



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01
на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

14 октября 2020 года

Защита диссертации
на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Мышкиной Надежды Михайловны

**Создание автономно светящихся эукариот,
экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты**

специальность: 03.01.03 — молекулярная биология

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 14 октября 2020 года.

Председатель диссертационного совета д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Учёный секретарь диссертационного совета д.физ.-мат.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 6.

1. Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
3. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
4. Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
5. Академик РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
6. Академик РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
7. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
8. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
9. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
10. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
11. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
12. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
13. Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
14. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
15. Д.б.н.	Мурашев Аркадий Николаевич	(03.01.06)
16. Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
17. Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(02.00.10)
18. Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
19. Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)
20. Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(02.00.10)

Иванов Вадим Тихонович: Приветствую всех собравшихся. В это непростое время напряжённое, почти военное, осадное положение мы продолжаем работу, пока не сдаёмся. В повестке дня нашего Учёного совета, в общем-то, один вопрос, как вы знаете, как было объявлено по электронной почте: защита диссертации Мышкиной Надежды Михайловны. Правда, у нас ещё один вопрос, такой, рабочий, поступила ещё одна диссертация к нам на рассмотрение: Рубцов Юрий Петрович, и полагается, когда принимается диссертация к защите сначала пройти через комиссию нашего Учёного совета и мы рассмотрим на этой комиссии, надеюсь, мы её одобрим. Два вопроса. Справимся с этим делом, нет возражений? Естественно, нет. Спасибо. Итак, защита диссертации. Мышкина Надежда Михайловна. Владимир Александрович...

Олейников Владимир Александрович: *(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечает, что материалы личного дела и документы предварительной экспертизы соответствуют требованиям Положения ВАК)*

Иванов Вадим Тихонович: Вопросы, замечания по личному делу? Обычно их не бывает, сегодняшней день не исключение, как я полагаю. Вроде, так оно и есть. Переходим собственно к защите. Надежда Михайловна, 20 минут для доклада.

Мышкина Надежда Михайловна: *(Излагает основные положения диссертационной работы)*

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо за ясный, четкий доклад. Переходим к обсуждению. У кого есть вопросы? Николай Владимирович, прошу к микрофону, чтобы было все стенографировано.

Бовин Николай Владимирович: Спасибо, отличный доклад, отличная работа. Но у меня возникают вопросы по применению этих результатов, собственно, для биологических исследований. По моему, наверное, наивному представлению, что несветящиеся растения или какой-то сложный организм... Что сложный организм, у которого светятся все клетки, они одинаково не дают или почти не дают, информации для изучения, скажем, физиологии и каких-то биологических процессов. То есть, для того чтобы ставить серьезные биологические задачи, нужно уметь специфически делать светящимися те или иные органы или типы клеток. Соответственно, у меня мой вопрос делится на два подвопроса. Первый вопрос: есть ли уже какие-то соображения или даже наметки на то, чтобы делать специфическое окрашивание? И второй подвопрос заключается в том, можете ли вы или рассказать о существующей задаче, решенной или решаемой, либо, как вы это себе видите, как с помощью тех данных, которые вы уже сейчас получили, можно решить какую-то конкретную биологическую задачу вот на сегодняшнем уровне того, что вы сегодня продемонстрировали?

Иванов Вадим Тихонович: Значит, у вас два подвопроса, да?

Мышкина Надежда Михайловна: Да, спасибо большое за вопросы. Да, во-первых, безусловно, в данной диссертации я предоставляю скорее не уже готовые методы решения реальных задач, а прототипы этих решений и когда все гены стоят под контролем одного и того же промотора, разумеется, они все будут изменяться... уровни их экспрессии будут изменяться одинаково. Тем не менее, можно представить себе такую систему, и подобные системы уже разрабатываются в нашей лаборатории, в которой все гены биосинтеза люциферина будут стоять какого-либо сильного конститутивного промотора, а ген непосредственно люциферазы будет стоять под контролем какого-либо другого промотора. Таким образом, наработка предшественника люциферина будет происходить во всех

клетках, однако, световой сигнал будут испускать только те клетки, в которых активен промотор, под контролем которого будет стоять ген люциферазы. И в данном случае у нас уже есть работы по постановке различных промоторов, например, промоторы контроля развития корней и промоторы с контрольными элементами ответа на растительные гормоны. Пока ещё готовых результатов нет, но вот начало пути уже есть.

Бовин Николай Владимирович: А вот второй подвопрос: если не использовать специфическое окрашивание, только на уровне общего окрашивания можно какие-то серьёзные задачи решить?

Мышкина Надежда Михайловна: В целом, так как у нас в данной системе одними из основных предшественников являются метаболиты фенольного пути, то можно с помощью непосредственно данной системы, например, исследовать распределение и доступность фенольных метаболитов в растительном организме, поскольку это никакими другими простыми методами пока невозможно визуализировать. В случае данной системы видно было, что распределение свечения очень разное и оно, конечно же, отражает и общие изменения уровня метаболизма вообще, но и фенольного метаболизма, в частности. Поэтому при исследовании именно фенольного метаболизма данная система в уже существующем виде, в целом, может быть пригодна.

Бовин Николай Владимирович: Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Продолжаем обсуждение. У кого есть ещё вопросы? Я могу не видеть, потому что тут слепит прожектор. Если у кого-то есть вопросы, прошу активнее просто выходить к микрофону и задавать. Прошу.

Дубинный Максим Анатольевич: Скажите, а какая выдержка была на смартфоне при съёмке светящихся растений?

Мышкина Надежда Михайловна: Выдержка была 30 секунд, съёмка производилась со штатива и это смартфон, который позиционирует себя как смартфон, обладающий профессиональной камерой, поэтому, наверное, это самое лучшее, что можно именно с помощью смартфона снять на данный момент.

Дубинный Максим Анатольевич: А какие у вас стратегии на данный момент так, чтобы светилось ярче и можно действительно было бы снимать обычной камерой и смотреть глазами без привыкания?

Мышкина Надежда Михайловна: У нас есть различные стратегии, во-первых, это... можно перечислить, причислить к этим стратегиям гормональную обработку растений, также можно причислить усиление самого биохимического пути биосинтеза кофейной кислоты - ну, если мы говорим именно про растения. То есть, мы не вводили в растения гены биосинтеза кофейной кислоты из тирозина, но, в целом, это возможно и также можно усилить данный путь, в том числе, и шунтированием, поскольку в растениях биосинтез кофейной кислоты осуществляется одним определённым путём, а в микроорганизмах, например, альтернативным путём. Можно поставить гены из микроорганизмов для усиления биосинтеза кофейной кислоты. Кроме того, ведётся поиск по более сильным промоторам, нежели вирусный 35s-промотор. В целом, наверное, основные стратегии я перечислила.

Дубинный Максим Анатольевич: Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Вопросы иссякли? Или ещё есть? Вы кого-то видите?

Олейников Владимир Александрович: Нет.

Иванов Вадим Тихонович: Тогда спасибо, вопросы кончились, можете ненадолго отдохнуть, дальше у нас по процедуре защиты слово предоставляется научному руководителю для характеристики диссертанта. Илья Викторович Ямпольский.

Ямпольский Илья Викторович: Уважаемые коллеги, я о Наде мог бы очень долго говорить только самые хорошие слова, но я скажу только вот самое главное. То, что Надя - это один из основных столпов, так сказать, нашего отдела и я надеюсь, она им... эту свою функцию будет выполнять и дальше у нас в институте, это раз. Во-вторых, Надя воспитала и продолжает воспитывать уже приличного размера коллектив студентов и аспирантов, и это тоже мы очень ценим, тоже рассчитываем на то, что это будет продолжаться. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Коротко, но ёмко. Дальше мы должны заслушать серию отзывов, во-первых, отзыв организации, где работа выполнялась, то есть отзыв нашего института.

Олейников Владимир Александрович: *(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается)* Так, заключение организации, это наш институт. Диссертация “Создание автономно светящихся эукариот, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты”, Мышкина Надежда Михайловна, ну, опять же, в личном деле то, что перечислялось: она в последнее время работает в должности младшего научного сотрудника, окончила институт в тринадцатом году, это Университет. Сдача кандидатского экзамена, удостоверение выдано в двадцатом году, научный руководитель Ямпольский, тема диссертации утверждена на заседании Учёного совета нашего института, это было, последняя версия 18 марта двадцатого года. Далее, по итогам обсуждения принято следующее заключение: диссертационная работа Мышкиной выполнена на высоком теоретическом, методологическом и практическом уровне, целью работы является проверка возможности создания автономно светящихся эукариот с помощью введения гетерологических генов цикла кофейной кислоты, обнаруженных в высших биоллюминесцентных грибах. Ну, далее достаточно подробно рассматриваются и представляются материалы диссертации, подчёркивается, что основные результаты изложены в трёх работах, опубликованных соискателем учёной степени в ведущих отечественных и международных журналах, всё соответствует положению о присуждении учёных степеней. Далее, заключение принято на открытом заседании отдела биомолекулярной химии, подписано замдиректора института, доктором химических наук Смирновым и, соответственно, утверждено директором нашего института, академиком Александром Габировичем Габировым. Это что касается заключения организации.

Теперь по поводу отзыва. Отзыв ведущей организации, ей является Федеральное Государственное Автономное образовательное учреждение высшего образования, Московский физико-технический институт, национальный исследовательский университет. Ну, и что пишется в отзыве.

(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается)

Отзыв полностью положительный, диссертация Мышкиной посвящена созданию автономно биоллюминесцентных эукариот, подчёркивается актуальность и то, что мы уже слышали сегодня в докладе, указывается, что непосредственно люциферин-люциферазная реакция обладает недостатком при практическом применении, поскольку для её прохождения необходимо добавлять люциферин извне, что технически затруднено и существует потребность в автономной биоллюминесцентной системе и вот эта потребность и определяет во многом актуальность данной работы, поскольку диссертация этому

посвящена. В диссертационной работе Мышкина описывает обнаружение кластера генов, кодирующих ферменты биосинтеза люциферина в геноме биоломинесцентного гриба - название, соответственно, гриба по латыни - автор описывает создание автономно биоломинесцентных дрожжей, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты и вспомогательные гены, Мышкина описывает создание полностью биоломинесцентных растений двух видов рода, указаны роды растений, с помощью введения в них генов цикла кофейной кислоты. В работе Мышкиной впервые описаны ферменты биосинтеза люциферина грибов, показана применимость для создания автономно биоломинесцентных модельных объектов, принадлежащих разным царствам живой природы, таким как дрожжи, растения и животные, в том числе описано создание многоклеточных автономно биоломинесцентных организмов - высших растений рода *Nicotiana*. Работа написана по классическому плану, 139 страниц, 252 ссылки, соответственно, таблицы, рисунки, автор подробно описывает в соответствующем разделе большое количество разнообразных экспериментальных подходов, результаты и выводы опубликованы в трёх статьях в международных журналах. Принципиальных замечаний по работе не имеется, есть несколько моментов, на которые хотелось бы обратить внимание диссертанта: в работе встречаются стилистические погрешности, а также пунктуационные ошибки; обзор литературы, как было указано выше, даёт полное представление об объектах исследования, стилистически написан хорошо, однако занимает ровно половину объёма диссертационной работы; экспериментальный материал диссертации более чем превосходит требования к квалификационным работам, поэтому нет необходимости введения в текст диссертации раздела "3.5.3.3. Подбор гетерологической тирозин-аммоний-лиазы в автономно светящейся культуре клеток млекопитающих", в котором эксперименты только запланированы. Однако отмеченные выше замечания не снижают общего впечатления о работе, результаты имеют важное значение для биологической и медицинской физики, могут быть практически применены, например, при создании сенсоров на лекарственные средства и моделей опухолей. На основании вышесказанного можно заключить, что диссертационная работа Мышкиной Надежды Михайловны соответствует критериям, установленным Положением о присуждении учёных степеней, а сам диссертант несомненно заслуживает присуждения присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология. Отзыв обсуждён и одобрен на расширенном научном семинаре кафедры молекулярной и трансляционной медицины физтех-школы биологической и медицинской физики МФТИ, подписан отзыв доктором биологических наук, Лазаревым Василием Николаевичем, отзыв утверждён, соответственно - проректор по научной работе физтеха Баган Виталий Анатольевич.

Иванов Вадим Тихонович: Там были краткие замечания, будете комментировать?

Мышкина Надежда Михайловна: Я со всеми замечаниями согласна.

Иванов Вадим Тихонович: Согласны. Ну, тогда всё понятно. Есть ли отзывы на автореферат?

Олейников Владимир Александрович: Да. На автореферат поступил один отзыв, отзыв полностью положительный, ну, опять же пишут, что проанализированы гены, обеспечивающие процесс биоломинесценции грибов, выявлены новые компоненты каскада, получены последовательности и уточнены функции и особенности функционирования участников молекулярных путей, ну и так далее. Полностью положительный и, соответственно, говорится, что соответствует положениям о порядке

присуждения учёных степеней, подписан - кандидат биологических наук по специальности молекулярная биология, это МГУ имени Ломоносова, подписано - Астахова Алина Анатольевна.

Иванов Вадим Тихонович: Ну, поскольку там не было замечаний больше, то примем к сведению всё, что говорилось и двинемся дальше. А дальше у нас выступление официальных оппонентов. Член-корреспондент Лось Дмитрий Анатольевич, доктор биологических наук, институт физиологии растений.

Лось Дмитрий Анатольевич:

(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается).

Дорогие коллеги, добрый день. Я очень рад всех приветствовать и рад был выступить оппонентом этой диссертации, имея в виду, что ИБХ является мировым центром по разработке и изучению систем биолюминесценции, при любом раскладе эта работа должна была быть солидной, интересной, ну и так далее. Я вот слышал здесь в аудитории всего два вопроса и оба они (я на безопасном расстоянии, плевать я не буду, поэтому с точки зрения Роспотребнадзора выдержано). Так вот, два вопроса и оба они касались растительной системы люминесценции. Вот, я хочу сказать, что мы привыкли к тому, что растения нас окружают и ничего в этом как бы необычного и интересного уже нет. На самом деле, растения дают нам кислород, которым мы дышим, они же поглощают углекислый газ, о котором сейчас все так заботятся. Кстати сказать, и то другое делается на 50% высшими растениями, лесами, а остальное - морской фитопланктон, невидимые глазу микроорганизмы. Но дело не в этом, дело в том, что мы употребляем продукты из винограда, пшеницы, ржи, кукурузы; томаты, огурцы и прочее, но мало задумываемся о том, как это всё работает. А на самом деле растения - это система, которая создана для того, чтобы поглощать свет, а не излучать и в данной работе сделана такая интересная система, которая заставляет растения излучать дополнительные кванты света в темноте. Это вообще, ну, как бы с точки зрения растений я бы сказал, что нонсенс. Вот, но с другой стороны это открывает такие, в общем-то, области изучения, как вот связь, допустим, той же люминесценции и фотосинтеза. В работе об этом мало и вообще ничего нет, но это понятно, потому что она посвящена не этому, но тем не менее точки для дальнейшего изучения - они становятся видны. Я хочу ещё сказать, перед тем как перейти к замечаниям... Вы, наверное, уже догадались, что отзыв не буду зачитывать, потому что он был размещён в интернете, кто хотел, мог прочитать и вчера я его перечитывал, обнаружил там три опечатки на трёх страницах, поэтому насчёт опечаток я вообще промолчу в своих замечаниях. Да, вот, я что хочу сказать, вообще мысль про светящиеся растения - она возникла давно. Вот я даже помню, что в нашем институте в начале девяностых как раз пытались использовать систему прокариотической люминесценции на основе люциферазы *Vibrio*, вот таких бактерий морских, была идея трансформировать растения, сделать там светящуюся газонную травку: идёте вы к своему дому, а у вас светится, так сказать, ваша дорожка. Или, например, светящаяся ёлка: вы приходите на Красную площадь, а там стоят знаменитые кремлёвские ёлки, во-первых, это очень дорого стоит, а во-вторых, вдруг гасят свет, например, война. Или, допустим, прилетел какой-нибудь Руст, он сел, свет гаснет, а всё светится, стоят светящиеся ёлки. И вдруг на Мавзолее появляется человек, и он светится, и мы понимаем: если он светится целиком, то это млекопитающее, а если он светится чуть-чуть, ну, скажем, кружком где-то там, то это уже выше, чем млекопитающее. То есть это задача нетривиальная совершенно - светящиеся организмы. Вот и что из этого вышло, на самом

деле: вот все светящиеся ёлки уехали в Финляндию, светящаяся газонная травка уехала в Соединённые Штаты, и мы видели публикации по этой тематике, то есть, трансформация хлоропластов, она, можно сказать, была как бы декларирована, но на самом деле нельзя сказать, чтобы это удачный вариант, потому что хлоропласты - трансформация их нестабильна, это надо делать из пушки, стрелять по ним, в общем. А в данном случае, в данной работе мы видим совершенно удивительно стабильную систему, которая светится. Почему не светятся листья - надо вообще-то это изучать, но вот мне кажется, что там так много квантопоглощающих пигментов, что им не резон светиться, поэтому, если заставлять светиться растения, то, наверное, таким способом - наверное, не в листьях. Наверное. Но этого я не знаю. Вот, и после такого долгого вступления, я бы хотел сформулировать свои вопросы, которые у меня возникли после чтения этой работы. Их немного и они, наверное, для диссертанта будут весьма простыми. Вот я сделал такое замечание относительно цитаты «Особенно перспективны в виде культуры клеток более примитивные растения: мхи и водоросли». Ну, водоросли, конечно, можно называть растениями, они очень хотели ими стать, но у них не получилось. И вот второй мой вопрос — это даже, наверное, не к диссертанту, просто мне интересно, почему некоторые гены называются семью буквами, тогда как классическое там, допустим, микробиологическая аббревиатура состоит из четырёх: три маленькие, одна большая, как правило. Вот и, конечно, интересно, что трансформированы были два вида растений, оба табака, табак сейчас, правда, не в моде, но тем не менее, это два разных вида и на картинках в диссертации видно, что они почему-то по-разному светятся, их органы светятся тоже по-разному, вот мне хотелось бы пояснения по этому вопросу получить. Какие есть по этому поводу соображения. Вот. И, наверное, я должен сказать, вернее, зачитать, произнести-то это невозможно и запомнить сакраментальные слова, которые всегда должны быть произнесены. Ну, прежде надо ещё добавить, что результаты опубликованы в таких изданиях, как PNAS и Nature Biotechnology, это очень солидные и хорошие издания, свидетельствует, как вот нам руководитель пояснил о том, что квалификация исполнителя очень высока. Так вот, значит, предъявленная диссертация является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований впервые получены трансгенные клетки эукариот обладающие системой постоянного свечения. Выводы из работы обоснованы, автореферат полностью отражает содержание диссертации. Таким образом, данная диссертационная работа по теоретическому уровню, объёму проведённых исследований, научной новизне и практической значимости отвечает критериям, сформулированным в пункте 9 Раздела «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства № 842 от 24 сентября тринадцатого года, а автор работы Мышкина Надежда Михайловна, заслуживает присуждение ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Молекулярная биология». Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо, Дмитрий Анатольевич. Надежда Михайловна, вам слово для ответа на вопросы оппонента.

Мышкина Надежда Михайловна: Большое спасибо за труд по созданию отзыва, были вопросы, я для простоты их вынесла в слайды, чтобы всем было видно. Да, с первым комментарием я согласна, это была фактическая ошибка с моей стороны, больше так не буду говорить. Второй вопрос про аббревиатуры генов: это была вынужденная мера, в принципе, мы воспользовались достаточно широко распространённой практикой, когда разными аббревиатурами обозначаются в целом ген, выполняющий какую-то конкретную

функцию, в отличие от гена, выделенного из определённого организма. Во втором случае в виде префикса добавляются две буквы, соответствующие первым буквам родового и видового названия, то есть, в данном случае это ген, кодирующий гиспидинсинтазу из гриба *Neonothopanus nambi*. Это, к сожалению, меньше чем семь букв не получилось. И третий вопрос: данный... данное изображение не попало в мой доклад, по разнице локализации свечения в листьях *Nicotiana tabacum* и *Nicotiana benthamiana*. *Nicotiana tabacum* представлен на верхней панели, *Nicotiana benthamiana* - на нижней панели. Действительно видно, что локализация свечения очень разная и в целом я могу сказать, так как исследований было довольно много на эту тему, далеко не все фотографии попали даже в полный текст диссертации: в случае с *Nicotiana benthamiana* также присутствуют пятна на листьях, в случае если растение живо. Но в данном случае, к сожалению, это *post mortem* фотографии, где уже отрезанные листья и листья конкретно *Nicotiana benthamiana*, они очень быстро высыхают и, видимо, с этим связан эффект того, что пропадают пятнам более высокого свечения. С чем в целом могут быть связаны эти пятна - тоже можно спекулировать на этот счёт. Скорее всего, это доступность предшественников, которых очень много, то есть, помимо кофейной кислоты, про которую я много говорила, это такие метаболиты, как НАДФН, АТФ, малонил-КоА и в каких-то определённых точках листа суммарно представленность этих метаболитов оказывается выше и эти пятна отражаются более ярким свечением листьев. Ответила ли я на Ваши вопросы?

Лось Дмитрий Анатольевич: Да.

Мышкина Надежда Михайловна: Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Видимо, ответили. Теперь давайте слушаем второго официального оппонента, Илья Андреевич Остерман, главный научный сотрудник Центра наук о жизни Сколково, “Сколковский институт науки и технологий”.

Остерман Илья Андреевич: Добрый день. Добрый день, глубокоуважаемые коллеги, мне очень приятно было прочитать и оценить эту работу. Про светящиеся растения я услышал ещё до прочтения этой статьи... этой диссертации. Это было и в СМИ, и обсуждалось в соцсетях, поэтому было интересно прочитать... Как бы и эту статью я видел раньше, но и как бы, собственно говоря, как это всё создавалось. И уже были процитированы статьи очень высокорейтинговые, и тема такая интересная - у меня были некоторые опасения, что работа будет написана немножко небрежно, потому что, ну, как бы, ну, вот вам статьи, Nature Biotechnology, PNAS, вот светящиеся растения, что ещё вам надо? Вот, всё уже показано. А тем не менее, стиль изложения и сама диссертация вызывают у меня очень положительное впечатление. Вот тут мне показалось, что в качестве замечания было сказано, что большой литобзор, то ли в отзыве ведущей организации, то ли... по-моему. Мне как раз литобзор очень понравился, литобзор заслуживает издания, может быть, как там или как статьи, или, может быть, даже какой-то там небольшой монографии, потому что он представляет собой такой небольшой учебник для человека, который планирует вот что-то экспрессировать где-то, в общем и очень широко. Начиная, взять какой-нибудь кластер из бактерий, грибов или ещё чего-то и экспрессировать его опять же в бактериях, грибах, растениях, млекопитающих. Вот, так как тема эта очень активно развивается и появляются всё новые и новые данные то вот, в общем, более-менее современное представление об этой науке в этом литобзоре представлено. Так как мне эта тема тоже интересна, то, в общем, литобзор на меня произвёл большое впечатление, я его всем, кто интересуется гетерологической экспрессией и вообще там биотехнологией,

рекомендую его прочитать... Это можно вообще как целый курс из этого литобзора сделать для студентов биотехнологических направлений. Вот. Работа замечательная. Ну, вот поставлена цель создать светящееся растение, светящееся растение создано. Что ещё нужно? И, казалось бы, это звучит очень просто, если бы это была задача создать там *E. coli*, экспрессирующую белок, вот, её создали. Вроде бы то же самое, а на самом деле, совсем другое, потому что очень сложные технологии за двадцатиминутный доклад. Вот это один слайд - вот плазмиды, на следующем слайде - вот светится растение. Можно представить себе, какой реально практический объём работы был проделан между двумя там этими слайдами. И я восхищаюсь диссертантом. И понятно, что большой коллектив это делает и, к чести тоже защищающейся, стоит отметить, что в диссертации всегда отмечено, какие работы сделаны ей лично, а что сделано в сотрудничестве. То есть, приятно, что это... за этим следит. Ну, я не буду пересказывать результаты, потому что они как бы хорошо представлены и уже обсуждались, поэтому, так как я оппонент, я всё-таки постараюсь, постараюсь найти какие-то недостатки, но вот прям недостатков и замечаний таких серьёзных у меня нет. Но вот что у меня, что я отметил. Так как вот я уже сказал, что очень хорошо и представлены результаты, и всё время все необходимые контроли есть, то иногда, когда их немножечко не хватает, это начинаешь замечать. Если бы с самого начала их не хватало, может быть, уже бы привык, а так как уже диссертант приучил с первых частей своего... экспериментальной части, к тому, что всё это есть, то когда нет - замечаешь. Ну, вот что я отметил. Мне показалось, что вот в случае, когда были дрожжи получены, содержащие все 4 гена, там в диссертации представлена картинка с оксילוциферинном, что они светятся, а вот что без оксילוциферина - ну, скорее всего, они не светятся без него, но это было бы приятно её увидеть. Вот, то же самое с автономной биолюминесценцией: есть среда с тирозином приведена, ну, предполагаю, что на среде без тирозина, опять же, не будет свечения. Но такой картинке тоже... Мне кажется, не сложно её было привести. И наверняка это было, конечно, сделано. Вот. Что ещё? Ну, вот тоже ещё одного изображения, что вот когда был тест с геном *nmluz* при добавлении гиспидина - вот сказано, что свечения не было текстом, а картинки не хватает. Что к этой части, какое можно было бы пожелание: я понимаю, что естественно, в эту диссертацию это, наверное, не могло войти, потому что она и так очень большая по объёму практической работы. Но, конечно, вот здорово было бы, если мы характеризуем новые гены и говорим, что вот этот вот ген обладает такой-то функцией, показать это в каких-то модельных реакциях бесклеточных, то есть взять субстрат, взять белок, его выделить и показать, что вот из субстрата он получается вот такой-то продукт реакции. Тогда для характеристики вот этих вновь открытых генов это было бы здорово. Ну, и, наверное, это будет сделано, я думаю, в дальнейшем в этой лаборатории. Что касается частей с уже с получением светящихся млекопитающих - меня немножко удивило, как раз хотя я вот похвалил очень сильно литобзор, в котором очень много рассказано про то как вот это делается, а вот мне не хватило объяснений, вот как, собственно говоря, были выбраны те плазмиды и те системы для получения светящихся млекопитающих. Например, вот тут немножко уже про количество плазмид шла речь, что вот их многовато, вот, и их, наверное, хотелось бы сократить. Например, почему было не попробовать бы получить какие-то гены на одной плазмиде. Понятное дело, что это там эукариоты, млекопитающие, но есть IRES'ы, в принципе, можно какую-то систему было придумать, где бы с одной РНК получались бы сразу несколько белков. Вот, может, опять же это бы помогло повысить эффективность. Ну, вот да, опять же, для дрожжей вот был

использован вектор - почему этот вектор? Потому что как бы какого-то вот обоснования, какие системы для экспрессии были выбраны. Я уверен, что они, эти обоснования, есть, но на фоне вот как бы литобзора, который это хорошо разбирает их немножко не хватило в экспериментальной части. Ну, это всё, безусловно, небольшие замечания и комментарии, которые не снижают общий уровень, давайте тоже зачитаю важную фразу, что диссертационная работа Мышкиной Надежды Михайловны соответствует критериям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства № 842, а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология». Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Надежда Михайловна, ваша очередь.

Мышкина Надежда Михайловна: Спасибо большое за труд по рецензированию моей работы. Да, я также подготовила слайды с вопросами, чтобы проще было воспринимать мои ответы. Да, согласна по некоторой небрежности я поставила далеко не все контрольные эксперименты в текст диссертации. Значит, объясняю почему в случае с определением функции гена кафеоилпируватгидролазы был выбран альтернативный контроль, не такой, как во всех остальных экспериментах. Во всех остальных экспериментах контроли строились по принципу дрожжи без субстрата и дрожжи после добавления субстрата. Однако оксилуциферин грибов может в принципе в водных средах самопроизвольно разлагаться на кофейную кислоту и пировиноградную кислоту и поэтому мы опасались, что даже при отсутствии экспрессии гена кафеоилпируватгидролазы может наблюдаться свечение дрожжей. Поэтому мы провели контроль несколько иного типа. Ну, дрожжи дикого типа, в общем-то, никто не ждал, что они засветятся в ответ на добавление оксилуциферина, однако дрожжи, которые экспрессировали все гены цикла кофейной кислоты кроме кафеоилпируватгидролазы в теории могли бы за счёт гидролиза оксилуциферина также демонстрировать свечение. К счастью, наши опасения не подтвердились и данные дрожжи действительно были контрольными и свечения не демонстрировали, а дрожжи, которые экспрессировали все гены цикла кофейной кислоты, включая ген кафеоилпируватгидролазы, реагировали на добавление оксилуциферина. Вторая часть вопроса про автономно биоллюминесцентные дрожжи. Да, тест на среде без тирозина я не привела в диссертации, однако мы его проводили и, стоит отметить, что, во-первых, тирозин не является незаменимой аминокислотой для дрожжей, поэтому они всё равно светятся, поскольку в их клетках всегда присутствует тирозин, даже если он не добавлен в явном виде в среду. И кроме того, судя по всему, превращение тирозина в паракумаровую кислоту не является лимитирующей стадией каскада, я об этом, в целом, уже говорила. Поэтому дрожжи всё равно светятся, даже если дополнительного тирозина не добавлять. Следующий вопрос тоже касался контролей. Да, действительно упущение, опять же несколько контролей я не добавила в текст, привожу их с некоторым запозданием здесь. Дрожжи, которые экспрессируют только ген люциферазы грибов в ответ на добавление гиспидина не светятся. И также дрожжи, которые экспрессируют гены люциферазы, гиспидин-3-гидроксилазы и фосфопантетеинилтрансферазы в ответ на добавление кофейной кислоты не светятся, потому что не хватает гена гиспидинсинтазы. Также, да, был комментарий насчёт демонстрации активности белков в бесклеточной системе. Я полностью согласна, что это было бы прекрасным подтверждением функции данных генов, однако, к сожалению, для их функционирования, во-первых, необходимо

достаточно большое количество кофакторов, которые очень нестабильны в бесклеточных системах. Кроме того, один из генов и, соответственно, его продукт крайне большие: ген размером больше чем 5000 пар оснований и в его продукте больше чем 1700 аминокислотных остатков. Такие белки плохо нарабатываются в бесклеточной системе и крайне затруднительно их выделять. Ну, и наконец, судя по предварительным экспериментам нашей лаборатории, то ли все, то ли, как минимум, большая часть белков... ферментов цикла кофейной кислоты ассоциированы с мембранами. То есть тоже, создание подходящих условий в бесклеточной системе крайне затруднительно, поэтому пока, к сожалению, это сделано не было. Насчёт выбора генетических конструкций: все представленные конструкции уже... мы выбрали те или иные контрольные элементы, регуляторные, именно потому что они зарекомендовали себя хорошо в данных модельных организмах и, в целом, с альтернативными регуляторными элементами мы также проводили эксперименты, просто это не вошло в текст диссертации. Конкретно вектор pGar для дрожжей рекомендован производителем для использования в дрожжах *Pichia pastoris*. Проведение генов на отдельных плазидах... Да согласна, что... Немножко про другое. Оперон в том виде, в котором он встречается в природе в автономно биолюминесцентных грибах. В природе в геноме автономно биолюминесцентных грибов: да, безусловно, гены расположены близко друг от друга, однако регуляторные элементы у них не могут быть, скорее всего, распознаны, по крайней мере, вообще всеми гетерологическими хозяевами, кроме того, установление функции каждого из генов нами производилось по отдельности, поэтому я могу предположить, что если полностью кластер генов кофейной кислоты встроить в гетерологический организм именно в том виде, как он встречается в геноме грибов, он может не сработать из-за отсутствия распознавания регуляторных элементов. В нашем же случае мы смогли получить положительные результаты именно за счёт замены регуляторных элементов. Вопрос про трансфекцию большим набором плазмид. Да, спасибо за вопрос, я полностью согласна, что если бы мы могли объединить гены в одну конструкцию, то, скорее всего, повысилась бы эффективность попадания различных генов в одну и ту же клетку и эта работа уже проводится в нашей лаборатории, это дипломная работа одного из студентов. Пока она не завершена, но она в процессе. И, наконец, были комментарии, что для повышения эффективности свечения клеток НЕК можно было бы попробовать интегрировать гены в геном. Это также не попало в текст моей диссертации, но мы сейчас работаем в этом направлении и в одинаковых условиях временная трансфекция и стабильно созданная линия - линия, стабильно экспрессирующая ген люциферазы грибов, мы пока начали в первого гена. Они в ответ на добавление абсолютно одинаковых количеств люциферина реагируют очень по-разному: линия, стабильно экспрессирующая ген люциферазы на два порядка более высокие сигналы даёт. Поэтому по возможности мы как можно быстрее перейдём на гены, которые интегрированы в геном, поскольку ответ гораздо более эффективный. Ответила ли я на Ваши вопросы?

Остерман Илья Андреевич: Да.

Мышкина Надежда Михайловна: Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Если у оппонентов есть какие-то возражения по поводу услышанных ответов, у нас будет общая дискуссия и будет возможность продолжить это обсуждение. Собственно, я и перехожу сейчас к общей дискуссии. Кто бы хотел продолжить обсуждение, какие-то вопросы остались не отвеченными? Что-то осталось непонятным? Хотел бы услышать какие-то соображения по поводу, как голосовать

в данном случае? Открываю данную дискуссию, кто хотел бы выступить? Или всем всё ясно? Бывают такие случаи, когда нет необходимости в дискуссии, но, тем не менее, часто...

Олейников Владимир Александрович: Миш, там в удалённом доступе нет этих запросов? На выступление? У нас ещё удалённый доступ есть, присутствует.

Иванов Вадим Тихонович: А присутствуют? Я понимаю. Ну, как мы узнаем их пожелания?

Олейников Владимир Александрович: Они могут выступить.

Иванов Вадим Тихонович: А мы их слышим?

Олейников Владимир Александрович: Вообще да, у них микрофоны есть. Но нет.

Иванов Вадим Тихонович: По-моему, по-моему, я не слышу никаких...

Прокофьев Михаил Владимирович: Ну, у меня заявок не было пока.

Олейников Владимир Александрович: Понятно.

Иванов Вадим Тихонович: Не было, понятно. Ну, если вопросов для общей дискуссии не возникло никаких, я даю слово Надежде Михайловне для завершения дискуссии. Прошу.

Мышкина Надежда Михайловна: Да, я хотела бы сказать спасибо, во-первых, моему научному руководителю за его безграничный оптимизм и терпение, Илье Викторовичу, моим оппонентам Дмитрию Анатольевичу и Илье Андреевичу и представителю ведущей организации Василию Николаевичу за их большой труд по чтению и рецензии моей работы, моим коллегам, без которых эта работа не была бы возможна, моим родственникам и друзьям, которые поддерживали меня на протяжении всего пути, ну, и также всем присутствующим в зале за ваше внимание. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Ну, дальше у нас формальности остались. Нам нужно избрать счётную комиссию, и я думаю, одновременно с этой комиссией мы ещё выступим по поводу комиссии по диссертации Рубцова и дальше будем голосовать и подождём чуть-чуть подсчёт голосов, я надеюсь, он будет быстрый, и завершим нашу работу. По поводу счётной комиссии у меня уже готово предложение, традиционно мы считаем оптимальным размер три человека в счётной комиссии. И у меня без регалий и имён-отчеств просто список предлагаемый: Бовин, Завриев, Олейников. Вот три человека, которые согласились участвовать в работе счётной комиссии. Есть ли отводы, самоотводы? Не вижу. Кто за счётную комиссию? Есть ли против? Счётная комиссия избрана. Давайте заодно одобрим те кандидатуры, которые предлагаются для оценки приемлемости на нашем учёном совете диссертации Юрия Петровича Рубцова, диссертация называется "Клеточные и молекулярные механизмы контроля лимфопрлиферации и аутоиммунитета", докторская диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по двум специальностям: молекулярная биология и иммунология. Комиссия предлагается следующая, опять же без регалий и имён-отчеств: Лебедев, Габибов, Смирнов и Лукьянов. Лукьянов Сергей Анатольевич. Хорошо известные специалисты, мнению которых мы, как правило, доверяем. Нет ли возражений против данного состава оценочной комиссии, которая скажет нам, брать к защите или не брать к защите эту работу? Нет возражений? Я считаю, что мы её одобрили. В таком разе объявляю перерыв на голосование, прошу голосовать и не расходиться, я думаю, что это...

Олейников Владимир Александрович: Давайте сразу обсудим...

Иванов Вадим Тихонович: А, да, мы обычно, прошу, спасибо. Мы обычно ещё обсуждаем проект заключения, который, за который нам предстоит голосовать после утверждения итогов голосования. Иногда появляются пожелания по редакции того текста, который предлагается учёному совету. Есть ли такие предложения сейчас? Я таких предложений не вижу. И тогда мы подготовлены к тому, чтобы голосовать за данный проект заключения в таком первоначально подготовленном варианте. Объявляю перерыв, давайте голосовать.

(Проводится тайное голосование)

Иванов Вадим Тихонович: Голосование закончено, начался подсчёт голосов. Так, у меня впечатление, что счётная комиссия свою работу провела и готова нам доложить итоги. Правильно я понял, Владимир Александрович?

Олейников Владимир Александрович: Абсолютно, да. Значит, по диссертации счётная комиссия закончила свою работу. Присутствовало на заседании 20 членов совета, роздано бюллетеней - 20, оказалось в урне бюллетеней - 20, за - 20, против нет, недействительных нет.

Иванов Вадим Тихонович: То есть единогласно, да? Значит... Рано аплодировать! А вдруг кто-то проголосовал против, а тут его не оказалось, и он опротестует итоги голосования! Кто за то, чтобы утвердить итоги голосования? Кто против? А вот теперь поаплодируем. Поздравляем с защитой! Мы завершили нашу работу, остаётся только проголосовать за проект заключения. Есть ли какие-то возражения против того, чтобы принять данный проект заключения? Кто за то, чтобы его принять, давайте проголосуем. Против? Внимательно смотрю, против не вижу.

(Проходит голосование по проекту заключения диссертационного совета. Заключение принято единогласно).

Иванов Вадим Тихонович: И эту процедуру мы тоже завершили. Спасибо всем за работу, следующее наше заседание через две недели, там будут две защиты. Начало будет в десять часов.

Олейников Владимир Александрович: Да, начало в десять.

Председатель диссертационного совета Д 002.019.01

д.х.н., академик РАН

Учёный секретарь

диссертационного совета Д-002.019.01

д.ф.-м.н.



(Handwritten signature of V.T. Ivanov)
Иванов В.Т.

(Handwritten signature of V.A. Oleynikov)
Олейников В.А.