Отзыв

официального оппонента
на диссертацию 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»

Работа Романа Андреевича Камышинского посвящена изучению структуры биокристаллов комплекса Dps-ДНК методами криоэлектронной микроскопии. Под воздействием неблагоприятных факторов внешней среды клетки *E.coli* переходят в стационарную фазу, начиная активный синтез ДНК-связывающего белка Dps, который образует кристаллы с ДНК, обеспечивая защиту бактериального генома. Данное явление широко описано в литературе, однако до сих пор не удавалось осуществить прямую визуализацию биокристаллов и однозначно установить их структуру. Новые данные о структуре биокристаллов Dps-ДНК могут пролить свет на понимание механизмов кристаллизации нуклеиновых кислот и белков, обеспечивая потенциальную возможность преодоления бактериальной резистентности и разработки новых лекарственных средств.

Таким образом, тема настоящей диссертационной работы, основной целью которой являлось определение структуры биокристаллов комплекса Dps-ДНК, является весьма актуальной и перспективной, представляя, помимо фундаментального, еще и сугубо практический научный интерес.

Для решения поставленных задач диссертант Р.А. Камышинский использует целый набор современных методов криоэлектронной микроскопии: растровую электронно-ионную микроскопию в криогенном режиме, просвечивающую криоэлектронную микроскопию,

криоэлектронную томографию (в т.ч. с применением субтомографического усреднения), метод анализа проекций одиночных частиц. Такой комплекс современных методов, наряду с верификацией полученных результатов с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния, обеспечивает несомненную достоверность полученных в работе результатов.

Диссертация Р.А. Камышинского построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 178 наименований. Работа изложена на 136 страницах с 57 рисунками и 2 таблицами.

В обзоре литературы приводится достаточно подробный анализ данных по проблематике исследования. Рассматриваются явление внутриклеточной кристаллизации биомолекул, роль белка Dps и известные данные о структуре комплекса Dps-ДНК. Также приведен обзор современных методов криоэлектронной микроскопии и пробоподготовки биологических образцов.

В разделе “Материалы и методы” содержится подробное описание используемых в работе экспериментальных процедур, представлены параметры экспериментов, детально описаны основные этапы получения и обработки экспериментальных данных, сопровождаемые наглядными схемами.

В отдельный раздел вынесено описание предварительных экспериментов по оптимизации методов пробоподготовки для криоэлектронной микроскопии и обработки данных, которые в дальнейшем были применены для исследования кристаллов Dps-ДНК. Хотя в качестве модельных объектов в этом разделе использовались различные образцы, эта часть исследования также представляется абсолютно необходимым этапом, ключевым для получения значимой информации по главное теме диссертации, поэтому могла быть на совершенно законных основаниях включена в раздел результатов.

В разделе “Результаты” содержится детальное описание и анализ данных, полученных автором в ходе выполнения диссертационной работы. В частности, продемонстрирован полиморфизм кристаллов комплекса, с помощью криоэлектронной томографии получены трехмерные реконструкции кристаллов. Показано формирование биокристаллов двух различных типов - с триклинной и кубической элементарными ячейками, определены их параметры. Определено положение молекул ДНК в структуре биокристаллов, полученных *in vitro*, а также пространственное распределение кристаллов в бактериальных клетках. Представлена трехмерная реконструкция с высоким пространственным разрешением для одиночных додекамеров Dps, а также визуализированы N-концевые фрагменты додекамеров на двумерных классах изображений. Хочется отметить высокое качество исходных данных, важную роль в получении которых играет не только высококлассное оборудование, но и навыки и умения диссертанта.

Тем не менее, при рассмотрении диссертации у меня возникло некоторое количество вопросов и замечаний.

Можно ли по полученным данным предположить, в какой форме существует ДНК в исследуемых биокристаллах? Какие у автора имеются предположения о параметрах биокристаллов, формируемых in cellulo? Насколько отличаются друг от друга структуры биокристаллов Dps-ДНК в контрольных клетках, подвергнутых стрессу, и в клетках, суперэкспрессирующих Dps? Как сильно отличается внутриклеточная концентрация Dps в условиях стресса и при суперэкспрессии? Хотя автор очмечает, что в экспериментах in vitro структура ко-кристаллов не зависит от соотношения Dps : ДНК, это заявление мне кажется спорным, или во всяком случае разные соотношения могут быть источником разнообразия кристаллических форм. Наконец, известно ли что-нибудь о других молекулах, которые могут входить в состав биокристаллов in cellulo и модулировать процесс кристаллизации? Также при описании экспериментов

не везде указано, какая именно ДНК использовалась для ко-кристаллизации: короткая линейная или кольцевая. Поскольку in cellulo очевидно в образование кристаллов вовлечены в первую очередь кольцевые молекулы (хромосомы или плазмиды), для более корректного сравнения важно было бы указывать более четко природу ДНК, используемую в экспериментах in vitro. Почему используется термин “Тяж ДНК” - это молекула ДНК, или пучок молекул?

Наконец, в тексте встречается некоторое количество опечаток и некорректных русскоязычных версий англоязычных терминов (например - “микротомические срезы”).

Однако, отмеченные замечания не влияют на значимость полученных результатов и не снижают общей высокой оценки работы. Поставленные цели работы достигнуты, задачи решены. Автореферат и публикации диссертанта достаточно полно отражают содержание работы. Полученные результаты являются абсолютно новыми, имеют важное фундаментальное и практическое значение. Особенно стоит отметить высокий методический уровень проведенных структурных исследований. Диссертация выполнена на очень высоком экспериментальном и теоретическом уровне. Полученные результаты опубликованы в ведущих научных журналах, реферируемых системами Web of Science и Scopus и входящих в Перечень изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, а также прошли апробацию на международных и национальных конференциях.

Таким образом, диссертация Романа Андреевича Камышинского «Структура биокристаллов Dps-ДНК по данным криоэлектронной томографии» представляет собой законченную 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.

Автор диссертации Камышинский Роман Андреевич, несомненно, заслуживает присуждения ему учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов».

Официальный оппонент:
доктор биологических наук,
заведующий отделом электронной микроскопии
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова

Киреев Игорь Игоревич
«21 » января 2021 г.

Тел: +7-495-939-55-28
E-mail: iikireev@gmail.com
119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 40
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Зам. директора по научной работе
НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского
МГУ имени М.В.Ломоносова
к.б.н.

Фенюк Борис Александрович