

Om forfatterne



Theresa Louise Boye¹ er ph.d.-studerende på Kræftens Bekæmpelse. Arbejder med cellestudier af membranreparation, modelmembraner og rekombinant fremstilling af Annexiner.



Martin Berg Klenow² er ph.d.-studerende ved Institut for Fysik, Kemi og Farmaci, SDU. Arbejder med modelsystemer for membranreparation.



Jesper Nylandsted¹ er leder af Membrane Integrity Group på Kræftens Bekæmpelse. Forskning i mekanismer for membranreparation og nye behandlingsformer for kræft, som udnytter disse mekanismer.



Adam Cohen Simonsen² er lektor ved Institut for Fysik, Kemi og Farmaci, SDU. Forskning i membraners fysik og udvikling af modelsystemer til at undersøge membranrelaterede mekanismer i celler.

1) Membrane Integrity Group, Kræftens Bekæmpelse, Center for Kræftforskning, København. www.cancer.dk/research

2) Institut for Fysik, Kemi og Farmaci (FKF), Syddansk Universitet (SDU). www.sdu.dk/da/om_sdu/institutter_centre/fysik_kemi_og_farmaci

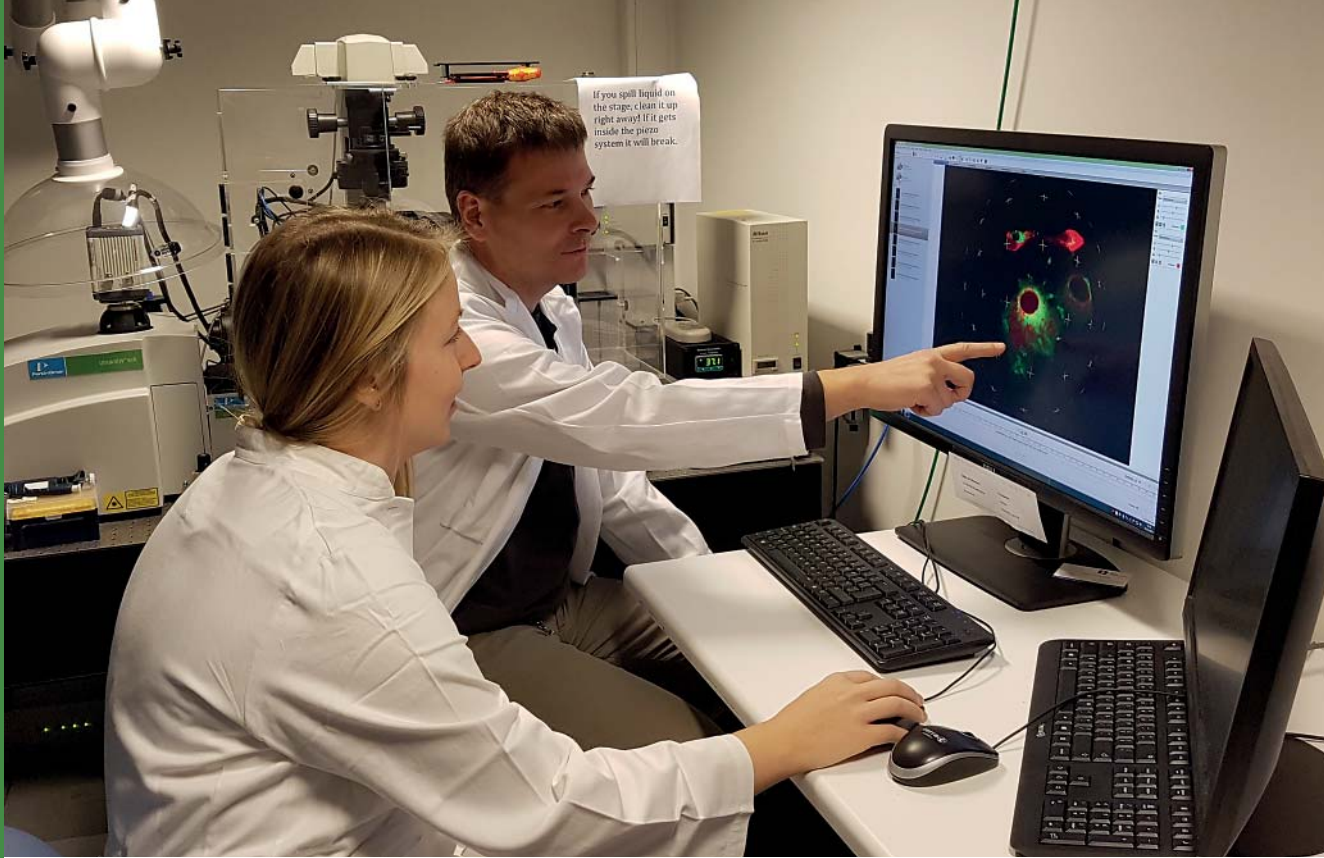


Foto: Stine Lauritzen Sønder

KRÆFTCELLER OVERLEVER VED AT BØJE CELLEMEMBRANEN

Kræftceller er meget robuste overfor skader, f.eks. reparerer de selv huller i deres cellemembran. Det er en af grundene til, at kræft effektivt kan sprede sig. Forskerne er nu kommet nærmere en forståelse af, hvordan reparationsprocessen i celler foregår på nanoskala. På sigt kan det føre til mere effektiv behandling.

Biologiske celler er omgivet af en plasmamembran, som adskiller dem fra omgivelserne. Det er en forudsætning for liv, som vi kender det. Plasmamembranen består af en blød film af fedtstoffer med en tykkelse på kun to fedtmolekyler eller cirka 5 nanometer. En nanometer er en meter delt med en milliard.

Hvis plasmamembranen bliver beskadiget, er det nødvendigt for cellen, at skaden repareres på få sekunder. Ellers dør den, fordi den ikke kan opretholde sin unikke sammensætning, hvis den er utæt. Skader på membranen kan opstå ved påvirkninger fra det omgivende væv og forekommer særlig ofte i celletyper, som er meget aktive og dynamiske. Det gælder eksempel-

vis mange kræftformer. Anlægget for at reparere huller findes også i normale celler, men kræftceller har udviklet en særlig "superkraft" til at reparere membranskader. Hvis vi kan forstå, hvordan de gør det, åbner det i princippet mulighed for at udnytte den viden til sygdomsbehandling. Og med et nyt forsknings-samarbejde mellem Kræftens Bekæmpelse og Syddansk Universitet

er den forståelse nu kommet et skridt nærmere.

Cellemembraner er simple og sofistikerede

Membraner findes overalt i celler. Plasmamembranen afgrænser cellen mod omgivelserne, og inde i cellen definerer membraner en lang række organeller. Organeller er strukturer i cellen med særlige funktioner, f.eks. mitokondriet, som er cellens "kraftværk".

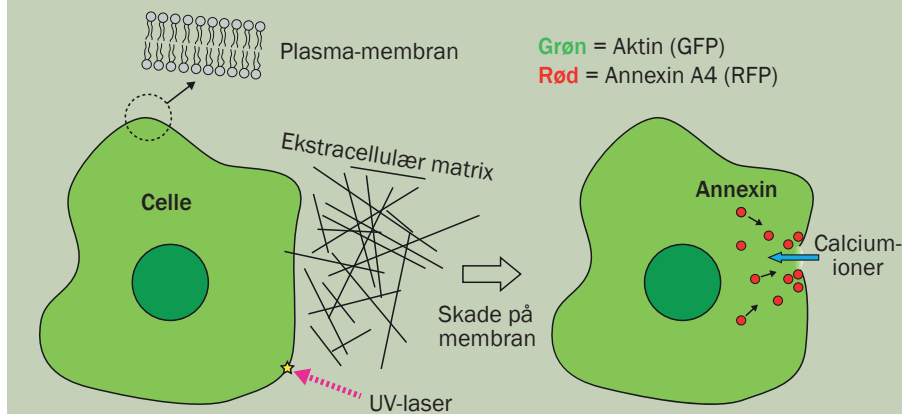
Selvom cellemembraner er yderst komplekse og består af mange dele, så er den basale struktur simpel: En film bestående af fedtstoffer som spontant samler sig til et dobbeltlag i vand. Selvsamlingen skyldes, at fedtmolekylerne er amfifile, dvs. den ene del af molekylet kan binde til vand (hydrofil), mens den anden ende skyr vandet (hydrofob). I dobbeltlagets struktur har den hydrofile del af fedtmolekylerne kontakt med vandet, mens den hydrofobe del er skærmet fra vandet.

Plasmamembranens opgave er dog ikke kun at isolere cellens indhold fra omgivelserne, men i lige så høj grad at sørge for en kontrolleret transport af molekyler og signaler ind og ud af cellen. Denne transport foregår ved hjælp af mange tusinde forskellige proteiner i cellemembranen, som er specialiseret til hver deres opgave.

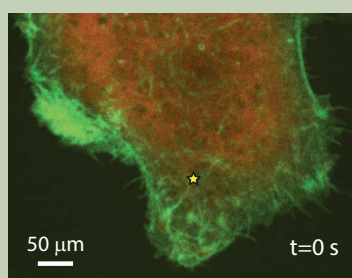
Hvis der går hul på plasmamembranen, forstyrres cellens kemiske balance, og det fører hurtigt til, at cellen dør, hvis skaden ikke udbedres. Men i mange tilfælde kan celler reparere selv ret store skader på membranen og leve videre. Studiet af membranreparation er et voksende felt, men fortsat relativt nyt. Men den forskningsmæssige interesse er stor, da processen spiller en væsentlig rolle i en lang række sygdomme.

Selvlysende farvestof afslører reparationsproteiner

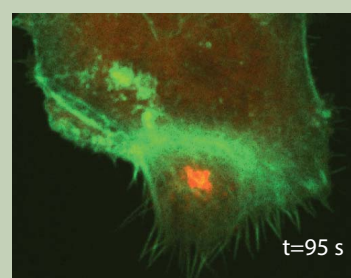
Tidligere mente mange forskere, at huller i cellemembranen spontant lukker sig selv, da membranen er



Beskadigelse og reparation af plasmamembranen i en kræftcelle. Skaden kan påføres naturligt af påvirkninger fra det omgivende væv eller kunstigt af en fokuseret laserstråle på celler i en cellekultur. Efter skaden er opstået, strømmer calcium-ioner ind i cellen, og derfor kan proteinet annexin binde til membranen i nærheden af hullet under reparationsprocessen.



Kræftcelle før laser-skade



Efter skade: Annexin (rød) ved hullet

Fluorescensmikroskopi før og efter en kræftcelle beskadiges med en laser i punktet markeret med *. Proteinets annexin er mærket med rødt farvestof og proteinet aktin er mærket med grønt. Ved hjælp af de proteiner, der strømmer til skadesområdet, er cellen nu i stand til at reparere sig selv og leve videre.

en blød og selvsamlet struktur. I dag ved vi, at sådan spontan reparation formodentlig kun er relevant for meget små huller på få nanometer. For større skader har celler udviklet avancerede processer til at reparere huller, og forskningen er i disse år kommet nærmere en forståelse af de basale mekanismer. Problemet er grundlæggende tværfagligt og kræver bl.a. samarbejde mellem cellebiologer og biofysikere.

En afgørende metode til at få viden om membranreparation er at studere, hvordan individuelle celler i en cellekultur reagerer, når de udsættes for en kontrolleret form for skade. En cellekultur består af celler udenfor deres naturlige omgivelser, som er dyrket i et kunstigt vækstmedie.

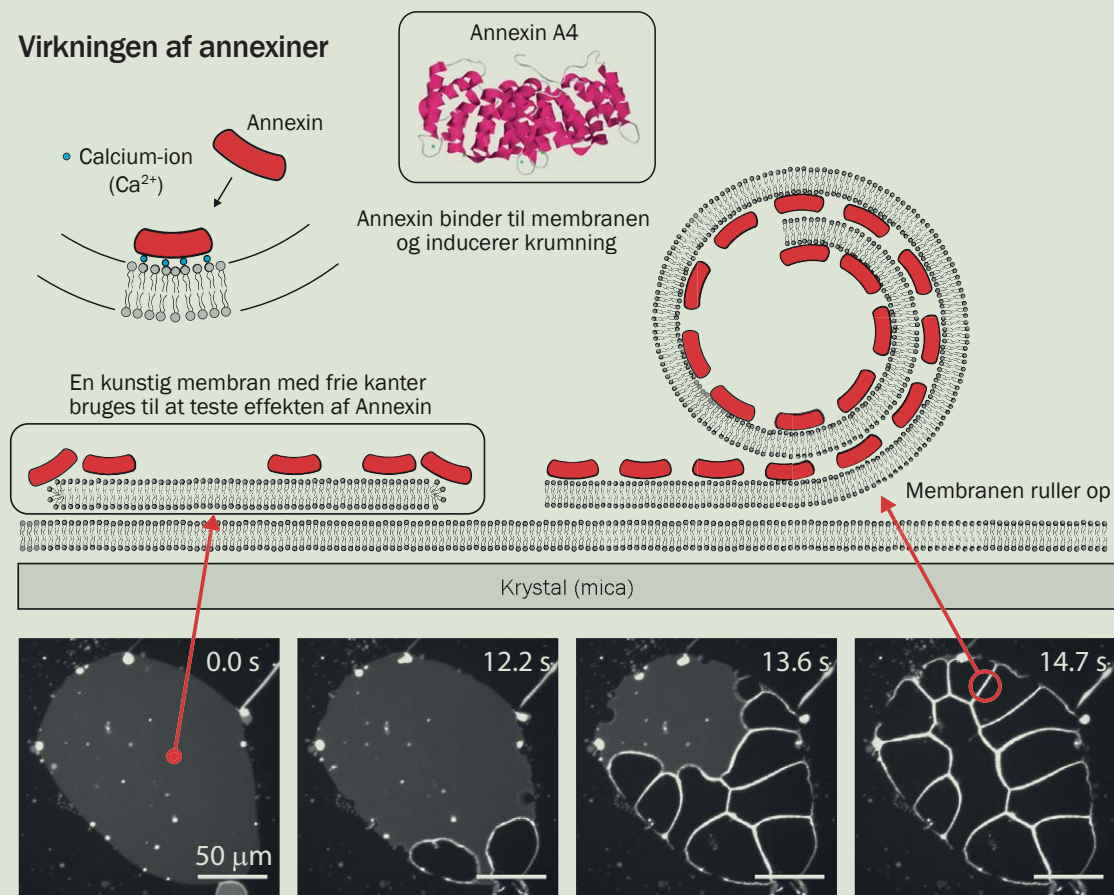
Vi har filmet cellers reaktion på en skade i et fluorescensmikroskop,

hvor vigtige molekyler er markeret med fluorescerende, dvs. selvlysende, farvestof. Herved kan vi følge med i, hvordan reparationsmolekylerne bliver omfordelt i cellen efter en skade.

Når en kræftcelle under mikroskop bliver beskudt med en kraftig, fokuseret laserstråle, opstår et hul i plasmamembranen på få mikrometer. Efter ganske få sekunder ser vi, at et protein ved navn annexin A4 (farvet rødt) bliver koncentreret omkring skaden. Lidt senere bliver også proteinet aktin (farvet grønt), som indgår i cellens skelet, koncentreret. Med de særlige proteiner, der strømmer til skadesområdet, er cellen nu i stand til at reparere sig selv og leve videre.

Ud fra forsøget ved vi derfor, at flere proteiner i annexin-familien er involveret i membranreparation.

Virkningen af annexiner



Øverst: Kunstige membraner kan benyttes til at teste virkningen af annexiner under kontrollerede forhold. Annexin binder til membraner med negative ladninger ved hjælp af calcium-ioner. Når det binder, medfører annexin en "spontan krumning" i membranen – det vil sige, at membranen har lavere energi, hvis den er bøjet. En flad membran-ø på et fast underlag reagerer derfor på binding af annexin ved at rulle op.

Nederst: Film optaget med fluorescens-mikroskop, som viser den gradvise oprulning af en membran-ø inden for få sekunder. Rullerne er de lyse bånd, som starter forskellige steder på kanten af membran-øen og til sidst transformerer membranen til et skeletlignende mønster af ruller.

Annexiner kan binde til membraner, når der er calcium-ioner (Ca^{2+}) til stede, og en skade på plasmamembranen medfører netop, at calcium strømmer ind i cellen udefra. Men det store spørgsmål er, præcis hvilken virkning annexiner har på membraner, og hvad mekanismen er for reparationen. Her viser det sig, at forsøg med kunstige membraner kan give nogle af svarene.

Membran-sandwich tillader forsøg

For at komme nærmere, hvordan annexiner påvirker membraner, har vi designet et kunstigt system, som efterligner vigtige forhold i en celle under reparationen. Når der går hul på plasmamembranen, opstår en fri kant i membranen. Denne frie kant

er sandsynligvis en vigtig struktur i reparationsprocessen.

Hvis man forsøger at lave en fritstående kugleformet membran, en såkaldt vesikel, med et hul, viser det sig dog hurtigt, at membranen er ustabil. Vesiklen går i stykker – lidt som en sæbeboble, der springer. Det skyldes, at frie kanter i membraner har en høj energi, som giver anledning til en kraft langs kanten af hullet. Kraften kaldes en linjespænding.

I stedet anbragte vi membranen på en overflade, som stabiliserer membraner med frie kanter. Nærmere bestemt benytter vi et dobbelt membransystem af flade "membran-øer", som ligger ovenpå en anden membran, der så igen

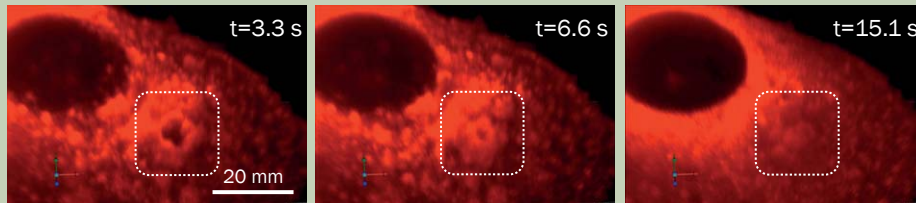
er stabiliseret af overfladen på en krystal. Virkningen af denne membran-sandwich er, at membran-øerne bliver holdt fast på overfladen af så tilpas svage kræfter, at de stadig opfører sig som fritstående membraner, men samtidig er så stabile, at det er muligt at lave forsøg med dem. Kanten af membran-øen efterligner kanten af et hul. Systemet kan derfor benyttes til at studere, hvordan annexiner virker nær huller i plasmamembranen.

Selve den kunstige membran består af de to fedtmolekyler POPC og POPS. POPS er nødvendigt, for at annexin kan binde. Når de kunstige membran-øer bliver udsat for annexin A4, sker det specielle, at membranen i løbet af ganske få sekunder ruller sig sammen.

Øverst: Efter annexin har bundet, krummer membranen og danner en karakteristisk krave-struktur omkring hullet. Den frie kant i membranen langs randen af hullet giver anledning til en såkaldt linjespænding langs kanten. I en simpel model vil krumningen og linjespændingen tilsammen definere formen af kraven.



Nederst: 3-dimensionel fluorescens-mikroskopi viser dannelsen af en kortlivet krave-struktur i en kræftcelle under en succesfuld reparationsproces.



Processen starter fra de frie kanter. Det minder om et gulvtæppe, som rulles sammen, bortset fra at her er der tale om et blødt, selvsamlet materiale med en tykkelse på 5 nanometer.

I eksperimenterne kan vi se, at oprulningen starter flere steder langs kanten af membran-øen, og at rullerne til sidst mødes i lange, lysende bånd. Vi har eftervist, at processen rent faktisk er en rulning og ikke en anden form for ændring i membranens struktur. Dette er bl.a. gjort ved at måle tykkelsen af rullerne med teknikken Atomar Kraftmikroskopi (AFM), som kan "se" formen af strukturer i membraner på nanoskala.

Reparation starter med en krum kant

Vi fortolker rulle-forsøgene sådan, at når annexin binder til overfladen af en membran, bliver der induceret en såkaldt 'spontan krumning'. Det betyder, at membranen kan opnå en lavere energi ved at være krum end ved at være flad. Det er velkendt, at mange proteiner og biomolekyler kan få membraner til at bøje ved at inducere spontan krumning, når de binder.

Årsagen til, at annexin A4 medfører bøjning af membraner, er formodentlig, at proteinet har form som en krum skive, hvor den konvekse del af molekylet - altså den overflade, der buer udad - binder til over-

fladen af membraner, når der er calcium-ioner tilstede. I mennesker findes der 12 forskellige proteiner i familien af annexiner, der alle indeholder et såkaldt 'core-domæne' med form som en krum skive, som kan binde til membraner. Derfor er det naturligt at forvente, at alle annexiner kan få membraner til at bøje. Det er da også konklusionen fra vores forsøg med kunstige membran-øer, hvor vi har testet flere medlemmer af annexin-familien.

Hvordan skal man så oversætte resultatet af modellforsøgene til forholdene i en celle? Forsøgene med kunstige membran-øer fortæller os, at annexiner virker ved at få membraner til at bøje i nærheden af frie kanter svarende til kanten af et hul i plasmamembranen.

Hvis vi betragter geometrien af et cirkulært hul, så medfører en spontan krumning af membranen i nærheden af hullet, at der bliver dannet en karakteristisk "krave-formet" struktur udenom hullet. Den førømtalte linjespænding, som virker som en slags elastik langs kanten af hullet, modvirker dannelsen af en krave. Den endelige form af krave-strukturen er derfor en balance mellem linjespændingen og den spontane krumning. Ved hjælp af en teoretisk model for bøjning af membraner har vi eftervist, at annexin rent faktisk kan danne en kraveformet struktur uden om et hul.

Forståelse bringer kræftforskningen fremad

Vores resultater tyder på, at krumning af membranen udenom et hul udgør det første trin i cellens reparations-system. Ved hjælp af 3D-fluorescensbilleder af celler under reparation har det også været muligt direkte at fange denne kortlivede kravestruktur i en levende celle.

Den endelige lukning af hullet sker formodentlig ved, at kraven indsnævres og til sidst bliver afsnøret. Vi ved, at bl.a. endnu et protein kaldet annexin A6 er involveret i denne proces - forventelig sammen med en række andre proteiner.

Vores resultater indikerer samlet, at krumning spiller en afgørende rolle i membranreparation, men det er samtidig også er klart, at processen endnu ikke er fuldt forstået. Vi arbejder derfor i øjeblikket på at af-dække flere aspekter, eksempelvis ved hjælp af nye slags modellforsøg og computersimuleringer af membraner.

Hvis vi til sidst fuldt ud forstår, hvordan reparationsmekanismen virker, så åbner det i princippet mulighed for at udnytte den viden til sygdomsbehandling. Det er ikke umuligt at forestille sig, at der i fremtiden udvikles lægemidler, som f.eks. kan hæmme reparationsmekanismen i kræftceller, så de dermed bliver mindre modstandsdygtige overfor andre typer af behandling. ■

Yderligere læsning
"Annexin A4 and A6 induce membrane curvature and constriction during cell membrane repair". T.L. Boye, K. Maeda, W. Pezeshkian, S. L. Sønder, S.C. Haeger, V. Gerke, A. C. Simonsen, J. Nylandsted. Nature Communications 8: 1623 (2017), DOI: 10.1038/s41467-017-01743-6

"Annexins induce curvature on free-edge membranes displaying distinct morphologies" T. L. Boye, J. C. Jepsen, K. Maeda, W. Pezeshkian, V. Solovyeva, J. Nylandsted, A. C. Simonsen. Scientific Reports 8:10309 (2018), DOI:10.1038/s41598-018-28481-z

Projektet er finansieret af Danmarks Frie Forskningsfond (DFF).