.3 – «молекулярная биология»**

Москва - 2024

## СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 03 апреля 2024 года

Председатель  
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Мирошников А.И.

Учёный секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 22 человека, из них докторов по профилю диссертации – 7.

1.	Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
3.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
4.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
5.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
6.	Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
7.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
8.	Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
9.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
10.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
11.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
12.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
13.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
14.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
15.	Академик РАН, д.б.н.	Лукьянов Сергей Анатольевич	(1.5.3)
16.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
17.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
18.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
19.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
20.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
21.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
22.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

**Мирошников А. И., председатель:**

Уважаемые коллеги, начинаем очередное заседание диссертационного совета. У нас сегодня защита докторской диссертации. Значит, сегодня у нас защищается Шагин Дмитрий Алексеевич. «Термостабильная дезоксирибонуклеаза из *Paralithodes camtschaticus* – новый инструмент исследования сложных геномов». На соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности «молекулярная биология». Научный консультант – академик Лукьянов Сергей Анатольевич. Официальные оппоненты: Янковский Николай Казимирович – академик, научный руководитель Института общей генетики им. Н. И. Вавилова; Лазарев Василий Николаевич – д.б.н. из «Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю. М. Лопухина; и Михайлович Владимир Михайлович – д.б.н. из Института молекулярной биологии, отсутствует по уважительной причине. Ведущая организация – Институт биологии гена Российской академии наук. И мы предоставляем слово ученому секретарю, который докладывает содержание личного дела соискателя.

**Олейников В. А., ученый секретарь:** *(излагает материалы личного дела соискателя)*

Ну, тут довольно много, потому что жизненный путь уже довольно большой. Значит, гражданин Российской Федерации, во-первых. 1995 год. Медико-биологический факультет он окончил в Российском государственном медицинском университете имени Пирогова. Врач-биофизик. 1995-1998-й – очная аспирантура нашего института. 2001-й – защита кандидатской диссертации по специальности «молекулярная биология». 1998-2017-й – в должностях младший научный сотрудник, научный, старший научный сотрудник нашего института ИБХ. С 2017 по 2018 старший научный сотрудник, руководитель научной группы «Новые технологии молекулярного анализа», 2018-2020-й – заведующий отделом молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. 2020 год – директор Российской детской клинической больницы. 2020-й и 2021-й – проректор по работе с обособленными структурными подразделениями РНИМУ им. Н. И. Пирогова. С 2021-го по настоящее время – проректор по инновационной деятельности РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Директор ташкентского филиала РНИМУ им. Н. И. Пирогова.

Настоящая работа выполнена в лаборатории молекулярных технологий отдела геномики и постгеномных технологий ИБХ РАН нашего института. Научный консультант – академик Лукьянов Сергей Анатольевич. По теме диссертации опубликовано 16 работ в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, соответственно входящих в перечень изданий рекомендованных для опубликования результатов диссертации, получено два международных патента. Объявления о защите авторефератов

диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 28 декабря 2023 года, и все необходимые документы в деле есть. Вопросы?

**Мирошников А. И., председатель:**

Вопросы к Дмитрию Александровичу нет? Спасибо. Ну что ж, тогда...

**Бовин Н. В.:**

Есть вопрос, да. У соискателя нету свежих научных публикаций. Это с формальной точки зрения имеет какое-то значение?

**Мирошников А. И., председатель:**

Нет. Не имеет. То есть удивительно, с таким послужным списком он еще успел ДНК выделить? Хотите это сказать? Так, пожалуйста, Дмитрий Алексеевич.

**Шагин Д. А., соискатель:**

*(Излагает основные положения диссертационной работы.)*

**Мирошников А. И., председатель:**

Скажите, а список публикаций у вас есть, да?.. Спасибо. Вопросы? Николай Владимирович, пожалуйста.

**Бовин Н. В.:**

Есть ли соображение, зачем камчатскому крабу и вообще ракообразным такая мощная нуклеаза?

**Шагин Д. А., соискатель:**

Это будет долгий ответ. Я расскажу, а потом, если будут еще вопросы, отвечу. На наш взгляд, дуплекс-специфическая нуклеаза – это первый барьер защиты краба от двухцепочных ДНК-вирусов. Дело в том, что вирус белых пятен, который выкашивает огромное количество в популяции промысловых креветок, это бич для людей, которые занимаются такого рода бизнесом. В ряде публикаций было отмечено, что некоторые нуклеазы из гепатопанкреаса креветок повышено экспрессируются в случае заражения креветок вирусом белых пятен. У краба этого вируса до недавнего времени открыто не было. Когда я работал в ЦНИИ эпидемиологии, то появилась информация, что Михаил Юрьевич Щелканов из Дальневосточного университета, вирусолог, выявил вирусные частицы в тканях камчатского краба. Я проанализировал образцы из камчатского краба, которые Михаил Юрьевич любезно мне предоставил, и обнаружил наличие геномной ДНК и РНК неопisanного вируса, внутри гепатопанкреаса этих образцов. Этот вирус имел где-то 40-60-процентную гомологию с известными штаммами вирусов белых пятен креветок, а их на тот момент было известно пять. Мне удалось собрать, наверное, треть генома, а всего предполагаемый геном это больше трехсот тысяч нуклеотидов. К сожалению, на этом работа притормозилась. До сих пор этот вирус не опубликован, хотя он очень интересен, и

он первый обнаруженный среди крабоидов. Кроме того, к тому, что дуплекс-специфическая нуклеаза принимает участие в обороне против этого вируса, косвенно свидетельствует, что в какой-то момент популяция камчатского краба у берегов Камчатки и Владивостока резко понизилась. Это объяснялось неправильными условиями промысла. Но я не исключаю, что проблема заключалась именно в вирусе белых пятен, потому что, если внимательно посмотреть на крабов, которые продаются в наших магазинах, они заражены этим вирусом. Другое дело, что так же, как и креветки, в какой-то момент их иммунная система начинает адаптироваться к этому патогену. Кроме того, я не исключаю, что есть достаточно большое количество двухцепочечных ДНК-вирусов среди морских животных, которые нам пока не известны и которые могут переноситься как вертикальным путем, так и горизонтальным. Вот такие предположения по поводу для чего нужна эта мощная нуклеаза.

Дальше, наверное, предвосхищая следующие вопросы, зачем ей такая высокая температура? Интересует это, нет? Да, ну, мне кажется, высокая температура, она нуклеазе незачем. Просто этот фермент в силу того, что он экспрессируется в гепатопанкреасе, а гепатопанкреас представляет собой смесь панкреатической железы и печени, фермент постоянно находится в очень агрессивных условиях. Из-за этого он достаточно стабилен. И возможность работать при высокой температуре – это следствие его протеазной стабильности. А дальше, чем сильнее мы повышаем температуру, тем, соответственно, сильнее увеличиваем скорость катализа. Поэтому это некая побочная вещь, связанная со стабильностью этого фермента. Спасибо.

**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо. Ещё вопросы? Николай Казимирович.

**Янковский Н. К.:**

Спасибо большое за интересный доклад, хотя я оппонент и ознакомился со всеми материалами, но доклад является самостоятельным жанром и очень полезным в данном случае и для меня, и для того, что это практически может быть использовано. Вы упомянули, ваше предположение, что адаптивный иммунитет был причиной того, что после того, как паразиты, двухцепочечные вирусы, они сработали к уменьшению численности популяции, потом она восстановилась. У насекомых адаптивного иммунитета нет, есть только врожденный. А у ракообразных он есть вообще?

**Шагин Д. А., соискатель:**

Я захожу в область скользкую для себя, предполагаю, что есть. Я предполагаю, но я могу ошибаться.

**Янковский Н. К.:**

Это практический важный вопрос, поскольку связан с проблемами биобезопасности, и ответ на него важен для принятия практических решений.

**Шагин Д. А., соискатель:**

Наверное, в пользу этого говорит все-таки то, что популяции креветочных, по крайней мере, адаптируются к вирусу белых пятен креветок.

**Мирошников А. И., председатель:**

Роман Гербертович, пожалуйста.

**Ефремов Р. Г.:**

Спасибо. Интересный фермент. Насколько я понимаю, вам случайно удалось его обнаружить. Это была большая удача, и до сих пор фермент является уникальным в своем роде. Но вот вы сказали, что сразу же после того, как фермент был выделен и проверена активность, вы задались вопросом о механизме действия, потому что со структурной точки зрения, я просто не знаю, есть ли модель пространственной структуры, в комплексе особенно с двухцепочечной ДНК. Как ферменту удается свои функции осуществлять с точки зрения структуры, динамики? И если есть какие-то предположения на этот счет, то можно ли создать что-то подобное на базе гомологичных каких-то белков, то есть на базе этого структурного шаблона нужную активность привить? Вот рациональный дизайн тут возможен? Спасибо.

**Шагин Д. А., соискатель:**

Я не включил это в свое выступление, по той причине, что не включал эти данные в диссертацию. Тем не менее, работа в этом направлении ведется, и, по крайней мере, биоинформатический анализ с помощью AlphaFold мы сделали. Приятность заключалась в том, что домены, которые мы предсказали другими программами, более современная программа наши предположения подтвердила. И если сравнивать дуплекс-специфическую нуклеазу с архетипом семейства SNF, то видно (это картинка слева), что у дуплекс-специфической нуклеазы есть такой характерный мини-домен, который мы называли «протяженной последовательностью с консервативными аминокислотными участками». И наши исследования показали, что делеция этого домена приводит к резкому снижению термостабильности фермента и его стократному снижению по специфичности. Более глубокий анализ продолжается.

То, что касается, опять же, пространственного выравнивания структур, с ДНК пока нам это сделать не удалось. Но вот наложение с нуклеазой EXOG человеческой, которая, прямо вот на удивление, достаточно хорошо выровнялась с Par\_DSN. Мы обнаружили, что нуклеазный домен Par\_DSN, ответственный за связывание с ДНК, располагается примерно в том же пространственном регионе, что и у нуклеазы EXOG. Кроме того, мы

проанализировали аминокислоты, которые в процессе направленного мутагенеза меняли, и на основе вот этой вот предсказанной структуры убедились, что мы были правы, и эти аминокислотные остатки действительно имеют большое значение для специфичности, для специфичности по отношению к совершенным дуплексам и для термостабильности. Более подробно, я надеюсь, и более глубоко в предстоящей публикации — это будет нами описано.

**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо. Ну, в общем, поле для развлечений широко. Еще вопросы? Пожалуйста.

**Долгих Д.А.:**

Спасибо за очень интересный доклад. Фермент действительно замечательный, биотехнологически очень перспективный, но у меня вот вопрос, касающийся доменов этого фермента. Вот вы, в автореферате я прочитал, что вы использовали метод Алексея Некрасова, информационные единицы, но это не совсем домены, это другое. Вот какого-нибудь метода прямого, вот по доменам, ну, например, микрокалориметрии не было у вас? И, если можно, сразу второй вопрос. Вот на рисунке я видел, что там у вас всюду сигнальный пептид. Он не отщепляется? То есть вот здесь вот что в природе происходит? Вы не экспрессировали его, например, в клетках млекопитающих, где это может быть по-другому? Спасибо.

**Шагин Д. А., соискатель:**

Да, отвечая на второй вопрос, мы экспрессировали этот фермент в дрожжах, сигнальный пептид отщепляется. То, что касается метода анализа доменов, нет. Только выявление границ нуклеазного домена с помощью метода Некрасова, ну и в дальнейшем подтверждение этого с помощью программы AlphaFold.

**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо. Ещё вопросы? Да.

**Белогуров А.А.:**

Возвращаясь к тому, что вы рассказывали по поводу температуры, анализировали ли вы специфичность нуклеазы при пониженных температурах, ну, допустим, при плюс четырёх? Я, извините, прежде чем вы ответите, я это объясню, с чем связан вопрос. То есть не может ли быть так, что вот ту активность, которую вы наблюдаете ну при каких-то нормальных температурах и повышенных, это, в общем, некая не специфичная активность, которая... ну, не специфичная не в том плане, что она не различает, а в том плане, что эта активность не присуща этому ферменту и, в общем-то, в норме у него активность, допустим, другая и похожа на какие-то известные нуклеазы?

**Шагин Д. А., соискатель:**

Да, спасибо. Действительно очень интересный вопрос. Те методы по анализу однонуклеотидных полиморфизмов, которые мы представляли, они осуществлялись при достаточно низкой температуре, в районе 27-30 градусов. И эффективность, специфичность была продемонстрирована в многочисленных экспериментах. Другое дело, что и 30 градусов температура достаточно некомфортная для камчатского краба, поэтому мне очень сложно вам ответить на этот вопрос, поскольку работа даже с короткими дуплексами ДНК, она подразумевает все-таки температуры ну не ниже 20 градусов.

**Белогуров А.А.:**

Я с вами полностью согласен, я к этому и веду. То есть вот все-таки, возвращаясь к вопросу Николая Владимировича, то есть что он делает в крабе при такой температуре? То есть, может быть, у него какая-то активность все-таки другая, природная?

**Шагин Д. А., соискатель:**

Он работает при низкой температуре. Он хорошо работает, хорошо различает двухцепочечные ДНК. Я говорил просто про конкретные мутации. И здесь никаких проблем нет. То есть, при температуре там 18-20 градусов он прекрасно различает двухцепочечные ДНК по сравнению с одноцепочечными ДНК. Спасибо.

**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо. Еще вопросы? Не вижу. Спасибо. Отдохните. Так, хотя эта процедура не предусмотрена, но все-таки я хотел предоставить слово научному консультанту академику Лукьянову. Пожалуйста, Сергей Анатольевич.

**Лукьянов С. А.:**

Спасибо, коллеги. Я хотел бы сказать, что у Дмитрия есть такое свойство, талант, те фундаментальные знания, которые получены, транслировать в практическую область. И это вот ощущается в пуле взаимодействия, и, по-моему, это очень важно, но еще и человек он такой позитивный и контактный очень, и склонный к работе в командах и к руководству, управлению проектами, что, наверное, его подвело. Когда у человека получается, на него наваливают, и значительное (последние годы) время было поглощено важнейшими проектами, связанными с наладкой работы, в том числе в нашем университете. Сейчас Дмитрий создал инжиниринговый центр, основной целью которого является внедрение разработок. Но, тем не менее, вот и работа, связанная со знанием, пониманием, основами фундаментальными, она велась очень творчески и с огромным интересом. Я считаю, что Дмитрий на сегодня это уже как бы для меня соратник, член такой команды, на которую всегда можно положиться. И, как говорится, тут грандиозные, в смысле по объёму, огромные были произведены работы. Прошу поддержать Дмитрия. Спасибо.



**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо. Так, Владимир Александрович, давайте вам слово.

**Олейников В. А., ученый секретарь:**

Так, ну сейчас речь пойдет о заключениях, о заключении и отзыве ведущей организации. Во-первых, заключение (*излагает заключение организации, где выполнялась диссертация*).

Ну понятно, значит, что работа выполнялась в нашем институте, в Институте биоорганической химии, поэтому заключение от нашего института, заключение начинается с неких биографических данных, о которых мы уже, так сказать, услышали. Ну и, соответственно, значит, что важно здесь? Что тема диссертации утверждена ученым советом ИБХ РАН, еще, значит, в последней, видимо, редакции в 2022 году в мае, и было обсуждение на семинаре отдела геномики и постгеномных технологий. И на основании вот этого обсуждения выдано вот такое заключение: «По итогам обсуждения принято, во-первых, по сути, речь идет о ферментах и подчеркивается, что до начала данной работы отсутствовали клонированные термостабильные ферменты, способные избирательно разрушать только двухцепочечную ДНК. Представленная работа имеет очевидную научную новизну. Очевидна как теоретическая, так и практическая значимость работы, подчеркивается вот это. И фактически предложена серия новых молекулярных технологий, которые условно можно разделить на две группы. Первая группа – это технологии анализа мутационных изменений в генах эукариот и технологии выделения ДНК-мишени в комплексном продукте ПЦР. Вторая группа – технология создания нормализованных библиотек кДНК и технология создания нормализованных библиотек геномной ДНК из клеток и тканей эукариотических организмов. Технология селективного удаления транскриптов из популяции кДНК и технология удаления кДНК рРНК последовательности при создании библиотек кДНК из прокариотических организмов. Важно отметить, что несмотря на многочисленные усилия западных и российских исследователей, до момента открытия термостабильной нуклеазы из камчатского краба, так и не был разработан эффективный метод нормализации как кДНК, так и геномной ДНК. А автор в своей работе эту задачу решил». Тут еще важно то, что на высоком экспериментальном уровне работа выполнена и на основе результатов работы созданы наборы реактивов, то есть практически выход, ну и перечислены здесь вот два реактива, которые были созданы.

Ну как было сказано, заключение принято на открытом заседании отдела геномики и постгеномных технологий, голосование единогласное и заключение утверждено директором нашего института, академиком А. Г. Габибовым. Это что касается заключения.

**Мирошников А. И., председатель:**

Заключение. Замечаний нет?

**Олейников В. А., ученый секретарь:**

Ну конечно нет, да. Рекомендована работа, да. Вот отзыв, теперь отзыв (*излагает отзыв ведущей организации*). Отзыв подготовлен Институтом биологии гена Российской академии наук. Отзыв положительный. Опять же, речь вначале идет об актуальности и значимости диссертационной работы Шагина Дмитрия, которая заключается в выявлении и клонировании дуплекс-специфической нуклеазы из камчатского краба, обладающей уникальными свойствами, с последующим созданием на ее основе новых молекулярных технологий, а также в выявлении характеристики нового семейства дуплекс-специфических нуклеаз. Результаты носят важный... как теоретическая, так и практическая значимость – это уже было подчеркнуто в отзыве, в заключении организации. Обзор литературы. Две части: экспериментальная часть – подробное описание методов; результаты обсуждения – несколько разделов, опять же, то, что мы слышали сегодня, достаточно подробно анализируются. Выводы логично следуют из поставленной цели и задач.

Общая оценка высокая, тем не менее есть замечания и вопросы по результатам работы. Первое. Зачем камчатскому крабу, живущему в среде с низкими температурами, термостабильный фермент? Мы уже получили ответ, по-моему, да? Второе. Были ли попытки создания технологии вычитающей гибридизации полноразмерной кДНК с использованием дуплекс-специфической нуклеазы из камчатского краба? Третье. На рисунке 3.13 анализ расщепления синтетических радиоактивно меченных дц ДНК субстратов, нуклеазой камчатского краба фигурирует п.о. (пар оснований), хотя правильнее было использовать н.о. (нуклеотидное основание). В работе присутствует ряд опечаток. Но, опять же, подчеркивается, что не носят принципиального эти замечания характера и не снижают высокой ценности работы.

Далее. В диссертации соблюдены все требования по присуждению ученых степеней. Результаты работы могут быть использованы – и целая серия тут организаций, где. И вот это вот важно. Заключение: «Суммируя вышесказанное, можно сделать заключение, что диссертационная работа Дмитрия Алексеевича Шагина является масштабным и комплексным исследованием, в результате которого разработаны теоретические положения и технологии, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное достижение в области изучения и анализа сложных смесей нуклеиновых кислот». Ну и далее: «Эти результаты являются технологическим прорывом и формируют мировой уровень медицины и исследований в биологии. Ну и далее: «Отзыв заслуженно утвержден на заседании межлабораторного семинара в Институте биологии гена. Подписано: доктор биологических наук Гаврилов Алексей Александрович. И утверждено: директором ИБГ

РАН академиком Георгиевым Павлом Георгиевичем».

**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо.

**Олейников В. А., ученый секретарь:**

Замечания были.

**Мирошников А. И., председатель:**

Дмитрий Алексеевич, будете отмечать?

**Шагин Д. А., соискатель:**

По вопросу о создании технологии полноразмерной вычитающей гибридизации с использованием дуплекс-специфической нуклеазы ответ – «да». Такие попытки нами проводились и были даже положительные результаты при использовании в качестве драйвера образцов поли(А)-РНК. Но поскольку поли(А)-РНК достаточно дорогая субстанция, а получить одноцепочечные формы для того, чтобы провести вычитание из кДНК оказалось достаточно непростой задачей, поэтому мы, удовлетворив свое самолюбие, то, что мы как бы можем это сделать, мы в какой-то момент просто переключились на решение другого рода задач. То, что касается замечания по поводу пар оснований, я согласен, там некорректно, там действительно нужно в картинке писать «нуклеотиды». А относительно вопросов по поводу биологии, соответственно, я минут 15 назад об этом отвечал. Вроде бы других замечаний не было. Ну, а опечатки, прошу прощения, да, старался, чтобы не было, но объем диссертации достаточно большой, поэтому без этого не обошлось.

**Олейников В. А., ученый секретарь:**

Спасибо. Теперь поступил целый ряд отзывов на автореферат (*зачитывает отзывы на автореферат, все отзывы положительные*). Отзывы – все положительные. Но вот интересно, что в качестве замечаний к работе можно бы сказать следующее. «В 2020 году Нонг в открытом доступе (Нонг – это автор, значит, ссылка) появились данные анализа транскриптома... (ну, соответственно, не могу прочитать), а в 2021 году результаты полногеномного секвенирования ДНК этого организма». Опять ссылка. «Однако диссертант не воспользовался ими и не провёл анализ геномной последовательности, кодирующей Par\_DSN и его транскрипта, хотя такой анализ не является трудоёмким и существенно расширил бы понимание биологической роли фермента, открытого в ходе её реализации. Более того, на наш взгляд, автор не уделил должного внимания биологической функции Par\_DSN. Между тем, такой анализ позволил бы лучше понять значение уникальных характеристик Par\_DSN и способствовал бы облегчению поиска его функциональных аналогов с близкими, но отличающимися характеристиками». Это первое.

Второе. «В работе следовало бы уделить большее внимание принципам подбора условий использования Paq\_DSN при конструировании библиотек, особенно кинетическим и концентрационным зависимостям результатов таких экспериментов. Восприятие работы сильно облегчилось, если бы автором было указано, на каком расстоянии от неспаренного нуклеотида в ДНК-дуплексе обеспечивается защита от деградации Paq\_DSN». Ну, опять же, значит, замечания носят дискуссионный характер, и это заключение подписано заведующим лабораторией ДНК-метилома и редактирования транскриптома Института общей генетики, значит, доктор биологической наук Шевелев Алексей Борисович.

Следующий отзыв. Значит, тоже некое, так сказать, замечание: «В рамках дискуссии по материалам работы хотелось бы заметить, что на каждую ключевую статью 2004 года в NAR, в РИНЦ обнаруживается более 300 ссылок, что само по себе говорит о важности работы Дмитрия Алексеевича. Интересно, что в динамике цитирования наблюдается экспоненциальный рост с резким падением в 2014 году. Здесь можно предположить связь либо с удешевлением технологии глубокого секвенирования, либо с появлением альтернативных методов обогащения библиотек кДНК, либо со сложностями выхода разработанных коммерческих наборов на международные рынки. Такого рода вещи естественны для такой бурно развивающейся области как молекулярная биология и напрямую не относятся к научному содержанию рассматриваемой работы, тем не менее, было бы интересно услышать соображения Дмитрия Алексеевича по данному вопросу». Ну а далее все сугубо положительно. Значит, подписано: Купраш Дмитрий Владимирович. Все знают, да.

Далее отзыв на автореферат диссертации. Четкое изложение, значит, достижение. Подписано сотрудником нашего Института доктором биологических наук. Татьяна Леодоровна Ажикина подписала, чисто положительный отзыв.

И здесь вот еще. Меня очень, так сказать, тронуло, что здесь по пунктам идёт научная новизна, выводы, публикации, предложения. «Интерес представляет анализ взаимодействия фермента с гибридными ДНК-РНК в различной степени комплементарности. Полагаю, что такого рода исследование позволило бы ещё глубже понять уникальные свойства нуклеазы краба и расширить область её применения». Подписано: Каменский Пётр Андреевич, это МГУ. Значит, это доктор биологических наук по специальности «молекулярная биология». Ну вот видите, есть просьбы высказать мнение.

**Шагин Д. А., соискатель:**

Заочная и очная благодарность людям, которые сделали отзыв на мой автореферат. То, что касается замечаний Алексея Шевелева, да, наверное, есть с моей стороны недоработка.

Просмотрел эту статью, хотя, честно говоря, с первого раза она и не выявляется в NCBI. Тем не менее, анализ транскриптома камчатского краба делался не только в этой работе, также делался в других работах. Частичный анализ делался японскими лабораториями, и в первом, и во втором, и в-третьих случаях в транскриптом, в частности, в транскриптом гепатопанкреаса выявлялась последовательность дуплекс-специфической нуклеазы.

То, что касается анализа генома, *Paralithodes camtschaticus*, да, наверное, это было бы интересно сделать, но, честно говоря, просто на всё не хватает времени и ресурсов. То, что мы хотели заявить, то, что мы хотели сказать, то, что мы сделали, мы это сделали. Дальше вот тема, связанная с анализом третичной структуры меня очень интересует, я бы хотел этим заниматься, но и не исключаю, что более внимательно посмотрю те статьи, которые рекомендовал Алексей Шевелев.

То, что касается вопроса Дмитрия Владимировича Купраша, да, действительно, динамика такая в публикациях наблюдается, и это связано, на наш взгляд, все-таки с двумя основными причинами: причиной действительно удешевления высокопроизводительного секвенирования; и, конечно же, к сожалению, с политической ситуацией. Уже после 2014 года, собственно, возникли проблемы с отправкой тех наборов, которые разрабатывались, в том числе с моим участием, на компании «Евроген», в зарубежные страны. Ну а после 2022 года это стало практически невозможным. Альтернативных, более серьезных методов обогащения я, честно говоря, не видел. Ну и плюс еще, я не знаю, может быть, я не прав, но, наверное, исследователям очень часто не хватает творческого какого-то подхода, а, собственно, работа с дуплекс-специфической нуклеазой – это не только рутинная, но это еще некий элемент творчества, может быть, поэтому не используют. Ну и по своему опыту скажу, что цитирование наших работ, оно как бы не всегда, как это ни странно, честное, потому что и на геномную нормализацию почему-то люди ссылаются не на нас, хотя на тех людей, на которых они ссылаются, это, собственно, результат того, что они подсмотрели и сделали на основе наших экспериментов. Ну и кроме того, компания «Евроген» достаточно длительное время проводила сервисные работы по предложению услуг в качестве подготовки образцов, в том числе и к высокопроизводительному секвенированию путем нормализации. И эти результаты публиковались во многих статьях, тоже со ссылкой просто на то, что процедура была осуществлена стандартным путем в компании «Евроген». Может быть, еще поэтому количество ссылок на наши публикации уменьшилось. Просто это вошло уже как бы в рутинную такую практику, в общедоступную.

То, что касается предложения господина Петра Андреевича Каменского по поводу анализа более глубокого гетеродуплексов. Это делалось, может быть, на недостаточно глубоком уровне, но в диссертационной работе эти примеры приведены. За то, что это работает и

работает достаточно хорошо, свидетельствует очень большое количество публикаций по использованию этого метода в различных приложениях по выявлению микро-РНК.

Да, и еще у Алексея Шевелева был вопрос по поводу расположения нуклеотидов, влияющих на специфичность фермента. Опять же, видимо, связано с тем, что господин Шевелев делал отзыв по автореферату, он, наверное, не глубоко просмотрел диссертационную работу, там эти аспекты все прописаны, эта работа делалась. Вроде бы ответил на все вопросы. Спасибо.

**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо. Николай Казимирович, пожалуйста.

**Янковский Н. К., оппонент:** *(излагает отзыв, отзыв положительный)*

Глубокоуважаемый председатель, глубокоуважаемые коллеги, я на этом месте первый раз был в 1970 году, гулял здесь со своей девушкой (здесь была очень высокая пшеница) и через год она стала моей женой. Место приятное осталось, но и, кроме того, с интересным и полезным после того, как здесь построено было это здание. И вот все эти годы, что я здесь бываю, это интересно всегда и приятно просто потому, что здесь работает очень много коллег, с которыми были совместные деятельности, интересные новые проекты, я надеюсь, что и будет. В частности, одним из таких вот моментов является то, что я был приглашен оппонентом на данную диссертацию. Надо сказать, что Дмитрий Алексеевич, поскольку мы познакомились в 90-х годах, и отчество тогда еще плохо запоминалось, значит, это оригинальнейшая работа, и я был 10 лет в ВАКе по генетике. Здесь, правда, не генетика специальность, но всё равно. Там типичной являлась для докторской 21 работа в качестве числа работ, которые по диссертации были основанием моего присуждения. Вот здесь как раз та величина, которая в ВАКе являлась типичной для генетики, она и представлена – 21. А то, что остальные 20 работ, они сделаны в 2014 году и раньше, это никак не ухудшает их качество, если они до сих пор интенсивно используются. Только говорит о том, что работа прочная и не перестала быть актуальной и сегодня.

Вообще, такая диссертация – это издевательство над оппонентом, потому что сколько здесь страниц? Я сейчас еще раз прочитаю... 342 страницы. Это очень много, хотя и не запрещено. Но вот в ВАКе, когда мы обсуждали, какую диссертацию можно принять к защите, то первый критерий был такой, что если оппонент может поднять диссертацию, то ее можно выносить. А если не может поднять диссертацию, и такие диссертации были по экологии, там было 10 томов, например, поднять их было нельзя, то принимать ее нельзя к защите.

**Мирошников А. И., председатель:**

Но это зависит от здоровья оппонента.

### **Янковский Н. К.:**

Ну да, может быть, не все были здоровы после этого. Кроме того, такой особенностью, но не недостатком, является 669 работ, которые процитированы. Мне кажется, что вот эта работа должна быть рекомендована автору и коллективу к тому, чтобы это было издано в виде солидного, толстого сборника методического фундаментального характера, потому что разнообразие методов успешности к применению, оно того стоит. Диссертация, которую прочтёт три оппонента, она вряд ли будет доступна, и поэтому такую рекомендацию нужно было бы, мне кажется, упомянуть в решении, как в частности для ВАКа некую значимую ссылку на ее качество, рекомендуется к публикации такой для более широкого круга пользователей. И я вот хочу попенять себе в частности то, что 10 лет прошло с тех пор, как были все работы, достаточные для защиты диссертации, уже опубликованы, тем не менее, защита состоялась только сейчас, через 10 лет. Но при этом полезность соискателя как руководителя, одного из руководителей науки нашей страны, она несомненна, но лучше бы это случилось раньше и оппонентам было бы легче, потому что не 342 страницы надо было бы читать, а меньше.

Надо сказать, что вот в институте, где я был 10 лет директором и почти 10 лет научным руководителем, у нас там получилось, что 3 месяца назад нам министерство решило заменить директора, что и произошло, и у нас кандидата, которого предлагали, не получилось рассматривать в качестве достойного. У него, скажем, в прошлом году защитилось 12 дипломников в один год. Но он был кандидатом по-прежнему, хотя 10 лет назад тоже мог защититься, но пока этого не сделал. И у нас директор другой, в частности, из вашего института замдиректора Пестов. Я не говорю, что он плохой или хороший, просто у своих, вот я в качестве директора и научного руководителя, не заставил человека защититься вовремя. Ну, сейчас это, наверное, удастся, к чему это приведет, не знаю, но, во всяком случае, своевременно люди, в общем, сразу видны как сильные, и квалификационные характеристики, которые достигаются, мне кажется, что мне было бы следовало вовремя учитывать, что мне, в моем случае, не удалось, а здесь это не помешало развитию Дмитрия Алексеевича в практическом приложении своих знаний.

Здесь, собственно, три группы данных, которые оказывались практически интересными. Я сейчас не буду останавливаться на сугубо теоретической части этой работы, которая по своему очень интересна. И когда я ее читал, меня удивило то, что, когда я смотрю на эти графики, я вижу там описание закона гомологических рядов в наследственной изменчивости, который сформулировал Николай Иванович Вавилов, имя которого наш институт носит. Почему? Потому что, когда строится филогенетическое дерево тех объектов, и они весьма отдаленные революционно, оно тем не менее было построено, и

было показано, где находится нуклеаза вот эта вот дуплекс-специфическая, в каких точках этого филогенетического дерева, было сказано, что в это филогенетическое дерево попадают также и другие неродственные объекты (ну там дерево из блоков состоит), в которых действительно теоретически было предсказано существование данной нуклеазы, и уже потом было подтверждено, что они там и есть. Это такая сугубо генетическая часть, которая не отмечена автором, но я как раз смотрю, ну, закон гомологических рядов вижу, что пишет автор, хотя он пишет про эти ферменты, которые так располагаются. Вот в практической части, мне кажется, она вообще потрясающая. Вот сейчас, в связи с тем, что биологическая безопасность является таким важным направлением внимания к науке, она имеет очень важное значение для применения вот этих методов. Почему? Потому что там генетика, это обычно то, что мы думаем, то, что имеет отношение к потомкам. Это правда. А болеем мы с одним и тем же геномом. И мы то болеем, то выздоравливаем. Кто-то болеет, кто-то не болеет. И данный человек, то есть фактически это все прижизненные изменения генома. Нет, у него есть, не будем брать опухолевые случаи, а просто те единичные изменения, которые происходят на 3 миллиарда папиных и 3 миллиарда маминых нуклеотидов, если единичные изменения происходят, то они мало что значат. А вот то, что, когда меняется что-то в прижизненной модификации этих нуклеотидов, оно происходит всегда по данной точке, но оно происходит в массе клеток. И это и есть причина наших болезней и не болезней или выздоровления от них и последствий этих болезней. И вот здесь те методы, которые приведены, они очень значимо дополняют те методы, которые существовали до данной работы, потому что оценка происходящих прижизненных модификаций – это и есть способ исследования нашего здоровья или нездоровья с точки зрения того, будет или не будет, какие будут последствия, какое будет течение. И то, что сделано в данной работе, я веду к своему, хотя я реплику на диссертацию читал, но вот читал, что вот это то, что мне нужно сейчас. И то, что можно использовать, конечно, нужно не самому это придумывать, а нужно взаимодействовать друг с другом, в частности, я надеюсь, что и с Дмитрием Алексеевичем. Почему? Потому что объектом исследования в генетике, когда наследственные, это разные люди. У них, естественно, есть свои разбросы по причинам, о которых я не буду говорить. А вот у человека самого эти разбросы, если есть единичные замены, они ничем на здоровье, кроме опухолевых вещей, не влияют и могут быть очень точно определены именно данными методами, что пока никогда не применялось. Потому что человека можно сравнивать самого с собой, у него геном если меняется, то это незначимо, по динамике изменения прижизненных модификаций его собственного генома. И это даст наибольшую точность, которая недостижима при использовании этих выборок, которые используются сейчас обычно в



работах, потому что это разные люди. Нужно использовать человека самого себя в динамике. Ну, возьмешь там не меньше семи человек, чтобы там по статистике было чего-то, а дальше там 10 миллионов точек, которые могут быть так-сяк модифицированы. И вот кДНК-шные вещи, и геном там, не буду говорить, какие приложения, мы уже об этом говорили с Дмитрием Алексеевичем, это кажется очень интересным именно с приложением того, что он придумал и сделал руками. Единственное, что когда я читал диссертацию, для меня было трудно в некоторых местах, потому что те схемы, которыми отображалось наличие явления или его там успешность, которая всегда подтверждалась в конце концов прямыми данными, и поэтому никаких сомнений в качестве результатов нет, но по рисунку не всегда можно было понять, потому что там не только два разных процесса (один – это работа вот этой самой ДНКзы дуплекс-специфический, а другой – это ПЦР, который с ней сопрягается) – это процессы разные, оба они имеют свои генетические характеристики, связанные и с концентрациями, и с температурами, и догадаться об этом по умолчанию мне было очень трудно. Поэтому я сидел и спрашивал, как школьник автора: «А вот что здесь нарисовано, где, собственно говоря, точка, которая является полиморфной?» Ну и выяснилось, что умолчание в голове у автора, оно, естественно, есть, а у меня этого умолчания нет. Поэтому вот полезная презентация была, она более ясно позволила бы сразу определить, почему именно это заявление правильное по виду. Ну вот я не буду характеризовать конкретику, это было и в докладе, и в диссертации, и в отзывах, которые я написал на шесть страниц, я его не буду читать, сейчас закончу. Это всё так. Просто эта работа, несомненно, заслуживает очень высокой оценки и формальности, которую я всё-таки прочту, их положено из отзывов прочесть мне как оппоненту.

«...Представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология» удовлетворяет всем требованиям ВАК, включая пункт 9, а ее автор Шагин Дмитрий Алексеевич заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология». И это было удовольствием, и я уверен, будет и пользой то, что вы решили пригласить меня на эту вашу защиту, потому что без этого я бы не доехал до того, что это нужно немедленно применять. Вам за это спасибо. Благодарю.

**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо. Ну, замечания были, нет? Да, как-то оно... не прозвучало, да?

**Янковский Н. К., оппонент:**

Замечаний я написал шесть, и их не буду зачитывать, потому что я получил на них ответ вчера. Я сутки просидел еще раз вчера с этой диссертацией. Замечу только такие вещи, что, скажем, использовано там слово, скажем, «первичная последовательность». Ну, вторичной

последовательности не бывает. Но дальше такие слова не используются. Есть и опечатки. А вот занятная вещь, я сейчас, извините, не удержусь, я читаю и пишу «аллель», и он используется как женский род, потом «аллель» – он используется как мужской род. Я в Ленинграде учился, не в Москве, и в Ленинграде аллель, она женского рода. А в Москве аллель, он мужского рода. Но поскольку в английском нет рода у «аллели» вообще, то как бы странно, нельзя решить, а вот оппонент использовал то и другое, что редкость. Обычно, когда одна буква используется. Я думаю, что вы не учились в Ленинграде, я там учился, но то, что используется мужской и женский род в отношении самого главного слова в генетике, это было необычно. Извините за внимание.

**Мирошников А. И., председатель:**

Да, спасибо. Дмитрий Алексеевич, ну я думаю, что мы отвечать не будем, и я хочу предоставить слово второму оппоненту, Василию Николаевичу Лазареву.

**Лазарев В. Н., оппонент:** *(излагает отзыв, отзыв положительный)*

Глубокоуважаемый председатель, коллеги, я, наверное, не буду останавливаться на актуальности работы, потому что она безусловна. Это очередной вклад в копилку фундаментальных знаний, с одной стороны, ну а то, что мы сейчас имеем возможность и используем эти наборы для своих исследований, это, безусловно, говорит о том, что работа нашла свое применение.

Коротко расскажу по пунктам. Значит, введение, все как положено, обзор литературы. Вот здесь я хочу заметить, что обзор литературы очень подробный и объем его, ну скажем так, превышает некие нормы, но в данном случае это, я считаю, вообще является достоинством работы. Я бы подумал о публикации его как отдельной работы. Если говорить о материалах и методах, то, безусловно, широчайший спектр выделения, изучения свойств нуклеазы, то есть с самого нуля, скажем так, с теоретического предсказания, и поэтому достоверность полученных результатов, исходя из той палитры методов, она не вызывает сомнений. В главе результаты обсуждения очень подробно изложены, четко, все этапы – от клонирования, выделения, очистки нуклеазы, анализ свойств ферментов до разработки практического набора реагентов для того или иного метода. Поэтому научная и практическая ценность не вызывает сомнений. Диссертация действительно это в данном случае та работа, о которой можно сказать, что действительно сделано открытие, то есть фактически открыт новый фермент. Опубликовано 16 работ, 3 главы в книгах международных издательств, как уже говорилось, получены два патента. Автореферат полностью отражает основное содержание работы, поэтому как бы достоверность, актуальность положения не вызывает сомнений.

Я остановлюсь на нескольких замечаниях, которые никоим образом не снижают

положительное впечатление от работы. Значит, первое замечание. Мне показалось немножко странным, что вроде вся диссертационная работа посвящена изучению фермента, который очищен из природного источника, но я не нашел ни электрофореграммы ни одной, ни хроматограммы, которые могли бы свидетельствовать о степени очистки препарата. Вот второе мое замечание. Здесь уже на него был получен ответ. Я спрашивал, удалось ли преодолеть проблему получения активного рекомбинантного белка. Дмитрий Алексеевич сказал, что у коллег все-таки, получился у них рефолдинг белка в E.coli. Я спрашивал, предпринимались ли попытки получить целевой фермент в других системах. Дмитрий Алексеевич сказал, что да, получен в дрожжах.

Следующее замечание. Анализируя структуру Par\_DSN у гомологов, автор вводит аббревиатуру КР, не расшифровывая ее, что несколько представляет неудобства при анализе. В представленных автором экспериментальных данных гибридизация нормализованных образцов кДНК с олигонуклеотидными пробами на микро- и макрочипе демонстрирует падение концентрации ряда последовательностей в принципе до не детективного уровня. Хотелось бы узнать, как это можно объяснить.

Из таких, может быть, замечаний про удобство, что в электронном варианте хотелось бы для экономии времени возможность перехода по ссылке из текста в обзоре литературы. Ну вот, конечно, встречаются по тексту организмы, режут, разрезают и так далее. Но все эти замечания никоим образом не меняют моего общего превосходного впечатления о работе.

И заключение: «Диссертационная работа Шагина Дмитрия Алексеевича, представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 «молекулярная биология», удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям положения «О присуждении ученых степеней», а Дмитрий Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности «молекулярная биология».

**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо, Василий Николаевич. Дмитрий Алексеевич.

**Шагин Д. А., соискатель:**

Василий Николаевич, спасибо большое за отзыв. Действительно, наверное, упущение, что мы в диссертации не продемонстрировали электрофореграммы, а результат последовательных стадий очистки на хроматографии белка. Но это все, безусловно, делалось, это все опубликовано. Степень очистки по сравнению с формой исходной составляла 618 раз. Все это делалось под контролем антител, полученных к рекомбинантному неактивному белку. Наверное, решение не включать эти данные было

связано с тем, что диссертация и без того достаточно перегружена. Видимо, это не совсем правильное было решение с моей стороны. Я запомнил второй вопрос. Если можно... Одно слово просто достаточно сказать, и я вспомню... Да, там было еще замечание с вашей стороны... Да, это, видимо, результат замыленного глаза. КР (консервативный регион) – это та самая область, которая располагается между сигнальным пептидом и нуклеазным доменом, и которая на AlphaFold представлена в виде мини-домена. Прошу прощения. Да, вроде бы на все вопросы ответил.

**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо. Так, третьего оппонента у нас нет. Но есть его отзыв.

**Олейников В. А., ученый секретарь:**

Да, значит, отзыв полностью положительный. Опять же, про актуальность и новизну здесь написано, я зачитывать не буду. Здесь, конечно, впервые: «Диссертационная работа изложена на 342 страницах включает 78 рисунков, 32 таблицы и 669 работ источников». Анализ большой, да. Значит, «литературный обзор сам по себе является качественным теоретическим исследованием, безусловно, способствующим введению в тему» и так далее. Результаты обсуждения, подробно представлены этапы исследования. Все это, так сказать, описывается. «Особо хочется отметить оригинальность разработанных автором технологий анализа сложных смесей ДНК и использование этих методов при изучении болевой чувствительности в рамках международного научного консорциума по исследованию хронической боли». Как-то прозвучало здесь тоже. «И исследование рака молочной железы в рамках международной программы по исследованию рака молочной железы, а также выявление у маркеров старения в сотрудничестве с группой лабораторий Германии в рамках проекта по изучению механизма старения. Достоверность подтверждается как экспериментальными данными, так и представлением результатов работ на российских и международных конференциях». И, наконец, замечания. «1. В тексте диссертации на странице 159 присутствует несоответствие температуры инкубации 70 градусов нуклеазы камчатского краба с отсылкой к рисункам 3.9 и 3.10 с температурой, указанной в подписи к самим рисункам, 65 градусов. 2. На рисунке 3.15 (стр. 165), для корректности эксперимента не хватает отрицательного контроля, представленного смесью радиоактивно меченых одноцепочечных ДНК и одноцепочечных РНК без обработки нуклеазой краба. 3. В работе была продемонстрирована специфичность гидролиза с помощью Par\_DSN флуоресцентно меченого зонда на матрице ДНК длиной 4000 пар оснований. При этом фермент распознавал однонуклеотидную замену среди 4000 оснований последовательности ДНК. Не натолкнуло ли это диссертанта на мысль о создании подобия «примитивного секвенатора»? 4. Насколько, по мнению автора, технология геномной нормализации с

помощью крабовой нуклеазы может быть применена к исследованию бактериальных сообществ? 5. В работе автором была продемонстрирована возможность идентификации с помощью Pac\_DSN и специфического ДНК-зонда заданной последовательности в молекуле РНК. Почему это не нашло продолжения в виде создания технологии? 6. Латинские названия видов принято писать курсивом. Ну и далее: «Приведенные замечания и вопросы не носят принципиального характера, не снижают высокую оценку. Исследование на отличном методическом уровне, содержит предложенный автором ряд оригинальных экспериментальных и биоинформатических подходов». И так далее. «Содержание диссертации в полной мере соответствует специальности «молекулярная биология», автореферат полностью отражает, выводы четкие и конкретные, в полной мере отражают основные результаты работы. И таким образом, представленная работа по своей актуальности, новизне и практической значимости, полноте описания, достоверности полученных результатов соответствует всем требованиям положения ВАК, а сам Дмитрий Алексеевич Шагин заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология». Ну и подписан: официальный оппонент Михайлович Владимир Михайлович.

**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо. Дмитрий Алексеевич, будете отвечать?

**Олейников В. А., ученый секретарь:**

Там интересные вопросы.

**Шагин Д. А., соискатель:**

Можно мне перед глазами чтобы было?

**Олейников В. А., ученый секретарь:**

Ради бога, для вас.

**Шагин Д. А., соискатель:**

Да, относительно несоответствия температур в тексте и температур на рисунке, ну это однозначно опечатка, прошу за это прощение. Относительно отрицательного контроля, отсутствующего в диссертации, к сожалению, не всегда удается получить достаточно парадные картинки. Все это делалось, просто немножко непрезентабельный был фореж, который, соответственно, в диссертацию я не включил.

Относительно возможности использования дуплекс-специфической нуклеазы для создания примитивного секвенатора. Да, эта идея была достаточно очевидна, и мы даже делали ряд подходов в попытке пришивки к твердой фазе флуоресцентных олигонуклеотидов, с которыми, соответственно, гибридизовали молекулы ДНК разной длины. Но, к сожалению, столкнувшись с собственной недостаточной компетентностью в этом техническом вопросе,

эту тематику мы свернули. Ну и, честно говоря, просто были задачи с той же самой ДНКзой более актуальные и более важные, нежели пытаться сделать очередное колесо в телеге. Но теоретически такая возможность, я уверен, что есть.

Насколько технология геномной нормализации может быть применена к бактериальным сообществам? Может, и в принципе на эту тему есть ряд публикаций, причем публикаций, сравнивающих нашу технологию с другими методами. И, по мнению авторов, которые осуществляли вот эту геномную нормализацию, насколько я помню, там пять было различных бактериальных сообществ, наша методика проявила себя наилучшим образом.

Да, почему не продолжили с идентификацией фрагментов РНК? Я, наверное, ответил на этот вопрос. Мы заложили некую основу. Мы посчитали, что для нас более важно заниматься немножко другими направлениями, связанными с Pac\_DSN. Вот. И, к счастью, как мы и ожидали, ту базу, которую мы заложили, она была реализована научными коллективами в других лабораториях.

То, что касается курсива, да, согласен. У меня там некий гибрид получился. Ну, видимо, да, мое упущение. Все. Вроде на все вопросы ответил. Спасибо.

**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо. Так, коллеги, следующий вопрос у нас открыт. Дискуссия. Откроем дискуссию. Кто хотел бы выступить? Не вижу желающих. Я хочу сказать очень коротко. Ну, то, что панкреас краба является действительно очень богатым источником биологически активных веществ, в том числе и инструментом для биотехнологии, мы в свое время достаточно много использовали ферменты, протеолитические ферменты для гидролиза растительных белковые. В общем, эти работы получили действительно признание. И здесь демонстрация еще одного, так сказать, образца, который действительно может принести большое преимущество перед использованием других ферментов. Ну, я не знаю, вы знаете или нет, то есть где-то последних, последних где-то шесть лет я был последний раз на Дальнем Востоке, и те же самые японцы сейчас предпочитают покупать у нас не разделанного краба, а замороженного краба, исходя из того, что из панкреаса они выделяют столько биологически активных веществ и инструментов в том числе для молекулярной биологии, физико-химической биологии, что панкреасы у них окупают стоимость крабового мяса.

Я хотел бы вот еще сказать об одной вещи. Дело в том, что я являюсь одним из членов комиссии по премиям правительства в области науки и техники. И сейчас как раз мы рассматриваем довольно много работ, представленных на соискание этой премии. Я подумал о том, что, наверное, эта работа могла бы претендовать на работу такую, так сказать, получающую премию. Правда, там есть один вопрос, связанный с экономикой, – сколько это приносит денег? Но здесь, в принципе, есть, пожалуй, политическая часть,

потому что, если отказывается покупать у нас по политическим причинам, это есть плюс для нашей страны. Поэтому, Сергей Анатольевич, подумайте с Дмитрием Алексеевичем по поводу в области биотехнологии, на секции биотехнологии в следующем году, может быть, эту работу и представить.

Коллеги, если нет желающих больше выступить, то я хотел бы огласить счётную комиссию. Любезно согласились: Николай Владимирович Бовин, Виталий Павлович Зубов, ну и ответственный у нас учёный секретарь постоянный счётной комиссии. Значит, я предлагаю проголосовать. А пока мы будем считать голоса, мы начнем обсуждать другие вопросы. Спасибо. Вперед голосовать. Ах да, никто не возражает против счетной комиссии? Не вижу.

*(Идет тайное голосование)*

**Олейников В. А., ученый секретарь:**

Так, счетная комиссия, значит, по диссертации Шагина Дмитрия Алексеевича, присутствующие на заседании 22 члена нашего диссертационного совета, роздано бюллетеней – 22, оказалась в урне бюллетеней – 22, за – 22, против и недействительных – нет.

**Мирошников А. И., председатель:**

Спасибо. Утвердим? Утвердим. Кто за то, чтобы утвердить? Кто против? Воздержавшиеся? Не вижу. Поздравляем.

*(Далее идет обсуждение проекта заключения диссертационного совета. Бовин Н.В. вносит предложение о незначительных редакторских правках в тексте заключения. С учетом этого диссертационный совет единогласно принимает заключение)*

Председатель  
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

