

Структурная организация синаптоагмина-1 и его взаимодействие с мембранами: новые данные от крио-электронной микроскопии

Научный руководитель – Баурина Марина Михайловна

Кочетова Эвелина Сергеевна

Студент (магистр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра клеточной биологии и гистологии, Москва, Россия

E-mail: evelina_kochetova@mail.ru

Синаптоагмин-1, ключевой трансмембранный белок в синаптических окончаниях нейронов, играет важную роль в экзоцитозе, облегчая слияние пузырьков при высвобождении нейротрансмиттера [1]. Принято считать его основным кальциевым сенсором, который активирует белки SNARE и способствует слиянию мембран нейронов [2]. Синаптоагмин-1 состоит из двух доменов - C2A и C2B, способных связываться с кальцием и другими молекулами на мембране пузырьков. Домен C2B является основным энергетическим драйвером, а C2A - посредником в этом процессе. Создание модели взаимодействия синаптоагмина-1 с везикулами, в том числе в присутствии ионов Ca^{2+} , методом крио-электронной томографии необходимо для разработки лекарственных препаратов направленного действия без значительных побочных эффектов при изучении заболеваний, которые воздействуют на нейронную передачу сигналов в организме человека.

В ходе работы разработана новая методика пробоподготовки полноразмерного синаптоагмина-1 для исследования на TITAN KRIOS. Для трансформации плазмидной ДНК нами использовались компетентные клетки BL21- GOLD(DE3). Создание нового протокола экспрессии, инкубации и многоступенчатой очистки синаптоагмина-1 с использованием метода аффинной хроматографии позволило подготовить не агрегированные образцы для дальнейшего соединения с комплексами нанодисков: MSP1D1 Δ H4-6, MSP2N2 и MSP1D1 Δ H5. Подготовленные нами белковые комплексы использовались для 3D-реконструкцию атомных моделей Syt-1 в разрешении до 1 нм с помощью молекулярной динамики и крио-электронной томографии. В процессе работы создана программа для анализа данных с крио-электронного микроскопа, позволяющая получать объёмные конструкции белковых структур с минимальными шумами и высокой точностью.

По результатам работы получены модели Syt-1 в свободном состоянии, в состоянии связанном с нанодиском, в состоянии связанном с нанодиском и кальцием. Показано, что Syt-1 имеет высокую гибкость и может принимать различные конфигурации в зависимости от окружения. Обнаружено, что кальций стабилизирует домены C2 Syt-1 и способствует их приближению к мембране везикула. Планируется проведение расширенной оценки полученных крио-электронных данных конфигураций комплекса с полноразмерным синаптоагмином-1.

Источники и литература

- 1) Anthony A. Bui, Faraz M. Harsini, Anne M. Rice, Souvic Karmakar, Kerry Fuson, R. Bryan Sutton. Domain Stability and Functional Analysis at the AD3 Locus of Synaptotagmin 1 C2 Domains. Biophysical Journal, 2019. 2610-Pos
- 2) Clémence Gruget, Oscar Bello, Jeff Coleman, Shyam S. Krishnakumar, Eric Perez, James E. Rothman, Frederic Pincet and Stephen H. Donaldson. Synaptotagmin-1 membrane binding is driven by the C2B domain and assisted cooperatively by the C2A domain. Scientific Reports, 2020. volume 10, Article number: 18011

Иллюстрации

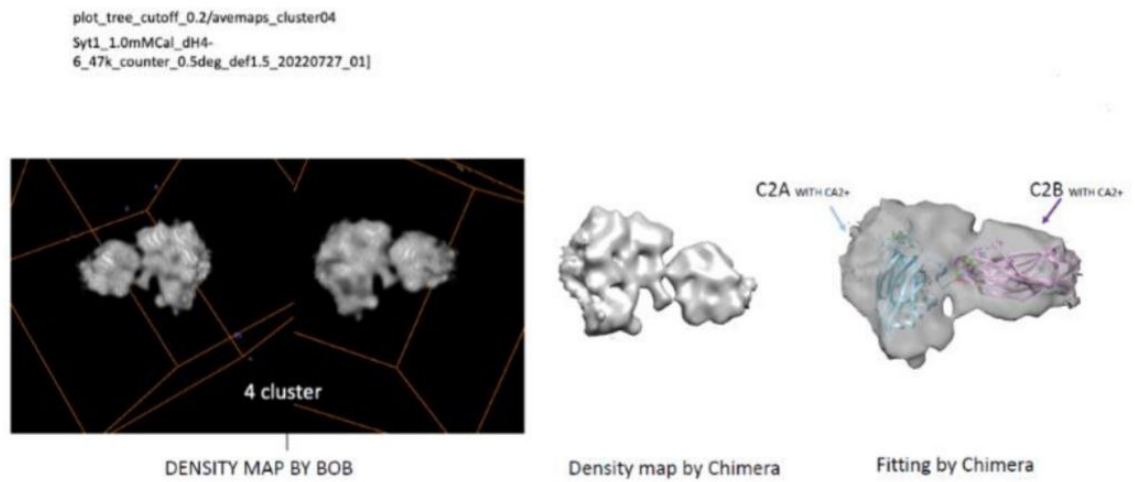


Рис. : Реконструированная модель синаптоагмина-1 в свободном состоянии.

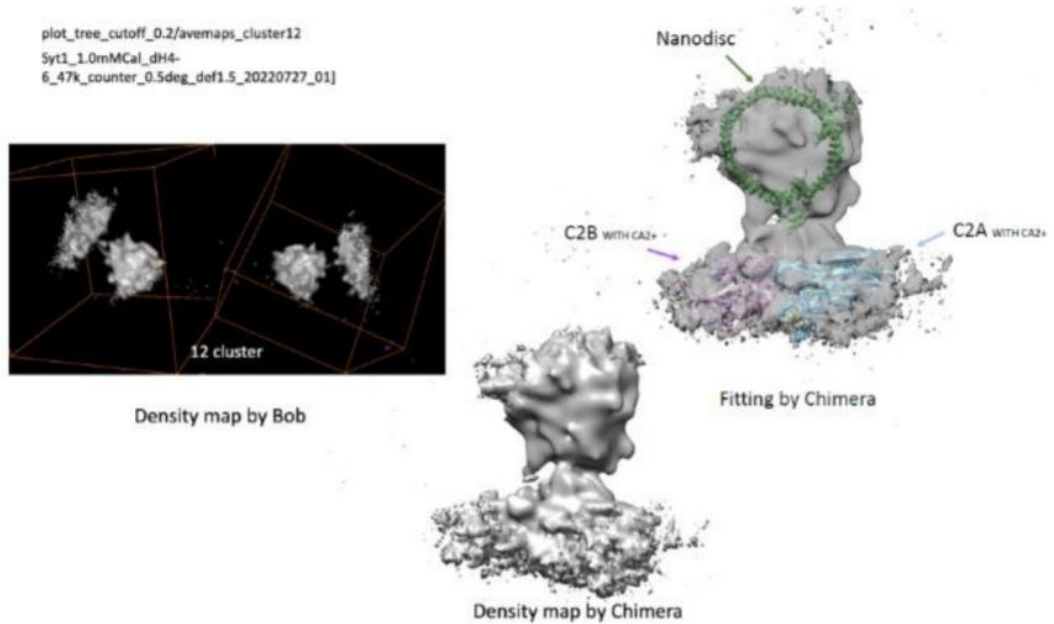


Рис. : Реконструированная модель синаптоагмина-1 в связанном с нанодиском состоянии.