

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

СТЕНОГРАММА

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

10 июня 2020 года

Защита диссертации
Тимербаева Вадима Рафаиловича
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**«Создание безмаркерных растений томата и яблони
с геном суперсладкого белка»**

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

Москва – 2020 г.

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 10 июня 2020 года.

Председатель диссертационного совета,

акад. РАН, д.х.н.

Иванов В.Т.

Ученый секретарь диссертационного совета,

д.ф.-м.н.

Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 23 человека, из них докторов наук по профилю диссертации – 7.

1.	Акад. РАН, д.х.н.	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2.	Д.ф.-м.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
3.	Д.ф.-м.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
5.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
6.	Акад. РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
7.	Акад. РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
8.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
9.	Чл.-корр. РАН, д.б.н.	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.	Акад. РАН, д.б.н.	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
14.	Акад. РАН, д.х.н.	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.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
18.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
19.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(02.00.10)
20.	Чл.-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
21.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
22.	Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)
23.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(02.00.10)

Председатель: Итак, речь идет о второй защите. Защите Тимербаевым Вадимом Рафаиловичем кандидатской диссертации о создании безмаркерных растений и так далее. Это все знают. Владимир Александрович, материалы личного дела.

Ученый секретарь: Материалы личного дела. Тимербаев Вадим Рафаилович, гражданин Российской Федерации, окончил с отличием Саратовский государственный университет имени Чернышевского в 2004 году. Специальность биология. В шестом году с отличием окончил магистратуру Пушинского государственного университета. С 2004 по 2008 год старший лаборант-исследователь, с 2008 года по настоящее время младший научный сотрудник лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений ФИБХа, филиала нашего института. Кандидатский экзамен по специальности молекулярная биология сдан с оценкой отлично. Работа выполнена в лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений Института биоорганической химии, научный руководитель диссертационной работы – доктор биологических наук Сергей Владимирович Долгов, это ФИБХ, заведующий лабораторией экспрессионных систем и модификации генома растений. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите, автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 31 марта 2020 года, и все необходимые документы в деле имеются.

Председатель: Вопросы, коррекции, замечания? Я не вижу. Посему даю слово диссертанту. Вадим Рафаилович, 20 минут для доклада.

Соискатель: *(излагает основные положения диссертационной работы)*

Председатель: Спасибо за доклад. Вопросы докладчику?

Деев Сергей Михайлович: Спасибо большое за очень интересную работу и очень интересный доклад. У меня скорее уже вопросы к докладчику и ученому секретарю. Дорогие коллеги, мне кажется, не очень здорово, когда в докладе последний слайд о выводах и выводы в автореферате диссертации отличаются. Чем это вызвано, редакционно?

Соискатель: Спасибо за вопрос. Просто я захотел выводы поместить на один слайд, а так они занимают чуть больший объём. На самом деле выводы по минимуму лишь переработал, то есть смысловая часть каждого вывода соответствует выводам, которые написаны в диссертации и автореферате, они лишь немного перефразированы, дабы сократить их объем. В дальнейшем постараюсь избегать таких ситуаций.

Председатель: Ситуация понятная. Прошу.

Ямпольский Илья Викторович: А скажите, пожалуйста, вот какие всё-таки фрагменты ДНК остаются в итоге, кроме промотора и целевого гена, вот Т-ДНК остается у вас в итоге вот в этих безмаркерных линиях?

Соискатель: Нет, Т-ДНК не остается. Как раз смысл в том, чтобы элиминировать область ДНК, которая фланкирована РС сайтами.

Ямпольский Илья Викторович: Понятно, спасибо. То есть и рекомбиназа и Т-ДНК, все удаляется?

Соискатель: Да, как раз задача их удалить.

Ямпольский Илья Викторович: Полностью, да? То есть, или какие-то фрагменты могут остаться?

Соискатель: Ну, чтобы это выяснить нужно секвенировать прилежащие области вокруг вставки. А так, доступными нам методами мы показываем: и ПЦР и Саузерном, что ничего там не остается.

Ямпольский Илья Викторович: Но секвенирование вы не делали?

Соискатель: Нет, мы не картировали вставки в безмаркерных сублиниях.

Ямпольский Илья Викторович: Ясно, спасибо.

Председатель: Еще вопросы имеются?

Ученый секретарь: А можно ещё вопрос. Ну, может что-то не так понял, но такое впечатление по вашим слайдам, что у вас этот тауматин, замечательный белок суперсладкий, он больше накапливается в листьях, чем в плодах, они, что, сладкие?

Соискатель: Нет, прошу прощения, как раз наоборот.

Председатель: Наоборот.

Соискатель: *(ищет нужный слайд)* Зеленые столбцы – это собственно накопление в листьях, а голубые столбцы – в плодах. Я еще расскажу, в частности, про промотор E8 в дальнейшем при ответе на вопрос...

Председатель: Вопросы иссякли?

Ямпольский Илья Викторович: Я прошу прощение за занудство, но флюороцитозин, как вы говорите, по-русски это фторцитозин, по-русски элемент этот называется не флюор, а фтор.

Соискатель: Спасибо, буду знать. Существует такая большая проблема, что часть терминов, которые мы привыкли видеть в англоязычной литературе, мы просто не встречаем в русской литературе. Буду знать, благодарю.

Председатель: Дальше слово имеет научный руководитель, если он хочет охарактеризовать диссертанта. Сергей Владимирович, прошу.

Долгов Сергей Владимирович (*научный руководитель зачитывает свой отзыв. Отзыв прилагается*).

Председатель: Владимир Александрович, давайте по отзывам. Отзыв организации, где была сделана работа, ведущей организации.

Ученый секретарь (*зачитывает заключение организации, где выполнялась диссертация, заключение прилагается, затем зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв прилагается*): Во-первых, заключение нашего института, поскольку работа была сделана в филиале Института биоорганической химии, и традиционно в заключении сначала описывается как, где и кем работал Тимербаев Вадим Рафаилович, что он окончил Саратовский государственный университет. В 2011 году тема диссертации была утверждена на заседании ученого совета нашего института. Сергей Владимирович Долгов, заведующий лабораторией экспрессионных систем и модификации генома растений, является научным руководителем этой работы. И конкретно по итогам обсуждения работы принято следующее заключение, что диссертационная работа Тимербаева выполнена на высоком теоретическом, методологическом и практическом уровнях. Целью работы является получение безмаркерных растений томата и яблони, экспрессирующих ген суперсладкого белка тауматина II... Диссертационная работа является результатом оригинальных исследований соискателя. При участии научного руководителя соискатель спланировал все представленные эксперименты, провел основную часть работы и написал настоящую диссертацию. Он лично сконструировал все бинарные векторы, использованные для трансформации растений, провел анализ последовательности промотора с применением баз данных и программ, доступных в сети интернет, осуществил агробактериальную трансформацию томата, ну и так далее. Объективный сравнительный анализ результатов диссертации с зарубежными научными работами, сопоставление, по-видимому, посвященными исследуемому предмету, а также использованные классические методы, применяемые в биотехнологии растений, свидетельствуют о достоверности результатов проведенных исследований. В диссертации присутствует научная новизна – впервые клонирован и охарактеризован промотор гена *ELIP* томата. Впервые промотор *ELIP* использован для целевой наработки белка в плодах томата. Впервые показано, что классический промотор томата E8 не обладает строгой плодовой специфичностью. Впервые получены безмаркерные растения томата и яблони, экспрессирующие ген суперсладкого белка тауматина под контролем преимущественно плодоспецифичных промоторов. Растения при этом не содержат генетических элементов нерастительного происхождения. Практическая значимость работы в том, что клонированный новый промотор может быть использован для обеспечения высокого

уровня экспрессии целевых генов в плодах различных видов растений, разработаны протоколы, которые позволяют получить безмаркерные растения томата и яблони. Материалы диссертации достаточно полно изложены в публикациях и диссертация «Создание безмаркерных растений томата и яблони с геном суперсладкого белка» Тимербаева Вадима Рафаиловича рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Голосование, открытое – единогласно, там 21 человек на семинаре присутствовал, зав отделом молекулярной биологии и биотехнологии растений подписал, член-корр. Российской академии наук Завриев. Ну и подписано замдиректора ИБХ РАН Ямпольским. Утверждено директором нашего института академиком Александром Габибовичем Габибовым. Это значит, что касается заключения организации. Теперь отзыв ведущей организации, ведущая организация у нас это Институт биологии развития имени Кольцова. Отзыв полностью положительный и актуальность темы выполненной работы опять же мы сегодня слышали очень подробно, что напряженность в связи с тем, что получение и коммерциализация трансгенных растений без чужеродного генетического материала, позволит снизить напряженность некую использования трансгенных каких-то организмов и тем самым сделать такие растения более привлекательными для потребителей. Научная новизна. Автором впервые клонирован и охарактеризован промотор гена раннего светоиндуцибельного белка томата. Результаты, изложенные в диссертации, пополняют знания о взаимосвязи между структурой и функцией промоторных регионов генов растений. Описанный новый промотор гена *ELIP* является перспективным инструментом для применения в биотехнологии растений. Впервые промотор *ELIP* использован для целевой наработки белка в плодах томата. Очень похоже на то, что было, то есть несколько раз «впервые показаны», «впервые получены»... Растения при этом не содержат генетических элементов нерастительного происхождения. Практическое значение. Новый промотор *ELIP* может быть использован для обеспечения высокого уровня экспрессии целевых генов в плодах томата и других видов плодовых культур, а также для производства различных белков и пищевых вакцин в растениях. Структура и содержание. Диссертация построена по классическому плану и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы. Список литературы 197 источников. Введение описывает тематику, актуальность, степень разработанности этой тематики, формулирует цели и задачи исследования. Обзор литературы – 3 раздела. Материал изложен лаконично, даёт представление о современных проблемах в заявленной тематике. В главе «Материалы и методы» достаточно подробно описаны использованные диссертантом методики, перечислены используемые приборы и

реактивы. Глава «Результаты» – последовательно представлены результаты. Отдельной главой идет обсуждение результатов, и достаточно подробное. Автореферат содержит всю необходимую информацию и полностью соответствует диссертации. Необходимо отметить аккуратное оформление работы. Текст диссертации написан грамотным научным языком. Высокий уровень работы подтверждают 4 статьи, опубликованных в иностранных научных журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus. Недостатки: в обзоре литературы хотелось бы видеть иллюстративный материал, способствующий лучшему восприятию изложенной информации, второе – на рисунке 1 не переведены на русский язык обозначения размера делеционных вариантов промотора bp на п.н., в работе имеется некоторое количество опечаток. Это все недостатки. Высказанные замечания не умаляют научной ценности представленной работы и имеют, в первую очередь, технический характер. Диссертационная работа Тимербаева выполнена в лаборатории, соответственно указана лаборатория, и тематика диссертации соответствует паспорту научной специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Заключение. Диссертационная работа Тимербаева Вадима Рафаиловича «Создание безмаркерных растений томата и яблони с геном суперсладкого белка», является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методологическом уровне с использованием современных методов исследования. Результаты, представляют высокую значимость для решения проблем получения генно-инженерных форм растений. По содержанию, актуальности, новизне, научному и методическому уровню, практической ценности полученных результатов диссертация полностью соответствует всем критериям положения о присуждении ученых степеней. Отзыв обсужден и утвержден на заседании объединенного семинара профильных лабораторий ИБР Российской академии наук. Подписано руководителем группы клеточных и генетических основ развития растений Института биологии развития профессором, доктором биологических наук, Гапоненко Александром Константинович и утвержден этот отзыв ведущей организации директором Института биологии развития имени Кольцова, доктором биологических наук, членом-корреспондентом РАН Васильевым Андреем Валентиновичем.

Председатель: Спасибо. Вадим Рафаилович, там была пара замечаний. Будем соглашаться или будем защищать?

Соискатель: Будем соглашаться.

Председатель: Согласны с замечаниями, принимаем к сведению. Есть ли отзывы на автореферат?

Ученый секретарь: Нет, не поступили.

Председатель: Ну, тогда мы переходим к официальным оппонентам. Ирина Васильевна Голденкова-Павлова, это ведущий научный сотрудник, институт физиологии растений имени Тимирязева.

Голденкова-Павлова Ирина Васильевна (*излагает свой положительный отзыв, отзыв прилагается*): Глубокоуважаемый председатель, глубокоуважаемые члены диссертационного совета и все присутствующие, позвольте мне не зачитывать отзыв полностью, эта фраза должна получить разрешение, да, так сказать, от председателя и всех, что бы мне его не зачитывать полностью. И рассказать лишь только по сути работы. В принципе основная задача, вернее две задачи у оппонента, это первая, сказать о том, соответствует ли диссертационная работа положению ВАК по актуальности, практической значимости, другим факторам и второй важный вопрос, это, заслуживает ли соискатель присуждения ему искомой степени. Что касается работы, она, в общем-то, написана по традиционному плану, что озвучено в отзыве ведущей организации, все ее пункты. Я хочу лишь только сказать о том, что читая работу, в принципе можно, с одной стороны, понять соответствует ли она положениям, а с другой стороны она характеризует и самого соискателя. Но прежде всего обзор литературы, который показывает насколько хорошо владеет Вадим Рафаилович теми современными знаниями, которые есть в области его научных интересов. Я почитала обзор литературы с большим удовольствием и скажу, что действительно, источники им очень квалифицированно обсуждаются, дискутируются, но маленькая такая, вот как бы ремарка, к обзору литературы, и об этом говорил оппонент в прошлой защите, что, хорошо бы, в конце обзора литературы иметь некое заключение, где было бы высказано, то что же осталось еще не сделано для того же, для объекта вашего исследования или для той цели, к которой вы хотите применять. Далее идет раздел материалы и методы, в котором, в общем-то, показан тот обширный арсенал не только экспериментальных методов, но и так же методов *in silico* анализов, биоинформатических методов, это возможности использования различных онлайн ресурсов для анализа биологических текстов, которыми в принципе автор, данной работы хорошо владеет. И следующий раздел – это раздел результаты, в котором последовательно изложено, в общем-то, мне кажется логично представленное исследование. Почему логично? Первое, что есть, мы хотим получить, создать трансгенные растения которые не содержат, с одной стороны чужеродного материала прокариотического происхождения, раз которые могут различные регуляторные последовательности селективные гены, без них, к сожалению, пока никуда. И второе, мы хотим обеспечить экспрессию, не просто во всем растении, а мы хотим направить нужный нам, экспрессию нашего гена, который кодирует вот этот вкусный, сладкий, полусладкий белок тауматин в плоды. Кажется, в принципе пишется о

промоторах и так далее, но на самом деле в арсенале экспериментаторов не так много этих промоторов, и то, что сделано, Вадимом Рафаиловичем, по клонированию и по анализу самого промотора, с использованием классической системы репортер – промотор или его делеционные варианты, мне кажется очень хорошо, по крайней мере понятно, что полноразмерный промотор, который был им клонирован, оказывает высокий уровень экспрессии, на уровне такого же вирусного известного и широко используемого, причем обеспечивает это больше специфичности именно в плодах, чем в листьях, это плюс. Второе – нужно в принципе его использовать, соответственно мы берем томаты и переносим ген тауматина уже под контролем двух промоторов. Почему двух? Потому что один известен E8, второй новый, да мы еще пока не знаем будет все ли хорошо проходить. Показали, что действительно, все происходит, при этом вот здесь, надо сказать, что, когда читаешь разные научные статьи, кажется, что так все хорошо, бело, гладко, быстренько получили, отобрали, убрали селективные гены, получили все растения. На самом деле, это большая работа и много еще не понятно как же работает рекомбиназная система в разных видах растений, не только в видах можно, может и сортоспецифичность такая быть и эта работа тем интересна, что не просто вот, мы получили, проанализировали и закрыли то, что было показано, что каждый из методов селекции, какая я уже сейчас не озвучу, да они имеют свои недостатки, ограничения и нужно решать эту проблему, то есть не только получены результаты, но и ставится, некая проблема, которая должна быть решена в будущем, то есть исследование выполнено, оно закончено, но при этом имеется еще, является фундаментом для дальнейшей работы. В принципе, следующий этап это уже не только томаты, а тут большой анализ надо сказать, не только анализ доказать, что интеграция произошла в геном, пожалуйста, вам есть Саузерн-блот гибридизация, которая хорошо доказывает, как интеграцию, так и элиминацию последующую ненужного материала из Т-ДНК области перенесенной. И второе, это то, что доказывается экспрессия гена не только на уровне транскрипции, которая может быть высокой, но и на уровне белкового продукта, который может в принципе варьировать, то есть уровень транскрипта будет много, а белочка будет мало, что в общем, надо сказать большая проблема при получении трансгенных растений. То, что мне понравилось, я это читала, хотела себе представить вкус, вернее сладкий вкус у томатов с послевкусием тауматина, я думаю, что Вадим Рафаилович принесёт сюда плоды как подтверждение практической значимости, и мы все ощутим послевкусие тауматина, попробовав томаты, надеюсь, в будущем мне удастся тоже это сделать. Но естественно следующий этап это растения древесные, которых получить не так просто и получить именно безмаркерные трансгенные растения древесных культур в частности – яблони. Конечно, это хорошая

перспектива и практическую значимость имеет. Но вот здесь опять же имеет, когда исследователь работал, он показал что тут в принципе можно получить, ему удалось эту линию получить, сублинии получить, но, однако у исследователя здесь тоже есть определенные подводные камни, которые следуют учитывать в своей работе и не просто отбрасывать ненужное, но и понимать, почему это происходит. Это большой плюс во всей работе. Но, естественно всегда ложку дегтя оппонент не может не сказать, в редких случаях наверное такое бывает. Могу сказать в целом, что конечно некоторые моменты диссертации остались без некоего такого более ясного прояснения. На часть вопросов, которые были заданы, я ответы получила, они были учтены при докладе, второе – они прозвучали в вопросах. Первый вопрос такой: в общем, так сказать, не совсем понятно, почему промотор, клонированный автором из томатов, не использован для получения трансгенных растений яблони. То есть он использован для томатов, но не использован для яблонь. Как-то вот подробного такого вот обоснования этого, я в диссертации, к сожалению не обнаружила. Второе – хотелось бы знать, есть ли корреляция между уровнем транскрипции, определенной по реал-тайм ПЦР, ОТ-ПЦР и уровнем образования белкового продукта, белка тауматина, в трансгенных растениях томата, то есть когда мы видим высокий уровень в плодах, коррелирует ли транскрипция с тем, что белка много образуется. Это, на самом деле, является важным. Почему? Потому что мы переносим гетерологичные гены, и не всегда частота использования кодонов соответствует тому, которое является в данном виде, и мы можем иметь проблемы: то есть транскрипция высокая, а белка у нас не так много. И, замечания некие редакционного характера, которые существуют: погрешности, неточности. Ну вот одно я все-таки обозначу, конечно простите, но – хочу. В самом начале во введении: «Создание трансгенных растений, которые не содержат чужеродного генетического материала, особенно бактериального и вирусного...», если это трансген, то он по природе не может не содержать чужеродного генетического материала. Я бы написала все-таки: «Создание трансгенных растений, которые не содержат чужеродного генетического материала прокариотического происхождения».

Из зала: Прокариотического?

Голденкова-Павлова Ирина Васильевна: Именно прокариотического. Поскольку мы растения получаем, то есть мы не хотим промоторы чтобы были, селективные гены прокариотического происхождения для трансгенов.

Председатель: Вадим Рафаилович, прошу ответить на замечания.

Соискатель: Спасибо, Ирина Васильевна, за то, что Вы прочитали, подробно вникли в диссертационную работу и за Ваши критические замечания. Первый вопрос был связан с

тем, почему не был использован промотор *ELIP* для трансформации растений яблони. Этого не было четко прописано в диссертации, поскольку объяснение прозаичное – когда начинали работы по созданию безмаркерных растений яблони, еще не было получено достаточного количества информации относительно функциональности этого промотора, поэтому было решено остановиться уже известном промоторе. Следующий вопрос это корреляция транскрипции с накоплением целевого белка. Дело в том, что, поскольку, в нашем арсенале методов присутствовал способ детекции уже самого белка методом и вестерн-блоттинга и методом иммуноферментного анализа, то для растений томата мы не проводили полуколичественный анализ транскрипта, в отличие от трансгенных растений яблони, поскольку там не было выбора – плодов еще нет. И благодаря тому, что выяснилось, что промотор *E8*, классический, плодоспецифичный, все-таки не обладает строгой плодовой специфичностью, он известен уже порядка 20 лет, даже больше, и вот впервые мы с удивлением обнаружили, что экспрессия транскрипта наблюдается еще и в листьях, мы впервые это показали, и вот за счет этого нам удалось провести хотя бы приблизительный количественный анализ на уровне транскрипции в листьях яблони. Поэтому мы надеемся, что плодах будет еще больше. И третий был вопрос относительно формулировки. Прошу прощения, но я позволю себе не согласиться, я считаю, что мое уточнение, относительно «...чужеродный генетический материал бактериального и вирусного происхождения» оно достаточно важное, поскольку если мы заменим, введем термин «прокариотический», то мы тем самым отсечем промоторы вирусного происхождения, а промотор вируса мозаики цветной капусты 35S, о котором я также рассказывал, он все-таки на данный момент самый широко применяемый в геномной инженерии растений. Спасибо.

Председатель: Спасибо. Ирина Васильевна, если Вы хотите дальше поспорить с диссертантом, у нас будет еще дискуссия и это можно будет сделать на этом этапе. А пока перейдем к следующему официальному оппоненту. Анастасия Михайловна Камионская. Это Федеральный центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Ученый секретарь: К сожалению, она не смогла приехать, т.к. есть ограничения, по крайней мере, в последнее время. У меня в руках отзыв официального оппонента, отзыв подписанный Анастасией Михайловной Камионской (*зачитывает отзыв, отзыв прилагается*). Отзыв полностью положительный, в каком-то смысле он дополняет то, что уже было сказано. В частности пишется, что актуальность исследования обусловлена двумя основными проблемами, стоящими перед современной биологией: во-первых это предвзятым отношении потребителей к генетически-модифицированным организмам, а

во-вторых, требуется поиск и исследование тканеспецифических промоторов, регулирующих экспрессию генов в конкретных тканях и/или на определенных стадиях онтогенеза. Это важнейшее фундаментальное направление современной биологической науки, которое позволяет постепенно, с большим трудом приоткрывать регуляторные генетические механизмы. Это обоснование актуальности. Именно эти направления исследования Тимербаева и определяют актуальность его диссертационной работы, полученные результаты имеют несомненную научную и практическую ценность. Автором были сформулированы 10 задач, которые охватывают весь комплекс работ, необходимых для достижения поставленной цели. Ну, дальше задачи включают то-то, то-то. Диссертация Тимербаева состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, условных обозначений и списка литературы, литературы 197 источников, тоже это прозвучало сегодня. Во введении автор описывает актуальность, современное состояние научной проблемы, формулирует цели и задачи исследования. Обзор литературы – 3 основные части, описывается, что в какой части. В главе «Материалы и методы» описаны объекты и методы исследований, которые были использованы в работе, описанные в этой главе методы соответствуют поставленным задачам, включают классические и современные биоинформатические способы обработки данных биотехнологии и генетической инженерии, молекулярной биологии. Глава 3 посвящена результатам исследования, разделена на 3 части. Полученные экспериментальные результаты обсуждаются в главе 4. Выводы диссертационной работы следуют из проведенных исследований, четко сформулированы и согласуются с целями и задачами работы, полученным экспериментальным данным, изложенным в предыдущих работах. В ходе работы над диссертацией автором выполнен значительный объем работы, получены экспериментальные данные, которые были систематизированы и изложены в доступной форме научным языком. Внутренняя логика исследования прослеживается на протяжении всей диссертационной работы, все ее части согласованы друг с другом и расположены согласно логике исследования. Научная новизна заключается в получении новых данных о механизмах регуляции экспрессии генов. Работа имеет большую практическую значимость, поскольку использование плодоспецифичных промоторов позволяет получать улучшенные сельскохозяйственно-важные растения. И вот, наконец, добрались до недостатков. Диссертационная работа не содержит серьезных изъянов, однако в ней имеются незначительные опечатки, неудачные формулировки или обороты, так фраза в обзоре литературы «недостатком промотора гена *LeACO1* является минорная активность в стареющих листьях, цветках и в местах поранений, ссылка», фраза несколько

неоднозначна, так как может говорить и о том, что промотор не тканеспецифичен, а с другой стороны, что он обладает слишком низкой эффективностью. Также в абзаце 1 на странице 38 дважды повторяется одно и то же утверждение. Еще одно замечание касается экстраполяции экспериментальных данных о вероятном высоком уровне целевого белка в плодах яблони на основании экспрессии гена тауматина в листьях безмаркерных линий, что кажется несколько преждевременным. Тем не менее, приведенные мелкие замечания не снижают общей ценности проделанной работы, несколько не умаляют и так далее. Таким образом, диссертация Тимербаева Вадима Рафаиловича является законченной научно-квалификационной работой, соответствует все критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней. Подписано Камионской Анастасией Михайловной, ведущим научным сотрудником, кандидатом биологических наук, руководителем группы биоинженерии растений Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»» Российской академии наук.

Председатель: Спасибо. На замечания можно ответить.

Соискатель: Первое замечание у нас касалось неоднозначности фразы про промотор. В литературном обзоре приводятся примеры известных уже плодоспецифичных промоторов, поэтому вот эта фраза, которая уважаемому оппоненту показалась неоднозначной, она именно низкой тканевой специфичности приводится. Дальше... подскажите, пожалуйста.

Ученый секретарь: Дальше в абзаце 1 на странице 38 дважды повторяется одно и то же утверждение.

Соискатель: К сожалению, да, это я упустил, с этим соглашаюсь. Что касается экстраполяции, я уже частично рассказывал про промотор E8, который, к нашему удивлению способен обеспечивать экспрессию в листьях, но до этого никогда этого не было показано, поэтому все-таки предполагаем, что будет высокая экспрессия в плодах, значительно более высокая, чем в листьях. Поэтому это вопрос времени, эксперимент заложен, уже скоро будут плоды, через год-два и собственно мы сможем подтвердить наше предположение, и узнаем, кто был прав. Тем не менее, без этого была бы работа и статья соответственно была бы какая-то незавершенная, есть перенесенный ген, есть показанная «безмаркерность» у растений и хотелось бы показать, что ген работает и без этого эксперимента пришлось бы ждать действительно плодов, а тут мы все-таки показали промежуточный результат, хотя бы на уровне транскрипта. Все, спасибо.

Председатель: Все? Спасибо. Мы сделали все необходимое, предшествующее общей дискуссии. Кто хотел бы высказаться по поводу голосования, по поводу работы. Впечатления: положительные, отрицательные. Александр Габирович, прошу.

Габиров Александр Габирович: Я никогда растениями не занимался, но эукариотами занимался. Я здесь выступлю как ученый директор. Вот мне очень приятно, что у нас растительная часть хорошо представлена в нашем институте. Это во много благодаря Сергею Кириаковичу Завриеву, заведомо и конечно, наш уважаемый профессор Долгов, есть и другие подразделения. Вот очень приятно, что мы держим здесь очень хорошую марку, работаем в сложных политических условиях, потому что, генно-модифицированные растения не могут в нашей стране рассеяться и так далее. Поэтому здесь нужно, знаете, как в период генетики, лысенковский период, нужно быть очень осторожным в выражениях, слава богу, что не будет репрессивных мер. Ну, я думаю, что всякие инициативы европейского союза будут в какой-то степени, потом модифицированы и, может быть, мы будем, как в США все-таки иметь возможность работать более открыто с генно-модифицированными производными растительной клетки. Очень приятно, что диссертация выполнена на хорошем уровне с точки зрения генетической инженерии и анализа иммуноферментного. Получены объективные результаты, и может быть неплохо даже иметь такой взгляд со стороны человека, занимавшегося эукариотической клеткой, но не растительной, поэтому я всецело выражаю удовлетворение полное этой работой и призываю членов диссертационного совета проявить положительно отношение и высказать его голосованием. Спасибо.

Председатель: Мнение понятно. Сергей Кириакович, прошу.

Завриев Сергей Кириакович: Уважаемые коллеги, я считаю, что работа, которая была доложена, она действительно хорошая. То, что касается проблем, которые связаны с чисто юридической стороной: можно – нельзя, работать с трансгенными растениями, получать можно, исследовать можно, получать так сказать хорошие результаты никто не запрещал, а то что, так сказать, они будут применены в практике или внедрены в сельскохозяйственное производство, я думаю это просто вопрос времени, тем более, что если здесь нет маркерных каких-то генов устойчивости к антибиотикам и так далее как это раньше было. Я думаю, эти вопросы будут решаться, не целым, что нельзя вообще генно-инженерные растения использовать в практике, а конкретные можно будет. Наверное, будет такой регламент, такое законодательство, оно, наверное, не за горами, тем более меня в эту проблему уже в каком-то смысле начинают привлекать. Поэтому я думаю, что эта работа действительно хорошая. Я думаю, что, где-то через два года, можно будет попросить автора принести томаты и яблоки, мы их попробуем на вкус, если это

будет все так, мы убедимся, что в том, что мы не напрасно голосовали сегодня «за». Так что я рекомендую всем членам ученого совета поддержать эту диссертацию. Спасибо.

Председатель: Хорошо, постараемся через два года вспомнить

Завриев Сергей Кириакович: Вообще долг диссертанта и его руководителя

Председатель: ...проверить ваши предсказания. Кто еще хотел бы выступить по дискуссии? Мне кажется ситуация достаточно ясная. Больше нет желающих да. Тогда Вадим Рафаилович, заключительное слово, завершаем.

Соискатель: Спасибо. В своем заключительном слове я хотел поблагодарить Долгова Сергея Владимировича, под чьим руководством собственно и состоялась эта работа и она также верил и заставлял меня защититься. Это ни в коем случае не его вина, что я так поздно защищаюсь, в общем, я его благодарю. Благодарю также своих оппонентов, Голденкову-Павлову Ирину Васильевну, Камионскую Анастасию Михайловну, представителя ведущей организации Гапоненко Александра Константиновича, за то, что они довольно подробно прочитали работу, не отнеслись к этим обязанностям формально, и изложили свои замечания и предложения. Также благодарю своих соавторов по публикациям, они тоже внесли весомый вклад в эту работу. Ну и благодарю свою семью, свою маму, которая верила в меня несмотря ни на что. Также благодарю председателя диссертационного совета, уважаемых членов и присутствующих за уделенное внимание. Спасибо.

Председатель: Ну что ж, счетная комиссия избрана. Уже есть какие-то предварительные замечания по поводу проекта заключения, может быть? Николай Владимирович кивает головой, по-видимому, есть.

Бовин Николай Владимирович: Уже традиционно, некоторая сумятица в разделе теоретическая и практическая часть, то есть в теоретической части есть элементы, которые касаются практического применения и наоборот. Я сейчас не буду вдаваться в подробности. Мне хотелось бы, чтобы эти части были более структурированы, именно чтобы в теоретической части писали только про теоретическое и наоборот. Я традиционно помогу.

Председатель: Согласны ли авторы совместно с Николаем Владимировичем доработать чисто редакционно предлагаемые замечания. Согласны?

Соискатель: Безусловно.

Председатель: Все согласны. Тогда мы готовы голосовать по этому поводу тоже. Ну что ж, тогда объявляем перерыв на голосование.

(Идет тайное голосование)

