УТВЕРЖДАЮ
Директор федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской
академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)
д.б.н. Федоров Алексей Николаевич

_____
«17» декабря 2020 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ
на диссертационную работу
Камышинского Романа Андреевича
«Структура биокристаллов Dps-ДНК по данным криоэлектронной томографии»,
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности
01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов»

Актуальность избранной темы.

Диссертация Р.А. Камышинского посвящена исследованию структуры биокристаллов комплекса Dps-ДНК, образуемых в бактериальных клетках *Escherichia coli* при переходе стационарную фазу в процессе защитной реакции на неблагоприятные условия окружающей среды. В работе подробно рассматриваются структурные особенности биокристаллов Dps-ДНК в зависимости от условий их формирования.

Актуальность темы исследования определяется необходимостью получения новых данных о структуре биокристаллов для более глубокого понимания механизмов резистентности патогенных организмов к экстремальным внешним воздействиям – голоданию, обезвоживанию, воздействию радиации, антибиотиков и др. В частности, до настоящего момента была неизвестна структура биокристаллов комплекса Dps-ДНК, обеспечивающих эффективную защиту бактериального генома, а все существующие модели комплекса носили предположительный характер. Представленная к защите работа в значительной

степени восполняет этот пробел, предоставляя детальные результаты изучения структуры биокристаллов Dps-ДНК современными методами криогенной просвечивающей электронной микроскопии (крио-ЭМ).

Целью диссертации Р.А. Камышинского является определение структуры биокристаллов комплекса Dps-ДНК, полученных *in vitro* и *in cellulo*, методами крио-ЭМ, в том числе восстановление трехмерных структур исследуемых кристаллов с помощью криоэлектронной томографии, а также анализ влияния концентрации и состава буфера образцов Dps и ДНК на структуру кристаллов *in vitro*.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые методом криоэлектронной томографии выполнена трехмерная реконструкция и определена структура биокристаллов комплекса Dps-ДНК *in vitro,* продемонстрировано существование полиморфизма биокристаллов и обнаружена зависимость структуры комплекса от условий его формирования. Впервые продемонстрировано формирование биокристаллов комплекса Dps-ДНК с триклинной и кубической элементарными ячейками, определены параметры элементарных ячеек, а также определено положение молекул ДНК в структуре биокристаллов. Впервые визуализировано пространственное положение биокристаллов в клетках *Escherichia coli*. Впервые методом анализа проекций одиночных частиц визуализировано взаимодействие Dps-ДНК, а также N-концевые фрагменты додекамеров Dps на двумерных классах изображений.

Оценка содержания выполненной работы в соответствии с требованиями ВАК.

Диссертационная работа Камышинского Р. А. имеет структуру, соответствующую установленным правилам ВАК, и состоит из введения, четырех глав и заключения, списка публикаций по теме диссертации и списка цитируемой литературы (178 наименований). Общий объем диссертации составляет 136 страниц, включая 57 рисунков и 2 таблицы.

Во **введении** диссертации приводится обоснование актуальности темы исследования, сформулированы поставленные цели работы и задачи, указаны научная новизна и практическая значимость, а также изложены основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена обзору литературы по теме диссертации. Приводится обзор публикаций по явлению внутриклеточной кристаллизации, рассматриваются существующие модели комплекса Dps-ДНК. Обсуждаются возможности и ограничения методов крио-ЭМ и их роль в структурной биологии. Представлен обзор методов пробоподготовки биологических образцов, подробно освещены основные подходы современной крио-ЭМ, получившие широкое признание в последние годы – метод анализа проекций одиночных частиц и криоэлектронная томография. В целом, обзор достаточно полно отражает состояние проблем, решаемых в данной диссертации.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. Приводится описание изученных материалов - образцов Dps и ДНК, клеток *E.coli*, подробно описаны методы получения и подготовки образцов для крио-ЭМ исследований. Детально освещены основные этапы получения и обработки экспериментальных данных.

В **третьей главе** приводится описание отработки методов крио-ЭМ на различных образцах. Представлены описание и результаты отработки процедур витрификации, применения крио-ЭМ, криогенной растровой электронно-ионной микроскопии, фокусированного ионного пучка в криогенном режиме, электронной и криоэлектронной томографии.

В **четвертой главе** отражены основные результаты диссертационной работы. Продемонстрировано влияние стрессового воздействия на формирование внутриклеточных кристаллов комплекса в *E.coli*, впервые получена трехмерная реконструкция клеток с кристаллами. Представлены результаты исследования, полученные *in vitro* методом криоэлектронной томографии кристаллов Dps-ДНК. По данным субтомографического усреднения показана зависимость структуры комплекса Dps-ДНК от состава и параметров буфера. Впервые

продемонстрировано формирование кристаллов комплекса Dps-ДНК с центрально симметричной триклинной элементарной ячейкой и кубической элементарной ячейкой, определены параметры элементарных ячеек, а также установлено существование полиморфизма кристаллов комплекса. Помимо этого, представлены результаты исследования образования одиночных комплексов Dps-ДНК. С помощью метода анализа проекций одиночных частиц получена трехмерная структура высокого разрешения свободных частиц Dps, трехмерная структура низкого разрешения для комплекса Dps-ДНК, а также впервые визуализировано взаимодействие между частицами Dps в псевдогексагональной упаковке.

В **заключении** диссертации изложено обобщение проведенных исследований и приведены основные результаты работы.

Автореферат диссертации и опубликованные статьи в полной мере отражают содержание работы. Полученные результаты отличаются научной новизной и практической значимостью, достоверностью, и обоснованностью.

Замечания:

Диссертация написана хорошим научным языком, однако в тексте встречаются отдельные терминологические неточности, усложняющие процесс восприятия.

Указанные недостатки не снижают высокой научной ценности работы и не влияют на общую положительную оценку диссертации Р. А. Камышинского.

Результаты, представленные в диссертации, получены лично автором или при его непосредственном участии. Р.А. Камышинский принимал активное участие в планировании и проведении экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, подготовке публикаций в рецензируемых научных изданиях, а также лично представлял результаты работы в виде устных и стендовых докладов на ведущих международных и российских конференциях, школах и семинарах.

Материал диссертации изложен четко и последовательно. Диссертационная работа содержит обширный набор ссылок на различные литературные источники, имеющие прямое отношение к теме диссертации, она хорошо оформлена. Наглядные рисунки, схемы и таблицы прекрасно иллюстрируют полученные автором результаты. Диссертация представляет собой цельную, завершенную научно-исследовательскую работу по актуальной тематике и обладает существенной практической значимостью. Достоверность полученных результатов подтверждена комплементарными исследованиями, выполненными соавторами публикаций соискателя методом малоуглового рентгеновского рассеяния, воспроизводимостью и согласованностью экспериментальных и расчетных данных, использованием высокоточной современной экспериментальной базы и передовых методов обработки данных, а также многократной апробацией работы в рецензируемых научных изданиях и докладами на национальных и международных конференциях.

Основное содержание диссертации отражено в 16 печатных работах, в том числе 7 статьях в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК.

Заключение.

Диссертация Камышинского Романа Андреевича «Структура биокристаллов Dps-ДНК по данным криоэлектронной томографии» представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, по своей актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне и научно-практической значимости несомненно удовлетворяет требованиям раздела II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, а ее автор – Камышинский Роман Андреевич – заслуживает присвоения ему учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов».

Диссертационная работа Камышинского Романа Андреевича «Структура

биокристаллов Dps-ДНК по данным криоэлектронной томографии» и отзыв обсуждены и утверждены на межлабораторном семинаре отдела метаболической инженерии федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН) 17 декабря 2020 г. (протокол №4).

Отзыв составил:
Старший научный сотрудник
Лаборатории молекулярной биотехнологии
ФИЦ Биотехнологии РАН
к.х.н.

А. В. Липкин

«17» декабря 2020 г.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
Почтовый адрес: 119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2.
Телефон: +7 (495) 954-52-83
E-mail: info@fbras.ru
Официальный сайт: http://fbras.ru