ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.114.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРИСТАЛЛОГРАФИЯ И ФОТОНИКА» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ КАМЫШИНСКОГО РОМАНА АНДРЕЕВИЧА НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 25 февраля 2021 г., протокол № 1

О присуждении **Камышинскому Роману Андреевичу,** гражданину Российской Федерации, учёной степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация «Структура биокристаллов Dps-ДНК по данным криоэлектронной томографии» по специальности 01.04.18 – «кристаллография, физика кристаллов» принята к защите 24.11.2020 г., протокол № 19, диссертационным советом Д 002.114.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук» (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН), Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России), 119333, г. Москва, Ленинский проспект, дом 59. Диссертационный совет Д 002.114.01 создан приказом Федеральной службы по надзору в сфере образования и науки № 105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель Камышинский Роман Андреевич, 1994 г.р., в 2018 г. окончил кафедру нано, био, информационных и когнитивных технологий Института нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных наук и технологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» по направлению подготовки 03.04.01 – прикладная математика и физика. В настоящее время Камышинский Р.А. работает в ресурсном центре зондовой и электронной микроскопии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Правительства Российской Федерации, в должности инженера-исследователя и в лаборатории электронной микроскопии структурного подразделения ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН – «Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН» (ИК РАН), Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в должности младшего научного сотрудника по совместительству.

Диссертационная работа выполнена в лаборатории электронной микроскопии структурного подразделения ФНИЦ «Кристаллография и фотоника»

РАН – ИК РАН, Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель – **Васильев Александр Леонидович**, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии НИЦ «Курчатовский институт», заведующий лабораторией электронной микроскопии Института кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН по совместительству.

Официальные оппоненты:

Боргардт Николай Иванович, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой общей физики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники».

Киреев Игорь Игоревич, доктор биологических наук, заведующий отделом электронной микроскопии Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

— дали **положительные отзывы** на диссертацию.

Ведущая организация **Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (г. Москва)** в своём **положительном отзыве**, подписанном кандидатом химических наук, старшим научным сотрудником лаборатории молекулярной биотехнологии А.В. Липкиным и утвержденном доктором биологических наук, директором ФИЦ Биотехнологии РАН А.Н. Федоровым, указала, что диссертационная работа Камышинского Романа Андреевича «Структура биокристаллов Dps-ДНК по данным криоэлектронной томографии» посвящена исследованию структуры биокристаллов комплекса Dps-ДНК, образуемых в бактериальных клетках *Escherichia coli* при переходе в стационарную фазу в процессе защитной реакции на неблагоприятные условия окружающей среды. 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.

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.

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.

Таким образом, можно заключить, что диссертация Камышинского Романа Андреевича представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, соответствующую всем критериям и требованиям раздела II Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, Камышинский Роман Андреевич, заслуживает присуждения ему учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов».

По теме диссертационной работы опубликовано 7 статей в рецензируемых научных журналах. Результаты представлены на 9 национальных и международных научных конференциях. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **R. Kamyshinsky**, Y. Chesnokov, L. Dadinova, A. Mozhaev, I. Orlov, M. Petoukhov, A. Orekhov, E. Shtykova, A. Vasiliev. Polymorphic Protective Dps–DNA Co-Crystals by Cryo Electron Tomography and Small Angle X-Ray Scattering // Biomolecules – 2020. – V.10 – №1 – 39.

2. L.A. Dadinova, Y.M. Chesnokov, **R.A. Kamyshinsky**, I.A. Orlov, M.V. Petoukhov, A.A. Mozhaev, E.Yu. Soshinskaya, V.N. Lazarev, V.A. Manuvera, A.S. Orekhov, A.L. Vasiliev, E.V. Shtykova. Protective Dps–DNA co-crystallization in stressed cells: an in vitro structural study by small-angle X-ray scattering and cryo-electron tomography // FEBS Letters – 2019. – V.593 – №12 – P.1360-1371.
3. **Р.А. Камышинский**, Ю.М. Чесноков, А.С. Орехов. Криогенная электронная томография в исследованиях клеточных систем // Кристаллография – 2020. – Т.65 –№5 – С.774-779.
4. A. Emelyanov, T. Shtam, **R. Kamyshinsky**, L. Garaeva, N. Verlov, I. Miliukhina, A. Kudrevatykh, G. Gavrilov, Y. Zabrodskaya, S. Pchelina, A. Konevega. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid // Plos one – 2020. – V.15 – №1 – e0227949.

На диссертацию и автореферат поступило 8 **положительных отзывов**.

Федорова Елена Эриковна – к.б.н., ведущий научный сотрудник, заведующий группой растительно-микробных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, прислала отзыв **без замечаний.**

Василов Раиф Гаянович – д.б.н., профессор, заместитель руководителя Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», прислал отзыв **без замечаний.**

Якимов Евгений Борисович – д.ф.-м.н., профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем технологии микроэлектроники и особочистых материалов Российской академии наук, прислал отзыв **без замечаний.**

Анохин Александр Сергеевич – к.т.н., заместитель директора по научной работе, заведующий лаборатории физико-химических основ металлургии цветных и редких металлов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук отметил в качестве замечаний следующее:

1. Трудно воспринимаемый рисунок № 2, страница 11 автореферата.
2. На странице 4 автор указывает, что задачей данной работы было «…определить оптимальные условия для проведения процедуры витрификации исследуемых образцов» и «подобрать соотношения и

составы буферов образцов Dps и ДНК, при которых наблюдается формирование биокристаллов комплекса», однако в дальнейшем тексте автореферата полученные результаты по этим целям раскрыты не в полном объеме.

Рогожкин Сергей Васильевич – д.ф.-м.н. начальник отдела атомно-масштабных и ядерно-физических методов исследования материалов ядерной техники Института теоретической и экспериментальной физики имени А.И. Алиханова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», прислал отзыв **без замечаний.**

Елисеев Андрей Анатольевич – к.х.н., доцент факультета наук о материалах Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», указал, что в автореферате, в положениях и выводах не указана точность определения углов в триклинной ячейке биокристаллов комплекса Dps-ДНК, а также не указаны способы пробоподготовки биологических образцов для криоэлектронной микроскопии (в особенности клеточных образцов). Не приведены данные энергодисперсионной спектроскопии/спектроскопии энергетических потерь электронов, позволяющих установить химический состав кристаллов, при этом при построении моделей структур не рассматривается возможность захвата в структуру ионов, а наличие «мостиков» между макромолекулами приписывается к N-концевым фрагментам Dps. В целом в автореферате не рассматривается возможный захват ионов буферных растворов и их роль при формировании биокристаллов. Также, для наблюдавшихся ранее (рис. 5 автореферата) и предлагаемых структур (рис. 7 автореферата) не приведены результаты моделирования картин просвечивающей электронной микроскопии и их сравнения с полученными изображениями. В тоже время сопоставление экспериментальных и расчетных картин кристаллов позволило бы оценить точность предлагаемых моделей.

Шабалин Константин Александрович – к.ф.-м.н., ученый секретарь отдела молекулярной и радиационной биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», прислал отзыв **без замечаний.**

Зезин Алексей Александрович – д.х.н., главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института Синтетических Полимерных Материалов им. Н.С. Ениколопова Российской

академии наук, отметил, что в автореферате описанию полученных результатов уделяется значительно большее внимание, чем их интерпретации и обсуждению, а также обратил внимание на некоторые редакционные недочеты.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оппоненты являются ведущими специалистами в области электронной микроскопии, а в ведущей организации активно проводятся фундаментальные и прикладные исследования в области структурной и клеточной биологии, в том числе работы по изучению белковых комплексов различными экспериментальными методами.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований реализован набор аналитических методов криогенной электронной микроскопии и успешно **применён** ряд современных численных методов обработки изображений, что позволило определить структуры биокристаллов комплекса Dps-ДНК. Соискателем **проведён** анализ результатов опубликованных работ по описанию структуры комплекса Dps-ДНК и **предложен** новый подход к определению трехмерной структуры комплекса. Использование методов фокусированного ионного пучка в криогенных условиях и криоэлектронной микроскопии подтвердило формирование биокристаллов**, в результате** стрессового воздействия на клетки *Escherichia coli* и дало возможность о**пределить** пространственное положение биокристаллов в клетках. **Получены новые** экспериментальные данные **о** полиморфизме биокристаллов комплекса Dps-ДНК: **в зависимости** от условий формирования, образуются биокристаллы комплекса Dps-ДНК с центрально симметричной триклинной и кубической элементарными ячейками, с параметрами $a \approx b = 9.3 \pm 0.4$ 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, $\alpha = \beta = \gamma = 90$, соответственно. В результате комплексного **использования** методов криоэлектронной томографии и субтомографического усреднения структура биокристаллов была впервые определена с пространственным разрешением 13.5 Å. Также **впервые выявлено** положение молекул ДНК в структуре биокристаллов. **Визуализированы** N-концевые фрагменты частиц Dps, **получена** структура высокого разрешения отдельных додекамеров белка Dps с разупорядоченными N-концевыми фрагментами.

Значение полученных соискателем результатов исследований для практики подтверждается тем, что новые данные о структуре защитного комплекса Dps-ДНК, полученные соискателем, имеют значительный потенциал в решении проблемы возникновения устойчивых к лекарственным препаратам форм болезнетворных бактерий и в разработке методов контроля перехода бактерий в анабиоз и выхода из него. Кроме того, сочетание использованных

методов изучения структуры биокристаллов может быть применено к исследованиям других биологических макромолекул и их комплексов.

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается использованием для получения экспериментальных данных современного высокоточного оборудования, использованием современных алгоритмов обработки, взаимосогласованностью и воспроизводимостью расчетных и экспериментальных данных. Полученные в диссертационной работе карты плотности рассеивающего потенциала размещены в электронно-микроскопической базе данных EMDB. Обоснованность положений, выносимых соискателем на защиту, подтверждается хорошей согласованностью полученных экспериментальных данных с литературными источниками. По материалам диссертации опубликовано **7 статей** в рецензируемых международных научных журналах, входящих в список рекомендованных ВАК, а также представлено 9 докладов на национальных и международных научных конференциях.

Личный вклад соискателя состоял в получении экспериментальных данных методами растровой и просвечивающей криогенной электронной микроскопии. Автором самостоятельно проводился детальный анализ полученных данных и их последующая обработка с помощью соответствующего пакета программ. Соискатель активно участвовал в обсуждении и обобщении полученных результатов и формировании научных выводов, подготовке научных публикаций в журналах, а также лично представлял результаты работы в виде докладов на российских и международных конференциях, школах и семинарах, что свидетельствует о его высокой квалификации.

Диссертация отвечает на ключевые вопросы поставленной научной проблемы и соответствует критерию внутреннего единства. Объединяющим фактором и основной идейной линией являются структурные исследования комплексом методов криогенной электронной микроскопии с применением современных подходов к обработке и интерпретации экспериментальных данных, представляющих интерес как с точки зрения кристаллографии, так и с точки зрения практических применений при изучении структуры биологических макромолекул и разработке новых методов борьбы с лекарственной резистентностью бактерий.

Диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям, установленным Положением о порядке присуждения учёных степеней, утверждённым постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

На заседании 25 февраля 2021 года диссертационный совет принял решение присудить Камышинскому Роману Андреевичу учёную степень кандидата

физико-математических наук по специальности 01.04.18 – «кристаллография, физика кристаллов».

В заседании 15 членов диссертационного совета участвовали очно, и 2 члена совета участвовали дистанционно.

При проведении открытого голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 6 докторов наук по специальности 01.04.18 – «кристаллография, физика кристаллов», участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 17, против – 0, воздержалось – 0.

Председатель диссертационного совета,

член-корреспондент РАН М.В. Ковальчук

Учёный секретарь диссертационного совета,

кандидат физико-математических наук К.В. Фролов

« 25 » февраля 2021 г.

Учёный секретарь ФНИЦ

«Кристаллография и фотоника» РАН

кандидат физико-математических наук Л.А. Дадинова