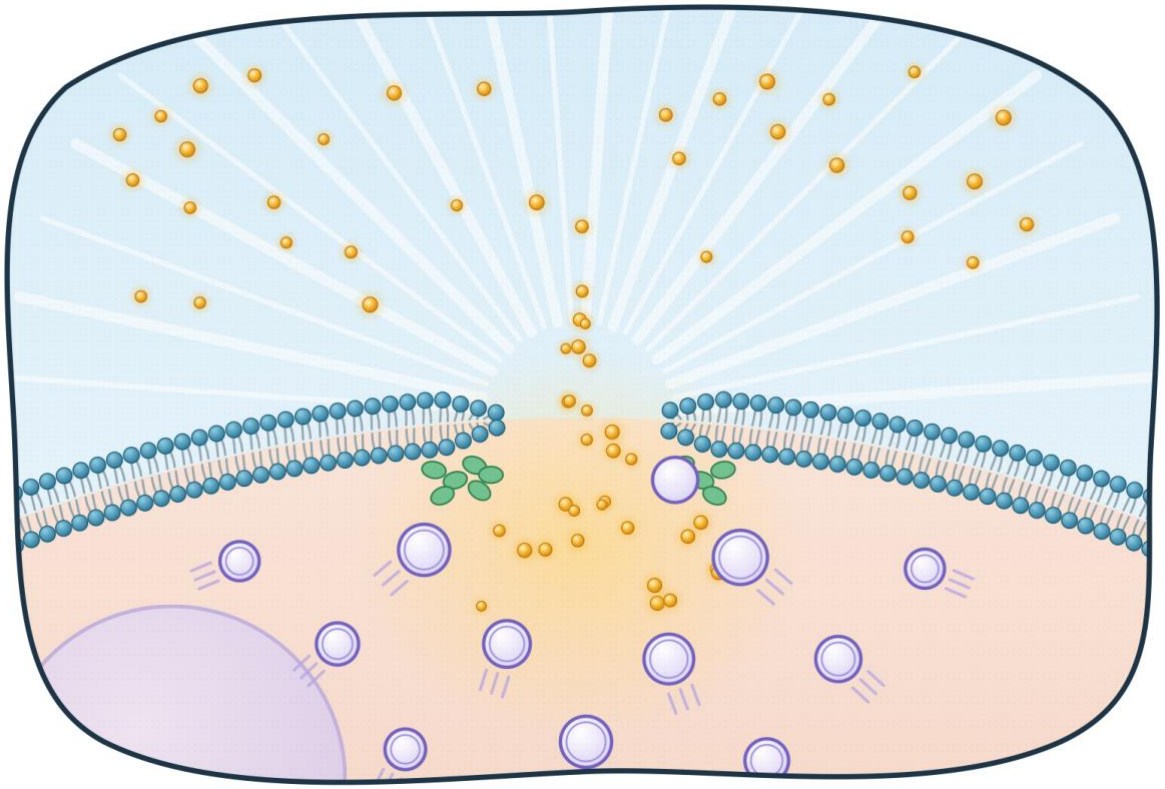


Fra sår til styrke: Et in vitro studie af priming af membranreparation i kræftceller

Projekt Forskerspirer 2026	
Titel	Fra sår til styrke: Et in vitro studie af priming af membranreparation i kræftceller
Identifikationskode	BQ042
Navn	Jeppe Toftdahl
Gymnasium	Herlufsholm Gymnasium
Fagområde	SUND

Indholdsfortegnelse

1. Indledning ***3***

2. Problemformulering, formål og afgrænsning ***3***

3. Teori ***4***

3.1 Membranreparation 4
3.2 Priming af membranreparation 5
3.3 Kræftceller og membranreparation 5
3.4 Måling med propidiumiodid 5

4. Metode ***6***

4.1 Cellelinjer 6
4.2 Ultralyd som skademodel 7
4.3 Kalibrering af doserne 7
4.4 Aflæsning 7
4.5 Forsøgsopstilling og kontroller 8
4.6 Databehandling 8

5. Projektets udførelse ***9***

5.1 Faser og tidsramme 9
5.2 Budget 9

6. Konklusion og perspektivering ***10***

6.1 Forventet resultat 10
6.2 Perspektivering 10

7. Anerkendelse ***11***

Litteraturliste ***12***

Bilag 1 - Forsideillustration ***14***

Bilag 2 - Cellemembranen og membranreparation ***15***

Bilag 3 - Priming af membranreparation ***18***

Omfang: 2.302 ord
(ekskl. indholdsfortegnelse, fodnoter, tabeller, litteraturliste og bilag)

1. Indledning

Når kræftceller spreder sig i kroppen, bevæger de sig gennem tæt væv og ind i blodkar. Dette forårsager gentagne skader på kræftcellens membran, og derfor er cellen nødsaget til at have effektive reparationsmekanismer.[1] Reparationsevnen eksisterer i alle celler, men grundet kræftcellers metastatiske natur er de hyppigere udsat for membranskade. Et hul i cellemembranen er som udgangspunkt dødeligt, fordi calcium strømmer ind fra omgivelserne, hvor koncentrationen er tusindvis af gange højere end inde i cellen.[2] Alligevel overlever cellen, fordi den kan lukke hullet igen.

Evnen er altså ikke en tilfældig egenskab ved kræftceller, men et nødvendigt redskab for, at de kan sprede sig. Derfor udgør den også en svaghed, idet en hæmning af membranreparationen gør invasive kræftceller langt mindre levedygtige.[3]

I ikke-maligne celler har man samtidig fundet, at membranreparationen kan trænes. En tidligere skade gør cellen bedre til at reparere den næste.[4] Denne træning, også kaldet priming, er så vidt jeg har kunnet finde aldrig undersøgt i menneskelige kræftceller. Det lægger op til at undersøge, om priming findes i kræftceller, og om den virker anderledes end i ikke-maligne celler.

Det er netop dette hul i forskningen, der har fanget min interesse. Kræftceller er afhængige af at kunne reparere deres membran, og alligevel ved man ikke, om de også kan trænes til det. Kan kræftceller trænes bedre end ikke-maligne celler, vil træningsevnen være noget, en behandling kan rette sig mod. Samtidig er kræft en sygdom, der rammer mange, også som pårørende, hvilket jeg selv har oplevet. Derfor er det vigtigt for mig at bidrage til forskning om kræft.

2. Problemformulering, formål og afgrænsning

Problemformulering: Kan kræftcellers membranreparation trænes af en tidligere, mild skade, og er denne træningsevne i givet fald stærkere end i ikke-maligne celler?

Problemformuleringen undersøger altså både, om egenskaben overhovedet findes i kræftceller, og om den er kraftigere end i ikke-maligne celler. Begge dele undersøges ved at måle reparationskinetikken, dvs. den hastighed, hvormed cellen lukker membranen efter en skade. Det sker i cellelinjerne MCF-7 og MCF-10A, som er hhv. malign og ikke-malign.

Formål: Priming af membranreparation er kun snævert undersøgt og er mest beskrevet i ikke-maligne dyreceller.[5] Jeg har hverken kunnet finde studier, der undersøger priming af kræftcellers samlede reparationsevne, eller studier, der sammenligner effekten mellem maligne og ikke-maligne celler fra samme væv. Reparationskinetikken analyseres på tværs af forsøgsbetingelser og cellelinjer, og et positivt resultat lægger op til en diskussion af, om

[1] (Jaiswal & Nylandsted, 2015; Lauritzen et al., 2015).
[2] (Ammendolia et al., 2021).
[3] (Bouvet et al., 2020; Jaiswal et al., 2014).
[4] (Togo et al., 2003).
[5] (Togo, 2004, 2012; Togo et al., 1999, 2003).

reparationsmaskineriet kan være et behandlingsmål (afsnit 6). Formålet er dermed at afgøre, om træningseffekten er kræftselektiv.

Afgrænsning: Projektet undersøger, om effekten findes, og hvor stor den er, men jeg har fravalgt at gå mere i dybden med de specifikke faktorer i processen, da det ville kræve, at man slår enkelte proteiner ud, hvilket er mere omfattende og dyrere. Et positivt resultat viser derfor et fænomen, men forklarer ikke den underliggende mekanisme nærmere. Jeg bruger desuden kun én skademetode, så resultaterne kan variere ved andre typer membranskade. Tilsvarende kan ét cellepar ikke repræsentere maligne og ikke-maligne celler bredt. Endelig undersøger jeg kun priming 30 minutter efter den milde skade, så forsøget siger ikke noget om effekten efter kortere eller længere tid.

3. Teori

Teorien herunder er den viden, mit metodevalg bygger på. Fokus er på, hvordan membranreparation foregår, herunder hvordan reparationen kan primes, hvorfor det er særligt relevant for kræftceller, og hvordan reparationen kan måles.

3.1 Membranreparation

Cellemembranen er et dobbeltlag af fosfolipider, som ioner og store molekyler ikke kan passere frit. Derfor kan cellen holde calciumkoncentrationen i sit indre tusindvis af gange lavere end på ydersiden.[6] Får membranen et hul, strømmer calcium ind. Et hul, der ikke lukkes, kan slå cellen ihjel.[7] Men calciumindstrømningen er også det signal, der sætter reparationen i gang.[8]

Reparationen er en aktiv proces, som cellen selv styrer. Calcium får små membranblærer, kaldet vesikler, til at smelte sammen med membranen omkring hullet.[9] Det tilfører ny membran og sænker spændingen i membranen, så hullet kan lukke.[10] Samtidig binder proteiner kaldet annexiner sig til de negativt ladede fosfolipider ved sårkanten og hjælper med at trække den sammen.[11] Cellen har også andre måder at lukke et hul på, typisk arbejder flere mekanismer sammen samtidig, og hvilke den bruger, afhænger bl.a. af skadens størrelse.[12] En gennemgang af mekanismerne findes i bilag 2. Uden calciumindstrømning kan cellen ikke lukke hullet.[13] Derfor kan celler i calciumfrit medium bruges som kontrol i forsøget.

[6] (Ammendolia et al., 2021).
[7] (Sønder et al., 2022).
[8] (Ammendolia et al., 2021).
[9] (Ammendolia et al., 2021).
[10] (Togo et al., 2000).
[11] (Boye et al., 2017).
[12] (Ammendolia et al., 2021).
[13] (Ammendolia et al., 2021).

3.2 Priming af membranreparation

Et studie opdagede i fibroblaster fra mus, at et nyt hul samme sted lukkede hurtigere end det første. Den første skade fik cellen til at danne nye vesikler, som den kunne bruge ved den næste.[14] Denne træning af reparationen kaldes også for priming.

Senere viste de, at hele cellen bliver bedre til at reparere, også når det nye hul kommer et andet sted.[15] Forbedringen udvikler sig i faser, som kræver forskellige ting (bilag 3).

Priming er også fundet i nyreceller fra hunde, hvor selv uskadte naboceller blev hurtigere.[16] I fibroblasterne blev uskadte celler derimod ikke hurtigere.[17] Evnen findes heller ikke i alle celler: COS-7-celler fra aber, som mangler proteinet myosin IIA, blev ikke hurtigere ved et nyt hul samme sted.[18] I den eneste kræftcellelinje, jeg har fundet undersøgt, en melanomlinje fra mus, var den lokale forbedring normal.[19]

3.3 Kræftceller og membranreparation

Invasive kræftceller får jævnligt huller i membranen, fordi de presser sig gennem tæt væv.[20] Et studie så, at brystkræftceller mistede stykker af membranen, når de bevægede sig hen over kollagenfibre. Cellerne døde, når forskerne slukkede for annexin A5 og A6.[21] Mange metastatiske kræftformer udtrykker desuden ekstra meget af reparationsproteinerne annexiner og S100.[22] Jaiswal og Nylandsted har derfor betegnet reparationen som "kræftcellernes akilleshæl" og et muligt mål for behandling.[23]

Häger et al. (2021) fra forskningsgruppen Membrane Integrity har skadet netop MCF-7-celler og målt, hvilke gener cellerne aflæste bagefter.[24] Efter 20 minutter havde 34 gener ændret udtryk, og efter en time var det 236. Undersøgelsen viser ikke, at cellerne dannede flere reparationsproteiner, men at de reagerede hurtigt med et bredt stressrespons. MCF-7 omstiller sig altså inden for den første time, hvilket er netop det tidsrum, forsøget undersøger.

Ud fra teorien kan man forvente to ting. Har kræftceller mere reparationsmaskineri, har de mere at bygge videre på, og så bør priming være stærkest i MCF-7. Arbejder maskineriet allerede tæt på sit maksimum, er der mindre at forbedre, og så bør priming være svagest i MCF-7. Forsøget kan skelne mellem de to forventninger.

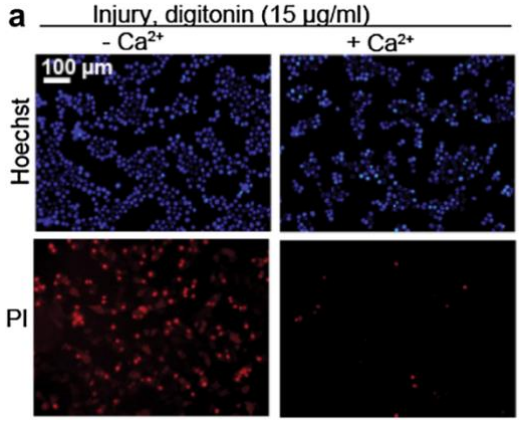
3.4 Måling med propidiumiodid

Hvor hurtigt et hul lukkes, kan måles med farvestoffet propidiumiodid (PI), som ikke kan passere en hel membran (figur 1). Er der hul, trænger det ind og binder sig til DNA'et i

[14] (Togo et al., 1999).
[15] (Togo et al., 2003).
[16] (Togo, 2012).
[17] (Togo et al., 2003).
[18] (Togo & Steinhardt, 2004).
[19] (Togo & Steinhardt, 2004).
[20] (Jaiswal & Nylandsted, 2015; Lauritzen et al., 2015).
[21] (Bouvet et al., 2020).
[22] (Jaiswal et al., 2014; Jaiswal & Nylandsted, 2015; Lauritzen et al., 2015).
[23] (Jaiswal & Nylandsted, 2015).
[24] (Häger et al., 2021).

cellekernen, hvor det lyser.[25] Når hullet er lukket, kan der ikke komme mere ind, og det, der allerede er inde, bliver i cellen. Mængden af propidiumiodid i en celle viser derfor, hvor længe hullet stod åbent: Jo mindre farvestof, desto hurtigere skete lukningen.

Farvestoffet Hoechst 33342 kan derimod passere membranen og farver alle cellekerner.[26] Det bruges til at tælle cellerne, så propidiumiodid-signalet kan opgøres pr. celle.



Figur 1 - MCF-7-celler skadet med digitonin uden calcium (venstre) og med calcium (højre). Hoechst 33342 farver alle kerner blå, mens propidiumiodid (PI) kun farver kerner i celler, der har hul i membranen. Gengivet fra Häger et al. (2021), CC BY 4.0.

4. Metode

Projektet er et kontrolleret forsøg på celler dyrket i laboratoriet. Et in vitro-forsøg giver kontrol over skaden, men viser ikke, hvad der sker i en krop.

For at undersøge problemformuleringen vil jeg give MCF-7 og MCF-10A en mild membranskade og senere en kraftig skade. Derefter måler jeg, hvor meget propidiumiodid cellerne optager ved den kraftige skade. Optager de mindre, når de har fået den milde skade først, er de blevet primet. Den kraftige skade gives efter 30 minutter. Så har cellerne tid til at reagere på den første skade, men ikke til at dele sig. Metoden bygger på den måling af membranskade, som forskningsgruppen Membrane Integrity group selv bruger.[27] Min udvidelse består i at give to skader efter hinanden og at sammenligne en kræftcellelinje med en ikke-malign cellelinje.

4.1 Cellelinjer

Jeg bruger brystkræftcellelinjen MCF-7 og den ikke-maligne brystcellelinje MCF-10A. Jeg har valgt de to, fordi begge stammer fra brystepitel. En forskel mellem dem kan derfor i et større billede forklares ved, at den ene er ondartet. Desuden er MCF-7 den cellelinje, Häger et al. (2021) undersøgte (afsnit 3.3).

En ulempe er, at MCF-10A stammer fra godartet, men ikke helt raskt brystvæv. Men da hver cellelinje sammenlignes med sig selv, kan priming stadig påvises i hver af dem.

[25] (Sønder et al., 2022).
[26] (Sønder et al., 2022).
[27] (Sønder et al., 2022).

4.2 Ultralyd som skademodel

Jeg skader cellerne med ultralyd. Trykbølgerne kan lave små huller i cellemembranen.[28] Cellen lukker selv hullerne igen, men kun når der er tilstrækkeligt calcium til stede.[29]

Jeg har valgt ultralyd af tre grunde. Skaden er mekanisk ligesom den, kræftceller får i væv. Den rammer alle celler i en brønd på en gang. Og styrken kan skrues op og ned, så den milde og den kraftige skade laves med samme metode.

Studier inden for feltet bruger bl.a. også laserskade og stoffet digitonin.[30] Laserskade er mere præcis, men rammer kun udvalgte celler. Til dette projekt er ultralyd bedre egnet, fordi den skader alle cellerne i brønden. Digitonins skade afhænger af membranens indhold af kolesterol,[31] så forskelle i kolesterol mellem cellelinjerne ville påvirke skaden.

4.3 Kalibrering af doserne

Før forsøget kalibreres doserne, så skaden bliver lige stor i de to cellelinjer. Ellers ville forsøget måle, hvilken cellelinje der er mest skrøbelig, frem for om priming virker. Begge cellelinjer udsættes derfor for stigende styrker af ultralyd, og jeg måler med PI, hvor mange celler der får hul, og hvor mange der ikke når at lukke det.

Den kraftige dosis vælges, så 10-30 % af cellerne ikke når at lukke hullet. Sønder et al. (2022) anbefaler ved mekanisk skade: Den er stor nok til at presse reparationen, men de fleste celler klarer den.[32] Så er der plads til at se, om reparationen bliver bedre eller dårligere. Den milde dosis er svagere og vælges, så flest mulige celler får hul, men næsten alle lukker det igen. Uskadte celler trænes nemlig ikke nødvendigvis (afsnit 3.2), så effekten udvandes, hvis kun få celler bliver skadet. Begge doser vælges, så skaden er lige stor i de to cellelinjer.

4.4 Aflæsning

Aflæsningen bygger på afsnit 3.4. Hoechst tilsættes inden forsøget, så alle kerner er farvet. Propidiumiodid tilsættes lige før den kraftige skade, så signalet kun afspejler reparationen af den. Pladen aflæses på et billedcytometer, som fotograferer hver brønd og måler lyset fra hver enkelt cellekerne.[33]

Pladen aflæses flere gange efter den kraftige skade. Signalet stiger, så længe hullerne er åbne, og flader ud, når de er lukket. Forløbet viser altså reparationskinetikken. En ulempe er, at propidiumiodid kun kommer ind gennem huller, der er store nok til molekylet, så meget små huller måles ikke.[34] Det gælder dog alle grupper ens.

[28] (Lentacker et al., 2014).
[29] (Zhou et al., 2008).
[30] (Sønder et al., 2022).
[31] (Sønder et al., 2022).
[32] (Sønder et al., 2022).
[33] (Sønder et al., 2022).
[34] (Lentacker et al., 2014).

4.5 Forsøgsopstilling og kontroller

Betingelse	Behandling	Funktion og begrundelse
A	Ingen skade	Propidiumiodid i uskadte celler (nulpunkt)
B	Kun kraftig skade	Reparation uden priming. Håndteres og inkuberes som betingelse C
C	Mild skade, 30 min. restitution, kraftig skade	Test af priming. Restitutionstid baseret på gennemgået teori.
Kontrol	Kraftig skade uden calcium i mediet	Største mulige optag, fordi hullerne ikke kan lukke uden calcium.

Tabel 1 - Forsøgets betingelser og kontrol. Alt laves i begge cellelinjer.

Forsøget har tre betingelser i hver cellelinje samt en kontrol (tabel 1). B håndteres og inkuberes som C, bare uden den milde skade, så forskellen mellem dem kun skyldes skaden. Under selve skaderne står begge cellelinjer i samme medium. Forsøget gentages tre gange med celler fra forskellige opdyrkningsrunder.

4.6 Databehandling

Der måles på PI-signalet pr. celle, når signalet er fladet ud. Første led i problemformuleringen besvares ved at sammenligne PI-signalet fra betingelse B med betingelse C i MCF-7-cellelinjen. Andet led besvares ved at undersøge, om forbedringen fra B til C er større i MCF-7 end i MCF-10A.

5. Projektets udførelse

5.1 Faser og tidsramme

Jeg udfører forsøget i samarbejde med Jesper Nylandsted, leder af forskningsgruppen Membrane Integrity Group, i et laboratorium han stiller til rådighed. Laboratoriet har apparatur og generelle forbrugsvarer, og forsøget tager ca. 4-5 uger (tabel 2).

Fase	Indhold og begrundelse	Varighed
1. Opdyrkning	Optøning af cellelinjerne. Cellerne deles, før de bruges i forsøg, og dyrkes derefter videre, så der er celler til alle gentagelser	1 uge
2. Kalibrering	Måling af mild og kraftig ultralydsdosis for hver cellelinje (afsnit 4.3). En dag ekstra, hvis målingen skal gentages	2 dage
3. Hovedforsøg	Tre uafhængige gentagelser på forskellige dage, hver med udsåning dagen før	1 uge
4. Databehandling	Propidiumiodid pr. celle og analyse	1 uge
5. Buffer	Tid til f.eks. forsøg, der skal gentages eller hvis noget går galt	1 uge
I alt		**ca. 4½ uge**

Tabel 2 - Projektets faser og tidsramme.

5.2 Budget

Tabel 3 viser de materialer, forsøget bruger. Apparatur, forbrugsvarer, øvrige tilsætningsstoffer og laboratoriet stilles til rådighed af min forskerkontakt, Jesper Nylandsted. Med 18.300 kr. ligger budgettet inden for rammen på 20.000 kr.

Post	Leverandør, kat.nr.	Bruges til	Pris (DKK)
Cellelinjer			
MCF-7, 1 hætteglas	ATCC HTB-22	Kræftcellelinjen	4.500
MCF-10A, 1 hætteglas	ATCC CRL-10317	Den ikke-maligne cellelinje	8.200
Medier			
RPMI 1640, 2 x 500 mL	Gibco 32404014	Basismedie	400
Føtalt kalveserum, 100 mL	ATCC 30-2020	Tilsættes mediet, så cellerne kan vokse	1.500
Calciumfrit medium (HBSS), 500 mL	Gibco 14175095	Kontrollen uden calcium	400
Øvrige tilsætningsstoffer til medierne	Stilles til rådighed af forskerkontakten	Dyrkning	-
Farvestoffer			
Hoechst 33342, 100 mg	Sigma-Aldrich B2261	Farver alle kerner	900

Propidiumiodid, 100 mg	Sigma-Aldrich 81845	Impermeabelt farvestof, måler reparationen	1.400
Forbrugsvarer og apparatur			
Plader med brønde, cellekulturflasker, pipettespidser og centrifugerør	Stilles til rådighed af forskerkontakten	Dyrkning og forsøg	-
Ultralydsudstyr, billedcytometer (Celigo), inkubator, sterilbænk og mikroskop	Stilles til rådighed af forskerkontakten	Skade, aflæsning og dyrkning	-
Reserve			1.000
I alt			**18.300**

Tabel 3 - Budget. Listepriser fra leverandørernes hjemmesider uden moms, september 2026, afrundet til nærmeste 100 kr. pga. valutaomregning. Kalveserum er medregnet med den andel, forsøget bruger.

6. Konklusion og perspektivering

6.1 Forventet resultat

På baggrund af teorien forventes det, at den milde skade forbedrer reparationen i begge cellelinjer, og at forbedringen er størst i MCF-7. Det forventes, fordi MCF-7 reagerer hurtigt på skade med ændret genudtryk (afsnit 3.3).

Resultatet kan dog også blive, at priming er svagest i MCF-7, fordi reparationen i kræftceller allerede arbejder tæt på sit maksimum (afsnit 3.3), eller at priming slet ikke ses, f.eks. fordi effekten er for lille til at kunne skelnes fra tilfældigheder. Også det udfald besvarer problemformuleringen, fordi det viser, hvor priming ikke har væsentlig betydning.

6.2 Perspektivering

Viser forsøget, at kræftceller kan trænes, vil det være oplagt at teste flere restitutionstider. Så kan man se, om forskellen mellem cellelinjerne vokser, når kræftcellerne får mere tid til at omstille sig. Det vil også være relevant at gentage forsøget i flere cellepar, så resultatet ikke kun gælder brystvæv.

På længere sigt kan resultatet få betydning for behandling. Immunforsvaret dræber bl.a. kræftceller ved at lave huller i deres membran med proteinet perforin, men kræftceller kan modstå angrebet ved at reparere hullerne.[35] Viser mit forsøg, at kræftceller kan trænes, kunne gentagne angreb fra immunforsvaret eller fra immunterapi gøre de overlevende mere modstandsdygtige. Reparationen ville så være et mål at hæmme sideløbende med behandlingen.

[35] (Ritter et al., 2022).

7. Anerkendelse

En stor tak til Jesper Nylandsted, professor og leder af forskningsgruppen Membrane Integrity, Danish Cancer Institute, for at tage imod mig og mit projekt. Tak for faglig sparring og for tilbuddet om at udføre forsøget i laboratoriet.

Tak til min vejleder, Peter Neidel, lærer og koordinator, Herlufsholm skole, for vejledning og opbakning undervejs.

Til sidst en tak til Steen Mouridsen, tidligere lærer og koordinator på Herlufsholm skole, som opfordrede mig til at deltage i Projekt Forskerspirer og hjalp mig tidligt i processen.

Litteraturliste

Ammendolia, D. A., Bement, W. M., & Brumell, J. H. (2021). Plasma membrane integrity: Implications for health and disease. *BMC Biology*, *19*(1), 71. https://doi.org/10.1186/s12915-021-00972-y

Anthropic. (2026). Claude (Opus 5.5) [Stor sprogmodel]. https://claude.ai. Tilgået 28. september 2026.

Bouvet, F., Ros, M., Bonedeau, E., Croissant, C., Frelin, L., Saltel, F., Moreau, V., & Bouter, A. (2020). Defective membrane repair machinery impairs survival of invasive cancer cells. *Scientific Reports*, *10*(1), 21821. https://doi.org/10.1038/s41598-020-77902-5

Boye, T. L., Maeda, K., Pezeshkian, W., Sønder, S. L., Haeger, S. C., Gerke, V., Simonsen, A. C., & Nylandsted, J. (2017). Annexin A4 and A6 induce membrane curvature and constriction during cell membrane repair. *Nature Communications*, *8*(1), 1623. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01743-6

Dias, C., & Nylandsted, J. (2021). Plasma membrane integrity in health and disease: Significance and therapeutic potential. *Cell Discovery*, *7*(1), 4. https://doi.org/10.1038/s41421-020-00233-2

Häger, S. C., Dias, C., Sønder, S. L., Olsen, A. V., da Piedade, I., Heitmann, A. S. B., Papaleo, E., & Nylandsted, J. (2021). Short-term transcriptomic response to plasma membrane injury. *Scientific Reports*, *11*(1), 19141. https://doi.org/10.1038/s41598-021-98420-y

Jaiswal, J. K., Lauritzen, S. P., Scheffer, L., Sakaguchi, M., Bunkenborg, J., Simon, S. M., Kallunki, T., Jäättelä, M., & Nylandsted, J. (2014). S100A11 is required for efficient plasma membrane repair and survival of invasive cancer cells. *Nature Communications*, *5*, 3795. https://doi.org/10.1038/ncomms4795

Jaiswal, J. K., & Nylandsted, J. (2015). S100 and annexin proteins identify cell membrane damage as the Achilles heel of metastatic cancer cells. *Cell Cycle*, *14*(4), 502-509. https://doi.org/10.1080/15384101.2014.995495

Lauritzen, S. P., Boye, T. L., & Nylandsted, J. (2015). Annexins are instrumental for efficient plasma membrane repair in cancer cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *45*, 32-38. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.028

Lentacker, I., De Cock, I., Deckers, R., De Smedt, S. C., & Moonen, C. T. W. (2014). Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *72*, 49-64. https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.008

Ritter, A. T., Shtengel, G., Xu, C. S., Weigel, A., Hoffman, D. P., Freeman, M., Iyer, N., Alivodej, N., Ackerman, D., Voskoboinik, I., Trapani, J., Hess, H. F., & Mellman, I. (2022). ESCRT-mediated membrane repair protects tumor-derived cells against T cell attack. *Science*, *376*(6591), 377-382. https://doi.org/10.1126/science.abl3855

Ruiz, M. (2007). *Cell membrane detailed diagram* [Illustration]. Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell_membrane_detailed_diagram_en.svg

Sønder, S. L., Ebstrup, M. L., Dias, C., Heitmann, A. S. B., & Nylandsted, J. (2022). Plasma membrane wounding and repair assays for eukaryotic cells. *Bio-protocol*, *12*(11), e4437. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4437

Togo, T. (2004). Long-term potentiation of wound-induced exocytosis and plasma membrane repair is dependent on cAMP-response element-mediated transcription via a protein kinase C- and p38 MAPK-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(43), 44996-45003. https://doi.org/10.1074/jbc.M406327200

Togo, T. (2012). Cell membrane disruption stimulates NO/PKG signaling and potentiates cell membrane repair in neighboring cells. *PLOS ONE*, *7*(8), e42885. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042885

Togo, T., Alderton, J. M., Bi, G. Q., & Steinhardt, R. A. (1999). The mechanism of facilitated cell membrane resealing. *Journal of Cell Science*, *112*(5), 719-731. https://doi.org/10.1242/jcs.112.5.719

Togo, T., Alderton, J. M., & Steinhardt, R. A. (2003). Long-term potentiation of exocytosis and cell membrane repair in fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(1), 93-106. https://doi.org/10.1091/mbc.e02-01-0056

Togo, T., Krasieva, T. B., & Steinhardt, R. A. (2000). A decrease in membrane tension precedes successful cell-membrane repair. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(12), 4339-4346. https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4339

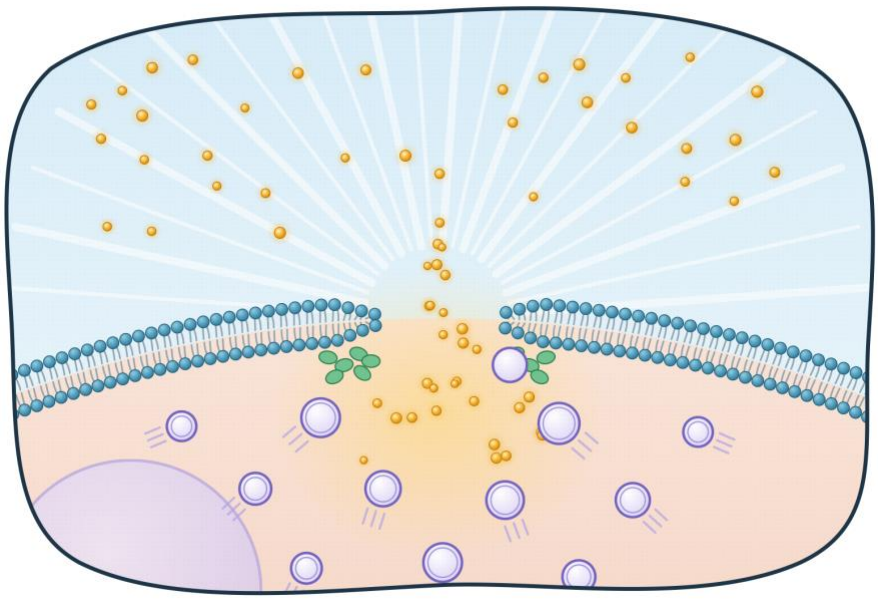
Togo, T., & Steinhardt, R. A. (2004). Nonmuscle myosin IIA and IIB have distinct functions in the exocytosis-dependent process of cell membrane repair. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(2), 688-695. https://doi.org/10.1091/mbc.e03-06-0430

Zhou, Y., Shi, J., Cui, J., & Deng, C. X. (2008). Effects of extracellular calcium on cell membrane resealing in sonoporation. *Journal of Controlled Release*, *126*(1), 34-43. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.11.007

Bilag 1 - Forsideillustration

Forsideillustrationen er lavet med AI Claude (model Opus 5.5) fra Anthropic. Illustrationen gengiver ikke data. Den er en skitse, der skal vise projektets emne: en cellemembran, der er brudt.

Illustrationen viser et udsnit af en cellemembran, tegnet som et dobbeltlag af fosfolipider, med et hul i midten. Calcium (gule kugler) strømmer ind gennem hullet fra ydersiden. På indersiden er vesikler (lilla) på vej mod hullet, og annexiner (grønne) samler sig ved sårkanterne.



Figur 2 - Forsideillustrationen. Lavet med Claude (Anthropic, 2026).

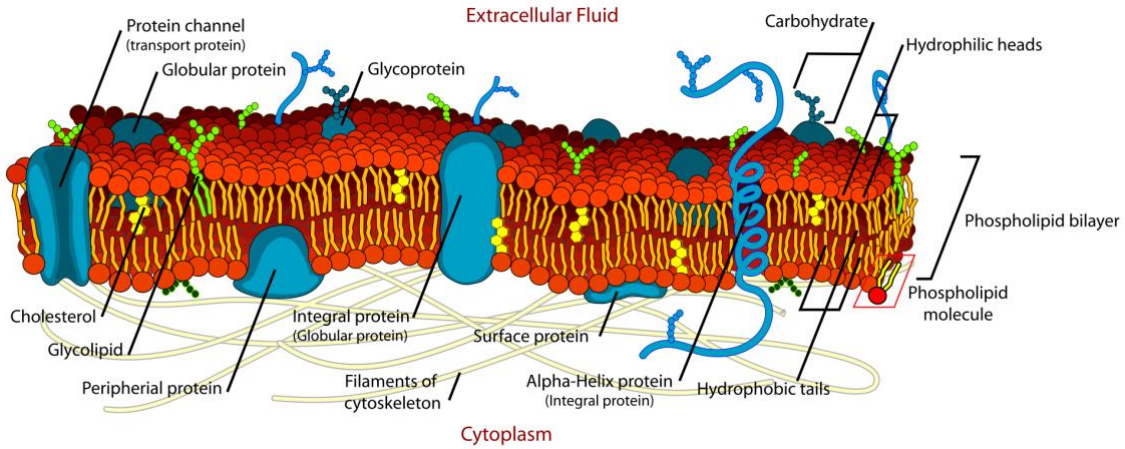
Bilag 2 - Cellemembranen og membranreparation

Dette bilag uddyber afsnit 3.1 og 3.3. Det forklarer, hvordan cellemembranen er bygget op, hvorfor et hul er farligt, og hvordan cellen lukker det igen.

Cellemembranens opbygning

Cellemembranen består hovedsageligt af fosfolipider. Et fosfolipid har et hoved, som er ladet og hydrofilt, og to haler, som er uladede og hydrofobe. I vand lægger fosfolipiderne sig derfor i et dobbeltlag. Hovederne vender ud mod vandet på begge sider, og halerne vender ind mod hinanden (figur 3).

Membranen er selektivt permeabel. Den lukker nogle stoffer igennem og holder andre ude. Mister den denne egenskab, kan cellen ikke opretholde sig selv og dør. Midten af dobbeltlaget er hydrofobt, så ioner og store, ladede molekyler ikke kan passere frit. De skal igennem bestemte kanaler eller transportproteiner.



Figur 3 - Cellemembranens opbygning: dobbeltlaget af fosfolipider med hydrofile hoveder og hydrofobe haler, proteiner, kolesterol og kulhydrater. Under membranen ses fibre fra cellens skelet. Gengivet fra Ruiz (2007), Wikimedia Commons, public domain.

Calciumgradienten

Uden for cellen er calciumkoncentrationen ca. 2 mM, mens den inde i cellen kun er ca. 100 nM. Det er en forskel på ca. 20.000 gange.[36] Får membranen et hul, strømmer calcium derfor ind med det samme.

Calciumindstrømningen fungerer som en alarm. Uanset hvordan membranen er blevet skadet, sætter calcium reparationen i gang.[37] Det er også grunden til, at en celle ikke kan lukke et hul, hvis der ikke er calcium udenfor.[38]

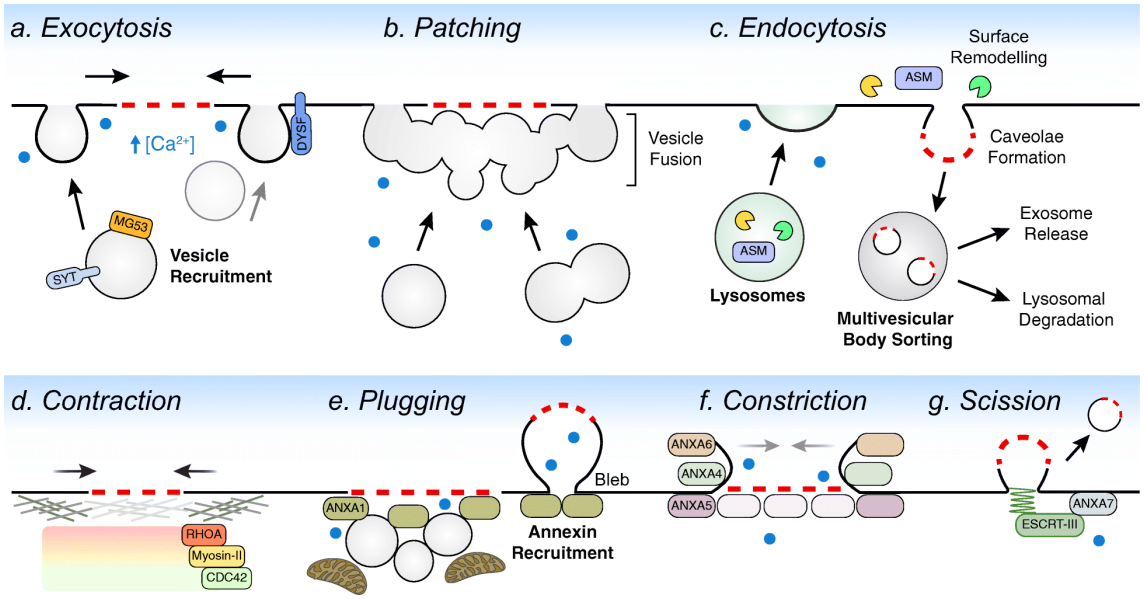
Hvordan cellen lukker et hul

Cellen har flere måder at lukke et hul på. Hvilke den bruger, afhænger af, hvor stor skaden er, og ofte virker flere samtidig.[39] Det afhænger også af celletypen.[40] Figur 4 viser syv af dem:

[36] (Ammendolia et al., 2021).
[37] (Dias & Nylandsted, 2021).
[38] (Ammendolia et al., 2021).
[39] (Ammendolia et al., 2021).
[40] (Jaiswal & Nylandsted, 2015).

- **a. Exocytose:** Vesikler transporteres op til hullet. Proteinet MG53 kan hjælpe med at hente dem. Ved hullet sørger synaptotagmin (SYT) og dysferlin (DYSF) for, at de smelter sammen med membranen, når calcium strømmer ind.
- **b. Lapning:** Ved store huller smelter vesiklerne sammen med hinanden under hullet og danner en lap, der lukker det.
- **c. Endocytose:** Lysosomer udskiller enzymer uden for cellen. Det får membranen omkring hullet til at krænge indad. Det beskadigede stykke bliver optaget og enten nedbrudt eller sendt ud af cellen igen.
- **d. Kontraktion:** Proteiner som RHOA, myosin-II og CDC42 danner ringe omkring hullet. De trækker sig sammen som en snøre i en pose.
- **e. Prop:** Vesikler og annexin A1 hober sig op ved hullet og danner en midlertidig prop, der begrænser, hvor meget der siver ind og ud.
- **f. Sammensnøring:** Forskellige annexiner samler sig langs sårkanten. Annexin A5 forhindrer hullet i at vokse, annexin A4 krummer membranen, og annexin A6 trækker kanterne sammen.
- **g. Afsnøring:** Annexin A7 kalder ESCRT-III-proteinerne hen til hullet, og de snører det beskadigede stykke membran af.

Gennemgangen af punkt a-g bygger på samme kilde som figur 4.



Figur 4 - Syv måder, cellen kan lukke et hul i membranen på. Rød stiplet linje=hullet. Blå prikker=calcium. Gengivet fra Ammendolia et al. (2021), CC BY 4.0.

Annexinerne

Annexiner er proteiner, der binder calcium og fosfolipider. Annexin A4 og A6 er nødvendige for, at cellen hurtigt kan lukke huller på et par mikrometer.[41] Når membranen bliver skadet, får calciumindstrømningen dem til at samle sig ved sårkanterne. Annexin A4 krummer membranen ved kanten. Annexin A6 trækker kanterne sammen.[42]

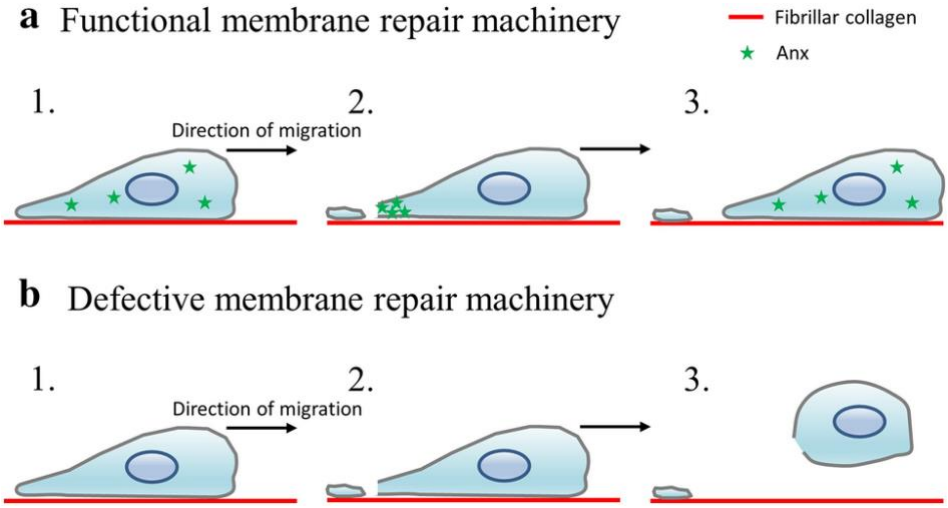
[41] (Boye et al., 2017).
[42] (Boye et al., 2017).

Membranskader i kræftceller

Invasive kræftceller er særligt udsatte for membranskader. De bevæger sig meget og skal igennem tæt væv omkring svulsten, og det øger risikoen for huller i membranen.[43]

Kræftcellerne kompenserer ved at udtrykke ekstra meget af reparationsproteinerne. Det gælder annexin A2 og andre annexiner[44] og S100A11, som er opreguleret i mange metastatiske kræftformer. Uden S100A11 kan kræftceller, der bevæger sig meget, hverken reparere deres membran effektivt eller overleve.[45]

Bouvet et al. (2020) har vist sammenhængen direkte. Når brystkræftceller bevægede sig hen over kollagenfibre, fik de huller i membranen og efterlod stykker af membranen bag sig. Cellerne kunne lukke hullerne ved hjælp af annexiner, som de udtrykker meget af. Slukkede forskerne for annexin A5 og A6, døde de celler, der bevægede sig (figur 5).[46]



Figur 5 - Model for en kræftcelle, der bevæger sig hen over kollagenfibre (rød). (a) Med et fungerende reparationsmaskineri: Cellen får et hul, annexinerne (grønne stjerner) samles ved hullet, og cellen reparerer det. (b) Uden et fungerende reparationsmaskineri: Hullet lukkes ikke, og cellen dør og slipper underlaget. Gengivet fra Bouvet et al. (2020), CC BY 4.0.

Kræftceller og immunforsvaret

Cytotoksiske T-celler og NK-celler, dræber kræftceller ved at frigive proteinet perforin. Perforin laver et hul i kræftcellens membran, og gennem hullet kommer granzymer ind og får cellen til at dø.[47]

Ritter et al. (2022) fandt, at ESCRT-proteinerne (figur 4g) blev kaldt hen til netop det sted, hvor T-cellen angreb, lige efter at perforinen var frigivet. Når de hæmmede ESCRT-proteinerne i kræftceller, blev cellerne lettere at dræbe. Reparationen kan altså begrænse, hvor mange granzymer der kommer ind, og hjælpe kræftcellerne med at overleve angrebet.[48]

[43] (Jaiswal & Nylandsted, 2015).
[44] (Lauritzen et al., 2015).
[45] (Jaiswal et al., 2014).
[46] (Bouvet et al., 2020).
[47] (Ritter et al., 2022).
[48] (Ritter et al., 2022).

Bilag 3 - Priming af membranreparation

Dette bilag uddyber afsnit 3.2. Det gennemgår de studier, der har vist, at membranreparation kan trænes, og forklarer bl.a., hvorfor forsøget bruger en restitutionstid på 30 minutter.

Begreber

I litteraturen bruges to betegnelser. Togo et al. (1999) kaldte den hurtigere lukning af et nyt hul samme sted for en "*facilitated response*".[49] De senere studier kalder den langvarige forbedring af hele cellens reparationsevne for "*long-term potentiation*".[50] I denne synopse bruges priming som fælles betegnelse for begge.

Oversigt over studierne

Studie	Celletype	Hvad der blev vist
Togo et al. (1999)	Fibroblaster fra mus (Swiss 3T3)	Et nyt hul samme sted lukker hurtigere. Kræver calcium og enzymet PKC, som får cellen til at danne nye vesikler fra Golgi-apparatet
Togo et al. (2000)	Fibroblaster fra mus (Swiss 3T3)	Spændingen i membranen falder 2,3 gange hurtigere ved en gentagen skade, og hullet lukker ca. dobbelt så hurtigt
Togo et al. (2003)	Fibroblaster fra mus (Swiss 3T3)	Hele cellen reparerer hurtigere efter en tidligere skade. Effekten findes under 5 minutter og efter 3, 6 og 24 timer og har tre faser
Togo (2004)	Fibroblaster fra mus (Swiss 3T3)	Den langvarige fase kræver ændret genudtryk
Togo & Steinhardt (2004)	Bl.a. COS-7 (abe) og S91-melanom (mus)	Myosin IIA er nødvendig for, at et nyt hul samme sted lukker hurtigere. COS-7, som mangler myosin IIA, gør det ikke. S91-melanom gør det normalt
Togo (2012)	Nyreceller fra hund (MDCK)	Effekten varer mindst 24 timer og kan brede sig til uskadte naboceller.

Tabel 4 - Studier af priming af membranreparation. Udarbejdet på baggrund af studierne i tabellen.

Hele cellens reparationsevne

Togo et al. (2003) viste, at forbedringen ikke kun gælder det samme sted. Hele cellen reparerer hurtigere, også når den anden skade kommer et andet sted på cellen. De mærkede de skadede celler med et farvestof, så de kunne finde dem igen og skade dem en gang til efter forskellige tider (tabel 5).

[49] (Togo et al., 1999).
[50] (Togo et al., 2003).

Tid mellem første og anden skade	Reparationshastighed ved anden skade	Hvad forbedringen kræver
Ingen tidligere skade	0,068 s^{-1}	-
Under 5 minutter (andet sted på cellen)	Hurtigere	Enzymet proteinkinase A (PKA). Ikke nye proteiner
3 timer	0,11 s^{-1} (ca. 1,6 gange hurtigere)	Nye proteiner
6 timer	0,13 s^{-1} (ca. 1,9 gange hurtigere)	-
24 timer	0,13 s^{-1} (ca. 1,9 gange hurtigere)	Ændret genudtryk (CREB)

Tabel 5 - Primingens forløb i fibroblaster fra mus, skade med en glasnål. Reparationshastigheden er 1/s (hvor s er lukningstiden). Udarbejdet på baggrund af Togo et al. (2003) og Togo (2004).

Forbedringen har altså tre faser, som kræver forskellige ting (tabel 5).

Uskadte celler i samme skål reparerede med normal hastighed. I fibroblasterne bliver kun de skadede celler altså trænet.[51]

Togo (2012) viste, at priming også findes i nyreceller fra hund, og at effekten varer mindst 24 timer.[52] Her blev også uskadte naboceller hurtigere til at reparere.

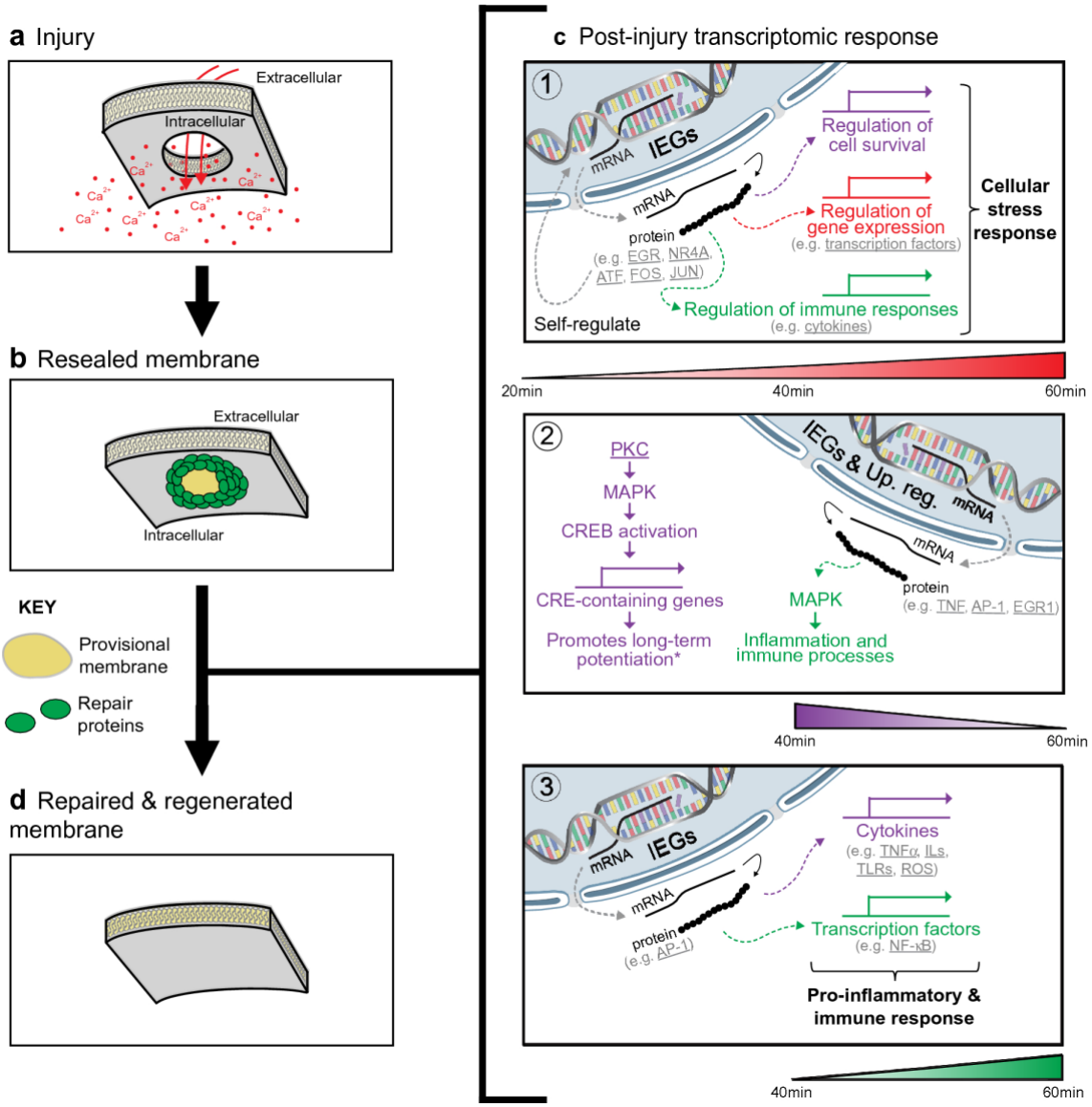
Om kun skadede celler trænes, afhænger altså af celletypen. Derfor vælges den milde dosis i forsøget, så flest mulige celler får hul.

Kræftceller reagerer hurtigt på en skade

Häger et al. (2021) skadede MCF-7-celler med digitonin og målte, hvilke gener cellerne aflæste bagefter. Antallet af gener med ændret udtryk steg i løbet af 60 minutter. Responsen havde tre dele (figur 6):

1. **Straks-gener** (immediate-early genes) blev set allerede efter 20 minutter. De styrer bl.a. cellens overlevelse og genudtryk og udgør et stressrespons.
2. **MAPK-signalveje** blev vurderet ud fra genudtrykket forudsagt til at aktiveres efter 40-60 minutter. Det kan aktivere gener og der er med til at fremme den langvarige priming, som Togo et al. (2003) beskrev.
3. **Betændelses- og immunreaktioner** blev aktiveret efter 40-60 minutter.

[51] (Togo et al., 2003).
[52] (Togo, 2012).



Figur 6 - Model for MCF-7-cellers respons på en membranskade. (a) Calcium strømmer ind. (b) Hullet lukkes. (c) Cellen ændrer sit genudtryk i tre dele: straks-gener og et stressrespons (1), MAPK-signalveje, der via CREB kan fremme langvarig priming (2), og betændelses- og immunreaktioner (3). Tidsakserne viser, hvornår delene er mest aktive. (d) Membranen er repareret. Gengivet fra Häger et al. (2021), CC BY 4.0.