

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ENERGIA E MATERIAIS
LABORATÓRIO NACIONAL DE LUZ SÍNCROTRON
DIVISÃO DE MATÉRIA MOLE E BIOLÓGICA
GRUPO MANACÁ

Cristalografia de proteínas em condições de temperatura ambiente:
coleta, processamento e análise

Pesquisador responsável: Evandro Ares Araujo

Pesquisador corresponsável: Ana C. M. zeri

ESTADO DA ARTE

Os experimentos em cristalografia de proteínas em modo serial vêm transformando a biologia estrutural com a obtenção de informações da dinâmica estrutural *in crystallo* em escala de μ s-fs em fontes de XFEL (*X-ray free-electron laser*) e de s-ms em fontes de luz Síncrotron, respectivamente, detalhando a mecanística de diversas macromoléculas biológicas que até então não era possível. MANACÁ é uma das linhas de luz Síncrotron [de quarta geração com micro/nano feixes de raios-X] que oferecerá facilidades para os usuários realizarem experimentos de difração de raios-X em mono e/ou múltiplo cristais de proteínas em temperaturas criogênica e/ou ambiente.

INTRODUÇÃO

No corrente panorama de enfrentamento mundial contra a doença causada pelo novo coronavírus SARS-COV2 (COVID-19) milhares de pesquisadores vêm juntando esforços para desenvolver vacinas e medicamentos de combate e erradicação dessa doença. Para isso, tem-se buscado determinar a estrutural tridimensional desse vírus e de suas proteínas com o objetivo de desvendar seu mecanismo de invasão na célula humana. Hoje já se sabe que a protagonista responsável pela invasão do SARS-COV2 nas células do hospedeiro é a proteína *Spike*. Ela é um dos alvos-chave para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos voltados ao controle e erradicação dessa doença pandêmica. Muito disso é possível devido o esforço de biólogos estrutural que vêm trabalhando intensamente para ter uma compreensão atômica e molecular das macromoléculas biológicas envolvidas no mecanismo de ação deste vírus. As bases da biologia estrutural estão nos trabalhos de pioneiros como Bernal, Hodgkin e Perutz^{1,2} que aplicaram cristalografia de raios-X à determinação

estrutural de macromoléculas biológicas. Isso trouxe uma mudança de paradigma porque, a partir de então, as relações entre estrutura e função de moléculas biológicas puderam ser traçadas, permitindo entender a ação de doenças de várias doenças e medicamentos, por exemplo². Modernamente, a determinação da estrutura dessas moléculas é uma tarefa razoavelmente simples do ponto de vista da coleta e processamento em laboratórios dedicados a cristalografia macromolecular espalhados por diversos países. Nesse contexto, o uso da luz Síncrotron é um dos fatores-chave para o tremendo sucesso da cristalografia macromolecular nas últimas décadas³. Enquanto pouco mais de 90% de todas as estruturas de macromoléculas biológicas foram determinadas por cristalografia de raios-X, cerca de 94% foram obtidos usando fontes de luz Síncrotron a partir de amostras de mono cristais criocongelados⁴⁻⁷.

A coleta de dados em temperaturas criogênicas reduz drasticamente os efeitos de danos causados por radiação⁸⁻¹⁰. Por outro lado, mesmo em condições criogênicas, os centros metálicos de metaloproteínas são facilmente reduzidos, que por sua vez pode induzir mudanças estruturais que prejudicam a coleta e interpretação dos dados^{10,11}. Além disso, as estruturas determinadas usando essa técnica são limitadas pela sua natureza estática decorrente do congelamento dos cristais¹¹, resultando em restrições da dinâmica local e podendo também resultar em cristais com pouca ou nenhuma difração após o processo de congelamento^{7,9,11}. A realização de experimentos cristalográficos em temperaturas criogênicas tem benefícios práticos, mas é fortemente limitada para cristais com tamanho da ordem de poucos microns ($< 10^{-5}$ μm) e potencialmente limita a identificação de conformações alternativas funcionalmente importantes que podem ser reveladas apenas em temperatura ambiente (RT)^{7,12}. Entretanto, o recente surgimento da cristalografia (SX) serial trouxe uma alternativa para a coleta de dados à RT quase sem nenhum dado por radiação¹²⁻¹⁴. Essa nova abordagem de coleta, processamento e análise de dados estruturais de macromoléculas biológicas foi primeiramente implementada em fontes de XFEL¹⁵⁻¹⁷ e mais recentemente está sendo estendida às fontes de Luz Síncrotron^{6,12,18}, dando origem à cristalografia serial nas fontes de XFEL (SFX) e cristalografia serial nas fontes de luz Síncrotron (SSX), respectivamente.

Durante o experimento de SX, os cristais são continuamente entregues ao feixe de raios-X, obtendo dados de difração de milhares destes cristais para resolver a estrutura molecular em escala atômica e/ou subatômica^{12,16}. Além disso, também permite a análise estrutural resolvida no tempo, o que fornece uma alternativa para a realização de estudos de dinâmica estrutural de macromoléculas biológicas em condições quase que fisiológicas¹⁹⁻²¹. As vantagens desta técnica são aparentes: ela não apenas evita os procedimentos de congelamento instantâneo dos cristais, mas também fornece informações sobre a estrutura das proteínas no estado fisiológico ou quase fisiológico. Além disso, pode usar amostras cristalinas com tamanho de micron a sub-mícron para determinar a estrutura de moléculas de interesse^{9,12,18}.

OBJETIVOS

Neste projeto de pesquisa pretendemos estabelecer um protocolo de coleta e processamento de dados cristalográfico de mono e múltiplo cristais de proteínas via coleta em temperatura ambiente, bem como avaliar efeitos da dosagem de radiação.

METODOLOGIA

Preparação, cristalização e otimização de amostras. As amostras da proteína lisozima serão preparadas e cristalizadas para serem usadas em experimentos de difração de raios X em mono múltiplo cristais. Para isso, será utilizado o sistema de cristalização em *batch*, como descrito por *Tenboer et al.*²² e/ou recentes variações deste método^{23,24}.

Coleta e processamento de dados. A aquisição de dados será realizada usando um sistema de coleta de dados em temperatura ambiente que estamos desenvolvendo internamente para usar na linha MANACÁ. Os padrões de difração serão obtidos a partir de conjuntos de diferentes cristais em temperatura ambiente usando o detector Pilatus2M (Dectris, Philadelphia, USA). Esses conjuntos de dados serão então pré-processados no programa *Cheetah*²⁵ para seleção de padrões indexáveis e posteriormente serão indexados e integrados usando o pacote de programas *CrystFEL*²⁶; e em seguida, o merge das reflexões parciais realizado por integração do tipo Monte Carlo para obtenção das reflexões totais. Por fim, os modelos das estruturas serão determinados por substituição molecular²⁷. Esses modelos serão refinados usando os programas

*Coot*²⁸ e *PHENIX*²⁹, e posteriormente validados pelo *MOLPROBITY*³⁰. Por fim, as análises da dose e danos por radiação serão realizadas no programa *RADDOSE*^{31,32}.

REFERÊNCIAS

1. Jaskolski, M., Dauter, Z. & Wlodawer, A. *FEBS J.* **281**, 3985–4009 (2014).
2. Curry, S. *Interdiscip. Sci. Rev.* **40**, 308–328 (2015).
3. Muench, S. P., Antonyuk, S. V & Hasnain, S. S. *IUCrJ* **6**, 167–177 (2019).
4. Garman, E. F. *Acta Crystallogr. D* **66**, 339–351 (2010).
5. Burley, S. K. *et al. Nucleic Acids Res.* **49**, D437–D451 (2021).
6. Stellato, F. *et al. IUCrJ* **1**, 204–212 (2014).
7. Fischer, M. Q. *Rev. Biophys.* **54**, 1–15 (2021).
8. Holton, J. M. *J. Synchrotron Radiat.* **16**, 133–142 (2009).
9. de la Mora, E. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 4142–4151 (2020).
10. Zeldin, O. B., Brockhauser, S., Bremridge, J., Holton, J. M. & Garman, E. F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 20551–20556 (2013).
11. Fukuda, Y., Hirano, Y., Kusaka, K., Inoue, T. & Tamada, T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 4071–4077 (2020).
12. Weinert, T. *et al. Nat. Commun.* **8**, 1–11 (2017).
13. Mehrabi, P. *et al. Sci. Adv.* **7**, eabf1380 (2021).
14. Hirata, K. *et al. Nat. Methods* **11**, 734–736 (2014).
15. Neutze, R., Wouts, R., der Spoel, D., Weckert, E. & Hajdu, J. *Nature* **406**, 752–757 (2000).
16. Chapman, H. N. *et al. Nature* **470**, 73–77 (2011).
17. Grünbein, M. L. *et al. Nat. Commun.* **9**, 1–9 (2018).
18. Schulz, E. C. *et al. Nat. Methods* **15**, 901–904 (2018).
19. Neutze, R. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369**, 20130318 (2014).
20. Weinert, T. *et al. Science* **365**, 61–65 (2019).
21. Mehrabi, P. *et al. Nat. Methods* **16**, 979–982 (2019).
22. Tenboer, J. *et al. Science* **346**, 1242–1246 (2014).
23. Beale, J. H. *et al. J. Appl. Crystallogr.* **52**, 1385–1396 (2019).
24. Stohrer, C. *et al. Acta Crystallogr. D* **77**, (2021).
25. Barty, A. *et al. J. Appl. Crystallogr.* **47**, 1118–1131 (2014).
26. White, T. A. *et al. J. Appl. Crystallogr.* **45**, 335–341 (2012).
27. McCoy, A. J. *et al. Acta Crystallogr. D* **40**, 658–674 (2007).
28. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. *Acta Crystallogr. D* **66**, 486–501 (2010).
29. Adams, P. D. *et al. Acta Crystallogr. D* **66**, 213–21 (2010).
30. Chen, V. B. *et al. Acta Crystallogr. D* **66**, 12–21 (2010).
31. Dickerson, J. L., McCubbin, P. T. N. & Garman, E. F. *J. Appl. Crystallogr.* **53**, (2020).
32. Dickerson, J. L. & Garman, E. F. *Protein Sci.* **30**, 8–19 (2021).