

EL DOMINIO C2B DE LA SINAPTOTAGMINA-1 ES UN REGULADOR CLAVE DE LA ESTABILIZACIÓN DE LOS POROS DE FUSIÓN.

Marcelo Caparotta^a, Claudia N. Tomes^{ab}, Luis S. Mayorga^{ab}, Diego Masone^{bc*}

^a Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNCuyo, Mendoza, Argentina

^b Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM-CONICET), UNCuyo, Mendoza, Argentina

^c Facultad de Ingeniería, UNCuyo, Mendoza, Argentina. *E-mail: diego.masone@ingenieria.uncuyo.edu.ar

Resumen

Los poros de fusión conectan organelas intracelulares y liberan contenido vesicular durante la exocitosis. Su formación es termodinámicamente desfavorable y por lo tanto debe ser mediada por proteínas. En este trabajo, hemos desarrollado una coordenada de reacción que genera un poro de fusión partiendo de bicapas lipídicas inicialmente planas y paralelas. La hemos usado para describir los efectos del dominio C2B de la sinaptotagmina-1 durante este proceso y hemos obtenido los perfiles de energía libre. Nuestros resultados apuntan a una región polibásica abundante en lisina del dominio C2B de la sinaptotagmina-1 como la clave para la reorganización de los lípidos a través de la formación de grupos de fosfatidilinositol bifosfato que estabilizan el poro de fusión.

Introducción

La sinaptotagmina-1 (Syt1) es un sensor de baja afinidad de Ca^{2+} que se conecta y penetra la biomembrana para desencadenar fusión de vesículas y liberación de neurotransmisores. Contiene dos dominios C2 (C2A y C2B) con estructuras similares, ambos con lazos de unión de Ca^{2+} . Estos lazos controlan la penetración en las biomembranas que contienen fosfatidilserinas. Además, C2B es conocido por enlazar fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) de manera independiente al Ca^{2+} .

Resultados

Hemos desarrollado por primera vez una coordenada de reacción (ξ') que induce la formación de un poro de fusión. Para ello definimos dos cilindros perpendiculares a los planos de las bicapas (ver figura 1) y realizamos umbrella sampling simultáneamente usando dos coordenadas de reacción: ξ'_1 y ξ'_2 . En consecuencia, dos potenciales independientes con constantes de fuerza k_1 y k_2 fueron aplicados a dos grupos diferentes de beads: Los beads W en el agua intraorganelar y los beads C4 de la cola en las moléculas lipídicas. La primera coordenada de reacción (ξ'_1) reporta la fracción de discos del cilindro interno ocupado por moléculas de agua intraorganelar, definido como todos los beads W por encima y por debajo de las membranas inicialmente planas y paralelas (cian). La segunda coordenada de reacción (ξ'_2) está definida como la fracción de discos ocupados por beads C4A y C4B en las colas de los lípidos (verde), que es utilizada aquí para fusionar las membranas inclinando las moléculas lipídicas y desplazando radialmente el agua citosólica (azul).

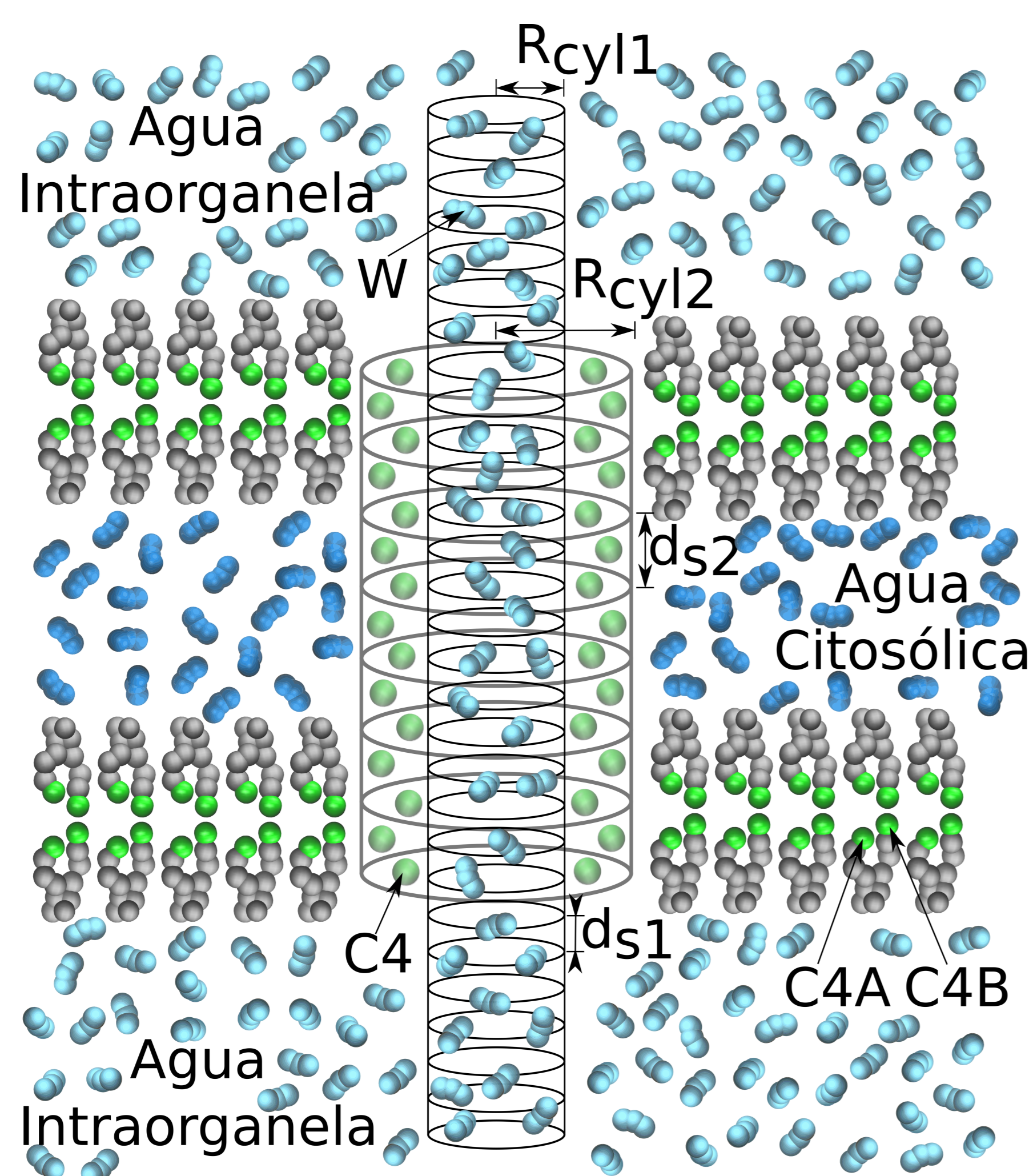


Figura 1: Coordenada de reacción ξ'

Con nuestra coordenada de reacción hemos obtenido perfiles de energía libre para la iniciación de un poro de fusión con y sin el dominio C2B de la sinaptotagmina-1, alcanzando resultados similares en ambos casos. Esto indica que el dominio C2B de la sinaptotagmina-1 no tiene efectos significativos en el proceso de formación del poro de fusión.

Luego, partiendo de un poro de fusión expandido corrimos 10 simulaciones de dinámica molecular sin restricciones de 100 ns cada una en dos casos: con las bicapas solas y con el dominio C2B de la sinaptotagmina-1. En la figura 2, se muestran los promedios de las trayectorias por cada uno de los dos sistemas, graficando el conteo de moléculas lipídicas en la escala de los μs para observar el momento del cierre definitivo del poro.

El poro de fusión expandido permanece abierto en condiciones libres de restricción hasta los 1,1 μs para las membranas solas, mientras que permanece estable por al menos 10 μs para las membranas en presencia de un dominio C2B.

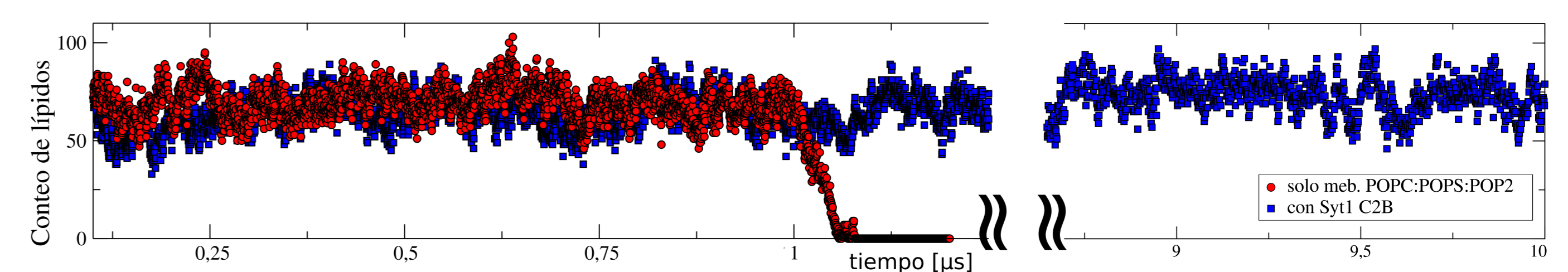


Figura 2: Cierre del poro

Esta diferencia de un orden de magnitud se aclara mediante la descripción de las interacciones lípido-proteína a nivel molecular entre los diferentes grupos de moléculas lipídicas y de proteína. En la figura 3a, hemos usado una función de distribución radial $g(r)$ para cuantificar la coordinación de la región polibásica con las tres especies de lípidos en las bicapas (POPC, POPS, y POP2) como una función de la distancia (r). Notablemente, la mayoría de los lípidos POP2 están en los alrededores ($\sim 0,6nm$) de la región polibásica, señalando que KRLKKKTTIKK coordina fuertemente con los lípidos POP2.

Como una medida práctica del agrupamiento de POP2, la figura 3b muestra el número de contactos ($<0,6nm$) entre beads POP2:POP2 promediado sobre 10 simulaciones libres e independientes desde el poro de fusión expandido. Se puede observar que el poro de fusión con las membranas solas muestra una cantidad significativamente menor de contactos POP2:POP2 (círculos rojos), mientras que son sistemáticamente incrementados en la presencia del dominio C2B (cuadrados azules).

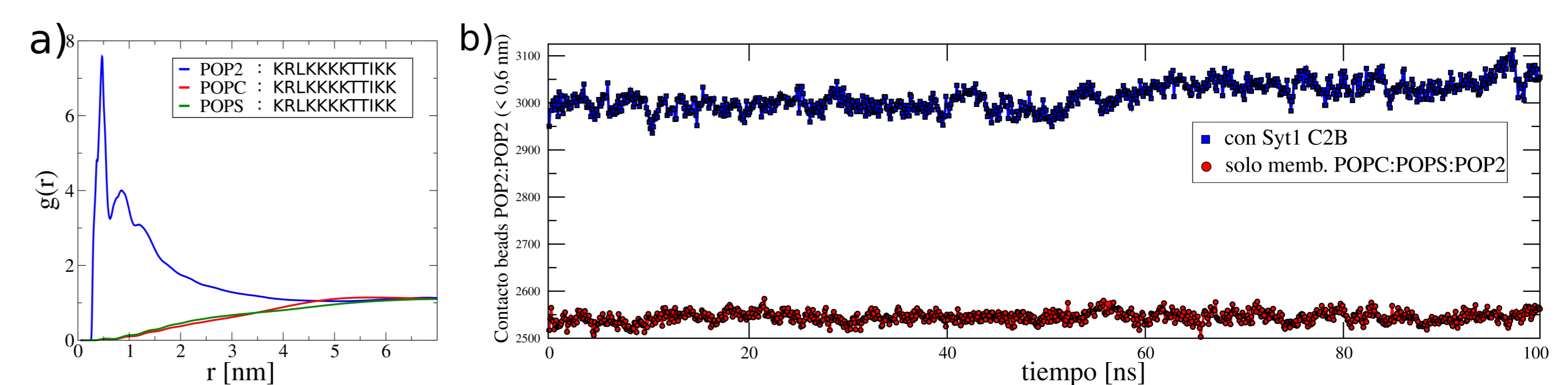


Figura 3: Cuantificación de los efectos del dominio C2B en los lípidos POP2.

Métodos

Todas las simulaciones fueron realizadas con GROMACS-2018.3 bajo el modelo de grano grueso MARTINI. Los perfiles de energía libre se calcularon con umbrella sampling y WHAM.

Conclusiones

Hemos explorado el espacio de fases de la dinámica del poro de fusión a lo largo de (i) la curvatura de membranas, (ii) la fusión de membranas, y (iii) la nucleación usando una coordenada de reacción especialmente diseñada. Hemos demostrado que el dominio C2B de la sinaptotagmina-1 no tiene efecto en la formación del poro de fusión. Sin embargo, expandiendo el poro de fusión, hemos observado cuantitativamente que la región polibásica KRLKKKTTIKK en C2B maneja las interacciones lípido-proteína que inducen la formación de grupos de POP2, los cuales colectivamente estabilizan el poro de fusión expandido.