

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Кошеверовой Веры Владиславовны «Роль ЕЕА1-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 исследования, выбор цели и задачи диссертационной работы

Эндоцитоз является одним из фундаментальных клеточных процессов, с помощью которого осуществляется контакт клетки с внешней средой. Путем эндоцитоза в клетку поступают необходимые для ее жизнедеятельности высокомолекулярные метаболиты, а также токсины и вирусы. Наряду с этим, связывание рецепторов, локализованных в плазматической мембране с внеклеточными лигандами, их активация и последующая интернализация лиганд-рецепторных комплексов в эндосомы приводит к запуску широкого спектра внутриклеточных сигнальных каскадов. К настоящему времени накоплено достаточно доказательств в пользу того, что сами по себе эндосомы могут рассматриваться как органеллы, в которых происходит как поддержание и усиление активности сигнальных путей, стимулированных на поверхности клетки, так и генерация новых сигнальных путей. Модулируя внутриклеточные сигнальные каскады, эндоцитозный путь осуществляет контроль над основными функциями клетки, такими как подвижность, пролиферация, дифференцировка, поддержание полярности, а нарушения функционирования этого пути приводят к развитию патологии. Следует отметить, что в последние годы интерес к процессу эндоцитоза приобрел практическую направленность в связи с необходимостью развития технологий высокоспецифичной внутриклеточной адресной доставки лекарственных препаратов. Все это указывает на то, что исследование фундаментальных основ организации эндоцитозного пути является одной из актуальных проблем современной молекулярной и клеточной биологии.

Несмотря на интенсивное изучение молекулярных механизмов эндоцитозного пути, многие вопросы, связанные с его функционированием, до сих пор остаются нерешенными. Так, до конца не ясно, что представляют собой основные компартменты эндоцитозного пути в клетке – ранние и поздние эндосомы, поскольку и те и другие представлены гетерогенными популяциями везикул. Согласно одной из гипотез, которая в настоящее время является основной, биогенез эндосом осуществляется путем их созревания – постепенного изменения белково-липидного состава эндосом. Согласно этой гипотезе, ранние эндосомы созревают из интернализированной с плазматической мембраной транспортной везикулы, несущей груз. Затем ранние эндосомы преобразуются в поздние, что

осуществляется, в том числе, путем замены на поверхности эндосом белков, специфичных для ранних эндосом, на белки, характерные для поздних эндосом. Таким образом, отпочковавшаяся от плазматической мембраны эндосома является относительно короткоживущей структурой, исчезающей после слияния с лизосомами. Эта гипотеза, однако, не дает четких представлений о том, где проходит граница между ранними и поздними эндосомами, каким образом регулируется этот переход, в чем состоят функциональные особенности двух субпопуляций эндосом. Согласно альтернативной гипотезе, эндосомы представляют собой предсуществующие компартменты, которые синтезируются клеткой биосинтетическим путем. В этом случае необходимо выявить структуры, которые соответствуют определению компартмента, а также транспортные везикулы, переносящие груз между ними. До сих пор такие мембранные структуры, аналогичные эндоплазматическому ретикулуму и аппарату Гольджи – основным компартментам биосинтетического пути, не выявлены. С этой точки зрения диссертационное исследование В.В. Кошеверовой, посвященное изучению биогенеза и функционирования везикул, несущих на поверхности белок заякоривания ранних эндосом EEA1, представляет собой принципиально новый виток в развитии представлений об организации эндоцитозного пути. Результаты этого исследования позволяют рассматривать популяцию EEA1-везикул в качестве предсуществующего раннеэндосомального компартмента. Вследствие этого, новизна такого подхода, основанного на адекватной доказательной базе, представляется очевидной.

Из всего вышесказанного логично вытекает цель диссертационной работы В.В. Кошеверовой, которая состояла в доказательстве гипотезы о том, что EEA1-положительные везикулы являются постоянно существующим везикулярным компартментом, обеспечивающим ранние этапы эндоцитозного пути мембранных белков, направляемых на лизосомную деградацию. Для достижения поставленной цели диссертантом были поставлены и решались три группы задач.

В первую очередь решался вопрос о том, рекрутируется ли белок EEA1 на вновь сформированные рецептор-содержащие эндосомы или он остается постоянно ассоциированным с определенной популяцией уже существующих везикул. Ответить на этот вопрос помогли эксперименты, позволившие сравнить количество общего ассоциированного с мембранами белка EEA1 в контроле и при стимуляции эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР), а также изучить характер взаимодействия периферического белка EEA1 с мембранами везикул.

Описанный ранее в лаборатории цикл формирования гибридных EEA1-ЭФР-содержащих эндосом для окончательной интерпретации требовал прижизненного анализа событий, происходящих на самых ранних этапах эндоцитоза и на стадии завершения цикла. Крайне важным было выявить механизм так называемой Rab5–Rab7 конверсии, т.е. смены на поверхности эндосом малой ГТФазы Rab5 на малую ГТФазу Rab7, которые являются ключевыми регуляторами ранних (Rab5) и поздних (Rab7) этапов эндоцитозного пути.

И, наконец, третья группа задач состояла в выяснении того, вносит ли эндоцитозный путь вклад в формирование ЕЕА1-везикул, или их биогенез связан в основном с биосинтетическим путем, ответственным за возникновение и поддержание мембран большинства органелл.

Структура и содержание диссертационной работы, научная новизна, обоснованность и достоверность полученных результатов

Диссертационная работа В.В. Кошеверовой изложена на 131 странице машинописного текста, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания используемых в работе материалов и методов, результатов исследования, обсуждения результатов и списка цитируемой литературы, содержащего 240 источников. Работа проиллюстрирована 27 рисунками.

В разделе «Введение» обосновывается актуальность изучаемой проблемы, формулируются цель и задачи исследования и основные положения, выносимые на защиту, отмечены научная новизна полученных результатов, а также их теоретическое и практическое значение. Обзор литературы написан ясно, логично, хорошо иллюстрирован. В нем проводится тщательный и всесторонний анализ всей совокупности данных по исследуемой проблеме, включая описание путей везикулярного транспорта в клетке, общих принципов организации эндоцитозного пути, функций, биогенеза и молекулярных маркеров ранних эндосом, а также механизмов созревания поздних эндосом. В разделе 1.6 обосновано применение эндоцитоза рецептора ЭФР, как наиболее перспективной и адекватной модели для изучения механизмов рецептор-опосредованного эндоцитоза, в ходе которого груз проходит весь путь от поверхности клетки до лизосом. Имеются незначительные опечатки и неудачные фразы, но их мало и они никак не влияют на общее очень хорошее впечатление от высококачественного и грамотного изложения материала. Важно отметить, что обзор литературы основан на последних и основополагающих работах в анализируемой области молекулярной и клеточной биологии, в нем рассматриваются как общепринятые, так и альтернативные точки зрения, что позволяет оценить весь спектр представлений в области биогенеза и функционирования ранних эндосом и их созревания в поздние эндосомы.

В разделе «Материалы и методы исследования» подробно описаны методы молекулярной и клеточной биологии, используемые при выполнении работы, включая создание плазмидных конструкций, электрофорез и иммуноблоттинг, двойное иммунофлуоресцентное мечение, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, восстановление флуоресценции после фотовыжигания и др. Описание результатов собственных исследований и их обсуждение автор приводит в соответствии с решаемыми задачами.

В ходе проведенных исследований с помощью метода прижизненной микроскопии автор впервые продемонстрировал, что в ходе эндоцитоза

происходит сначала слияние предсуществующих EEA1-везикул с везикулами, формирующимися на плазматической мембране и несущими ЭФР-рецепторные комплексы, а затем на поздних этапах эндоцитоза наблюдается процесс выделения рецептор-содержащего домена из состава гибридной везикулы. Определение количества EEA1-белка методом иммуноблоттинга показывает, что в ходе эндоцитоза количество ассоциированного с мембранами EEA1 не изменяется. Таким образом, впервые показано, что в ходе эндоцитоза транспортные везикулы, несущие груз, не созревают напрямую в ранние эндосомы путем привлечения белка EEA1, маркера ранних эндосом, из цитоплазматического пула, а приобретают этот белок, взаимодействуя с предсуществующими EEA1-везикулами. Выделение же рецепторного домена из состава гибридных везикул (сегрегация) приводит к восстановлению свободных EEA1-везикул, не несущих груз. Впервые установлено, что замена на поверхности эндосом малой ГТФазы Rab5 на Rab7 также происходит в момент сегрегации – Rab5 остается ассоциированным с EEA1-содержащей везикулой, в то время как Rab7 покидает гибридную эндосому в составе везикулы, несущей груз. Все вышесказанное свидетельствует о том, что сегрегация – один из ключевых процессов, происходящих на эндоцитозном пути, на котором осуществляется смена основных регуляторных белков эндосом, контролирующих их судьбу. Представленные в работе данные, описывающие процесс сегрегации в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов, а также связанный с этим механизм Rab5-Rab7 конверсии, являются приоритетными. Автор также показал, что в процесс сегрегации вовлечены ГТФаза динамин и Arp 2/3 комплекс, который осуществляет нуклеацию тонкой сети актиновых филаментов.

Автор диссертационной работы высказал обоснованное предположение о роли EEA1-везикул в эндоцитозном пути, как компартмента, несущий набор белков, который необходим на ранних сроках эндоцитоза грузов, направляемых на путь деградации. Белок EEA1 является фактором дистанционного взаимодействия, который заякоривает эндосомы на фиксированном расстоянии друг от друга, что способствует их дальнейшему слиянию. Слияние ранних эндосом – чрезвычайно важный процесс на эндоцитозном пути, позволяющий увеличить площадь мембраны эндосомы для того, чтобы стало возможным образование внутренних пузырьков поздних эндосом. Таким образом, согласно новым данным, полученным В.В. Кошеверовой, EEA1-везикулы могут временно предоставлять платформу для слияния везикул, несущих груз.

Еще одним важнейшим аспектом работы, позволившим дополнительно охарактеризовать EEA1-везикулы, явился анализ динамики ассоциации/диссоциации белка EEA1 с мембранами везикул в условиях минимальной эндоцитозной активности и в условиях стимуляции эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Для решения этой проблемы автор использовал уникальный метод FRAP - восстановления флуоресценции после фотовыжигания. В результате было впервые продемонстрировано увеличение времени жизни EEA1

белка на мембране при стимуляции эндоцитоза, причем увеличение времени ассоциации с мембранами не приводило к увеличению общего количества мембранно-локализованного EEA1. Это связано с тем, что даже в контроле все сайты связывания EEA1 на везикулах оказываются оккупированными, т.е. происходит насыщение связывания белка EEA1 с мембранами везикул.

В заключительной части работы автор изучил пути биогенеза EEA1-везикул и впервые показал, что EEA1-везикулы не являются аутофагосомами. Им были определены количественные показатели популяции EEA1-везикул в клетках в условиях длительного ингибирования эндоцитозного и биосинтетического пути. На основании полученных данных был сделан принципиально важный вывод о том, что биогенез EEA1-везикул связан с биосинтетическим путем.

Статистическая обработка данных, представленных в работе, выполнена тщательно. Достоверность полученных автором результатов и сделанных на их основе выводов не вызывает сомнений. Статистическую обработку результатов проводили с применением программы SPSS statistics 19 (США) с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Выводы представлены корректно и грамотно сформулированы, они полностью отражают полученные автором экспериментальные результаты и сделанные на их основе теоретические заключения.

Научно-практическая значимость работы

Диссертационная работа В.В. Кошеверовой, несомненно, имеет большое практическое значение. Полученные автором данные позволяют в значительной степени расширить и дополнить существующие представления о механизмах организации эндоцитозного пути, в том числе расшифровать ранее неизвестные механизмы осуществления эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Расшифровка принципов организации и механизмов эндоцитозного пути открывает широкие перспективы для разработки новых фармакологических препаратов, модулирующих и регулирующих различные этапы эндоцитоза, что имеет большое значение в онкологии, при лечении инфекционных заболеваний и др. Результаты исследования могут быть использованы для разработки лекционных курсов по клеточной и молекулярной биологии и по биофизике клетки на биологических факультетах университетов и медицинских ВУЗов.

По материалам диссертации имеется 12 публикаций, в том числе пять статей в международных и российских журналах (три из них - в журналах, рекомендуемых ВАК). Промежуточные этапы исследования, основные положения и результаты работы широко обсуждались автором на четырех международных и всероссийских конференциях.

Автореферат диссертационной работы В.В. Кошеверовой в полной мере отражает основные результаты и выдвигаемые на их основе положения и соответствует требованиям ВАК РФ.

В целом диссертационная работа Кошеверовой Веры Владиславовны, безусловно, заслуживает положительной оценки. Принципиальных замечаний и возражений она не вызывает. По работе имеется ряд вопросов, которые, не влияя на общую положительную оценку работы, но требуют разъяснения.

1. Насколько EEA1-белок специфичен, как маркер для эндоцитоза, опосредуемого при активации рецептора ЭФР? Может ли EEA1-белок являться маркером для эндоцитоза при активации других рецепторов, отличающихся по своей структурно-функциональной организации от рецептора ЭФР, а также для эндоцитоза, который запускается при активации рецептора ЭФР, но лигандами, отличными от ЭФР, например, трансформирующим фактором роста?

2. Малый G-белок Rab4 является важнейшим маркером эндосом на стадии раннего рециклирования. Присутствует ли этот белок на EEA1-позитивных эндосомах? Поскольку имеются данные о том, что Rab4 локализуется в основном в тубулярных выростах ранних эндосом, которые подвергаются рециклизации, а Rab5 – в везикулярной их части, которая направляется к местам деградации, то каков молекулярный механизм, позволяющий осуществить сегрегацию Rab4- и Rab5-позитивных участков на поверхности эндосом и определить их дальнейшую судьбу в клетке?

3. Каков механизм привлечения ГТФазного белка Rab7 в эндосому, содержащую ЭФР и его рецептор? Поступает ли Rab7 в EEA1/Rab5-позитивные эндосомы из цитозоля или путем слияния Rab7-позитивных эндосом с EEA1/Rab5-позитивными эндосомами? Насколько Rab5/Rab7 конверсия специфична для эндоцитоза, опосредуемого при активации рецептора ЭФР?

4. При проведении иммуноэлектрофореза, какие белки использовали в качестве референсных белков? Это нигде не отмечено.

Заключение

Диссертационная работа Кошеверовой Веры Владиславовны «Роль EEA1-положительных везикул в эндоцитозе рецептора эпидермального фактора роста и их биогенез», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология», является самостоятельным научно-исследовательским трудом, который посвящен актуальной проблеме современной молекулярной и клеточной биологии, цитологии и гистологии – изучению биогенеза и функционирования везикул, несущих на поверхности белок заякоривания ранних эндосом EEA1. В результате проведенных исследований методом прижизненной съемки были (1)

впервые визуализированы процессы слияния и сегрегации везикул, содержащих ЕЕА1-белок и рецептор ЭФР, в ходе эндоцитоза ЭФР, (2) получены приоритетные данные об участии биосинтетического пути в биогенезе ЕЕА1-положительных везикул, (3) впервые установлено, что стимуляция эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов приводит к увеличению времени жизни ЕЕА1-белка на мембране везикул, (4) впервые показано, что процесс сегрегации можно рассматривать как механизм конверсии малых ГТФаз Rab5 и Rab7. Все вышесказанное позволяет заключить, что по актуальности, новизне поставленных и решенных задач, научному и практическому значению диссертационная работа Кошеверовой Веры Владиславовны «Роль ЕЕА1-положительных везикул в эндоцитозе рецептора эпидермального фактора роста и их биогенез» полностью соответствует основным квалификационным требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Кошеверова Вера Владиславовна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

Заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии,
заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук по научной работе,
доктор биологических наук
по специальности 03.01.04 – Биохимия

08 февраля 2017 г.

А.О. Шпаков

Адрес: 194223, Российская Федерация, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии
наук

Телефон (812) 552-79-01

Email: office@iephb.ru

Сайт института: <http://www.iephb.ru/>



Подпись руки
удостоверяю
зав. канцелярией
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института эволюционной
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук
08.02.2017