



Министерство здравоохранения
Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное
учреждение

**РОССИЙСКИЙ
КАРДИОЛОГИЧЕСКИЙ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ
КОМПЛЕКС**

ОГРН 1037739144640 ИНН 7731243467
121552, г. Москва, 3-я Черепковская ул., 15 а

Тел. 140-93-36, факс 495-414-66-99
www.cardioweb.ru cclibr@comcor.ru

Исх. № 01/102 от 15.02.17

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Генерального директора
ФГБУ РКНПК МЗ РФ по научной работе,
директор института экспериментальной
кардиологии, д.м.н., профессор



С.Н. Терещенко

«14» февраля 2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации Кошеверовой Веры Владиславовны «Роль EEA1-положительных везикул в эндоцитозе рецептора эпидермального фактора роста и их биогенез», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»

Актуальность темы работы

Эндоцитоз представляет собой разновидность везикулярного транспорта, с помощью которого клетка получает и сортирует внешнюю информацию, питательные вещества и иную материю, в том числе, инфекционные агенты. В частности, эндоцитоз обеспечивает длительное функционирование мембранных рецепторов, которые поступают в клетку после связывания гормонов и продолжают работать в составе эндосом, или рециклируют на поверхность клетки, или деградируют вместе с лигандом в составе лизосом. Тонкий баланс этих процессов обеспечивает адекватные реакции клетки на воздействия внешней среды и сигналы, поступающие от других клеток многоклеточного организма. Нарушение процессов эндоцитоза и модуляции внутриклеточной сигнализации в эндотелии сосудов может иметь далеко идущие последствия в плане регуляции сосудистого тонуса, онкотического давления в плазме крови и подлежащих тканях, сосудистой проницаемости, протекания воспалительных реакций, ангиогенеза. Нарушение эндоцитоза тирозинкиназных рецепторов, часто связаны с их активацией, неконтролируемым ростом и делением клеток, повышением их двигательной активности и переключением метаболизма, что характерно для роста и метастазирования опухолей. Тесная связь эндосом с аутофагией и мастер-регулятором клеточного метаболизма (белковым комплексом mTOR) указывает на возможную роль эндоцитоза в процессах старения и в развитии ожирения и сахарного диабета - заболеваний, часто сопутствующих

основным сердечно-сосудистым патологиям. Таким образом, несмотря на ярко выраженный фундаментальный характер, рассматриваемая работа весьма важна и для практической медицины, в том числе, для кардиологии, в плане понимания молекулярных основ патологических процессов вследствие нарушения работы внутриклеточных сигнальных систем. Актуальность диссертационной работы В.В. Кошеверовой, посвященной выяснению фундаментальных механизмов внутриклеточной сортировки сигнальных везикул, содержащих классический тирозинкиназный рецептор, не вызывает сомнений.

Объем, структура и основное содержание работы

Диссертационная работа изложена на 130 страницах и содержит 27 рисунков, 22 из которых относятся к результативной части и, как правило, состоят из нескольких панелей результатов каждый. Написана работа в традиционной форме и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы» (240 источников), благодарности и список сокращений.

Во Введении кратко описан процесс рецептор-зависимого эндоцитоза, даны виды эндосом и обозначена фундаментальная проблема, которой посвящена диссертационная работа. Она состоит в выяснении возможности существования постоянного везикулярного компартмента, обеспечивающего ранние этапы эндоцитоза в направлении лизосомальной деградации. Предполагается, что белок EEA1 специфически маркирует этот компартмент. Научная актуальность данного исследования аргументирована, показано существование двух альтернативных моделей эндоцитоза, в рамках которых автор разрабатывает свою гипотезу. Четко сформулирована цель исследования, даны задачи и основные положения, выносимые на защиту. Во Введении обозначены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, личный вклад автора, приведены сведения об апробации результатов, перечислены публикации автора по материалам диссертации.

Обзоре литературы состоит из 6 разделов. В них приведена необходимая для понимания работы информация о путях везикулярного транспорта в клетке; общие принципы организации эндоцитозного пути; функции, биогенез и молекулярные маркеры ранних эндосом; механизмы созревания поздних эндосом и Rab-конверсии; взаимосвязь эндоцитоза с аутофагией; и использование рецептора эпидермального фактора роста как главной модели рецептор-зависимого эндоцитоза. Обзор литературы содержит несколько схем, проясняющих некоторые аспекты эндоцитозного пути и формирования везикул.

В разделе Материалы и методы представлено подробное описание всех методов исследования и обработки полученных результатов. В работе использованы три основных методических блока, включая электрофорез и иммуноблоттинг для анализа белкового

состава клеточных мембран; культивирование и трансфекцию клеток; флуоресцентную микроскопию и обработку изображений фиксированных (иммуноцитохимия) или живых (прижизненный анализ) клеток. Следует отметить, что прижизненный флуоресцентный анализ позволяет одновременно регистрировать динамику трех флуоресцентно-меченых белков. Это часто снимает вопросы о возможности артефактных результатов, связанных с условиями проводки клеточных образцов. Примененный в работе лазерный сканирующий микроскоп Leica TSC SP5 позволяет разрешать объекты, близкие по размеру везикулам и эндосомам. Вместе с тем, как отмечено ниже, исключительно малый размер исследуемых объектов находится на пределе разрешения современной микроскопии. Поскольку данное исследование имеет ярко выраженный демонстрационный характер (не включая причинно-следственных экспериментов с помощью генетических манипуляций с экспрессией белков интереса), следует особо отметить сложность поставленных задач и высокий экспериментальный уровень их решения. Резюмируя, использованные в работе методы адекватны для решения поставленных задач на современном уровне развития исследовательских технологий.

Результаты работы получены с использованием ставшей уже классической модели рецептор-зависимого эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста. Эта модель хорошо налажена и давно изучается в лаборатории, где выполнялась данная работа. Для нее использовали также стандартную и хорошо охарактеризованную культуру клеток HeLa. Вероятно, в будущем можно ожидать расширения полученных результатов в отношении других клеточных моделей, включая первичные культуры и/или опухолевые клетки, для которых рецептор-зависимый эндоцитоз имеет ключевую значимость.

В разделе Результаты исследования представлены экспериментальные обоснования существования стабильного везикулярного компартмента, маркированного EEA1. Во-первых, автор показывает, что мембранная локализация EEA1 присутствует до рецептор-зависимого эндоцитоза, и существенно не изменяется после его активации. Во-вторых, автор демонстрирует сегрегацию EEA1-содержащих везикул от зрелых эндосом, проясняя при этом довольно слабо изученный механизм так называемой Rab5/7-конверсии. В третьих, пристальное внимание уделяется происхождению пула предсуществующих EEA1-эндосом. Автор показывает, что хотя эндоцитозный путь связан с аутофагией, этот пул эндосом не является аутофагосомальным. Напротив, наиболее вероятно, что биогенез EEA1-эндосом связан с участием аппарата Гольджи и, возможно, эндоплазматического ретикулума, что характерно для многих стабильных везикулярных компартментов клетки. Экспериментальные результаты подробно и детально иллюстрированы в печатной работе, а для рецензирования работы были также предоставлены оригинальные видеозаписи. Они демонстрируют достижение автором высокого профессионального уровня и наглядную основу для сделанных по работе выводов.

В отдельном разделе Обсуждения результатов автор в высшей степени тщательно анализирует полученные данные в свете данных других исследователей. Для дискуссии

ею использован обширный список публикаций последних лет, что отражает как важность и актуальность изучаемой научной проблемы, так и глубину личного понимания и участия автора. Хотя многие вопросы нашли подробное обсуждение, некоторые из них остались за кадром и обозначены ниже в разделе Основные замечания.

Наконец, в Заключение В.В. Кошеверова резюмирует основные достижения своего диссертационного исследования, переходя к формулировке Выводов. Выводы, сделанные по работе, отвечают исходным задачам и дают все основания расценивать проведенное исследование как полностью законченное.

Новизна исследования

Автором получены новые фундаментальные знания о молекулярных механизмах рецептор-зависимого эндоцитоза. В частности, экспериментально подтверждено наличие стабильного пула предсуществующих EEA1-содержащих везикул, получены новые данные об их биогенезе и предложен новый механизм Rab5-Rab7 конверсии, которая обеспечивает регуляцию жизненного цикла сигнальных везикул. Примечательно, что для получения этих знаний использован метод прижизненного анализа везикулярной динамики в модельных клетках. Он позволяет визуализировать процессы слияния ранних везикул и сегрегацию эндосом на более поздних этапах эндоцитозного пути. Такой подход и практические наработки должны быть шире использованы при проведении современных клеточно-биологических исследований в различных областях экспериментальной науки.

Научно-практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении фундаментальных знаний о молекулярных механизмах эндоцитоза как важного механизма реакции клеток на воздействия внешней среды и гуморальной регуляции в многоклеточном организме. Автором описан механизм эндосомального транспорта с участием предсуществующего пула EEA1-содержащих везикул, что позволяет под новым углом рассматривать процессы внутриклеточного транспорта и сигнализации в норме и патологии. Углубленное понимание фундаментальных принципов организации эндоцитозного пути в клетках разных органов открывает возможности для разработки новых фармакологических препаратов с целью подавления проонкогенных сигнальных путей и метаболических нарушений, затрагивающих различные системы организма, в том числе, сердечно-сосудистую систему. Материал диссертации может быть использован в образовательных целях для подготовки специалистов медико-биологических специальностей.

Основные замечания

Нисколько не умаляя фундаментальную значимость работы, очевидный уровень достигнутого профессионализма и высокое качество полученных данных, хотелось бы остановиться на некоторых технических и методических аспектах исследования, а также особенностях изложения материала. Они требуют обсуждения, поскольку, на наш взгляд, отражают текущий предел экспериментальных возможностей для изучения, фактически, нанообъектов. Совокупная аргументация, приведенная и тщательно выверенная автором, звучит крайне убедительно и согласуется с независимыми результатами других авторов. С большой долей вероятности, концепция предсуществующего везикулярного компартмента имеет все основания быть принятой, по крайней мере, в отношении некоторых рецепторов и лизосомального пути транспорта везикул. Тем не менее, основной контраргумент может быть связан с недостаточным аппаратным разрешением, что не дает однозначности и оставляет поле для дальнейших исследований. Однако следует еще раз отметить, что с квалификационной точки зрения исследование проведено на высочайшем уровне, выводы сформулированы аккуратно и обоснованы полученными данными. Основные замечания по работе приведены ниже в порядке изложения диссертационного материала.

1. Традиционно принято сопоставлять выводы поставленным задачам. В данной работе поставлено 5 задач, сформулировано 4 основных выносимых на защиту положения, и сделано 6 выводов. В данной работе соответствие задач и выводов, на первый взгляд, не очевидно. Представляется, что такое затруднение возникает в результате несфокусированной формулировки задач. Например, задача 2 звучит как "оценить характер взаимодействия белка EEA1 с мембранами...", задача 3 – как "изучить... поведение везикул в реальном времени", а задача 4 – как "проанализировать процесс конверсии...". Без четкой расшифровки и характера ожидаемого результата довольно затруднительно проследить формальное соответствие задач выносимым положениям и выводам, которые сделаны предметно, но несколько в ином порядке и в описательном стиле.
2. Текст очень насыщен информацией, используется много сокращений, в том числе для названий многочисленных белков и плазмидных конструкций. Часто используется английская терминология, что допустимо, так как русские эквиваленты отсутствуют. Хорошо заметно, как автор подробно объясняет свои экспериментальные действия, их результаты и значимость, что получается весьма успешно. Тем не менее, текст страдает от перегруженности предложений, что затрудняет прочтение. Материал мог бы быть представлен более четко, если бы диссертант ограничил размер предложений и придерживался тезисного стиля изложения, разделяя утверждения и пояснения к ним.

3. Обзор литературы посвящен описанию многокомпонентных и многостадийных путей формирования внутриклеточных везикул, их транспорта и сортировки. Возможно, было бы полезно более полно проиллюстрировать эти процессы и их участников, особенно учитывая большое количество обзорных статей по этим вопросам.
4. Основное критическое замечание в плане интерпретации экспериментальных данных связано с работой на пределе разрешающей способности прижизненной микроскопии. Автор справедливо указывает, что объекты площадью 20000 нм^2 находятся на пределе разрешения данным методом. Это значит, что достоверно разрешаются симметричные объекты размером порядка $140 \times 140 \text{ нм}$, что несколько превышает размер ранних везикул и эндосом, но меньше размера поздних эндосом и мультивезикулярных телец. Именно поэтому результаты микроскопической колокализации белков на ранних эндосомах, в том числе содержащих EEA1, должны интерпретироваться и обсуждаться крайне осторожно. Представляется, что этому вопросу можно было уделить больше внимания в разделе Обсуждения результатов. В плане дискуссии, интересует мнение автора, насколько велика вероятность того, что исследуемые белки (EEA1, Rab5/7) могут находиться на разных мембранах близко расположенных и/или контактирующих эндосом?
5. Эксперименты выполнены с использованием одной стандартной модели и одной линии клеток. Это оставляет потенциальную возможность того, что предложенный автором механизм с участием постоянного пула EEA1-содержащих везикул специфичен для некоторых типа клеток и/или их поверхностных рецепторов. Хотя автор и упоминает о такой возможности, ей стоило бы уделить больше внимания в разделе Обсуждение.
6. Хотелось остановиться, казалось бы, на частном вопросе использования метода FRAP. Несмотря на трудоемкость и сложность этого метода, его применение для исследования таких высокодинамичных внутриклеточных структур, как EEA1-содержащие везикулы, заслуживает особой оценки. Он позволил с высоким уровнем достоверности сравнить время жизни EEA1 на мембране в клетках, находящихся в различных условиях (норма, сывороточное голодание, активация эндоцитоза). Анализ динамики белка EEA1 вблизи везикулярных мембран был проведен без дополнительных модификаций (например, трансфекции клеток CD74 антигеном, что увеличивает размер везикул, но уменьшает их подвижность). Такие воздействия могли бы повлиять на время жизни EEA1 на мембране. Вместе с тем, в качестве контроля для такого анализа отбирались одиночные везикулы. Однако после стимуляции эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста такие структуры скорее "гибридные". Они могут представлять мультидоменные одиночные эндосомы или кластеры эндосом, как это можно заметить на приведенных иллюстрациях. По-видимому, имело смысл также провести анализ одиночных EEA1-везикул, не включивших мембраны с рецептором ЭФР после стимуляции эндоцитоза.

Это могло позволить более четкую интерпретацию данных по увеличению времени жизни доли EEA1, "фиксированной" между мембранами контактирующих везикул.

7. Наконец, в плане изложения, Обсуждение результатов было бы полезно разделить на отдельные секции, согласно полученным результатам, завершая раздел формулировкой единой непротиворечивой концепции. Учитывая глубину анализа, иногда затруднительно удерживать логику, структура которой нарушается в таких, например, ситуациях, как обсуждение разных экспериментальных подходов, использованных в работе (стр. 99, сверху). В то время как первый логично обозначен "Во-первых", его обсуждение занимает несколько параграфов, и остается неясным, что автор имела в виду "во-вторых" и далее.

Сделанные замечания не являются принципиальными, не умаляют научную и фундаментальную значимость работы, не ставят под сомнение основные результаты и не снижают в целом положительную оценку диссертационной работы В.В. Кошеверовой.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты и выводы диссертационной работы В.В. Кошеверовой могут быть использованы в образовательном процессе при чтении лекций студентам медико-биологических специальностей в университетах России. Полученные автором данные могут быть использованы при планировании и проведении научных исследований в следующих научно-исследовательских учреждениях России: в институте цитологии РАН, в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» МЗ РФ, в Московском научно-исследовательском онкологическом институте имени П. А. Герцена, на факультете фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, научно-исследовательских подразделениях ФГБОУ ВО «РНИМУ» имени Н.И. Пирогова МЗ РФ, в институте экспериментальной кардиологии «РКНПК» МЗ РФ.

Заключение

Анализ диссертационной работы Кошеверовой В.В. позволяет заключить, что сформулированные в данной диссертационной работе задачи успешно решены, положения, выносимые на защиту, доказаны и научно обоснованы, выводы логично вытекают из соответствующих экспериментальных данных. Работа содержит новые фундаментальные научные результаты, которые могут иметь прикладное значение. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе, 3 статьи в

Таким образом диссертационная работа Кошеверовой В.В. «Роль ЕЕА1-положительных везикул в эндоцитозе рецептора эпидермального фактора роста и их биогенез» полностью отвечает требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г.), является законченным научно-квалификационным исследованием, а ее автор Кошеверова Вера Владиславовна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

Руководитель лаборатории
клеточной подвижности
Института экспериментальной кардиологии
ФГБУ РКНИК МЗ РФ
д.б.н., проф.
shirinsky@cardio.ru
8495-414-7246

Владимир Павлович Ширинский

Ведущий научный сотрудник лаборатории
клеточной подвижности
Института экспериментальной кардиологии
ФГБУ РКНИК МЗ РФ
к.б.н., доцент
a.vorotnikov@icloud.com
8495-414-6713

Александр Вячеславович Воротников

Подписи д.б.н., профессора В.П. Ширинского
и к.б.н., доцента, А.В. Воротникова заверяю
Ученый секретарь ИЭК РКНПК МЗ РФ

С.А. Левашова

14.02.2017

