

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Кошеверовой Веры Владиславовны «Роль EEA1-положительных везикул в эндоцитозе рецептора эпидермального фактора роста и их биогенез», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность и новизна диссертационного исследования

Диссертационная работа В.В.Кошеверовой представляет собой фундаментальное исследование динамики, на уровне отдельных молекул, процесса эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР). Эндоцитозный путь обеспечивает проникновение в клетку извне грузов различной природы (в основном макромолекулярных) в составе мембранных везикул, традиционно называемых эндосомами. Эндоцитоз регулирует число транспортеров и ионных каналов на плазмалемме, он вовлечен в регуляцию внутриклеточной сигнализации, и также путь попадания в клетку ряда инфекционных агентов и токсинов. Понимание фундаментальных принципов организации эндоцитозного пути открывает перспективы для разработки фармакологических препаратов, модулирующих различные этапы эндоцитоза с целью подавления проонкогенных сигнальных путей, предотвращения интернализации различных инфекционных агентов в клетки и т.д. В связи с этим очевидна высокая степень актуальности диссертационной работы В.В.Кошеверовой.

Как и в случае других транспортных процессов в клетке, эндоцитоз протекает по детерминированным сценариям, и в ходе эндоцитоза интернализованный груз последовательно оказывается в везикулах различного липидного и белкового состава. До сих пор неясно, происходит ли при этом процессе постепенная смена молекул, ассоциированных с везикулами, или груз последовательно проходит по эндоцитозным компартментам (т.е. долгоживущим мембранным структурам с характерной морфологией, локализацией и функцией). Исследования эндоцитоза технически сложны, поскольку эндоцитозные везикулы морфологически невыразительны, и для их исследования, классификации, описания динамики требуется применение современных методических приемов молекулярной биологии клетки: световой микроскопии высокого разрешения, эктопической экспрессии флуоресцентно-меченных белков и т.п.

В рамках изучения эндоцитоза диссертантку привлекло исследование одной из его стадий, сопровождающейся попаданием интернализованного груза в везикулы, содержащие белок EEA1. Она решила проверить предположение о том, что EEA1-

положительные везикулы можно рассматривать как постоянно существующий везикулярный компартмент, обеспечивающий ранние этапы эндоцитозного пути мембранных белков, направляемых на лизосомную деградацию.

В связи с вышеизложенным, перед В.В.Кошеверовой стояли следующие, четко сформулированные в работе задачи:

1. Выяснить, изменяется ли количество ассоциированного с мембранами белка EEA1 при стимуляции эндоцитоза РЭФР.
2. Оценить характер взаимодействия белка EEA1 с мембранами везикул в контроле и при стимуляции эндоцитоза РЭФР.
3. Изучить в реальном времени поведение ЭФР-содержащих структур и EEA1-везикул на начальных и конечных этапах эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.
4. Проанализировать процесс Rab5-Rab7 конверсии в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.
5. Выяснить пути биогенеза EEA1-везикул: по биосинтетическому пути, по эндоцитозному пути или из аутофагосом.

Следует отметить, что все эти задачи были успешно выполнены. В ходе выполнения диссертационной работы В.В.Кошеверовой при помощи современных и адекватных задачам исследования методических приемов удалось показать, что стимуляция в клетках эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов приводит к увеличению времени жизни EEA1 на мембранах везикул, не изменяя при этом общее количество EEA1, ассоциированного с мембранами. На ранних этапах эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов происходит слияние вновь образованных транспортных везикул, содержащих эти комплексы, с предсуществующими EEA1-везикулами. На поздних стадиях рецепторный домен выделяется (сегрегируется) из состава гибридной везикулы при участии ГТФазы динамина и Arp2/3-зависимой актиновой сети. В ходе сегрегации Rab7 привлекается к рецептор-содержащему домену гибридной эндосомы, в то время как EEA1 и Rab5 отделяются в составе единой везикулы, что может выглядеть как Rab5-Rab7 конверсия. Популяция EEA1-везикул поддерживается за счет функционирования биосинтетического пути, что характерно для предсуществующих компартментов, но не транспортных везикул.

Приоритетным и новым является общий вывод диссертантки о том, что EEA1-везикулы можно рассматривать как везикулярный компартмент, который и является «истинными» ранними эндосомами», в то время как интернализирующиеся с плазмалеммы везикулярные структуры, несущие груз, следует называть транспортными везикулами. По

всей видимости, EEA1-везикулы специализируются на грузе, направляемом по пути лизосомной деградации.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа В.В.Кошеверовой, изложенная на 131 стр., построена по традиционному плану и состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, названного литературным обзором, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, содержащего 240 наименований. Работа содержит 27 рисунков, которые нередко состоят из нескольких частей и комбинируют в себе микрофотографии и графики. Все микрофотографии – очень высокого качества. На графиках имеются четкие обозначения. Также к диссертации в качестве иллюстраций приложены видеофайлы с прижизненными видеосъемками клеток. Диссертация написана хорошим литературным языком, текст практически не содержит опечаток.

Во введении к диссертации изложена актуальность исследования, цель работы, задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту; сформулирована научная новизна и научно-практическая значимость диссертации. Отмечено, что все эксперименты были выполнены диссертанткой лично, а их результаты обсуждены с научным руководителем. Далее приведен список сокращений в диссертации; он занимает 2 страницы, значительную часть которых занимают укоренившиеся в литературе неудобочитаемые аббревиатурные названия белков. Возможно, следовало бы эти названия выделять в особый раздел, с кратким пояснением свойств белка, а не только с расшифровкой аббревиатуры.

В обзоре литературы подробно рассматриваются все аспекты, имеющие отношение к работе: пути везикулярного транспорта в клетке (10 стр.), общие принципы организации эндоцитозного пути (15 стр.), функции ранних эндосом, их биогенез, молекулярные маркеры (11 стр.), механизмы созревания поздних эндосом (4 стр.), деградация компонентов клетки путем аутофагии и взаимодействие аутофагии и эндоцитозного пути (2 стр.), эндоцитоз рецептора эпидермального фактора роста как модель для изучения механизмов рецептор-опосредованного эндоцитоза (3 стр.). Обзор включает самые современные данные, написан на очень хорошем научном уровне, логически и понятно. Представляется, правда, что сведения про аутофагию можно было бы не выделять в отдельный раздел или перенести в отдел Обсуждение, поскольку это очень обширная тема, лишь вскользь затронутая в диссертационном исследовании.

В главе Материалы и методы исследования подробно описаны примененные в работе методы культивирования клеток, стимуляции в них эндоцитоза, описаны метки

для клеточных компонентов, использованные плазмиды, фармакологические ингибиторы изучаемых процессов, описано фракционирование клеток и анализ фракций методом электрофореза белков и иммуноблотинга. Особое внимание уделено микроскопии, включая метод FRAP (восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания), компьютерный анализ изображений, статистическую обработку результатов. Все использованные методы современны и адекватны задачам исследования.

Результаты исследования описаны в 8 разделах данной главы диссертации. В первом разделе описано измерение количества белка EEA1 в мембранной фракции клеток методом фракционирования и иммуноблотинга и показано, что его количество не изменяется при стимуляции в клетках эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Во втором разделе описано исследование динамики ассоциации белка EEA1 с мембранами везикул в клетках, стимулированных или не стимулированных добавлением ЭФР. Это один из наиболее трудоемких и обширных разделов работы. Проведены прижизненные наблюдения за EEA1-содержащими везикулами при транзientной экспрессии EEA1-GFP. Далее динамика EEA1 в везикулах исследована методом FRAP, причем проведен тщательный математический анализ кривых восстановления флуоресценции в стимулированных и нестимулированных добавлением ЭФР клетках. Показано, что характер восстановления двухфазный, причем быстрая компонента (около 2 с) не изменяется при стимуляции клеток ЭФР, тогда как медленное восстановление занимает в стимулированных клетках многократно большее время (99 с против 21 с), причем происходит снижение мобильной фракции EEA1. Диссертантка делает вывод, что общее количество белка EEA1 не изменяется в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов, но стимуляция эндоцитоза РЭФР приводит к увеличению времени жизни на мембране части популяции EEA1 белка. Это свидетельствует в пользу гипотезы о том, что EEA1-везикулы являются долгоживущим компартментом, а не возникают в ходе эндоцитоза. Однако В.В.Кошеверова решила увидеть процесс взаимодействия EEA1-везикул и эндоцитозных везикул, содержащих ЭФР, воочию, что можно осуществить с помощью современных микроскопов высокого класса и современных приемов визуализации клеточных компартментов. И третий раздел результатов называется «изучение взаимодействия EEA1- и ЭФР-положительных везикул методом прижизненной съемки». В нем приведены видеофильмы, которые удалось снять диссертантке, где хорошо видно, как происходит взаимодействие предсуществующих EEA1-везикул с интернализирующимися в клетку ЭФР-содержащими везикулами, при этом на позднем этапе эндоцитоза происходит восстановление популяции EEA1-везикул.

Получив достоверные результаты, свидетельствующие о том, что в процессе эндоцитоза нагруженного рецептора ЭФР происходит слияние ЭФР-эндосом с ЕЕА1-везикулами, и затем сегрегация ЕЕА1- и ЭФР-содержащей частей, В.В.Кошеверова решила сосредоточиться на исследовании механизма сегрегации. В четвертом разделе результатов она показала, что в процессе эндоцитоза меняется взаимодействие везикул с кортактином, и что сегрегацию замедляют ингибиторы Arp2/3 актинового комплекса и динамина. В пятом разделе изучена сегрегация ЕЕА1- и ЭФР-положительных везикул с точки зрения процесса Rab5-Rab7 конверсии, что включило в себя элегантный анализ со-локализации везикул по трем различным меткам при различном времени стимуляции клеток. В итоге показано, что гибридная везикула, содержащая ЕЕА1, Rab5, Rab7 и ЭФР, разделяется затем на ЕЕА1-Rab5 и ЭФР-Rab7 везикулы. Наконец, диссертантка исследовала происхождение ЕЕА1-везикул – из аутофагосом, из эндосом или по биосинтетическому пути из аппарата Гольджи, продемонстрировав, что (раздел 6) ЕЕА1-везикулы, выявляющиеся в подверженных сывороточному голоданию клетках, не являются аутофагосомами, что (раздел 7) ЕЕА1-везикулы не являются эндосомами, и что (раздел 8) они скорее всего происходят из биосинтетического пути.

В главе Обсуждение результатов приводится подробное сопоставление полученных в диссертации и литературных данных. Этот раздел убедительно демонстрирует основные достижения В.В.Кошеверовой и ее умение анализировать и интерпретировать полученные данные. В диссертационной работе сделана серьезная заявка на обнаружение новой клеточной органеллы – ЕЕА1-везикулы. Хотелось бы, чтобы этот компартмент был охарактеризован немного более полно, т.е. чтобы автор описал еще какие-либо маркерные белки ЕЕА1-везикулы и порядок их сборки на везикуле. Искренне желаю диссертантке и ее научному руководителю продолжить исследования в этом интереснейшем направлении.

Выводы работы обоснованы, четко сформулированы, и вполне соответствуют представленным результатам, достоверность которых не вызывает сомнений. Содержание диссертации полностью отражено в автореферате. Материалы диссертации изложены в 12 публикациях, в том числе в 3 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для размещения материалов кандидатских диссертаций. Среди них – англоязычный журнал *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

Заключение

Диссертационная работа Веры Владиславовны Кошеверовой «Роль ЕЕА1-положительных везикул в эндоцитозе рецептора эпидермального фактора роста и их биогенез» содержит новые, приоритетные данные, касающиеся динамики везикулярных структур в ходе

эндоцитоза и выделения транзиторных и постоянных клеточных компартментов. Диссертация решает актуальные задачи общебиологической значимости и по своей новизне, научной ценности, объему выполненных исследований и достоверности полученных результатов полностью соответствует основным квалификационным критериям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Вера Владиславовна Кошеверова заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

Главный научный сотрудник, руководитель
группы физиологии цитоскелета
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института белка
Российской академии наук.
доктор биологических наук
по специальности 03.00.25 – Клеточная биология,
профессор



Елена Сергеевна Надеждина

05.02.2017

Адрес: 142290, Российская Федерация, Московская область, г.Пушино, ул.Институтская, 4; филиал: 117988 Москва, ул. Вавилова, 34. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук.

Телефон: (499) 135-21-47

Email: nadezhdina@vega.protres.ru



Собственноручная подпись
тов. Надеждина Е.С.
удостоверяется зав. кадр. отделом
Подпись

