

*Т. Н. Муругова, Ю. Л. Рижиков,  
А. И. Иванов, А. В. Власов,  
А. И. Куклин, В. И. Горделий*

## **Механизмы кристаллизации мембранных белков в «бицеллах»**

Мембранные белки играют важную роль в процессах, проходящих в живых клетках, таких как перенос ионов через мембрану, преобразование энергии и передача сигнала. Треть человеческого генома кодирует именно мембранные белки. Из-за своей важной роли в физиологии человека мембранные белки являются мишенями около 60% используемых в настоящее время лекарств. На сегодня наиболее широко применяемым методом получения белковых структур высокого разрешения является рентгеновская кристаллография, для которой необходимы высококачественные белковые кристаллы. Однако кристаллизация мембранных белков до сих пор сложная задача. Уникальные структуры мембранных белков составляют лишь ~1% всех имеющихся в базе PDB уникальных белковых структур высокого разрешения.

---

*T. N. Murugova, Yu. L. Ryzhykau,  
O. I. Ivankov, A. V. Vlasov,  
A. I. Kuklin, V. I. Gordeliy*

## **Mechanisms of Membrane Protein Crystallization in “Bicelles”**

Membrane proteins (MPs) play an essential role in living cell processes such as ion transport across the membrane, energy conversion, and signal transduction. One-third of the human genome encodes membrane proteins. Due to their significant role in human physiology, membrane proteins are the targets of about 60% of currently used drugs. To date, the most widely used method for obtaining high-resolution protein structures is X-ray crystallography, which requires high-quality protein crystals. However, the crystallization of membrane proteins remains a major challenge. Unique structures of membrane proteins account for only ~1% of all available unique high-resolution protein structures.

Чтобы решить эту проблему, в 1996 г. был предложен новый метод кристаллизации мембранных белков в матрице липидной кубической фазы. Этот подход позволил кристаллизовать сложные мембранные белки (например родопсины и рецепторы, связанные с G-белком), кристаллы которых до этого не удавалось получить в течение десятилетий. Этот *in meso* подход нашел свое дальнейшее развитие и был дополнен другими методами и подходами. Например, развились методы кристаллизации в кубической фазе, состоящей из липидов с различными свойствами, кристаллизации из нанодисков на основе белка MSP или полимерсодержащих нанодисков и кристаллизации белков из бицелл.

Бицеллы формируются определенными смесями липидов и детергентов и представляют собой дискообразные частицы. Ядром этих дисков является липидный бислой, который по краям окружен детергентным ободком. Бицеллы таким образом имитируют клеточную мембрану и прекрасно стабилизируют мембранные белки в водных растворах.

В 2002 г. был впервые представлен новый метод кристаллизации мембранных белков, основанный на бицеллярных липидно-детергентных системах. С тех пор с помощью этого подхода было кристаллизовано несколько важных мембранных белков. Тем не менее

механизм процесса кристаллизации до сих пор остается неясным и применение этой методики на практике опирается в основном на опыт, полученный путем проб и ошибок.

Часто используемый термин кристаллизация из бицелл может означать только то, что исходная кристаллизационная матрица представляет собой жидкую фазу, состоящую из бицелл, мембранных белков (окруженных мембранной системой, имитирующей биологическую мембрану) и буфера. Однако неизвестно, что происходит с кристаллизационной матрицей после начала кристаллизации (при добавлении пресипитата) и каково ее фазовое состояние (структура) в процессе роста кристаллов.

Ученые из ЛНФ ОИЯИ и МФТИ совместно с коллегами из европейских институтов с помощью малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей исследовали эволюцию структуры кристаллизационного матрикса от начального бицеллярного состояния до конечного гелеподобного, в котором начинается формирование белковых кристаллов [1]. Эксперименты проводились на спектрометре ЮМО (реактор ИБР-2, ОИЯИ), спектрометре Rigaku (МФТИ) и спектрометре BM-29 (ESRF, Гренобль, Франция).

To overcome the challenge, a new method, i.e., MP crystallization in the lipid cubic phase (LCP) matrix, was introduced in 1996. This approach allowed crystallization of challenging MPs (e.g., rhodopsins and G protein-coupled receptors) that have resisted crystallization with the standard vapor diffusion methods for decades.

The *in meso* crystallization approach was further developed and expanded with other methods and tools, e.g., the utilization of lipids with varied properties to create the LCP matrix, crystallization from MSP-based or polymer-bounded nanodiscs, and crystallization from bicelles.

Earlier, bicelles were introduced as a membrane mimicking model potentially superior to micelles. It was shown that some mixtures of lipids and detergents form disc-shaped particles, with a lipidic bilayer, a core, and a detergent-stabilized rim providing a stabilizing environment for MPs by mimicking native cellular membranes.

In 2002, for the first time, a new method for crystallizing membrane proteins based on bicelle forming lipid/detergent systems was presented. Since that time, several important membrane proteins have been crystallized by this approach. Nevertheless, this method, whose mechanism is still unclear, only relies on exhaustive trials and errors. The

often-used term “crystallization from bicelles” may only mean that the initial crystallization matrix is a liquid phase comprising of bicelles, membrane proteins (surrounded by native membranes or membrane mimicking systems), and buffer. However, what happens with the crystallization matrix after the initiation of crystallization (upon adding precipitant) and what the phase state (structure) is when crystals grow is not known.

Scientists from the Frank Laboratory of Neutron Physics of JINR and Moscow Institute of Physics and Technology, together with colleagues from European institutes performed the small-angle X-ray and neutron scattering studies of structural evolution of the crystallization matrix from the initial bicelle to the final jelly-like state where MP crystals grow [1]. The experiments were carried out on the YuMO spectrometer (IBR-2 reactor, JINR), the Rigaku spectrometer (MIPT), and the BM-29 spectrometer (ESRF, Grenoble, France).

Since standard crystallization tools (such as sitting drop or hanging drop) are not suitable for simultaneous performing small-angle experiments, an equivalent crystallization procedure in glass capillaries was developed (Fig. 1). The bacteriorhodopsin (BR) from *Halobium*

Поскольку стандартные методики кристаллизации (такие как сидячая капля или висючая капля) не подходят для проведения экспериментов по малоугловому рассеянию, была разработана эквивалентная процедура кристаллизации в стеклянных капиллярах (рис. 1). В качестве мембранного белка был взят бактериородопсин из *Halobium salinarum*. Процедура кристаллизации состояла из следующих шагов: шаги 1, 2 — приготовление кристаллизационной системы и создание условий для роста кристаллов, шаг 3 — запечатывание кристаллов с помощью воска, шаг 4 — наблюдение за ростом кристаллов бактериородопсина. В течение этапов 2–4 наблюдение за структурными параметрами кристаллизационного матрикса и ростом кристаллов проводилось в режиме реального времени с использованием малоуглового рассеяния.

В отличие от существующей парадигмы эксперименты по малоугловому рассеянию показали, что зарождение белковых кристаллов происходит после формирования гелеподобной фазы, которая является бицеллярной только на начальных этапах экспери-

мента, а затем она формирует лентоподобные взаимосоединенные ламеллы. Соединение ламелл между собой помогает белку мигрировать между мембранами к месту формирования и роста кристаллов (рис. 2). Процесс кристаллизации начинается с жидкой смеси пурпурных мембран и бицелл. На начальном этапе при испарении воды из кристаллизационной системы концентрация бицелл и пурпурных мембран значительно возрастает. Затем бицеллы сливаются в лентоподобные ламеллы. Этот процесс сопровождается растворением пурпурных мембран в этих ламеллах. Ленты формируют гелеподобную фазу, которая является главным компонентом кристаллизационной системы, в которой появляются и растут белковые кристаллы. Однако, помимо формирования лент, в системе появляются и другие интересные структуры: ламеллярная фаза  $L_\alpha$ , нематическая фаза («phase 500–700 Å») и локальная ламеллярная фаза  $L_{\text{cryst}}$  (рис. 2). Фаза  $L_\alpha$  представляет собой мультиламеллярную липидную фазу, появляющуюся вследствие слияния лентоподобных структур. Количество этой фазы растет по мере умень-

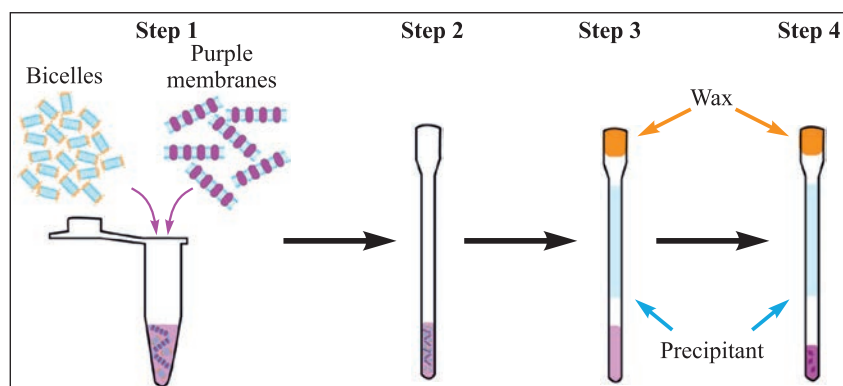


Рис. 1. Схематическое представление экспериментальных этапов кристаллизации бактериородопсина в капиллярах с использованием метода кристаллизации в бицеллах

Fig. 1. Schematic representation of the experimental stages of crystallization of bacteriorhodopsin in bicelles within capillaries

*salinarum* was taken as a membrane protein. The crystallization procedure consisted of the following steps: steps 1, 2 — preparation of the crystallization system and crystallization conditions; step 3 — sealing the capillary with wax; step 4 — monitoring of the formation of the bacteriorhodopsin crystals. During steps 2–4, monitoring of the structure of the crystallization system and the growth of the crystals was performed using real-time small-angle scattering.

In contrast to the existing paradigm, this study shows that the jelly-like ribbon state of the “bicelle” crystallization matrix, rather than the initial bicelle, is the state where crystals grow. These lamellar structures are assumed to be interconnected to help proteins migrate from bilayers to the place of the crystal formation which is a necessary condition for the growth of crystals (Fig. 2). The process of crystallization starts with a fluid phase containing a simple mixture of bicelles and purple membranes (PMs). Initially,

the concentration of bicelles and PMs increases due to a decrease in volume of the crystallization matrix upon drying. Then bicelles fuse to ribbons; this process is accompanied by the PM dissolution. Ribbons form a jelly-like phase, which is the main component of the crystallization matrix during the appearance and growth of BR crystals. However, between the appearance of ribbons and crystals, several more types of structural elements appear: the lamellar lipid phase  $L_\alpha$ , the “phase 500–700 Å”, and the local lamellar phase  $L_{\text{cryst}}$  (Fig. 2). Phase  $L_\alpha$  corresponds to multilamellar lipid membranes appearing due to the fusion of ribbons. The amount of  $L_\alpha$  increases simultaneously with a slow decrease of ribbon concentration. The “phase 500–700 Å” presents a high-ordered structure with a lattice parameter equal to or even higher than the length of ribbons. We suppose that such structures can correspond to smectics or cholesterics (chiral nematics). The exact role of this high-ordered structure for the protein crystallization

шения количества лентоподобных структур в системе. Фаза «500–700 Å» представляет собой высокоупорядоченную систему с большим структурным параметром, близким или даже превышающим длину отдельной ленты. Мы предполагаем, что эта структура может иметь смектический или холестерический порядок. Какую роль играет данная структура в процессе кристаллизации, пока остается открытым вопросом. Фаза  $L_{\text{cryst}}$  является мультислойной липидной фазой, появление которой взаимосвязано с появлением зон нуклеации кристаллов. По нашим данным, эта фаза физически связана с поверхностью кристаллов и помогает отдельным белкам диффундировать к месту роста кристалла.

Полученная информация поможет внести больше ясности в понимание процесса кристаллизации мембранных белков *in meso* и использовать результаты в дальнейшем для рационального дизайна лекарственных средств.

### Список литературы

1. Murugova T.N., Ivankov O.I., Ryzhykau Y.L. et al. Mechanisms of Membrane Protein Crystallization in ‘Bicelles’ // Sci. Rep. 2022. V. 12. P. 11109; <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13945-0>.

Рис. 2. Схема, демонстрирующая последовательное появление/исчезновение различных структурных элементов в кристаллизационном матриксе. Оси соответствуют времени, сложности системы (т.е. количеству новых образованных структур) и концентрации соответственно. Концентрация дана в условных единицах и имеет качественный вид зависимости от времени

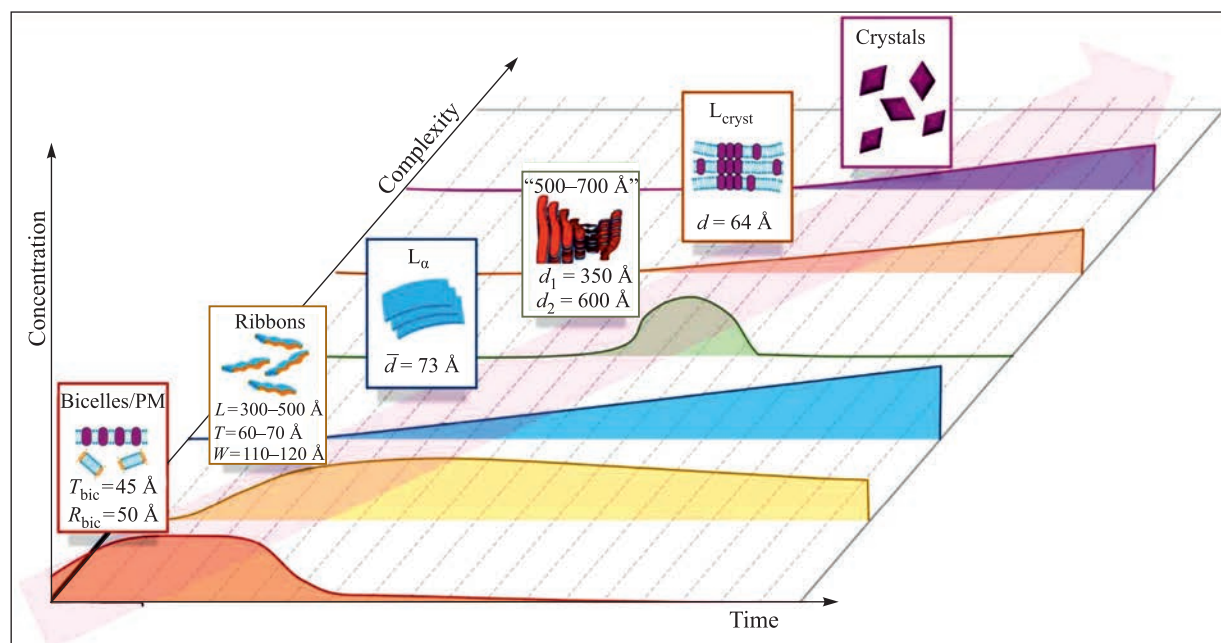


Fig. 2. The scheme demonstrating the evolution of the crystallization matrix and sequential appearance/disappearance of various structural elements. The axes correspond to time, complexity (i.e., number/quantity of the new structural elements that appeared), and concentration, respectively. Concentration is given in arbitrary units (dependencies of concentrations vs time are shown qualitatively)

process is questionable. The phase  $L_{\text{cryst}}$  presents multilayer membranes, the appearance of which is associated with the protein nucleation zones. This phase is connected with the surface of protein crystals and allows the protein to diffuse to the crystal surface.

Our results help to shed more light on *in meso* MP crystallization making it considerably more efficient for structure-based drug design.

### References

1. Murugova T.N., Ivankov O.I., Ryzhykau Y.L. et al. Mechanisms of Membrane Protein Crystallization in ‘Bicelles’ // Sci. Rep. 2022. V. 12. P. 11109; <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13945-0>.