

Mechanisms of membrane protein crystallization in "bicelles"

murugova@jinr.ru

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. One of the method for crystallizing membrane proteins is based on bicelle forming lipid/detergent systems. 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 starting 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.

The small-angle x-ray and neutron scattering were used for studies of structural evolution of the crystallization matrix from the initial bicelle to the final jelly-like state where MP crystals grow [1]. Since standard crystallization tools (such as sitting drop or hanging drop) are not suitable for simultaneous performing small angle experiments, we developed an equivalent crystallization procedure in glass capillaries. The bacteriorhodopsin (BR) from *Halobium Salinarum* was taken as a membrane protein.

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 necessary conditions for the growth of crystals. Between the appearance of ribbons and crystals, several more types of structural elements appear: the lamellar lipid phase, the nematic phase with distances 500–700 Å and the local multilamellar phase. The last is connected the surface of protein crystals and allows the protein to diffuse to the crystal surface.

The described 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* 12, 11109 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13945-0>

Исследование механизма кристаллизации мембранных белков в бицеллярных системах

murugova@jinr.ru

Мембранные белки играют важную роль в процессах, проходящих в живых клетках, таких, например, 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 сегодняшний день наиболее широко используемым методом получения белковых структур высокого разрешения является рентгеновская кристаллография, для которой необходимы высококачественные белковые кристаллы. Однако кристаллизация мембранных белков до сих пор является сложной задачей. Уникальные структуры мембранных белков составляют лишь ~1% всех имеющихся в базе PDB уникальных белковых структур высокого разрешения. Одним из методов кристаллизации мембранных белков является кристаллизация в бицеллярной смеси. С помощью этого подхода было кристаллизовано несколько важных мембранных белков. Тем не менее, механизм процесса кристаллизации до сих пор остается не ясным 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 что происходит с кристаллизационной матрицей после начала кристаллизации (при добавлении пресипитата) и каково её фазовое состояние (структура) в процессе роста кристаллов, неизвестно.

С помощью малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей мы исследовали эволюцию структуры кристаллизационного матрикса от начального бицеллярного состояния до конечного гель-подобного, в котором начинается формирование белковых кристаллов [1]. Поскольку стандартные методики кристаллизации (такие как сидячая капля или висячая капля) не подходят для проведения экспериментов по малоугловому рассеянию, была разработана эквивалентная процедура кристаллизации в стеклянных капиллярах (Рисунок 1). В качестве мембранного белка был взят бактериородопсин (БР) из *Halobium Salinarum*.

В отличие от существующей парадигмы, эксперименты по малоугловому рассеянию показали, что зарождение белковых кристаллов происходит после формирования гель-подобной фазы, которая является бицеллярной только на начальных этапах эксперимента, а затем она формирует лентоподобные взаимосоединенные ламеллы. Соединение ламелл между собой помогает белку мигрировать между мембранами к месту формирования и роста кристаллов. Помимо формирования лент, в системе появляются и другие интересные структуры: ламеллярная фаза, нематическая фаза (с параметром порядка 500–700 Å) и локальная мультиламеллярная фаза, которая 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 сделать более осознанным такой тип кристаллизации для использования результатов 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* 12, 11109 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13945-0>