ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Камышинского Романа Андреевича

«Структура биокристаллов Dps-ДНК по данным криоэлектронной томографии»,

представленную на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук по специальности

01.04.18 - Кристаллография, физика кристаллов

Диссертационная работа Р.А. Камышинского посвящена исследованию структурных особенностей биокристаллов комплекса Dps-ДНК современными методами криогенной просвечивающей электронной микроскопии (крио-ПЭМ), включая криоэлектронную томографию, которые стремительно развиваются в последнее десятилетие. Она состоит из введения, четырех глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, словаря терминов, списка публикаций автора по теме диссертации из 16 наименований, списка литературы из 178 наименований. Ее содержание изложено на 136 страницах, она включает 57 рисунков и 2 таблицы.

Во введении диссертации обоснована актуальность выполненного исследования, направленного на определение структуры биокристаллов комплекса Dps-ДНК методами крио-ПЭМ, включая получение трехмерных структур исследуемых кристаллов с помощью криоэлектронной томографии и анализ влияния концентрации и состава буфера образцов Dps и ДНК на структуру формирующихся в нем кристаллов. Во введении приведены цели и задачи, сформулированы научная новизна и основные положения, выносимые на защиту,

описана практическая значимость работы и ее достоверность, охарактеризован личный вклад автора, представлены сведения об апробации работы и основных публикациях.

Тема диссертационной работы Р.А. Камышинского является актуальной, поскольку в ней исследуется образование кристаллов комплекса Dps-ДНК, которое происходит в бактериальных клетках *E.coli* в качестве защитной реакции на неблагоприятные воздействия внешней среды. Такой механизм обеспечивает сохранность бактериального генома при экстремальных температурах, голодании, воздействии радиации и антибиотиков. Помимо фундаментального научного интереса исследования структуры биокристаллов имеют практическую значимость, поскольку они способствует разработке новых методов борьбы с бактериальной резистентностью к лекарствам. Безусловно важным также является развитие методов современной крио-ПЭМ, которые играют все более важную роль в исследовании структуры биологических объектов.

Первая глава представляет собой обзор литературных данных по тематике диссертации. В ней приведены сведения о внутриклеточной кристаллизации и формировании биокристаллов комплекса Dps-ДНК, а также о существующих моделях комплекса. В главе рассматриваются основные методы современной крио-ПЭМ, их возможности и ограничения в исследованиях биологических объектов, описываются методы приготовления образцов для таких исследований.

Вторая глава посвящена описанию изученных в диссертации материалов образцов DPS, ДНК и клеток *E.coli.* В ней подробно рассмотрены методы получения и подготовки образцов для последующих исследований, в том числе процедуры витрификации и приготовления тонких клеточных срезов с помощью системы с фокусированным ионным пучком, работающей в криогенном режиме. В главе также представлены этапы обработки экспериментальных данных, полученными методами криоэлектронной томографии и анализа проекций одиночных частиц.

В третьей главе приведено описание отработки методов приготовления и исследования образцов. В ней представлены полученные при выполнении диссертационной работы результаты отработки и оптимизации процедур витрификации, применения растровой электронной микроскопии и фокусированного ионного пучка в криогенном режиме, а также обработки экспериментальных данных криоэлектронной томографии.

В четвертой главе представлены основные результаты диссертационной работы, ряд которых обладает существенной научной новизной. В ней продемонстрировано влияние стрессового воздействия на формирование кристаллов комплекса в клетках *E.coli* и получена трехмерная реконструкция клеток с кристаллами. Представленные результаты исследования методом криоэлектронной томографии комплекса Dps-ДНК, полученного *in vitro*,

показавают, что в растворе буфера 20 мМ Tris-HCl, 20 мМ NaCl, pH 7.5 образуется 2 типа кристаллов с центрально симметричной триклинной и кубической элементарными ячейками. Методом субтомографического усреднения получены трехмерные реконструкции кристаллов, определены параметры элементарных ячеек. На основе анализа проекций одиночных частиц получена трехмерная структура высокого разрешения для частиц Dps и структура низкого разрешения для комплекса Dps-ДНК, продемонстрировано взаимодействие между частицами Dps.

Характеризуя диссертационную работу в целом, следует отметить, что она представляет собой законченное исследование, выполненное с использованием оборудования последнего поколения, современных методов получения и обработки экспериментальных данных. С применением криогенной просвечивающей электронной микроскопии в ней получены новые результаты о строении биокристаллов. Отметим наиболее важные из них.

1. Получены новые данные о структурных особенностях комплекса ДНК-связывающего белка Dps и молекул ДНК в зависимости от условий биокристаллизации в буферном растворе *in vitro*.

2. Продемонстрировано формирование кристаллов с центрально симметричной триклинной и кубической элементарными ячейками, определены параметры элементарных ячеек: $a \approx b = 9.3 \pm 0.4$ нм, $c = 10.3 \pm 0.4$ нм, $\alpha = 73^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 60^\circ$ и $a = b = c = 13 \pm 1$ нм, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, соответственно.

3. Осуществлена прямая визуализация молекул ДНК в структуре биокристаллов и показано, что в кристаллах с триклинной элементарной ячейкой молекулы ДНК упакованы параллельно друг другу, образуя слои, чередующиеся со слоями додекамеров Dps, а в кристаллах с кубической элементарной ячейкой молекулы ДНК упакованы перпендикулярно друг другу, перемежаясь с частицами белка.

Результаты диссертационной работы получены при непосредственном участии ее автора, который владеет навыками проведения экспериментально сложных электронно-микроскопических исследований при криогенных температурах. Им отработаны процедуры пробоподготовки и выполнена оптимизация получения экспериментальных данных методом крио-ПЭМ различных объектов. Обработка данных электронной томографии осуществлялась с использованием хорошо апробированных методов одновременной итерационной реконструкции и обратно взвешенных проекций, а также с применением субтомографического усреднения. Полученные на основе выполненных исследований карты плотности рассеивающего потенциала с разрешением 1,35 нм кристаллов комплекса Dps-ДНК с центрально симметричной триклинной элементарной ячейкой и кубической ячейкой

размещены в базе данных электронной микроскопии под номерами EMD-4615 и EMD-10286, соответственно.

Основные научные положения и результаты диссертации опубликованы в 16 работах, включая 9 тезисов докладов на различных конференциях и симпозиумах и 7 статьях в рецензируемых зарубежных журналах, все из которых входят в Перечень изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки России и реферируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

В диссертационной работе имеется ряд недочетов, перечисленных ниже.

1. Полученные в работе данные о кристаллическом строении комплекса Dps-ДНК, относятся к биокристаллам, полученным путем смешения додекамеров Dps и молекул ДНК в буферах различного состава (*in vitro*). Несмотря на то что в диссертации представлены результаты исследований *E.coli*, подвергнутых стрессовому воздействию, из ее текста остаются не ясным, насколько реалистичным является возникновение изученных биокристаллов в этих бактериальных клетках.

2. Хотя параметры элементарных ячеек изученных автором кристаллов комплекса Dps-ДНК приведены с погрешностями, в диссертационной работе не описано, каким образом указанные погрешности оценивались.

3. Приведенные в автореферате в списке публикаций по теме диссертации работы 4 – 7 безусловно характеризуют высокую квалификацию диссертанта в области крио-ПЭМ и полученные в них результаты способствовали оптимизации методов приготовления исследованных в диссертационной работе образцов, методик получения и обработки экспериментальных данных, однако автору следовало бы более детально представить эти результаты в тексте диссертации.

4. Хотя в целом диссертация неплохо оформлена и достаточно ясно изложена, в ней встречаются погрешности. Например, рис. 5 расположен на одной странице (стр. 24), а подпись к нему на другой (стр. 25), такое замечание справедливо и для рис. 18, 25 и др., таблицы 2, стр. 61, 62. В тексте диссертации встречаются опечатки, в частности, на стр.88, стилистически неудачно построенные предложения и жаргонизмы, например на стр. 26, на некоторых графиках подписи осей сделаны на английском языке (рис. 38, 39 и др.). Следует также отметить излишнее структурирование в изложении материала, которое привело к тому, что, например, на стр. 51, 52, 54 представлено 3-4 названия подразделов и только 10-15 строк текста.

Отмеченные недостатки не влияют на значимость полученных в диссертационной работе результатов и ее общую положительную оценку.

Текст автореферата в полной мере отражает содержание диссертации.

Диссертационная работа Камышинского Р. А. полностью удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.18 - Кристаллография, физика кристаллов, и ее автор заслуживает присуждения ему искомой степени.

Официальный оппонент, Н.И. Боргардт
доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий кафедрой общей физики
Национального исследовательского университета «МИЭТ»

22.01.21

Подпись Николая Ивановича Боргардта заверяю,
ученый секретарь МИЭТ, Н.М. Ларионов
кандидат технических наук, профессор

Сведения о месте работы оппонента:
124498, г. Москва, г. Зеленоград, площадь Шокина, дом 1.
Национальный исследовательский университет «МИЭТ»
Заведующий кафедрой общей физики
Начальник научно-исследовательской лаборатории электронной микроскопии
Телефон: (499) 720-85-58
Электронная почта: borgardt@miee.ru