

**Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
Divisão de Matéria Mole e Biológica
Grupo MANACÁ**

Projeto de Iniciação Científica - Programa PIBIC 2020-2021

Sistemas microfluídicos para cristalografia serial na linha de luz
MANACÁ: modelagem e simulação da fluidodinâmica de cristais de
proteínas

Orientador

Evandro A. de Araújo – Pesquisador

Co-orientador

Ana C. de M. Zeri – Pesquisadora e lider de grupo



CNPEM
Centro Nacional de Pesquisa
em Energia e Materiais

Campinas, São Paulo, 2020

Conteúdo

Resumo	2
1 Introdução	3
1.1 Estado da arte	3
1.1.1 Determinação e análise estrutural de macromoléculas por cristalografia de raios X: dos métodos tradicionais à cristalografia serial	3
1.1.2 Dos sistemas de porta amostras à difusão de substratos	6
2 Justificativa, objetivos e cronograma	8
3 Materiais e Métodos	10
3.1 Simulações de fluidodinâmica	10
3.2 Programação e interface gráfica	11

Resumo

A linha de luz MANACÁ (acrônimo de MACromolecular Micro and Nano CrystAllography) será a primeira estação do Sirius dedicada à difração de raios X para macromoléculas biológicas (MX). Nesta linha de luz Síncrotron será possível a realização de experimentos a partir de métodos convencionais de coleta e processamento de mono cristais e métodos mais recentes vindos da cristalografia serial (SX) dedicados à coleta e processamento de múltiplos cristais. Essa nova abordagem, em si, é complementar à cristalografia tradicionalmente feita atualmente nas fontes de luz Síncrotron por permitir manuseio e a coleta de cristais com dimensões da ordem de microns a sub-microns e analisar a evolução temporal de mudanças estruturais induzidas físico e/ou quimicamente. Entretanto, apesar do constante avanço, um dos desafios no estabelecimento de SX como facilidade padrão aos usuários de MX é o desenvolvimento de sistemas de porta amostras com versatilidade no controle e entrega dos cristais ao ponto de difração. Neste projeto vamos conduzir simulações de fluidodinâmica em sistemas candidatos a porta amostras na linha MANACÁ com carregamento de cristais por microfluídica e analisar os efeitos da difusão dos cristais em meios com diferente viscosidade, assim como os efeitos da difusão de substratos nos cristais de proteínas; além disso, vamos desenvolver uma interface gráfica [a ser integrada à rotina de coleta da linha] que permita ao usuário definir as condições iniciais de sua coleta de dados.

Palavras-chave: Sirius, MANACÁ, cristalografia serial, porta amostras, simulação

1 Introdução

1.1 Estado da arte

O início do século 20 foi marcado pela efervescência no campo da Física e Matemática. Na área de física dos materiais, a observação da difração de raios X por Max von Laue e família **Bragg**[1, 2] tornou possível o estabelecimento da cristalografia como uma das técnicas mais poderosas na análise e determinação da estrutura de materiais. Em especial, quando aplicada a biomoléculas, tem notadamente contribuído para o avanço da biologia estrutural a partir da determinação da estrutura de moléculas de proteínas, entre outras mais; com isso, é possível traçar as relações entre estrutura e função acerca destas macromoléculas e seus complexos no meio biológico. Além disso, com o recente surgimento da SX nas fontes de lasers de elétrons livres (X-ray free electron lasers — XFEL), e mais recente em fontes de luz Síncrotron, é possível analisar a estrutura destas moléculas em condições muito próximas às fisiológicas.

1.1.1 Determinação e análise estrutural de macromoléculas por cristalografia de raios X: dos métodos tradicionais à cristalografia serial

Os avanços em biologia estrutural vêm aumentando cada vez mais nossa capacidade de entender mais profundamente o papel que as macromoléculas desempenham no meio biológico. A maioria destas estruturas foram resolvidas experimentalmente pelo método de cristalografia por difração de raios X (aproximadamente 90%)[3]. isso tem ajudado a racionalizar as estratégias de busca e desenvolvimento de medicamentos para diversas doenças; um exemplo foi a determinação da estrutural

cristalográfica da principal protease [envolvida na invasão da célula humana] do SARS–COV–2 responsável pela pandemia da COVID-19 [4]. Esses avanços são, em grande parte, resultantes do aumento de número e acessibilidade das fontes de luz Síncrotron, em especial às fontes com auto brilho de terceira e quarta geração[5, 6].

Por outro lado, a dificuldade em obter cristais bem ordenados com dimensões da ordem de algumas dezenas de microns tolerante a altas doses de radiação são importantes limitações desta técnica; em geral, à medida que se tem um feixe de raios X com fluxo de alta densidade, mais energia é depositada por unidade de área do cristal, significando que os danos por radiação serão ainda mais proeminentes[7]. Entretanto, isso é quase negligenciável para cristais menores que 10 μm [7]; além disso, a difração de cristais com dimensões equivalentes às do feixe de raios X tem como efeito a otimização da relação entre sinal e ruído[8, 9]. Esses fatores tornam possível a coleta de cristais cada vez menores[10] e a consequente implementação de novas técnicas, tais como cristalografia serial em fontes XFELs[11, 12, 13] e Síncrotron[14, 15].

Tomando como premissa a hipótese da “difração antes da destruição” do cristal de proteína[16], o surgimento da cristalografia serial aplicada à determinação de estrutura de proteínas foi impulsionado pelo desenvolvimento das fontes de lasers de elétrons livres dedicadas à produção de raios X (XFELs) inicialmente em Stanford no LCLS (Linac Coherent Light Source) e logo em seguida em outros países como Alemanha (CFEL), Suíça (SwissFEL), Japão (SACLA-XFEL) e Coreia (PAL-XFEL). Nestas fontes, a aquisição única e quase instantânea do padrão de difração de cada cristal em uma dada orientação tem o menor acú-

mulo de dano por radiação[16, 11, 12].

Experimentalmente, cada cristal é atingido uma única vez pelos pulsos de raios em intervalos de femtossegundo, acarretando em doses muito baixas de radiação para causar danos estruturais significativos aos cristais, já que estes são dinamicamente substituídos toda vez que há espalhamento; isso tem aberto a possibilidade para experimentos de difração de cristais com dimensões da ordem de microns a nanômetros [a maioria das proteínas cristalizam em cristais de tamanhos dessa ordem][16, 17] e observar a dinâmica estrutural de proteínas em temperatura ambiente [importante para os cristais que não são adequados para serem congelados] em tempos ultracurtos [permite observar processos cinéticos quase em tempo real][18, 19, 20] nunca antes acessados por métodos cristalográficos tradicionais. Como resultado, a estrutura completa de uma molécula pode ser obtida pelo mergeamento de dados dos múltiplos cristais, podendo assim obter “um filme tridimensional” das mudanças estruturais que ocorrem durante a interação de uma proteína com seu ligante[21, 22] ou de intermediários enzimáticos[23, 20].

O uso pioneiro destas fontes de luz traz consigo uma nova era para a determinação e análise estrutural de macromoléculas biológicas por cristalografia de raios X; contudo, a escassez e o custo do tempo de feixe limitam fortemente o acesso às estações de XFEL. Felizmente, os conceitos e métodos envolvidos nessas fontes de luz têm sido estendidos com sucesso às fontes de luz Síncrotron, inaugurando a chamada cristalografia serial em fontes de luz Síncrotron (SSX)[15, 24, 25, 26]; além disso, a popularização do acesso a essas facilidades, vem permitindo também determinar a estrutura tridimensional da maioria das proteínas biologicamente relevantes.

Esta abordagem cristalográfica usando luz Síncrotron tem vantagens inerentes deste tipo de instrumento. É possível estudar a dinâmica de alguns sistemas com resolução temporal da ordem de milissegundos a segundos, assim como controlar a captura das estruturas intermediárias formadas durante a interação de uma enzima com seu substrato[25, 26]; permite a coleta de dados de cristais com alta taxa de indexação e controle do tempo de exposição aos raios X, sejam eles mantidos estáticos ou em fluxo durante a aquisição de dados [25, 26, 15, 24]; permite o baixo consumo de amostras (poucos microlitros), controle da quantidade de ligantes (poucos picolitros), difusão e teste em larga escala também [25, 26, 27]; o controle da dose de radiação[28] e temperatura de aquisição dos dados[15, 25] e; além disso, a qualidade dos dados e resultados são comparáveis aos obtidos nas fontes de XFEL[24, 26].

1.1.2 Dos sistemas de porta amostras à difusão de substratos

Entretanto, tanto em fontes luz de XFEL quanto em Síncrotron, o efetivo desenvolvimento da SX depende fortemente dos sistemas de hardware e software dedicados ao processamento de dados, assim como da padronização de tecnologias experimentais[29]. Em particular às técnicas experimentais, a expansão e sistematização da SX é afetada principalmente pela falta de padronização dos sistemas de porta amostras e preparação das amostras de cristais, assim como do controle na difusão de cristais nos sistemas de carreamento ou do tempo de difusão dos ligantes nos cristais. Os sistemas de porta amostras podem ser classificados em duas categorias: i) com processo de migração de cristais e ii) sem migração de cristais em relação ao dispositivo de entrega], nomeadamente sistema de amostras em fluxo e sistema de amostras

fixas[30, 31, 29], respectivamente.

Nos sistemas de amostras fixas os cristais estão em um suporte que, em geral, são movimentados em frente ao feixe de raios X durante o experimento de difração. Esses sistemas são os mais comumente implementados nas estações experimentais de luz Síncrotron que oferecem esse tipo de facilidade aos usuários; em muitos casos se mostram versáteis, eficiente e com baixo consumo de amostra. Entretanto, são limitados para aplicações em experimentos resolvidos no tempo [dificilmente o tempo de mistura e difusão do substrato no cristal são controlados exatamente].

Já nos sistemas de “entrega” em fluxo, os cristais são continuamente atingidos pelo feixe de raios X, onde os cristais difratados são renovados com uma dada taxa de tempo [ajustados pelo operador]; tipicamente precisam incluir um meio de carregamento [com alta ou baixa viscosidade] de baixo espalhamento de luz [mantendo os cristais hidratados e continuamente entregues até o ponto de interseção com os raios X].

A implementação destes dispositivos precisa, necessariamente[30, 31, 29]: minimizar o estresse mecânico e químico dos cristais; maximizar a relação sinal/ruído dos picos de difração; minimizar o espalhamento do meio carreador e das janelas por onde passam os raios X; minimizar o consumo de amostras; permitir automação e padronização; permitir estabilidade da amostra; permitir a mistura e difusão rápida dos cristais no meio carreador e/ou do substrato no interior dos cristais.

Os sistemas de entrega de cristais em fluxo mais promissores [em parte suprem demandas citadas acima] são os com carregamento por microfluídica[30, 31, 29]: permitem o controle da pressão e fluxo dos líquidos, assim como modular o diâmetro do “jato” de cristais ao longo

dos canais microfluídicos do porta amostras; permite ainda fazer a entrega dos cristais com fluxo estável e prevenir o entupimentos dos canais; eliminam a deposição de cristais na parede do porta amostras e a formação de bolhas; ainda, são versáteis em ambientes à pressão atmosférica ou em vácuo. Além destas vantagens, esses dispositivos podem ser fabricados com baixo custo, precisão e reprodutibilidade, permitindo a rápida acessibilidade nas estações experimentais de cristalografia de proteínas.

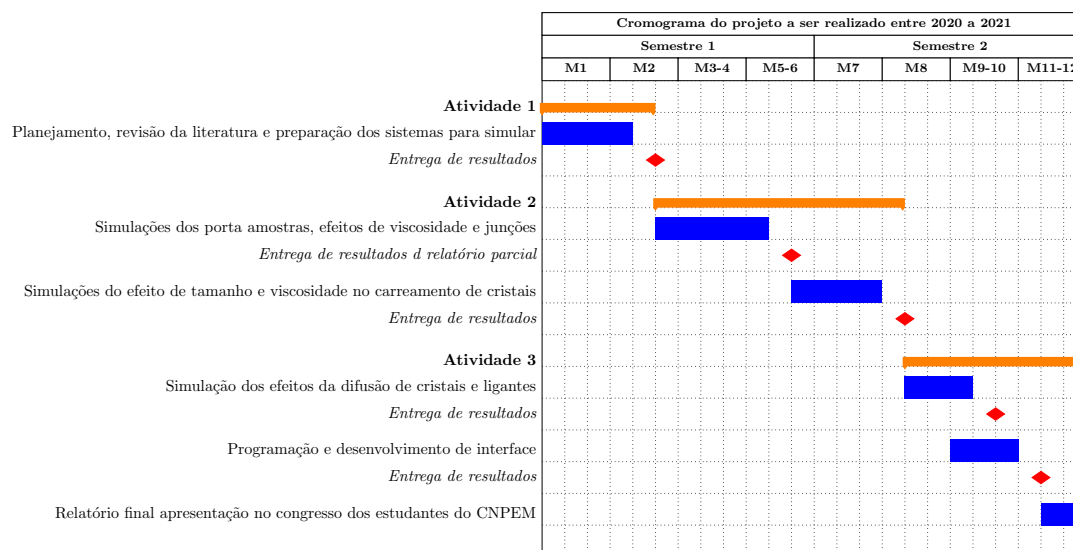
2 Justificativa, objetivos e cronograma

O Sirius é nova fonte de luz Síncrotron de quarta geração brasileira nascida da experiencia de sucesso com a fonte UVX a partir dos anos 90 até 2019 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). O Sirius abrigará modernas e inovativas estações experimentais abertas à comunidade científica nacional e internacional, dentre as quais inclui-se a linha de luz MANACÁ. Essa é uma das linhas de luz do Sirius otimizada para micro e nano feixes de raios X comportando duas estações experimentais [estação micro e estação nano] dedicadas a cristalografia por difração de raios de macromoléculas biológicas a partir de métodos de coleta e processamento de dados convencionais e métodos mais recentes vindos da cristalografia serial.

Atualmente os métodos de cristalografia serial na MANACÁ estão em fase de planejamento e testes de alguns protótipos. Dentre estes, estamos desenvolvendo um sistema de porta amostras com microfluídica que fará parte das facilidades da linha que serão oferecidas aos usuários. Este projeto faz parte de um trabalho maior voltado ao estudo

e desenvolvimento de instrumentação para cristalografia serial [tanto na estação micro quanto na estação nano] da linha de luz MANACÁ no Sirius. Em particular, nosso porta amostras terá um sistema de carregamento em co-fluxo duplo para entrega e co-focalização dos cristais. Para isso, neste projeto nós pretendemos realizar estudos da fluidodinâmica e difusão nestes portas amostras microfluídicos.

Especificamente, pretendemos: 1) simular os efeitos da viscosidade na taxa de carregamento de cristais; 2) simular os efeitos do diâmetro dos canais do sistema microfluídico e o efeito do tipo de junção na mistura do cristal com o ligante; 3) simular a difusão de cristais em líquidos com viscosidades distintas e a taxa de difusão de ligantes no canal de solvente dos cristais. Além disso, 4) pretendemos criar uma interface computacional a ser integrada à rotina de coleta da Manacá que permitirá ao usuário definir as condições iniciais de experimento [fluxo e taxa de difusão] que serão usadas na sua coleta de dados de SSX. O cronograma de execução do projeto ao longo dos 12 meses pode ser visualizado no quadro abaixo.



3 Materiais e Métodos

3.1 Simulações de fluidodinâmica

As simulações serão realizadas usando o pacote de programas *ANSYS* (versão R3 2019) com temperatura (293 *K*) e pressão (1 *atm*) controladas. A geometria dos canais serão obtidas partir do sólido 3D criado no programa *autoCAD* (autoDESK, Inventor 2018).

Os perfis de fluxo laminar serão simulados usando a solução da equação de *Navier-Stokes* (3.1) e equação da continuidade em condições de fluxo contínuo para líquidos incompressíveis (2) [32]:

$$\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} - \nu \nabla^2 \mathbf{u} = -\nabla w + \mathbf{g} \quad (1)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0. \quad (2)$$

As condições de contorno da parede e entrada, assim como velocidade do fluido do nosso sistema serão definidas posteriormente no planejamento das simulações. Adicionalmente, os fenômenos de difusão serão simulados a partir da equação de difusão descrita por *Einstein-Stokes* [33] com coeficiente de difusão dado por $D = \frac{k_B T}{\zeta}$ [onde $\zeta = 6\pi\eta r$ e η a viscosidade do líquido] e equação de convecção dada por $\nabla \cdot (-D\nabla c) - \mathbf{u}\nabla c = R$ [onde D é coeficiente de difusão, R é uma variável do sistema simulado e c é a concentração das partículas do meio]. Além disso, o tempo de difusão de um dado substrato no interior de um cristal de proteína será simulado usando a solução da equação de Fick[34] $\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C$ [onde C é a variável que descreve a concentração do ligante num volume].

3.2 Programação e interface gráfica

A interface gráfica de usuário (IU) será escrita em *JavaScript* aplicando o *framework* **Vue.js** e compilada em uma plataforma executável pelo cliente (usuários). A programação do sistema será feita com o pacote Python (pacote do Python 3), como back-end, e *framework* **vibe.d** desenvolvido em linguagem **D**. A arquitetura da interface permite ao usuário simular rapidamente as pré-condições do experimento a ser realizado na linha de luz [melhor taxa de difusão dos cristais no meio carreador e tempo de difusão do ligante no crista, etc.] tomando parâmetros previamente conhecidos experimentalmente [viscosidade do meio de carreamento e unidades da cela unitária do cristal, etc.].

Na possibilidade de coleta remota, como extensão futura, o software cliente será um aplicativo de interface de usuário (IU) com uma ferramenta de autorização. A troca de dados entre servidor e cliente será implementada usando o domínio **https** ou um software executável de plataforma cruzada independente. Essa arquitetura é flexível e pode atender a muitos clientes ao mesmo tempo, cobrindo vários cenários de uso: cada membro da equipe experimental pode ter acesso independente ao experimento a partir de qualquer local restrito pela política de uso da instalação ou um responsável da linha de luz pode monitorar/ajudar na experiência remotamente.

Referências

- [1] PP Ewald. The theory of the interference of x [U+2010] rays in crystals. *Phys. Z.*, 14:465–472, 1913.
- [2] WL Bragg and JJ Thomson. The diffraction of short electromagnetic waves by a crystal. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 17, 1914.

- [3] Protein data bank archive-information about the 3d shapes of proteins. URL <https://www.rcsb.org/stats/summary>.
- [4] Linlin Zhang, Daizong Lin, Xinyuanyuan Sun, Ute Curth, Christian Drosten, Lucie Sauerhering, Stephan Becker, Katharina Rox, and Rolf Hilgenfeld. Crystal structure of sars-cov-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*, 2020.
- [5] Masaki Yamamoto, Kunio Hirata, Keitaro Yamashita, Kazuya Hasegawa, Go Ueno, Hideo Ago, and Takashi Kumasaka. Protein microcrystallography using synchrotron radiation. *IUCrJ*, 4(5): 529–539, 2017.
- [6] Michael G Rossmann. Serial crystallography using synchrotron radiation. *IUCrJ*, 1(2):84–86, 2014.
- [7] Selina LS Storm, Adam D Crawshaw, Nicholas E Devenish, Rachel Bolton, David R Hall, Ivo Tews, and Gwyndaf Evans. Measuring energy-dependent photoelectron escape in microcrystals. *IUCrJ*, 7(1), 2020.
- [8] Gwyndaf Evans, Danny Axford, and Robin L Owen. The design of macromolecular crystallography diffraction experiments. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4):261–270, 2011.
- [9] Carolin Seuring, Kartik Ayyer, Eleftheria Filippaki, Miriam Barthelmeß, Jean-Nicolas Longchamp, Philippe Ringler, Tommaso Pardini, David H Wojtas, Matthew A Coleman, Katerina Dörner, et al. Femtosecond x-ray coherent diffraction of aligned amyloid fibrils on low background graphene. *Nature communications*, 9(1):1–10, 2018.
- [10] James M Holton and Kenneth A Frankel. The minimum crystal size needed for a complete diffraction data set. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4):393–408, 2010.
- [11] Henry N Chapman, Petra Fromme, Anton Barty, Thomas A White, Richard A Kirian, Andrew Aquila, Mark S Hunter, Joachim Schulz, Daniel P DePonte, Uwe Weierstall, et al. Femtosecond x-ray protein nanocrystallography. *Nature*, 470(7332):73–77, 2011.
- [12] Sébastien Boutet, Lukas Lomb, Garth J Williams, Thomas RM Barends, Andrew Aquila, R Bruce Doak, Uwe Weierstall, Daniel P DePonte, Jan Steinbrener, Robert L Shoeman, et al. High-resolution protein structure determination by serial femtosecond crystallography. *Science*, 337(6092):362–364, 2012.
- [13] Max O Wiedorn, Dominik Oberthür, Richard Bean, Robin Schubert, Nadine Werner, Brian Abbey, Martin Aepfelbacher, Luigi Adriano, Aschkan Allahgholi, Nasser Al-Qudami, et al. Megahertz serial crystallography. *Nature communications*, 9(1):1–11, 2018.

- [14] Cornelius Gati, Gleb Bourenkov, Marco Klinge, Dirk Rehders, Francesco Stellato, Dominik Oberthür, Oleksandr Yefanov, Benjamin P Sommer, Stefan Mogk, Michael Duszhenko, et al. Serial crystallography on in vivo grown microcrystals using synchrotron radiation. *IUCrJ*, 1(2):87–94, 2014.
- [15] Tobias Weinert, Natacha Olieric, Robert Cheng, Steffen Brünle, Daniel James, Dmitry Ozerov, Dardan Gashi, Laura Vera, May Marsh, Kathrin Jaeger, et al. Serial millisecond crystallography for routine room-temperature structure determination at synchrotrons. *Nature communications*, 8(1):1–11, 2017.
- [16] Richard Neutze, Remco Wouts, David Van der Spoel, Edgar Weckert, and Janos Hajdu. Potential for biomolecular imaging with femtosecond x-ray pulses. *Nature*, 406(6797):752–757, 2000.
- [17] Marie Luise Grünbein, Johan Bielecki, Alexander Gorel, Miriam Stricker, Richard Bean, Marco Cammarata, Katerina Dörner, Lars Fröhlich, Elisabeth Hartmann, Steffen Hauf, et al. Megahertz data collection from protein microcrystals at an x-ray free-electron laser. *Nature communications*, 9(1):1–9, 2018.
- [18] Jason Tenboer, Shibom Basu, Nadia Zatsepin, Kanupriya Pande, Despina Milathianaki, Matthias Frank, Mark Hunter, Sébastien Boutet, Garth J Williams, Jason E Koglin, et al. Time-resolved serial crystallography captures high-resolution intermediates of photoactive yellow protein. *Science*, 346(6214):1242–1246, 2014.
- [19] Henry N Chapman. X-ray free-electron lasers for the structure and dynamics of macromolecules. *Annual review of biochemistry*, 88:35–58, 2019.
- [20] Medhanjali Dasgupta, Dominik Budday, Saulo HP De Oliveira, Peter Madzellan, Darya Marchany-Rivera, Javier Seravalli, Brandon Hayes, Raymond G Sierra, Sébastien Boutet, Mark S Hunter, et al. Mix-and-inject xfel crystallography reveals gated conformational dynamics during enzyme catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(51):25634–25640, 2019.
- [21] Eriko Nango, Antoine Royant, Minoru Kubo, Takanori Nakane, Cecilia Wickstrand, Tetsunari Kimura, Tomoyuki Tanaka, Kensuke Tono, Changyong Song, Rie Tanaka, et al. A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. *Science*, 354(6319):1552–1557, 2016.
- [22] Gabriela Nass Kovacs, Jacques-Philippe Colletier, Marie Luise Grünbein, Yang Yang, Till Stenzki, Alexander Batyuk, Sergio Carbajo, R Bruce Doak, David Ehrenberg, Lutz Foucar, et al. Three-dimensional view of ultrafast dynamics in photoexcited bacteriorhodopsin. *Nature communications*, 10(1):1–17, 2019.
- [23] Takehiko Tosha, Takashi Nomura, Takuma Nishida, Naoya Saeki, Kouta Okubayashi, Raika Yamagiwa, Michihiro Sugahara, Takanori Nakane, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, et al. Capturing

- an initial intermediate during the p450_{nor} enzymatic reaction using time-resolved xfel crystallography and caged-substrate. *Nature communications*, 8(1):1–9, 2017.
- [24] Eike C Schulz, Pedram Mehrabi, Henrike M Müller-Werkmeister, Friedjof Tellkamp, Ajay Jha, William Stuart, Elke Persch, Raoul De Gasparo, François Diederich, Emil F Pai, et al. The hit-and-return system enables efficient time-resolved serial synchrotron crystallography. *Nature methods*, 15(11):901–904, 2018.
- [25] Pedram Mehrabi, Eike C Schulz, Michael Agthe, Sam Horrell, Gleb Bourenkov, David von Stetten, Jan-Philipp Leimkohl, Hendrik Schikora, Thomas R Schneider, Arwen R Pearson, et al. Liquid application method for time-resolved analyses by serial synchrotron crystallography. *Nature methods*, 16(10):979–982, 2019.
- [26] Tobias Weinert, Petr Skopintsev, Daniel James, Florian Dworkowski, Ezequiel Panepucci, Demet Kekilli, Antonia Furrer, Steffen Brünle, Sandra Mous, Dmitry Ozerov, et al. Proton uptake mechanism in bacteriorhodopsin captured by serial synchrotron crystallography. *Science*, 365(6448):61–65, 2019.
- [27] Diana CF Monteiro, David von Stetten, Claudia Stohrer, Marta Sans, Arwen R Pearson, Gianluca Santoni, P van der Linden, and M Trebbin. 3d-mixd: 3d-printed x-ray-compatible microfluidic devices for rapid, low-consumption serial synchrotron crystallography data collection in flow. *IUCrJ*, 7(2), 2020.
- [28] Robin L Owen, Danny Axford, Darren A Sherrell, Anling Kuo, Oliver P Ernst, Eike C Schulz, RJ Dwayne Miller, and Henrike M Mueller-Werkmeister. Low-dose fixed-target serial synchrotron crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 73(4):373–378, 2017.
- [29] Feng-Zhu Zhao, Bin Zhang, Er-Kai Yan, Bo Sun, Zhi-Jun Wang, Jian-Hua He, and Da-Chuan Yin. A guide to sample delivery systems for serial crystallography. *The FEBS Journal*, 286(22):4402–4417, 2019.
- [30] Isabelle Martiel, Henrike M Müller-Werkmeister, and Aina E Cohen. Strategies for sample delivery for femtosecond crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 75(2), 2019.
- [31] Marie Luise Grünbein and Gabriela Nass Kovacs. Sample delivery for serial crystallography at free-electron lasers and synchrotrons. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 75(2):178–191, 2019.
- [32] Cx K Batchelor and GK Batchelor. *An introduction to fluid dynamics*. Cambridge university press, 2000.

- [33] Steven Berghout. The einstein smoluchowski equation in the one dimensional exclusion process. Master's thesis, Utrecht University, 2013.
- [34] Horatio Scott Carslaw and John Conrad Jaeger. Conduction of heat in solids. *Oxford: Clarendon Press, 1959, 2nd ed., 1959.*