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 2021-2022

Modelagem e simulação da fluidodinâmica de cristais de proteínas em dispositivos microfluídicos

Pesquisador responsável
Evandro Ares Araújo – Pesquisador Grupo MANACÁ

Pesquisadora corresponsável
Ana C. M. Zeri – Pesquisadora e lider do grupo MANACÁ

Campinas, São Paulo, 2021

1 Estado da arte

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 será possível realizar experimentos a partir de métodos convencionais de coleta de mono cristais e por cristalografia serial (SSX). A bordagem de SSX é complementar à cristalografia tradicionalmente feita atualmente nas fontes de luz Síncrotron por permitir manuseio e a coleta de múltiplos cristais com dimensões da ordem de mícrons a sub-mícrons e analisar a evolução temporal de mudanças estruturais induzidas físico e/ou quimicamente. Neste projeto vamos conduzir simulações de fluidodinâmica em sistemas microfluídicos candidatos a porta amostras na linha MANACÁ dedicados ao carreamento de cristais 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, pretendemos 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.

2 Introdução

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%). isso tem ajudado a racionalizar as estratégias de busca e desenvolvimento de medicamentos para diversas doenças. 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[29, 20].

Por outro lado, a dificuldade em obter cristais bem ordenados com dimensões da ordem de algumas dezenas de mícrons [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[23]. Entretanto, isso é quase negligenciável para cristais menores que 10 μm[23]. 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, 22]. Esses fatores tornam possível a coleta de cristais cada vez menores[12] e a consequente im-

plementação de novas técnicas em cristalografia de proteínas[6, 3, 28, 9, 26]. Tomando como premissa a hipótese da "difração antes da destruição" do cristal de proteína[18], 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 (XFEL). Nestas fontes de luz, a aquisição única e quase instantânea do padrão de difração de cada cristal em uma dada orientação tem o menor acúmulo de dano por radiação[18, 6, 3].

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 cristas, já que este são dinamicamente substituídos toda vez que há espalhamento[18, 6]. Isso tem abrindo a possibilidade para experimentos de difração de cristais com dimensões da ordem de mícrons a nanômetros [a maioria das proteínas cristalizam em cristais de tamanhos dessa ordem][18, 10] 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][6, 24, 5, 7] 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[17, 13] ou de intermediários enzimáticos[25, 7]. 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)[26, 21, 15, 27].

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[15, 27]; 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 [15, 27, 26, 21]; permite o baixo consumo de amostras (poucos microlitros), controle da quantidade de ligantes (poucos picolitros), difusão e teste em larga escala também [15, 27, 16]; o controle da dose de radiação[19] e temperatura de aquisição dos dados[26, 15] e; além disso, a qualidade dos dados e resultados são comparáveis aos obtidos nas fontes de XFEL[21, 27]. 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[30] e dos sistemas de entrega de cristais.

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[14, 11, 30]: minimizar o estresse mecânico e químico dos cristais; minimizar o espalhamento do meio carreador e janelas por onde passam os raios X; minimizar o consumo de amostras; e permitir a mistura e difusão dos cristais e/ou ligantes de maneira controlada.

3 Objetivos

Neste projeto pretendemos realizar estudos de modelagem e simulação por fluidodinâmica da difusão de cristais e ligantes em sistemas microfluídicos. Além disso, pretendemos desenvolver uma interface gráfica integrada à rotina de coleta da Manacá que permitirá ao usuário definir as condições iniciais de fluxo e taxa de difusão durante a coleta de dados.

4 Materiais e Métodos

4.1 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* (4.1) e equação da continuidade em condições fluxo contínuo para líquidos incompressíveis (2) [1]:

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

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0. \tag{2}$$

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* [2] 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 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[4] $\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C$ [onde C é a variável que descreve a concentração do ligante num volume].

4.2 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.].

Referências

[1] BATCHELOR, C. K., AND BATCHELOR, G. *An introduction to fluid dynamics*. Cambridge university press, 2000.

[2] BERGHOUT, S. The einstein smoluchowski equation in the one dimensional exclusion process. Master's thesis, Utrecht University, 2013.

[3] BOUTET, S., LOMB, L., WILLIAMS, G. J., BARENDS, T. R., AQUILA, A., DOAK, R. B., WEIERSTALL, U., DEPONTE, D. P., STEINBRENER, J., SHOEMAN, R. L., ET AL. High-resolution protein structure determination by serial femtosecond crystallography. *Science 337*, 6092 (2012), 362–364.

[4] CARSLAW, H. S., AND JAEGER, J. C. Conduction of heat in solids. *Oxford: Clarendon Press, 1959, 2nd ed.* (1959).

[5] CHAPMAN, H. N. X-ray free-electron lasers for the structure and dynamics of macromolecules. *Annual review of biochemistry 88* (2019), 35–58.

[6] CHAPMAN, H. N., FROMME, P., BARTY, A., WHITE, T. A., KIRIAN, R. A., AQUILA, A., HUNTER, M. S., SCHULZ, J., DEPONTE, D. P., WEIERSTALL, U., ET AL. Femtosecond x-ray protein nanocrystallography. *Nature 470*, 7332 (2011), 73–77.

[7] DASGUPTA, M., BUDDAY, D., DE OLIVEIRA, S. H., MADZELAN, P., MARCHANY-RIVERA, D., SERAVALLI, J., HAYES, B., SIERRA, R. G., BOUTET, S., HUNTER, M. S., ET AL. Mix-and-inject xfel crystallography reveals gated conformational dynamics during enzyme catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences 116*, 51 (2019), 25634–25640.

[8] EVANS, G., AXFORD, D., AND OWEN, R. L. The design of macromolecular crystallography diffraction experiments. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 67*, 4 (2011), 261–270.

[9] Gati, C., Bourenkov, G., Klinge, M., Rehders, D., Stellato, F., Oberthür, D., Yefanov, O., Sommer, B. P., Mogk, S., Duszenko, M., et al. Serial crystallography on in vivo grown microcrystals using synchrotron radiation. *IUCrJ 1*, 2 (2014), 87–94.

[10] Grünbein, M. L., Bielecki, J., Gorel, A., Stricker, M., Bean, R., Cammarata, M., Dörner, K., Fröhlich, L., Hartmann, E., Hauf, S., et al. Megahertz data collection from protein microcrystals at an x-ray free-electron laser. *Nature communications 9*, 1 (2018), 1–9.

[11] Grünbein, M. L., and Nass Kovacs, G. Sample delivery for serial crystallography at free-electron lasers and synchrotrons. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology 75*, 2 (2019), 178–191.

[12] Holton, J. M., and Frankel, K. A. The minimum crystal size needed for a complete diffraction data set. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66*, 4 (2010), 393–408.

[13] Kovacs, G. N., Colletier, J.-P., Grünbein, M. L., Yang, Y., Stensitzki, T., Batyuk, A., Carbajo, S., Doak, R. B., Ehrenberg, D., Foucar, L., et al. Three-dimensional view of ultrafast dynamics in photoexcited bacteriorhodopsin. *Nature communications 10*, 1 (2019), 1–17.

[14] Martiel, I., Müller-Werkmeister, H. M., and Cohen, A. E. Strategies for sample delivery for femtosecond crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology 75*, 2 (2019).

[15] Mehrabi, P., Schulz, E. C., Agthe, M., Horrell, S., Bourenkov, G., von Stetten, D., Leimkohl, J.-P., Schikora, H., Schneider, T. R., Pearson, A. R., et al. Liquid application method for time-resolved analyses by serial synchrotron crystallography. *Nature methods 16*, 10 (2019), 979–982.

[16] Monteiro, D. C., von Stetten, D., Stohrer, C., Sans, M., Pearson, A. R., Santoni, G., van der Linden, P., and Trebbin, M. 3d-mixd: 3d-printed x-ray-compatible microfluidic devices for rapid, low-consumption serial synchrotron crystallography data collection in flow. *IUCrJ 7*, 2 (2020).

[17] Nango, E., Royant, A., Kubo, M., Nakane, T., Wickstrand, C., Kimura, T., Tanaka, T., Tono, K., Song, C., Tanaka, R., et al. A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. *Science 354*, 6319 (2016), 1552–1557.

[18] Neutze, R., Wouts, R., Van der Spoel, D., Weckert, E., and Hajdu, J. Potential for biomolecular imaging with femtosecond x-ray pulses. *Nature 406*, 6797 (2000), 752–757.

[19] Owen, R. L., Axford, D., Sherrell, D. A., Kuo, A., Ernst, O. P., Schulz, E. C., Miller, R. D., and Mueller-Werkmeister, H. M. Low-dose fixed-target serial synchrotron crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology 73*, 4 (2017), 373–378.

[20] Rossmann, M. G. Serial crystallography using synchrotron radiation. *IUCrJ 1*, 2 (2014), 84–86.

[21] Schulz, E. C., Mehrabi, P., Müller-Werkmeister, H. M., Tellkamp, F., Jha, A., Stuart, W., Persch, E., De Gasparo, R., Diederich, F., Pai, E. F., et al. The hit-and-return system enables efficient time-resolved serial synchrotron crystallography. *Nature methods 15*, 11 (2018), 901–904.

[22] Seuring, C., Ayyer, K., Filippaki, E., Barthelmess, M., Longchamp, J.-N., Ringler, P., Pardini, T., Wojtas, D. H., Coleman, M. A., Dörner, K., et al. Femtosecond x-ray coherent diffraction of aligned amyloid fibrils on low background graphene. *Nature communications 9*, 1 (2018), 1–10.

[23] Storm, S. L., Crawshaw, A. D., Devenish, N. E., Bolton, R., Hall, D. R., Tews, I., and Evans, G. Measuring energy-dependent photoelectron escape in microcrystals. *IUCrJ 7*, 1 (2020).

[24] Tenboer, J., Basu, S., Zatsepin, N., Pande, K., Milathianaki, D., Frank, M., Hunter, M., Boutet, S., Williams, G. J., Koglin, J. E., et al. Time-resolved serial crystallography captures high-resolution intermediates of photoactive yellow protein. *Science 346*, 6214 (2014), 1242–1246.

[25] Tosha, T., Nomura, T., Nishida, T., Saeki, N., Okubayashi, K., Yamagiwa, R., Sugahara, M., Nakane, T., Yamashita, K., Hirata, K., et al. Capturing an initial intermediate during the p450nor enzymatic reaction using time-resolved xfel crystallography and caged-substrate. *Nature communications 8*, 1 (2017), 1–9.

[26] Weinert, T., Olieric, N., Cheng, R., Brünle, S., James, D., Ozerov, D., Gashi, D., Vera, L., Marsh, M., Jaeger, K., et al. Serial millisecond crystallography for routine room-temperature structure determination at synchrotrons. *Nature communications 8*, 1 (2017), 1–11.

[27] Weinert, T., Skopintsev, P., James, D., Dworkowski, F., Panepucci, E., Kekilli, D., Furrer, A., Brünle, S., Mous, S., Ozerov, D., et al. Proton uptake mechanism in bacteriorhodopsin captured by serial synchrotron crystallography.

Science 365, 6448 (2019), 61–65.

[28] WIEDORN, M. O., OBERTHÜR, D., BEAN, R., SCHUBERT, R., WERNER, N., ABBEY, B., AEPFELBACHER, M., ADRIANO, L., ALLAHGHOLI, A., AL-QUDAMI, N., ET AL. Megahertz serial crystallography. *Nature communications 9*, 1 (2018), 1–11.

[29] YAMAMOTO, M., HIRATA, K., YAMASHITA, K., HASEGAWA, K., UENO, G., AGO, H., AND KUMASAKA, T. Protein microcrystallography using synchrotron radiation. *IUCrJ 4*, 5 (2017), 529–539.

[30] ZHAO, F.-Z., ZHANG, B., YAN, E.-K., SUN, B., WANG, Z.-J., HE, J.-H., AND YIN, D.-C. A guide to sample delivery systems for serial crystallography. *The FEBS Journal 286*, 22 (2019), 4402–4417.