

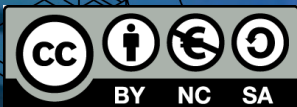
# KOSMOS

## MEDICINSK FYSIK

SVENSKA FYSIKERSAMFUNDETS ÅRSBOK 2022

### MAXAT LJUS PÅ MEDICINSKA FRÅGOR

© KAJSA SIGFRIDSSON CLAUSS



Artikeln publiceras under Creative Commons-licensen CC BY-NC-SA 4.0  
För bildmaterial med källhänvisning  
gäller samma upphovsrättsliga  
regler som för källan.





**Kajsa Sigfridsson Clauss**

är i grunden biokemist och arbetar som strålrörsforskare på MAX IV laboratoriet alltsedan 2012. Idag tar hon hand om användare på strålröret Balder och utvecklar provmiljöer. Hon disputerade i Kemi vid Uppsala universitet 2009 och har sedan dess undersökt metallers funktion i biologin i framförallt proteiner med hjälp av röntgenspektroskopi.

Synkrotronanläggningen MAX IV är en av Sveriges viktigaste vetenskapliga infrastruktursatsningar. Verksamheten är tvärvetenskaplig och gagnar i hög grad medicinsk forskning. Kajsa Sigfridsson Clauss skriver om detta, med ett flertal exempel, och hon berättar också i allmänna ordalag om hur röntgenljus av hög kvalitet hjälper oss att se längre in i materien i allmänhet, och i vävnad i synnerhet.

*För att se behöver vi ljus. Detta illustreras genom en teckning av ett öga av Freja Havelius (författarens dotter). Under ögat en stiliserad skiss av MAX IV. Se vidare på sid 47.*

# MAXat Ljus på medicinska frågor

För att se behöver vi ljus. Synligt ljus passerar in genom ögat och träffar de ljuskänsliga fotoreceptorerna som signalerar till hjärnan vad vi ser. Den initiala processen börjar med att den ljuskänsliga molekylerna 11-cis-retinal, som sitter bundet i opsinproteinerna, omvandlas till all-trans-retinal då ljus av rätt våglängd/energi absorberas. Opsinproteinet måste då anpassa sin struktur till den nya rakare molekylformen vilket startar signalkaskaden via synnerven till hjärnan som till slut ger oss en bild. Med andra ord är ljus oumbärligt för förmågan att se.

## Synkrotronljus

Ljus är elektromagnetisk strålning, uppbyggd av fotoner. En foton är till sin natur både våg och partikel. Fotonerna kan både reflekteras och absorberas i sin växelverkan med materia, och dessa egenskaper gör det möjligt att använda ljus av olika våglängder för att se in i olika storleksordningar av material. Till exempel kan infrarött ljus (IR), vars energi ( $\sim 1$  eV) motsvarar vibrationer i molekylernas bindningar, ge ett tydligt fingeravtryck av varje molekyl.

Röntgenljus har en energi omkring 1–100 keV, vilket motsvarar bindningsenergin för en atoms innersta elektroner och våglängden är i samma storleksordning som avståndet mellan atomer i en kristallstruktur (Braggs lag). Röntgenljuset kan användas för att undersöka en molekylstruktur med diffraktion eller för att titta på större strukturer med spridning. Dessutom kan man studera den elektroniska strukturen hos det belysta materialet genom att följa röntgenljusets absorption.

Synkrotronljus uppstår då elektroner som accelererats till nära ljushastigheten ändrar sin bana i ett starkt magnetfält. Detta ljus har hög briljans (är fotontätt), är kollimerat (väl samlat) och har

hög koherens (är synkroniserat) samt är lika intensivt i alla våglängder. Synkrotronljuset nyttjas för forskning på de olika experimentstationerna — strålrören som är placerade runt lagringsringen — ett vid varje *insättningsselement*. Insättningsselementet består av multipla starka magneter som får elektronerna att ändra riktning (åka slalom) så många gånger att intensivt synkrotronljus produceras.

MAX IV laboratoriet i Lund är en av många synkrotronljusanläggningar i världen, men var den första av den fjärde generationens teknologi. Denna nya teknologi har givit ljuset ännu högre briljans än tidigare. Våglängden som genereras beror på lagringsringens storlek och vilka magnetiska insättningsselement som ger upphov till synkrotronljuset. Strålningen kan genereras i ett brett spektrum från IR till hård röntgen (energi  $> 5$  keV). MAX IV har för tillfället strålrör med energier på 5–40 000 eV, dvs. från ultraviolett (UV) till hård röntgen. I nästa utvecklingsfas har MAX IV planer på att utöka utbudet med bland annat ett IR-strålrör, samt ett strålrör helt dedikerat till medicinsk forskning, MedMAX.

## Medicinska frågor

Historiskt har vanlig röntgen länge använts inom medicin för att se in i kroppen, alltsedan den första röntgenbilden som Wilhelm Röntgen tog av sin hustru Anna Berthas hand 1895 (se bild i artikel av Kalholm & Häger). På röntgenplåtarna syns skillnaderna i elektrontäthet tydligt, dvs. ben avbildas svarta mot den omgivande mjukvävnaden. Allt från benbrott till karies undersöks idag rutinemässigt.

Synkrotronljuset erbjuder utöver detta mycket fler användningsområden inom medicinsk forskning och kan ha bäring på frågor som rör allt från enskilda proteinstrukturer, där läkemedelsfragment kan sällas fram för morgondagens mediciner (FragMAX, MX på BioMAX), till inmärkningsfri<sup>1</sup>avbildning av vävnader för att se lokalisering av vissa grundämnen (XRF på NanoMAX) eller kemiska föreningar (STXM på SoftiMAX). Med hjälp av röntgenbaserad småvinkelsprindning (SAXS) kan man bland annat dynamiskt följa vad som händer i läkemedelsformuleringar, alltså i medlet som bär läkemedlet in i kroppen via t.ex. tablett, kräm eller injektion när temperatur, tryck, salinitet med mera ändras (SAXS på CoSAXS). Genom att använda röntgenabsorp-

<sup>1</sup>Ingen infärgning, märkning med antikroppar eller liknande behövs.

tionsspektroskopi (XAS på Balder) kan man till exempel studera verkningsmekanismen hos metalljonbaserade läkemedel såsom äggstockscancermedicinen cisplatin.

## Strålrör och tekniker

Ett strålrör (eng. *beamline*) är en experimentstation som får sitt ljus från synkrotronljuskällan via ett vakuumrör. Detta tar det spektralt breda röntgenljuset som insättningselementet genererat genom olika röntgenoptiska element, såsom speglar, spalter, och monokromatorer, för att forma, fokusera och välja ut den våglängd av ljuset som passar respektive teknik och experiment. Ett strålrör är ibland öronmärkt till mer än en teknik, och kan även ha mer än en experimentstation.

Då en röntgenstråle träffar materia kan flera olika processer ske, men de tre huvudsakliga för energier under 100 keV är:

1. Fotoelektrisk absorption — fotonen absorberas när den har en energi som överskrider bundna elektroners bindningsenergi. Elektronen blir en fri *fotoelektron* med kinetisk energi motsvarande överskottsenergin.
2. Comptonspridning — en foton kolliderar med en elektron och studsar ut med minskad energi, vilken beror av spridningsvinkeln.
3. Rayleigh/Thomsonspridning — i detta fall behåller fotonen sin energi vid kollisionen som därför kallas elastisk. I det fall Rayleigh/Thomsonspridningen träffar ett välordnat material, som en kristall, uppstår diffraktion, dvs. ett spridningsmönster som beror av atomernas positioner i kristallstrukturen.

Dessa tre fysiska fenomen utgör grunden i strålrörens huvudtekniker: *absorption, spridning och diffraktion*.

Röntgenkristallografi är baserad på den passiva diffraktionsprocessen och kallas XRD (*X-ray diffraction*). Den kan göras på en enkristall eller på kristallint material i pulverform. Proteiner kan kristalliseras och på så sätt kan man lista ut deras molekylära struktur. Tekniken kallas MX (*macromolecular X-ray crystallography*).

Den spridningsbaserade tekniken SAXS (*small angle X-ray scattering*) bygger på samma process som diffraktion, men tillämpas på icke-kristallina material. Man kan med denna detektera objekt i storleksordningen (1–100 nm) samt bestämma formen

på partiklar i lösning, vilket ofta kan göras med god tidsupplösning för dynamiska processer. SAXS är en metod som tillämpas brett inom medicinsk forskning för att titta på globulär struktur hos proteiner i lösning, DNA/RNA under olika fysiologiska förhållanden, formulering av läkemedel, nanopartiklar (se artikel av Uvdal & Skallberg) etc.

Inom röntgenspektroskopin tittar man istället på den aktiva process där en foton absorberas i materialet när dess energi är större än elektronens bindningsenergi — den fotoelektriska processen. Fotoelektronen rör sig som en våg ut ur de bundna elektronskalen och kommer på sin väg ut läsa av sin omgivning och ge information om både den elektroniska strukturen (molekylärorbitaler och oxidationstillstånd) och de närliggande grannatomerna (lokal atomstrukturell information). Denna metod kallas XAS (*X-ray absorption spectroscopy*). Vid elektronens bindningsenergi ökar absorptionen av röntgenljuset dramatiskt; man får en så kallad absorptionskant. Kanten är specifik för varje grundämne och elektronskal. Det bildas ett hål i elektronskalet då fotoelektronen lämnar, vilket fylls då elektroner från högre elektronskal faller ner och samtidigt avger överskottsenergin som antingen röntgenfluorescens (XES, *X-ray emission spectroscopy*) eller genom att en annan elektron från samma skal sparkas ut — en *Augerelektron*. Augerelektronen kan detekteras tillsammans med den ursprungliga fotoelektronen i XPS (*X-ray photoelectron spectroscopy*).

Samtliga ovanstående tekniker kan ligga till grund för röntgenbaserad avbildning och mikroskopi för att ge information i olika storleksordningar och dimensioner. Därför behöver de röntgenbaserade mikroskopimetoderna varken infärgning eller inmärkning för att synliggöra strukturer och ge grundämnesspecifik information. En karta över grundämnenas fördelning i provet får man genom att analysera röntgenfluorescens som strålar ut om man belyser, och därmed exciterar, med en högre energi — en metod som kallas XRF (*X-ray fluorescence*).

En annan teknik som kombinerar XAS-metoden med mikroskopi är STXM (*Scanning Transmission X-ray Microscopy*). Man gör då transmissionskartor innan och på absorptionskanten för grundämnet man är intresserad av. Material kan avbildas i två dimensioner ( $x, y$ ), tomografiskt i 3D ( $x, y, z$ ) och dynamiskt i 4D, där den fjärde dimensionen är tid vilket gör det möjligt att följa ett förlopp. För skanningsmikroskopi, dvs. när provet förflyttas i

strålen, gäller förhållandet att ju mindre strålstorlek, desto högre rumslig upplösning och desto mindre och tunnare behöver det avbildade provet vara. Med en kvadratmikrometerstor stråle kan man få  $\mu\text{m}$  upplösning av mm–cm-stora prover, medan strålstorlek på  $(100 \times 100) \text{ nm}^2$  ger 100 nm upplösning av prover mindre än  $(100 \times 100) \mu\text{m}^2$ . På detta sätt kan man titta på en bit av biologisk vävnad som skivats tunt (cirka 1  $\mu\text{m}$ ) och urskilja subcellulära komponenter medan provet förflyttas i strålen.

Med det högkoherenta ljus som vi har på MAX IV ges möjlighet att ytterligare skärpa den rumsliga upplösningen genom så kallad ptychografi: en två-dimensionell diffraktionsbild detekteras i varje passerad position, och denna ger genom en numerisk rekonstruktionsalgoritm en bild med en upplösning på ner mot 10 nm. Ett annat sätt att göra tomografi av små prover är helfältsmikroskopi (eng. *full-field microscopy*). I detta fall är strålen större än provet som roteras i strålen och en bild projiceras på en 2D-detektor.

## Forskningsexempel

### Alzheimers; en fråga men många tillvägagångssätt

Alzheimers är den vanligaste demenssjukdomen i vårt land. Det är en sjukdom där nervcellerna i hjärnan förtvinar och värst drabbat är minnets celler. I de sjuka cellerna har det bildats amyloida plack — något som upptäcktes redan i början av 1900-talet av den tyska neuropsykiatrikern Alois Alzheimer, som gett sjukdomen dess namn. Upptäckten gjorde han då han undersökte hjärnan hos en avlidna patient som led av svår förvirring och minnesrubbing. Nu vet man att placken består av långa trådar, fibriller, av proteinet amyloid-beta (AB). Amyloid används allmänt för att känneteckna felveckade proteiner som bildar fibrer, som proteinet amyloid-beta.

Amyloid-beta bildas genom klyvning av ett mer komplicerat protein: beta-amyloid-prekursorprotein (APP). Fragmenten ansamlas och aggregerar sedan, vilket tros vara en drivande orsak till sjukdomsframskridandet i Alzheimers sjukdom. Man vet inte säkert vad som startar sjukdomsförloppet, men för att kunna hitta ett botemedel förefaller det vara viktigt att förstå vad som triggar processen. Försök har gjorts att eliminera eller minska produktionen av beta-amyloid, men utan klinisk framgång. Detta är ett intensivt

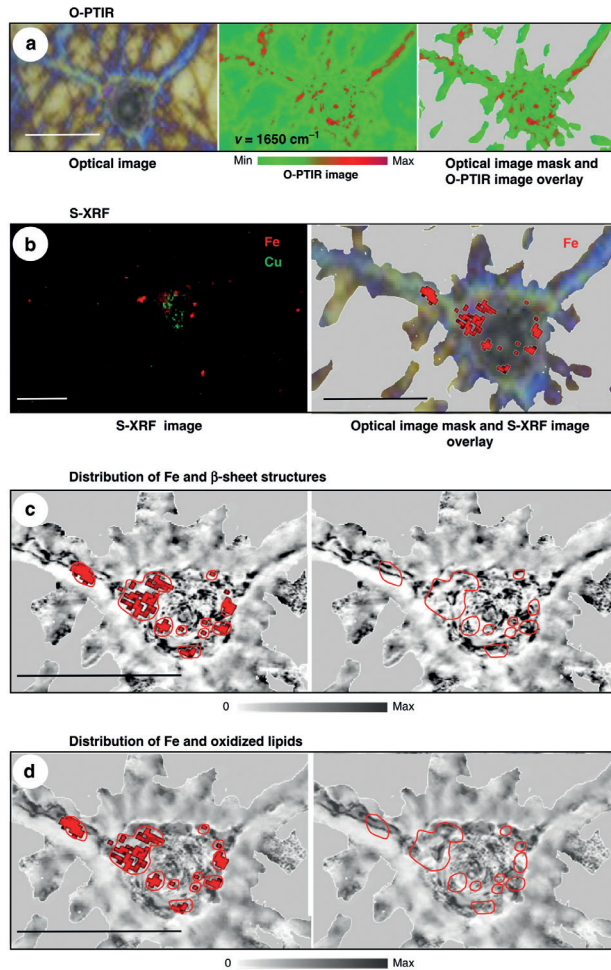
forskningsfält där många forskargrupper världen över försöker utredna mekanismen och hitta botemedel.

Ett exempel på forskning om detta är ett projekt som gjorts på bland annat MAX IV och som visar på styrkan i att kombinera många metoder för att finna svar. I Oxana Klementievas forskarlag medicinsk mikrospektroskopi på avdelningen för experimentell medicinsk vetenskap vid Lunds Universitet används flera mikroskopiska metoder för att belysa modeller av Alzheimerdrabbade nervceller, och i dessa celler undersöker de bildandet av amyloida plack och deras växelverkan med bland annat redoxmetaller (Gustavsson, 2021). De kombinerar de två inmärkningfria teknikerna optisk fototermisk infraröd mikroskopi (O-PTIR) och synkrotronbaserad röntgenfluorescensmikroskopi (S-XRF), vilka båda kan ge kemisk information med en rumslig upplösning på några hundra nanometer. Med O-PTIR ses skillnad på olika kolbaserade föreningar (fetter, proteiner, kolhydrater) genom deras karakteristiska kolvätebindningar. Bland annat synliggörs proteinernas sekundärstruktur, dvs. hur deras peptidkedjor är veckade.

Metoden är mycket känslig när det gäller att urskilja områden med amyloid-beta-protein veckat i så kallade betaflak och man kan upptäcka mycket tidig plackbildning. Områden i den nanouplösta kartan över nervcellen med ansamlingar av betaflak har också en tydlig signal från oxiderade lipider, se figur 1 a, c, d. I en korrelativ studie studerades samma cell med S-XRF (figur 1 b), en synkrotronbaserad metod som synliggör fördelningen av olika grundämnen, t.ex. järn och koppar.

Den studerade cellen är en nervcellsmodell för Alzheimers från genmodifierande möss som har fått en gen borttagen från sin arvs massa. De saknar APP och har därför inte naturlig bildning av AB. Om AB-protein tillförs mössen utvecklar de däremot symptom på Alzheimers med plackbildning. När de korrelerade kartorna från de olika metoderna jämfördes sågs att AB-aggregaten sammanföll med oxiderade lipider och ansamlingar av järn i modellnervcellen för Alzheimers (figur 1 c, d), medan den obehandlede cellen (utan tillfört AB) inte visade några ansamlingar. Då istället koppar studerades i samma försök kunde man inte se någon ansamling som sammanföll med de amyloida placken. Detta är första gången någon har visat på ett samband mellan järn och den skadliga effekten av plackbildning. Sambandet bekräftades då gruppen också mätte S-XRF på tunna snitt av en mushjärna och





Figur 1: Korrelerade kartor med optisk fototermisk infraröd mikroskopi (O-PTIR) och synkrotronbaserad röntgenfluorescens mikroskopi (S-XRF) av en nervcell. a) vänster, ljusmikroskopibild av en nervcell från musen som saknar APP och behandlats med konstgjort AB; mitten, O-PTIR-karta över samma nervcell; höger, bildmask som bara visar nervcellen i bild placerad över O-PTIR-bilden. b) vänster, S-XRF karta med fördelning av järn och koppar i samma nervcell; höger, järnkartan överlagd maskerade optiska bilden. c) vänster, överlagd järnkarta (röd) med en O-PTIR-karta som visar betaflak (svart), järnområdena inringade; höger, inringade områdena på betaflakskartan. d) samma som c men O-PTIR-kartan visar denna gång oxiderade lipider (bild från [Gustavsson, 2021] CC BY 4.0).

kunde se samma typiska ansamlingar av järn i modellmusen, men inte i kontrollmusen.

För att försäkra sig om att järnansamlingarna i de frystorkade cellproverna inte drabbats av strålskador, utan var kemiskt relevanta, användes ännu en röntgenmetod, XAS. Här analyserades järns, respektive koppars oxidationstillstånd i frystorkade cellprover vid rumstemperatur (precis som i S-XRF). Resultatet var att trevärt järn var stabilt över mätningens tid, medan de tvåvärda kopparjonerna snabbt reducerades till envärt koppar i röntgenstrålen. För vidare studier av koppar bör därför provet kylas ner till flytande kväves temperatur, eller kallare, för att minska strålskadorna.

Arbetet i den beskrivna studien illustrerar väl fördelarna med att kombinera flera mikroskopiska och spektroskopiska metoder för att öka tolkningsvärdet. Utan S-XRF skulle resultat från OPTIR med ansamlingarna av betaflak och oxiderade lipider inte kunnat kopplas till järnansamlingarna och vice versa. Faktum är att störd reglering av järn i celler ofta leder till ökad oxidativ stress (reaktiva syreföreningar som skadar cellen) från radikaler bildade i Fentonreaktionen<sup>2</sup>, något som är väl känt inom cancerforskning, men som även setts tidigare i studier av Alzheimer. Dessa radikaler skulle i sin tur kunna stjäla elektroner från fettsyror och starta en reaktionskedja som leder till just oxiderade lipider och skadade nervceller. Med andra ord ger de spektromikroskopiska iakttagelserna ledtrådar för vidare forskning.

En forskargrupp från Storbritannien har använt en annan av de tekniker som också erbjuds på MAX IV, STXM, där de kunde se vilken sorts oxidationstal järn har med nanoupplösning (Everett, 2018). De observerade samma sorts järnansamlingar som den svenska forskargruppen, men nu i mänsklig vävnad med amyloida plack. Med den spektromikroskopiska metoden STXM tittade de in i flera av dessa ansamlingar och såg en mix av järnvalenser (0, II, III och II/III). I ett fall dominerade trevärt järn, medan ett annat hade mest tvåvärt järn. Detta kan visa på pågående järnkemi i placken. Kanske variationen har med plackens utvecklingsstadier att göra. Mer forskning får utvisa. Samma forskargrupp var nyligen på MAX IV strålröret SoftiMAX för att göra mer STXM och den spännande fortsättningen följer.

<sup>2</sup>Förenklat,  $Fe-II + väteperoxid \rightarrow Fe-III + radikaler$ .

## Mikrofluidikbaserad provmiljö med möjligheter

Många vetenskapliga frågor, som i exemplet ovan, kan behöva belysas med flera kompletterande tekniker för att finna de svar man söker. Då är det viktigt det finns provmiljöer som underlättar undersökningarna. En sådan provmiljö är *AdaptoCell* — en mikrofluidikbaserad plattform som jag och mina kollegor i AdaptoCell-projektet har tagit fram för att studera flytande prover under nära fysiologiska förhållanden, t.ex. proteiner i lösning, med flera röntgenmetoder såsom XAS, SAXS och seriekristallografi av proteiner (SSX).

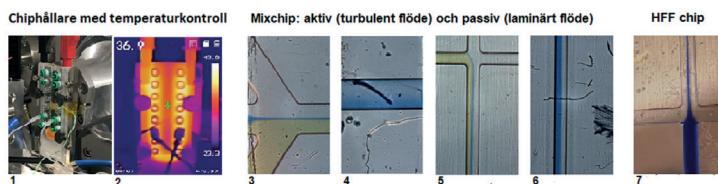
Mikrofluidik är läran om vätskor som är avgränsade på mikrometerskalan i någon dimension (höjd, bredd eller längd). När provet flödar i t.ex. en 1–100 mikrometer bred kanal blir flödesdynamiken laminär, dvs. flödet följer parallella linjer utan att blandas, i motsats till turbulent flöde som ”blandar om”. Det laminära flödet definieras av ett lågt *Reynoldstal* ( $Re < 2100$ ), medan ett turbulent flöde har ett högt ( $Re > 3000$ ). Reynoldstal mellan dessa värden svarar mot ett övergångsintervall.

### Reynoldstal

$$Re = \frac{U L}{\nu}$$

$U$  är mediets hastighet i [m/s],  $L$  är kanalens diameter [m] och  $\nu$  är mediets kinematiska viskositet [ $m^2/s$ ].

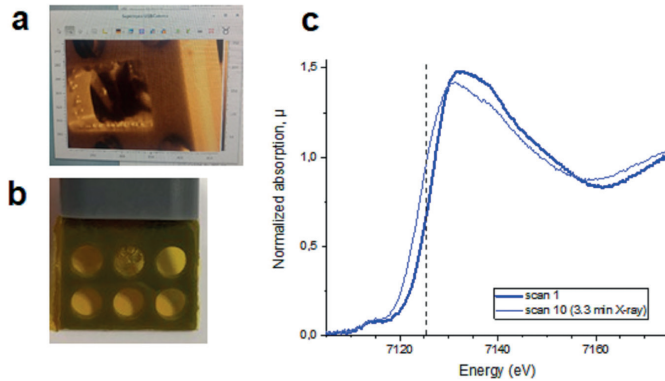
Det som gör mikrofluidiken till en attraktiv provmiljö är för det första att provet bör vara så homogent som möjligt, vilket uppfylls av det laminära flödet. Det vill säga, det prov som flyter förbi strålen på samma ställe i kanalen är likadant under hela experimentet. För det andra kan man följa en tidsutveckling genom att mäta på olika ställen längs med kanalen, vilket kan ge möjlighet att följa tidsförlopp på millisekunder. För det tredje innebär de smala kanalerna en minskad provåtgång (små volymer). Kanalerna finns i ett chip av ett röntgenhärdigt material, såsom vissa polymerer och glas. För det fjärde ger ett chip med olika utformning av kanalerna stora möjligheter att göra ytterligare analyser på själva chipet. Man kan t.ex. kontrollerat blanda olika substanser och följa en reaktion, eller ändra fysiologiska parametrar som temperatur, pH och syresättning, se figur 2. Det är också möjligt att integrera fler metoder, såsom spektrofotometri med synligt ljus med hjälp av små ljusledare.



Figur 2: 1 och 2: AdaptoCell på strålröret CoSAXS, med möjlighet att reglera värmen i chiphållaren. 2: En infraröd avbildning visar temperaturen på chipet. 3 och 4: Från ett och samma chip visas ett mixchip med en aktiv omblandning. Den gula lösningen innehåller en pH-indikator och är från början lätt sur. Den blir blå då den blandas med en basisk lösning (utan färg). Den aktiva turbulenta omblandningen gör hela kanalen blå. 5 och 6: Ett passivt mixchip, där de laminära flödena ger en annan typ av blandning. Färgen (pH-indikatorn) är en stor molekyl och kan inte lätt flytta sig mellan lösningarna, medan de små hydroxidjonerna som gör lösningen basisk rör sig över hela kanalen. Det resulterar i blå färg på bara en sida. 7: Ett chip för hydrodynamisk flödesfokusering (HFF), dvs. det blå provet i mitten flankeras av lösningen som flödar i sidokanalerna. På detta sätt kan man fokusera dvs. reglera bredden på den blå lösningen.

Varför vill man flöda provet istället för att titta på det statistiskt i en liten provhållare? Förutom de dynamiska möjligheterna nämnda i föregående stycke är många prover, speciellt vattenbaserade, mycket känsliga för röntgenljus. I ett vattenbaserat prov kommer radiolys (kemisk spjälkning av molekyler genom joniserande strålning) av vattnet ske under strålen och ge upphov till både fria elektroner, reaktiva radikaler och vätgas. Man kan till och med se bubblor bildas i strålen (se figur 3 a,b). Detta är dåligt av många orsaker: 1. provet förändras kemiskt (figur 3 c), 2. bubblorna förstör mätningen då provet ”simmar ur bild”. Om man istället kontinuerligt ersätter provet med ett nytt, som man gör i en flödescell, hinner inte strålskadorna påverka mätningen. Alla vätskor är inte lika känsliga för strålskador. Till exempel klarar sig många organiska lösningsmedel bättre än vatten. Liv är dock vattenbaserat och för att titta på biologiskt relevanta prover måste man hantera denna problematik. Därför är flödesceller eller fristående jetstrålar populära provmiljöer för vätskor vid synkrotroner, och högst relevanta för medicinska frågeställningar.

Vad är då AdaptoCell? Det är ett forskningsprojekt inom vilket vi har byggt upp en gemensam infrastruktur för mikrofluidik,



Figur 3: a) och b): Vattenbaserade prov i statistiska provhållare där röntgenstrålen har generat bubblor. c) XAS spektra från ett prov där absorptionskanten för järn har flyttats till lägre energi efter 3 minuter i röntgenstrålen; jämför scan 1 och scan 10. Kantflyttningen visar att provet har reducerats från trevärt till tvåvärt järn.

vilken spänner över flera tekniker och strålrör och finns tillgänglig för alla MAX IV:s användare. Vi (jag och mina forskarkollegor på MAX IV samt experter i Uppsala och Halmstad) har gemensamt tagit fram röntgentåliga chip som kan anpassas till olika experimentella behov, samt byggt upp en fristående flödesuppställning i ett laboratorium för att kunna ställa upp, karakterisera och provköra experimenten innan själva stråltiden äger rum. Projektet utformades, som tidigare nämnts, för att undersöka proteiner i en fysiologiskt relevant miljö.

De proteiner som finns i cellen fungerar som allt från byggstenar och signaleringssystem till enzymer som katalyserar olika reaktioner. En ökad förståelse av proteinernas funktion kan hjälpa oss att t.ex. bota sjukdomar, men den låter oss också inspireras av naturen för energi och materialframställning. För att förstå proteinernas samverkan och funktion i cellen behöver man studera proteiner i en miljö så nära cellens som möjligt. En standardmetod för att bevara och skydda proteinproverna är att frysa ner dem under experimentet, men detta utgör inte en normal miljö för proteinerna att utöva sin funktion i. För att kunna studera proteiners dynamiska samverkan med varandra, och deras funktion, behövs provmiljöer som tillåter förhållanden som är så nära de naturliga som möjligt. Ett sätt att tillhandahålla färsk prov till experimentet, som också ger möjlighet att stimulera och studera funktioner, är att flöda proteinet i en flödescell.

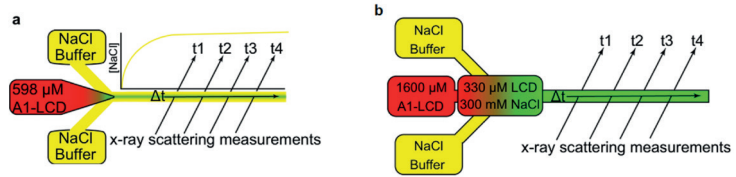
På strålröret Balder har vi använt AdaptoCell för XAS för att titta på den kemiska formen av de redoxmetaller som finns i många proteiner, t.ex. järn i hemoglobin som kan binda syrgas i sin tvåvärdiga form. Men chippen har även använts för att studera icke biologiska prover, bl.a. egenskaper hos det ”flytande bläck” som bildar det ljusabsorberande lagret i solceller. För den tillämpningen tog vi fram kemiskt inerta chip.

På strålröret CoSAXS har AdaptoCell för SAXS utrustats med temperaturreglering för att kunna undersöka proteiner och deras reaktioner vid korrekta fysiologiska temperaturer, t.ex. 37 °C, se figur 2, bilderna 1 och 2. CoSAXS-användare har undersökt skjuvspänning i proteiners fasövergångar, bildandet av nanopartiklar, samt studerat ostrukturerade proteiner. Nedan beskrivs några medicinska tillämpningar av SAXS.

För att cellen ska kunna utföra sina funktioner behöver biomolekylerna organiseras i tid och rum. Ett sätt att organisera dem är genom vätske-vätske-fasseparation, där kondensat snabbt formas och löses upp som respons på ändringar i koncentrationen och förändringar i omgivningen. I cellen bildas genom denna process små rum i dynamisk respons på t.ex. stress, signalförstärkning m.m. Exempelvis finns det biomolekyler som är ostrukturerade proteiner som saknar en fast eller ordnad tredimensionell struktur, men på detta sätt kan bilda kondensat.

Hur nukleringsprocessen startar i proteinerna har Tanja Mittag och hennes forskarlag på St Judes Research Hospital i USA undersökt med hjälp av ett prion-likt modellprotein med låg komplexitet (Martin, 2021). De använde tidsupplöst SAXS i ett fokuserande chip med tre ingångar; i mitten flödas proteinet och på sidorna finns det stark saltlösning. Längs kanalens laminära flöde kommer salthalten att öka i proteinlösningen, se figur 4 a. De såg ett tydligt samband mellan den omgivande saltkoncentrationen och proteinets förmåga att kondenseras. De mätte dessutom med tidsupplöst SAXS på ett chip med snabb aktiv omblandning (figur 4 b) och såg att den ursprungliga kompaktare inre veckningen skedde runt 470  $\mu$ s, innan den började växa i storlek genom att fler och fler proteiner gick ihop.

Proteiner påverkas generellt av saltkoncentrationen. Till en början ökar lösligheten av proteinet med ökad koncentration, vilket beror på att de laddade aminosyrorna skärmas av saltjonerna. Dessa attraherar i sin tur vattenmolekylerna, vilka bildar ett skal



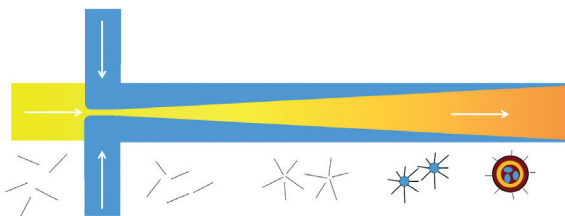
**Figur 4:** Bildtext översatt och förenklad från (Martin, 2021; CC BY 4.0).  
 a) Ett schematiskt laminärt flödesexperiment där proteinprovet flödas i mitten (rött) och fokuseras med hjälp av sidoflödena av saltlösning (gult) till en tunn ström av protein i saltlösning (grönt). Spridningsdata (SAXS) registrerades på olika avstånd efter att det fokuserade flödet startats vid de markerade positionerna ( $t$ ), vilket med kännedom av flödes hastigheten kan omvandlas till tid. b) visar ett annat schematiskt flödesexperiment från samma källa. Här används en snabb aktiv omblandning av proteinet (rött) och saltlösningen (gult) i den rödgröna boxen och blandningen (grönt) mäts med SAXS vid olika avstånd ( $t$ ).

runt proteinet. Över en kritisk saltkoncentration minskar lösligheten av proteinet, eftersom allt vatten nu går åt till att hydrera saltjoner. De hydrofoba krafterna mellan proteinkedjorna vinner och proteinerna klumpar ihop, aggregerar, ett fenomen som i läroböcker i kemi kallas att salta in respektive salta ut. De ostrukturerade proteinerna tenderar att ha en lägre andel laddade och fler hydrofoba aminosyror, vilket gör dessa protein än mer benägna att växelverka med varandra vid förändringar i saltkoncentrationen. Man kan säga att denna biologiska fassparation är kodad i strukturen.

Efter de senaste årens covid-19-pandemi har alla de av oss som tagit ett mRNA-vaccin mot SARS-COV2 kommit i närtkontakt med nästa tillämpning. För att stabilisera mRNA-molekylen packas den i så kallade lipidnanopartiklar (LNP) som består av nanodroppar av fettmolekyler. Med vaccinet i LNP tas det upp i cellerna innan det hinner brytas ner. Mikrofluidikchip är en effektiv metod för att producera LNP av jämn kvalitet.

Förenklat beskrivet: i ett korschip med tre ingångar (se figur 5) flödas en tunn polymerfas mitt emellan två snabbare vattenfaser. Faserna blandas med varandra längs med kanalen och lipidnanopartiklar bildas genom snabbmixning och spontan diffusion. För att förstå och förfina tillverkningsprocessen av LNP med värdefullt innehåll kan man studera dessa med SAXS direkt i mikrofluidik-

chippet under bildandet. SAXS ger svar på storlek, form och täthet av partiklarna. Man får ett smidigt verktyg för tidsupplöst karakterisering av de tidigaste dynamiska processerna i syntesen genom att koppla ihop synkrotron-SAXS med en röntgenkompatibel mikrofluidikplattform. Precis den här typen av mätningar kan man utföra med AdaptoCell på CoSAXS. Vi på MAX IV är inte den enda synkrotron som byggt upp en mikrofluidikbaserad plattform för röntgentekniker. Ett annat exempel är *SOLEIL* i Paris.



Figur 5: Schematisk bild av hur lipidnanopartiklar bildas i ett mikrofluidikchip (beskrivet i texten), polymerfas (gul), vattenfas (blå). Pilarna visar flödets riktning. Längs med kanalen blandas faserna och LNP bildas.

### Effektivt urval av läkemedelskandidater

Det är av högsta prioritet att utveckla nya läkemedel som människor runt om i världen har råd med. Fragmentbaserat urval (eng. *screening*) av nya läkemedelskandidater är en resurseffektiv metod. Flera olika biofysikaliska metoder kan användas för att hitta en träff, men den bästa är nog den röntgenbaserade, baserad på bestämning av proteinstrukturer. Med denna metod, *FragMAX*, ses exakt var fragmentet binder in i proteinet och man kan också detektera fragment med låg inbindningsstyrka. Målproteinet, som kan vara ett protein från en patogen cell kristalliseras och jämförs med stora bibliotek med fragment. Det görs genom att fragmenten inkuberas med proteinkristallen. Alternativt samkristalliseras fragmentet med proteinet från början.

Fragment är små molekyler som kan binda till specifika inbindningsställen, och som kan påverka aktiviteten eller hur mycket av proteinet som tillverkas i cellen. Fragmentens affinitet är ofta låg, då de har färre växelverkansytor än större molekyler, men kan ändå utgöra precis den startpunkt för läkemedelsutveckling



som behövs. De vinnande fragmenten tas vidare i utvecklingskedjan för att öka affinitet och för att titta på aktivitetspåverkan.

FragMAX är en plattform på MAX IV utformad för att underlätta fragmentbaserad sållning med hjälp av proteinkristallografi. Den är tillgänglig för alla användare och forskare, från såväl industri som akademi. Här ingår infrastruktur som kan hjälpa forskare med alla steg på vägen:

1. kristallisering med fragment,
2. datainsamling på strålröret BioMAX,
3. dataanalys,
4. identifiering av fragment,
5. sammanställning och rapport.

Det laborativa arbetet i punkt ett utförs på närliggande LP3 (Lunds proteinproduktionsplattform) som har en automatiserade pipetteringsrobot för att bearbeta kristallisationsplattorna, med en kapacitet på cirka hundra fragment per timme. Kristallerna som laddats med fragment kartläggs i en databas och skördas för strukturbestämning med hjälp av *kristallskiftaren*. Kristallerna stoppas i så kallade puckar och skickas till BioMAX på MAX IV för kristallografisk datainsamling. Väl på BioMAX laddas puckarna i en automatisk provbytare som består av ett kärl med flytande kväve, som håller kristallerna frusna, och en robotarm som kan plocka upp och sätta tillbaka kristaller och på så sätt byta prov. Väl laddade i kryokärlet kan både provbyten och diffraktionsdatainsamling ske fjärrstyrt, via en mjukvara kallad MXCuBE3.

För punkt tre till fem har forskarlaget kring FragMAX utvecklat en *FragMAX-app*. Appen övervakar experimentet, från första kartläggningen till datainsamlingen, men appens kanske största styrka är kedjan för dataanalysen. Analysdelen inkluderar strukturbestämning och godkännande av fragmentträffar för en rapport som kan publiceras.

Vilka fragment ska jag då använda? Ett fragmentbibliotek med cirka 96 fragmentmolekyler har sammanställts, lämpligt för kristallografi. Detta erbjuder en bra start. Det finns fler bibliotek, såväl akademiska som kommersiella, att välja mellan. Ett av de större är *F2X-universalbibliotek* som innehåller över 1100 molekyler. Nuförtiden går det så snabbt att strukturbestämma proteiner att en kontroll av 1000 fragment inte skulle ta mer än en vecka i anspråk på de mest automatiserade anläggningarna. Likande redskap för

fragmentbaserat urval med kristallografi finns på flera synkrotroner, *XChem* vid *Diamond* (Storbritannien) och *HZB Fragment Screening Facility* i Berlin är två exempel.

### MedMAX, Medicinsk avbildning med nya ögon

MedMAX är ett planerat nytt strålrör på MAX IV, helt öronmärkt till medicinsk forskning. Användarsamhället, dvs. forskarna bakom förslaget, har som mål att direkt påverka såväl kliniken som industriella processer, genom att tillverka ett strålrör för tomografi som kan avslöja morfologi, dynamik och funktion hos levande materia på längdskalor, från sub-mikrometers upplösning till flera centimeters synfält.

Tekniken som kan göra detta möjligt heter synkrotronljusbaserad mikrodatortomografi (SR $\mu$ CT). Det är en avbildningsteknik som utnyttjar röntgenljusets vågbeteende och ger en bättre faskontrast i mjukvävnad jämfört med standard-CT. Här kommer man utnyttja den höga koherensen i synkrotronljuset som produceras på MAX IV för att ge en högupplöst tredimensionell elektron-densitetskarta av provet, genom att optisk brytning av röntgenstrålen nu kan detekteras och matas in i fasåtervinningsalgoritmer. Här nedan presentera några vetenskapliga fall som illustrerar MedMAXs styrka: nanotomografi, mikrotomografi, och *in-vivo*-tomografi, dvs. tomografi på levande material.

På avdelningen för experimentell medicinsk vetenskap vid Lunds universitet har Karin Tran-Lundmarks forskargrupp tittat på lungans fysiologi för att förstå orsakerna bakom pulmonell hypertoni, alltså högt blodtryck i lungan. Det är ett tillstånd med få behandlingsalternativ och ganska dålig prognos. Dagens terapier är i huvudsak vasodilatorer (kärlutvidgande) men dessa har begränsad effekt på den vaskulära ombyggnaden, då kärlen tar nya vägar till följd av kärlblockeringar och därmed behövs nya behandlingar. För att kunna utveckla dessa behöver man öka kunskapen om de kliniska fall som finns med pulmonell hypertoni. Den traditionella tvådimensionella histologin har haft svårt att visa lungans invecklade förgreningar och här kan 3D-tomografin göra stor skillnad. Gruppen har besökt ett MedMAX-liknande strålrör i Schweiz, kallat *TOMCAT*.

Där mätte de på lungvävnad (formalinfixerat paraffinsnitt) från en patient som hade transplanterats p.g.a. högt blodtryck i lungan. De kunde se hur kärlen blockerats och blodet hade för-

sökt ta nya vägar (vaskulär ombyggnad) på ett sätt de aldrig kunnat förut (Westöö, 2021). Nästa steg i studien är att jämföra denna typ av mikroanatomi från fler patientgrupper och dessutom med de vanliga djurmodeller som idag används för att studera pulmonell hypertoni. Högst på önskelistan för MedMAX står studier *in-vivo* över tid, för att kunna följa förändringen i vävnadsmorfologi, och dynamiska studier för att titta på andningscykeln. Dessutom ses synkrotronbaserad tomografi som icke-förstörande och vävnaden kan användas för vidare, mer klassiska studier, med t.ex. immunohistokemi.

Nästa exempel kommer från Emely Bairds grupp på Stockholms universitet. De vill undersöka hur bin navigerar i regnskogen. När bin söker efter nektar kan de navigera över tiotals kilometer genom kompakt vegetation i regnskogen. Det enda som vägleder regnskogsbiet är deras lilla hjärna och fasettögonen. Regnskogen är speciellt svår att ta sig genom, eftersom bladverket förändrar ljusets intensitet och även täcker solen ovanför. Solen kan annars användas som en naturlig kompass hos ”vanliga” bin. Forskargruppen ställde sig frågan: är det så att tropiska bin har specialiseringar som hjälper dem att optimera behandlingen av den begränsade informationen som finns för att ändå få en effektiv visuell flygkontroll och navigation? För att ta reda på detta använde de SR $\mu$ CT på bland annat TOMCAT för att undersöka synsystemet hos olika tropiska bin och jämföra dem med vanliga bin från mindre komplex vegetation. Preliminära analyser av de högupplösta 3D-bilderna indikerar att tropiska bin har flera fysiska anpassningar som aldrig tidigare skådats. Forskningen går vidare, och även här är nästa önskade steg att med tidsupplöst *in-vivo*-tomografi titta på levande bin som flyger för att förstå hur de navigerar. Kanske kan människan lära av naturen och utveckla flygande robotar baserat på denna kunskap.

MedMAX har potential att i grunden förändra vår kunskap om biologi och medicinska frågor med de nya tomografiska ”ögonen” på samma sätt som proteinkristallografin förändrat vår kunskap om proteiner.

## Avslutningsord

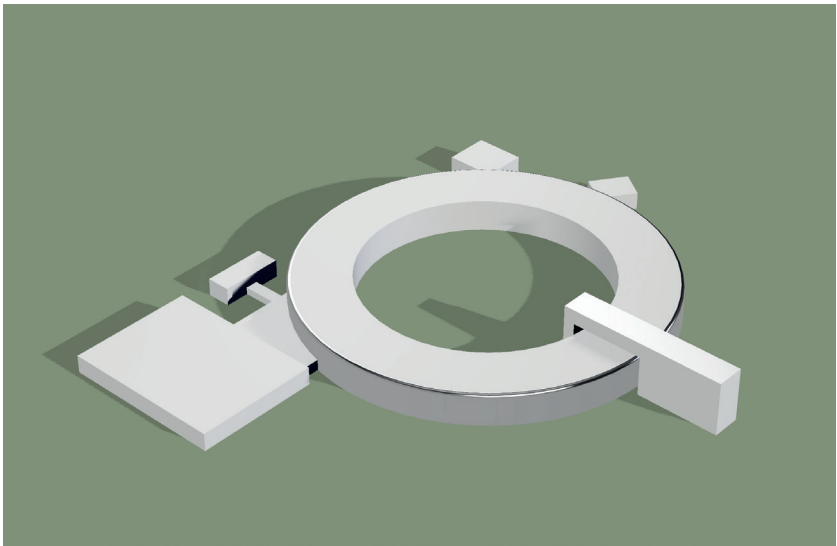
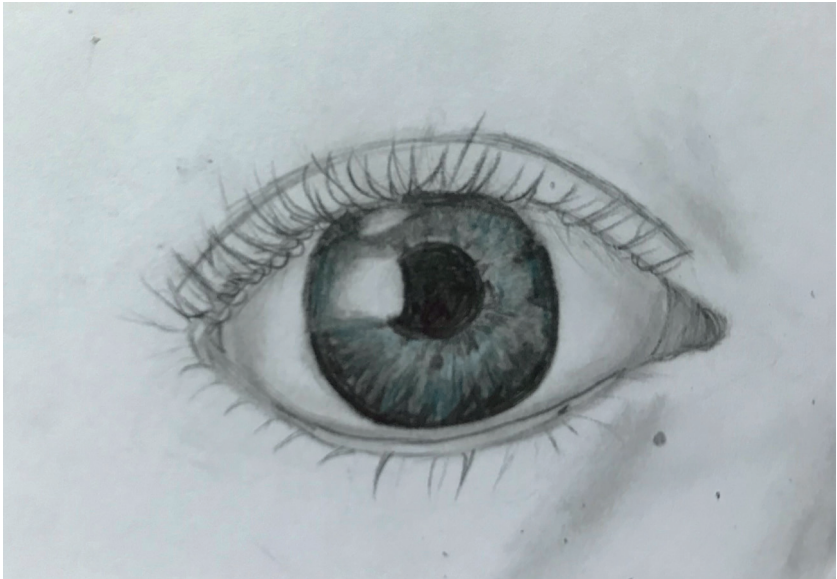
Synkrotronljuset har under många år försett forskare med nya ögon och genererat ovärderlig kunskap som driver den medicinska forskningen framåt. Synkrotronen fungerar som ett multiverk-

tyg för forskarna där nya instrument ständigt tillkommer. Medicinska forskningsfrågor är komplexa med flera dimensioner, allt från kliniken, ner till cell- och molekylnivå. Här kan en kombination av synkrotronlusanläggningens många instrument nyttjas för att finna svar på detaljnivå och på olika längdskalor. Den klassiska proteinkristallografin har fram till idag haft absolut störst betydelse för vår kunskap om cellens byggstenar och maskiner. I dagsläget studeras större proteinkomplex med framförallt *cryo-EM* (kryo-elektronmikroskopi). Framöver spås avbildningsmetoderna bli allt mer betydelsefulla för möjligheten att skapa ny förståelse för mer avancerade biologiska sammanhang. Faktum är att utan synkrotronljus skulle vi inte känna till alla de detaljer vi nu vet om vår egen förmåga att se, som beskrevs inledningsvis. Sammanfattningsvis, *för att se behöver vi ljus*.



## Vidare läsning

- Gustavsson N. *et al.* (2021). Correlative optical photothermal infrared and X-ray fluorescence for chemical imaging of trace elements and relevant molecular structures directly in neurons, *Light Sci. Appl.*, 10, 151.
- Everett J. *et al.* (2018). Nanoscale synchrotron X-ray speciation of iron and calcium compounds in amyloid plaque cores from Alzheimer's disease subjects, *Nanoscale*, 10, 11782.
- Knopman D. S. *et al.* (2021). Alzheimer disease, *Nat. Rev. Dis. Primers*, 7, 33.
- Lecoer J. *et al.* (2019). The role of optic flow pooling in insect flight control in cluttered environments, *Sci. Rep.* 9, 7707.
- Lima K. M. A. *et al.* (2020). FragMAX: the fragment-screening platform at the MAX IV Laboratory, *Acta Cryst. D*76, 771.
- Martin E. W. *et al.* (2021). A multi-step nucleation process determines the kinetics of prion-like domain phase separation, *Nat. Commun.* 12, 4513.
- Westöö C. *et al.* (2021). A Distinct types of plexiform lesions identified by synchrotron-based phase-contrast micro-CT, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 321,(1) L17.



*Bilder från montaget på sid 28  
Ögat: Freja Havelius, 14 år, författarens dotter.  
Den stiliserade Max-anläggningen: Göran Durgé.*