

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, Universidad Nacional de Cuyo (UNCuyo), Mendoza 5500, Argentina.

^b Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM) – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de Cuyo (UNCuyo), Mendoza 5500, Argentina.

^c Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo (UNCuyo), Mendoza 5500, Argentina, diego.masone@ingenieria.uncuyo.edu.ar

Resumen: Los poros de fusión sirven como un efectivo mecanismo para conectar organelas intracelulares y liberar contenido vesicular durante la exocitosis. Un complejo reordenamiento lipídico tiene lugar a medida que las membranas se aproximan, curvan, fusionan, y establecen un canal de agua para definir el poro de fusión, vinculando compartimentos inicialmente aislados. En este trabajo, hemos desarrollado una coordenada de reacción para inducir poros de fusión a partir de bicapas lipídicas inicialmente planas y paralelas y la hemos usado para describir los efectos del dominio C2B de la sinaptotagmina-1 durante este proceso. Hemos obtenido perfiles de energía libre del proceso completo. Nuestros resultados señalan a la región polibásica rica en lisina del dominio C2B de la sinaptotagmina-1 como la clave para controlar la reorganización lipídica a partir de la formación de grupos de fosfatidilinositol bifosfato, los cuales estabilizan el poro de fusión.

Palabras claves: *vesículas, lípidos, moléculas, membranas, dinámica molecular.*

2000 AMS Subject Classification: 92-08 - 92C40

1. INTRODUCCIÓN

La fusión y poración de membranas han sido ampliamente estudiadas por medios computacionales [1], [2], [3], [4] y experimentales [5]. Las simulaciones computacionales son particularmente adecuadas para estudiar estados transitorios y metaestables (como la hemifusión) como pasos intermedios previos a la configuración final permanente.

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 [6]. 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 [7]. Además, C2B es conocido por enlazar fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) de manera independiente al Ca^{2+} [8]. Consecuentemente, el dominio C2B de la sinaptotagmina-1 es conocido como una máquina de enlace de fosfolípidos [9] y ha sido relacionado a la deformación de membranas, fusión de vesículas sinápticas [10], apertura de poro de fusión [11], estabilización [12], y expansión [13].

El tamaño relativamente largo de los lípidos PIP_2 y su estructura erecta les permite sobresalir más a la fase acuosa que muchos otros fosfolípidos [14]. Los PIP_2 están involucrados en la regulación de una variedad de procesos celulares, como tráfico de vesícula sináptica [15], exocitosis, endocitosis, y activación de enzimas [14], [16].

En particular, parches polibásicos (similares a KRLKKKTTIKK, posiciones 321-332 en el dominio C2B de la sinaptotagmina-1 de rata, PDB ID: 1k5w) han sido sugeridos como aglutinadores de lípidos PIP_2 [17].

En este trabajo, hemos usado simulaciones computacionales para imitar organelas biológicas intracelulares a medida que se aproximan, fusionan, y conectan entre ellas a través de un poro de fusión. Introduciendo por primera vez una coordenada de reacción que induce la formación de un poro de fusión, hemos obtenido perfiles de energía libre para la iniciación de un poro de fusión. Para ello, hemos modificado la implementación original de la coordenada de reacción ξ de Hub y Awasthi [3], la cual induce un poro hidrofílico en una única bicapa lipídica. Nuestra versión modificada de ξ , definida como ξ' desde ahora en adelante, induce dos membranas inicialmente planas y paralelas a curvarse, fusionarse, y forma un fino canal hidrofílico atravesándolas para establecer el poro de fusión.

En biología computacional, el muestreo mejorado ha sido ampliamente utilizado para estudiar configuraciones de interés que son en general difíciles de alcanzar mediante dinámicas estándar [18]. Métodos populares y nuevos para la estimación de energía libre son, desafortunadamente, altamente dependientes de la correcta formulación de la coordenada de reacción que mejor proyecta la superficie de energía libre multidimensional [19]. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas coordenadas de reacción

describiendo fenómenos colectivos es de gran importancia para guiar simulaciones de dinámica molecular y calcular la energía libre asociada. Así, la descripción precisa de un evento raro (como la formación de un poro de fusión) mediante una expresión matemática es sumamente deseable.

2. COORDENADA DE REACCIÓN DE CILINDROS CONCÉNTRICOS PARA LA FORMACIÓN DEL PORO DE FUSIÓN.

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).

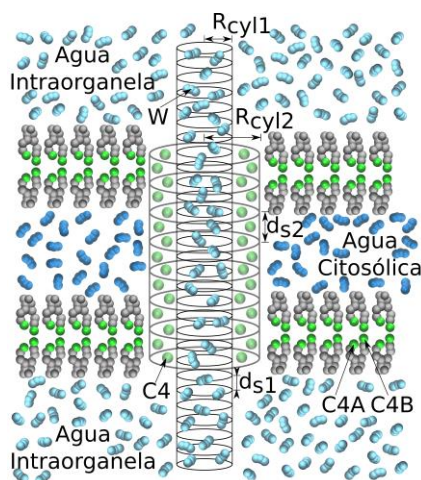


Figura 1: Coordenada de reacción de cilindros concéntricos.

Siguiendo una clasificación orientada a eventos de los diferentes estados del poro de fusión, como se describe en la literatura [2], [20], el proceso para inducir el poro de fusión comienza con dos bicapas separadas planas y paralelas ($\xi' \approx 0,2$). La primera etapa es la curvatura de la membrana ($0,2 < \xi' < 0,7$) con deformaciones localizadas opuestas de las bicapas donde los lípidos en el lugar de fusión comienzan a inclinarse. La segunda etapa es la fusión de membranas para formar el tallo con la exposición mutua de los interiores hidrofóbicos de las membranas ($0,7 < \xi' < 0,9$). La tercera etapa es la nucleación del poro de fusión: como se entiende en termodinámica (con particular interés biológico), nucleación es el primer paso en la formación de una nueva estructura, correspondiente aquí al establecimiento del primer canal de agua que atraviesa la zona de fusión ($0,9 < \xi' < 1$).

3. EL DOMINIO C2B DE LA SINAPTOTAGMINA-1 NO JUEGA UN ROL SIGNIFICATIVO DURANTE LA FORMACIÓN DEL PORO DE FUSIÓN.

Para abordar el problema de descripción de los efectos del dominio C2B de la sinaptotagmina-1 durante la formación del poro de fusión, aplicamos nuestra metodología computacional en un sistema con membranas biológicamente relevantes.

La figura 2b muestra una vista lateral de una toma instantánea de la dinámica molecular de los lípidos solamente con el dominio C2B de la sinaptotagmina-1 entre las bicapas (azul). Todos los beads de los lípidos son negros con PO4, NC3, y GL resaltados en amarillo. La figura 2c muestra las moléculas de agua solamente para las mismas tomas mostradas en (b) con el agua intraorganelar en cian y el agua citosólica en azul.

La figura 2a muestra los perfiles de energía libre para abrir un poro de fusión entre bicapas lipídicas POPC:POPS:POP2 solamente (línea roja) y con el dominio C2B de la sinaptotagmina-1 (línea azul)

con un costo total de ~350kJ/mol 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.

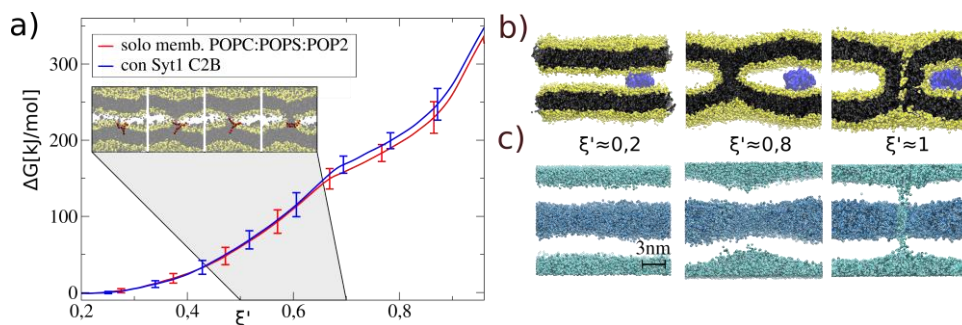


Figura 2: Efecto del dominio C2B de la sinaptotagmina-1 en la energética de la formación del poro de fusión.

4. EL DOMINIO C2B DE LA SINAPTOTAGMINA-1 INDUCE CLÚSTERES DE POP2 QUE ESTABILIZAN EL PORO DE FUSIÓN.

Una cuarta etapa en el poro de fusión es el ensanchamiento del canal de agua que logramos incrementamos el radio de ambos cilindros. Partiendo de este 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 3, 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 μ s 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 μ s para las membranas solas, mientras que permanece estable por al menos 10 μ s para las membranas en presencia de un dominio C2B.

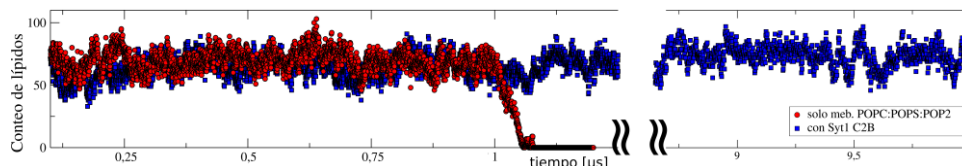


Figura 3: Conteo promedio de lípidos.

Esta diferencia inesperada 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 4a, 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 (~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 4b muestra el número de contactos (<0,6nm) entre beads POP2:POP2 promediado sobre 10 simulaciones libres 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 incrementadas en la presencia del dominio C2B (cuadrados azules).

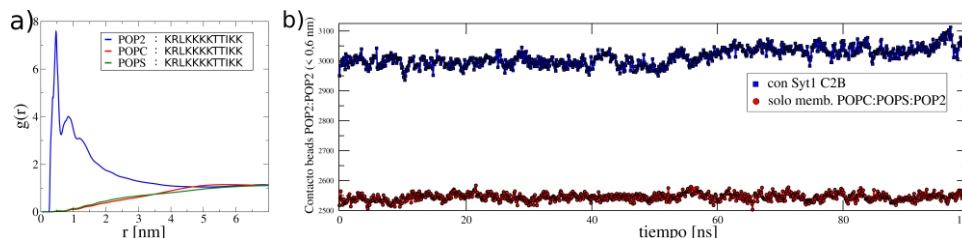


Figura 4: Cuantificación de los efectos del dominio C2B en los lípidos POP2.

5. 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.

AGRADECIMIENTOS

El tiempo de supercomputación para este trabajo fue provisto por el Sistema Nacional de Computación de Alto Desempeño (SNCAD), Iniciativa de Proyectos Acelerados de Cálculo (IPAC). También ayuda recibida de CONICET, ANPCyT y hardware GPU de NVIDIA. Agradecemos al Prof. Jochen Hub por compartir generosamente el código fuente de su coordenada de reacción.

6. REFERENCIAS

- [1] TOLPEKINA, T. V.; DEN OTTER, W. K.; BRIELS, W. J. *Nucleation free energy of pore formation in an amphiphilic bilayer studied by molecular dynamics simulations*. J. Chem. Phys. 2004, 121, 12060.
- [2] SHARMA, S.; LINDAU, M. *Molecular mechanism of fusion pore formation driven by the neuronal SNARE complex*. Proc. Natl. Acad. Sci. 2018, 115, 12751–12756.
- [3] HUB, J. S.; AWASTHI, N. *Probing a Continuous Polar Defect: A Reaction Coordinate for Pore Formation in Lipid Membranes*. J. Chem. Theory Comput. 2017, 13, 2352–2366.
- [4] AWASTHI, N.; HUB, J. S. *Simulations of Pore Formation in Lipid Membranes: Reaction Coordinates, Convergence, Hysteresis, and Finite-Size Effects*. J. Chem. Theory Comput. 2016, 12, 3261–3269.
- [5] BRUNGER, A. T.; CHOI, U. B.; LAI, Y.; LEITZ, J.; ZHOU, Q. *Molecular Mechanisms of Fast Neurotransmitter Release*. Annu. Rev. Biophys. 2018, 47, 469–497.
- [6] BRADBERRY, M. M.; BAO, H.; LOU, X.; CHAPMAN, E. R. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate drives Ca²⁺-independent membrane penetration by the tandem C₂ domain proteins synaptotagmin-1 and Doc2 β* . J. Biol. Chem. 2019, 10942.
- [7] RHEE, J.-S.; LI, L. Y.; SHIN, O.-H.; RAH, J.-C.; RIZO, J.; SUDHOF, T. C.; ROSENKUND, C. *Augmenting neurotransmitter release by enhancing the apparent Ca²⁺ affinity of synaptotagmin 1*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005, 102, 18664–18669.
- [8] VAN DEN BOGAART, G.; THUTUPALLI, S.; RISSELADA, J. H.; MEYENBERG, K.; HOLT, M.; RIEDEL, D.; DIEDERICHSEN, U.; HERMINGHAUS, S.; GRUBMÜLLER, H.; JAHN, R. *Synaptotagmin-1 may be a distance regulator acting upstream of SNARE nucleation*. Nat. Struct. Mol. Biol. 2011, 18, 805–812.
- [9] FERNANDEZ, I.; ARAÇ, D.; UBACH, J.; GERBER, S. H.; SHIN, O.-H.; GAO, Y.; ANDERSON, R. G. W.; SÜDHOF, T. C.; RIZO, J. *Three-Dimensional Structure of the Synaptotagmin 1 C2B-Domain: Synaptotagmin 1 as a Phospholipid Binding Machine*. Neuron 2001, 32, 1057–1069.
- [10] WANG, S.; LI, Y.; MA, C. *Synaptotagmin-1 C2B domain interacts simultaneously with SNAREs and membranes to promote membrane fusion*. eLife 2016, 5, No. e14211.
- [11] LAI, Y.; LOU, X.; DIAO, J.; SHIN, Y.-K. *Molecular origins of synaptotagmin 1 activities on vesicle docking and fusion pore opening*. Sci. Rep. 2015, 5, 9267.
- [12] ROGGERO, C. M.; DE BLAS, G. A.; DAI, H.; TOMES, C. N.; RIZO, J.; MAYORGA, L. S. *Complexin/Synaptotagmin Interplay Controls Acrosomal Exocytosis*. J. Biol. Chem. 2007, 282, 26335–26343.
- [13] BENDAHDANE, M.; BOHANNON, K. P.; BRADBERRY, M. M.; RAO, T. C.; SCHMIDTKE, M. W.; ABBINENI, P. S.; CHON, N. L.; TRAN, S.; LIN, H.; CHAPMAN, E. R.; ET AL. *The synaptotagmin C2B domain calcium-binding loops modulate the rate of fusion pore expansion*. MBoC2018, 29, 834–845.
- [14] MCLAUGHLIN, S.; WANG, J.; GAMBHIR, A.; MURRAY, D. *PIP 2 and proteins: interactions, organization, and information flow*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2002, 31, 151–175.
- [15] MORALES, K. A.; IGUMENOVA, T. I. *Synergistic effect of Pb(2+) and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on C2 domain-membrane interactions*. Biochemistry 2012, 51, 3349–3360.
- [16] DAS, D.; BAO, H.; COURTNEY, K. C.; WU, L.; CHAPMAN, E. R. *Resolving kinetic intermediates during the regulated assembly and disassembly of fusion pores*. Nat. Commun. 2020, 11, 231.
- [17] WU, Z.; MA, L.; ZHU, J.; COURTNEY, N.; ZHANG, Y.; CHAPMAN, E. R.; KARATEKIN, E. *A Polybasic Patch on Synaptotagmin-1 C2A Domain is Essential for Evoked Release and Dilatation of Fusion Pores*. Biophys. J. 2020, 118, 400a.
- [18] SALVALAGLIO, M.; PEREGO, C.; GIBERTI, F.; MAZZOTTI, M.; PARRINELLO, M. *Molecular dynamics simulations of urea nucleation from aqueous solution*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2014, 112, E6–E14.
- [19] SALADINO, G.; GAUTHIER, L.; BIANCIOTTO, M.; GERVASIO, F. L. *Assessing the Performance of Metadynamics and Path Variables in Predicting the Binding Free Energies of p38 Inhibitors*. J. Chem. Theory Comput. 2012, 8, 1165–1170.
- [20] COHEN, F. S.; MELIKYAN, G. B. *The Energetics of Membrane Fusion from Binding, through Hemifusion, Pore Formation, and Pore Enlargement*. The Journal of Membrane Biology 2004, 199, 1–14.