

CONNEXIN 43: DEN NYE BESLUTNINGSTAGER I BEHANDLINGEN AF GBM-PATIENTER?

Katrine Marie Thygesen

Kandidatspeciale i Klinisk Videnskab og Teknologi
Aalborg Universitet



Titel: Connexin 43: Den nye beslutningstager i behandlingen af GBM-patienter

Tema: Speciale i Klinisk Videnskab og Teknologi

Projektperiode: 1/2-1/6 2016

Projektgruppe: 16gr10509

Deltagere:

Katrine Marie Thygesen
(studienr: 20140839)

Vejleder:

Parisa Gazerani

Bivejledere:

Jeppe Nørgaard Poulsen
Johann Mar Gudbergsson

Anslag inkl. mellemrum: 78.828

Sideantal: 42

Appendixsantal: 5

Bilagsantal: 2

Afsluttet den: 1. juni 2016

Key words:

Connexin 43, glioblastoma, biomarker, therapeutic resistance, real time polymerase chain reaction, immunofluorescens staining, dot blot

Abstract

Introduction: The prognosis for glioblastoma (GBM) patients is poor and the risk of recurrence in patients is inevitable despite radiotherapy and adjuvant chemotherapy. Therapeutic resistance is proposed to be due to the presence of cancer stem cells in GBM. Evidence suggests that an increase in gap junction protein connexin 43(Cx43) expression is related to an increase in therapeutic resistance. However, it is not well understood yet whether and how Cx43 may play a key role in occurrence of therapeutic resistance. Hence, the aim of this study was to investigate if Cx43 is expressed in the cell lines of U87MG and C16, and to assess if Cx43-expression can be used as a biomarker as a potential for the therapeutic resistance in GBM patients.

Method: The presence of Cx43 in the cell lines of U87MG and C16 was analyzed by real-time PCR(RT-PCR) of Cx43-cDNA. Cx43-protein expression and localization were analyzed by immunofluorescence staining and protein expression was verified by dot blot.

Results: RT-PCR showed the expression of Cx43 in U87MG-cells, but no expression was found in C16-cells, which was similar to negative outcome from immunofluorescence staining and dot blot due to high background noise. Localization of Cx43-protein could not be identified in these cell lines.

Conclusion: Expression of Cx43 was demonstrated in the U87MG cell line, but not in C16. Further experiments are needed to understand presence and role of Cx43 in GBM and therapeutic resistance, which in turn would identify if Cx43 can be used as a potential biomarker to assist in patients' stratification and planning of individual treatments in the future.

Forord

Projektrapporten er udarbejdet af Katrine Marie Thygesen, specialestuderende i Klinisk Videnskab og Teknologi.

Sigtet for semestret er blandt andet at opnå færdighed i at tilrettelægge og gennemføre et projekt med fokus på implementering, evaluering eller vurdering af teknologianvendelse i forhold til etableret klinisk viden.

Formålet med projektet er at undersøge tilstedeværelsen af connexin 43 i to cellelinjer og vurdere dens relevans som biomarkør for den terapeutiske resistens ved glioblastom.

I den forbindelse er der blevet anvendt cellelinjer, reagenser og udstyr, venligst stillet til rådighed af afdelingen for Biomedicin ved Aalborg Universitet, som jeg gerne vil takke for.

Endvidere vil jeg takke mine vejledere Parisa Gazerani, Jeppe Nørgaard Poulsen og Johann Mar Gudbergsson for deres vejledning i projektet og i laboratoriet.

Aalborg Universitet, juni 2016

Katrine Marie Thygesen

Læsevejledning

I rapporten er appendix og bilag fortløbende nummereret. Appendix er materiale udarbejdet af forfatteren og bilag er indlægssedler med protokoller fra anvendte analysekit. Henvisning til disse sker ved at materialetypen angives efterfulgt af nummer, ex. appendix 1. Ved anvendelse af forkortelser er disse angivet i parentes første gang den optræder efter det fuldt udskrevne ord. På næste side er der en fuld oversigt over anvendte forkortelser i dette projekt.

Som referencesystem anvendes Harvard og der kildehenvises i teksten på følgende måde: ex. (Osswald et al. 2015). Ved henvisning til indhold i én sætning indsættes kilden før punktum og ved henvisning til indhold i flere sætninger indsættes kilden efter den sidste sætning efter punktum.

Forkortelser

ATP: adenosin triphosphat

BDWG: Biomarkers Definition Working Group

bp: basepar

BSA: bovine serum albumin

CCN3: NOV(nephroblastom overudtrykt)-protein

cDNA: kopi-deoxyribonukleinsyre

CNS: central nervesystemet

CSC: cancer stamceller

CTRL: kontrol

Cx43: connexin 43

DMEM: Dulbecco's modifikation af Eagle's Medium

dATP: deoxyadenosin triphosphat

dCTP: deoxycytidin triphosphat

dGTP: deoxyguanosin triphosphat

dNTP: deoxynukleotid triphosphat

dTTP: deoxytymidin triphosphat

EGF: epidermal vækstfaktor

FCS: føtal kalveserum

FDA: US Food and Drug Administration

GAPDH: glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase

GBM: glioblastom

GEN: gentamycin

GJ: gap junktion

GLP: Good Laboratory Practice

IgG: immunglobulin G

MgCl₂: magnesiumchlorid

MGMT: O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferase

mRNA: messenger-ribonukleinsyre

NEG: negativ

PBS: phosphatbuffered saltvand

PS: performancestatus

P/S: penicillin/steptomycin
RIPA-buffer: radioimmunoprecipitation assay buffer
RT-PCR: real time-polymerase kædereaktion
SAP: saponin
SOP: Standard Operating Procedure
TCGA: The Cancer Genome Atlas
T/E: trypsin/EDTA
T_m: smeltetemperatur
TMZ: temozolomid

Tabel- og skemaoversigt

Tabel 1: Incidensrate for Europa
Tabel 2: Eksempel på en bloksøgning
Tabel 3: Oversigt over opnåede koncentrationer af mRNA-template
Tabel 4: Oversigt over blandingsforhold af bestanddelene til cDNA-syntesen
Tabel 5: Oversigt over mængde af mRNA-template og tilført nukleasefrit vand til hver cDNA syntese-reaktion
Tabel 6: Inkuberingstider og -temperaturer til iScript™ cDNA Synthesis Kittet.
Tabel 7: Primerspecifikationer for Cx43 og GAPDH.
Tabel 8: Temperaturer og tid for trin i hver PCR-cyklus.
Tabel 9: Skematisk angivelse af antal dots sat på nitrocellulosemembranen
Tabel 10: Biomarkers Definition Working Group, definitioner på hhv. en biomarkør og et klinisk endpoint

Skema 1: Process over litteraturgennemgang
Skema 2: Fordeling af cellelinjer i 24-brøndsplade til immunfluorescensfarvning

Billedeoversigt

Billede 1: Cellelinje U87MG
Billede 2: Cellelinje C16
Billede 3: Gel indeholdende RT-PCR-produkt fra U87MG-cellelinjen

Billede 4: Gel indeholdende RT-PCR-produkt fra C16-cellelinjen

Billede 5: Immunfluorescensfarvning af U87MG-celler

Billede 6: Immunfluorescensfarvning af C16-celler

Billede 7: Dot blot over Cx43-protein i U87MG- og C16-cellelinjerne

Appendixoversigt

Appendix 1: Udregning af cellekoncentration til udsåning

Appendix 2: Viabilitetstest

Appendix 3: RT-PCR testkørsler

Appendix 4: Fremgangsmåde for EGF-stimulering og fiksering og immunfluorescensfarvning

Appendix 5: Fremgangsmåden for udførelse af dot blot

Bilagsoversigt

Bilag 1: Aurum™ Total RNA Mini Kit(Bio-rad) protokol

Bilag 2: iScript™ cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad) protokol

Indholdsfortegnelse

1. Indledning	9
2. Problemanalyse	10
2.1 Incidens	10
2.2 Klassificering	10
2.3 Mortalitet	11
2.4 Behandling	11
2.5 Terapeutisk resistens	12
2.6 Terapeutisk resistens ved Cx43	13
3. Problemafgrænsning	16
4. Formål	17
4.1 Problemformulering	17
5. Metode	18
5.1 Litteratursøgning	18
5.2 Projektopsætning	19
5.3 Analyser	20
5.3.1 Celledyrkning	20
5.3.2 Epidermal vækstfaktor-stimulering	21
5.3.3 Identificering af Cx43 mRNA	22
5.3.3.1 mRNA-oprensning	22
5.3.3.2 cDNA-syntese	22
5.3.3.3 Real time polymerase kædereaktion	24
5.3.4 Identificering af Cx43-proteinets ekspresion og lokalitet	25
5.3.4.1 Immunfluorescensfarvning	25
5.3.4.2 Dot blot	26
6. Resultater	28
6.1 Undersøgelse af Cx43 mRNA i GBM-celler in vitro	28
6.2 Ekspresion og lokalisering af Cx43-protein i GBM-celler in vitro	29
6.3 Semi-kvantitativ undersøgelse af Cx43-protein	32
7. Diskussion	33
7.1 Metodediskussion	33
7.1.1 Projektopsætning	33
7.1.2. Undersøgelse af Cx43 mRNA	33
7.1.3 Expression af Cx43-protein	34
7.2 Resultatdiskussion	35
7.2.1 Effekten af EGF på U87MG-cellelinjen	36
7.2.2 Udtrykkelsen af Cx43 i U87MG- og C16-cellelinjerne	36
7.2.3 Cx43-proteinets funktioner i forhold til øget terapeutisk resistens ved GBM	37
7.2.3.1 Funktion: Intercellulær kommunikation	37
7.2.3.2 Funktion: migration/invasion	38
7.2.4 Cx43 som biomarkør i fremtiden	39
8. Konklusion	43
9. Perspektivering	44
10. Referenceliste	45

1. Indledning

Prognosen for glioblastom(GBM)-patienter er dårlig og risikoen for recidiv er uundgåelig trods stråle- og adjuvant kemoterapi(Stupp et al. 2005; Ostrom et al. 2015). En årsag til dette menes at være terapeutisk resistens, blandt andet gennem den mulige tilstedeværelse af cancer stamceller(CSC)(Beier et al. 2011). Connexin 43(Cx43) formodes at være en afgørende medspiller i den terapeutiske resistens ved GBM(Osswald et al. 2015), hvorfor der på dette protein er særlig fokus inden for forskningen af GBM. En fremtidig mulig anvendelse af dette protein kan være som biomarkør for den terapeutiske resistens.

2. Problemanalyse

2.1 Incidens

Forekomsten af cancer i central nervesystemet(CNS), i Europa, varierer mellem 4,5 til 11,2 nye tilfælde pr 100.000/år for mænd og fra 1,6 til 8,5 pr 100.000/år for kvinder. Det er hyppigst voksne, der får cancer i CNS og særligt ældre der rammes, hvor incidensen for aldersgruppen 65+ ligger på 18,5 pr 100.000/år. Den hyppigst forekomne cancertype blandt cancer i CNS er astrocytiske tumorer med en samlet incidensrate på 4,8 pr 100.000/år. Den næst hyppigste er oligodendrogliale tumorer med en samlet incidens på 0,4 pr 100.000/år. Astrocytiske tumorer er fordelt blandt kønnene med 5,7 pr. 100.000/år for mænd og 4,0 pr. 100.000/år. Se tabel 1. (Crocetti et al. 2012) I Danmark blev der i 2014 diagnosticeret 826 personer med hjerne-cancer og forekomsten var for mænd 15,9 pr 100.000 og for kvinder 11,8 pr 100.000. (Cancerregisteret 2014)

Region	Årstal	Cancer	Incidens		
			Samlet	Mænd	Kvinder
Europa	1995-2002	Astrocytiske tumorer	4,8*	5,7*	4,0*
		Oligodendrogliale tumorer	0,4*	0,4*	0,3*

Tabel 1: Incidensrate for Europa opgjort over årene 1995-2002 fordelt på cancertype. *Standardiseret incidensrate pr. 100.000/år (Crocetti et al. 2012)

2.2 Klassificering

Gliomer udgør 31 % af alle hjernetumorer og er dermed den hyppigst forekomne form. 81 % af alle gliomer er maligne. Gliomer udspringer fra hjernens støtteceller, gliacellerne. Gliomer infiltrerer diffust hjernemassen og metastasere sjældent.(Ostrom et al. 2013; Ostrom et al. 2015) Gliomer er inddelt efter oprindelsessted og omfatter cancertyperne astrocytomer, oligodendrogliomer og ependymomas(Robbins og Cotran, 2010). GBM klassificeres som World Health Organisation(WHO)-grad IV astrocytom(Kumar et al. 2010) og med 54,4 % er GBM den største gruppe af gliomer(Ostrom et al. 2013).

2.3 Mortalitet

Af alle diagnosticerede cancers udgør cancer i CNS kun 1,3 %. Til gengæld er cancer i CNS ansvarlige for 2,5% af alle cancer-relaterede dødstilfælde.(Weinberg 2014) Efter diagnosen GBM er stillet, er den gennemsnitlige prognose for overlevelse 14,6 måneder med behandling(Stupp et al. 2005), hvorimod den kun er ca. 3 måneder uden behandling(Tran & Rosenthal 2010). Under 5% af GBM-patienterne lever længere end 5 år(Ostrom et al. 2015). I Danmark er 48 % af patienterne med diagnosen GBM i live 1 år efter diagnosen er stillet og efter 2 år er 21 % af disse i live(Dansk Neuro Onkologisk Gruppe 2014a).

2.4 Behandling

Behandling af GBM indbefatter operation, stråleterapi og kemoterapi. Ved operation fjernes så vidt mulig alt tumorvæv. På grund af GBM's infiltrerende egenskab er det meget sjældent muligt at bortoperere alt tumorvæv. Efter operationen behandles der først med stråleterapi og konkomitant kemoterapi i 6 uger. Stråleområdet defineres efter en postoperativ MR-scanning og tillægges en margin på 2 cm, for så vidt muligt at undgå at bestråle normalt hjernevæv. Derefter gives der adjuvant kemoterapi én uge om måneden i 6 måneder. Dette er den behandling, hvor det er bevist at give den længste overlevelse. (Dansk Neuro Onkologisk Gruppe 2014b)

Ved behandlingen kan der opstå akutte, forbigående bivirkninger i form af immunsuppression, træthed, huderytem, hårtab og mellemørebetændelse(Athanassiou et al. 2005; Stupp et al. 2005). Der kan også opstå sene bivirkninger hos langtidsoverlevende i form af demenssymptomer. Desuden forventes det, at sygdommen vil progrediere for ca. 50% af GBM-patienterne under behandlingsforløbet. Progression af tumor medfører ofte intraktable symptomer inklusiv personlighedsændringer, hvilket nedsætter patienternes livskvalitet.(Dansk Neuro Onkologisk Gruppe 2014b) Strålebehandlingen har desuden vist at kunne give dårligere score af emotionelle funktioner og kvalitet af fritidsaktiviteter(Kiebert et al. 1998).

Trods GBM-patienter får den behandling, der giver længst overlevelse, er under 5% i live 5 år efter diagnosen er stillet. Desuden er behandlingen ikke uden bivirkninger for patienten, hvor dennes livskvalitet nedsættes. De sidste to årtier har der været fokus på sygdommen, men fremskridtet har været begrænset. Det største fremskridt har været, at konkomitant kemoterapi gennemsnitlig har givet patienterne 2,5 måned længere at leve i(Stupp et al. 2005).

En mulig forklaring på, hvorfor GBM-patienter har en høj risiko for forekomst af recidiv, kan være, at nogle af tumorcellerne er resistente overfor den behandling, der gives.

2.5 Terapeutisk resistens

Der er hypoteser, inden for GBM-tumorcellers terapeutiske resistens, som blandt andet omhandler tilstedeværelsen af cancer stamceller(Beier et al. 2011). En øget grad af selvfornyelse er et hallmark for cancerceller(Hanahan & Weinberg 2000). Tumorer er heterogene og det har vist sig, at nogle af tumorcellerne besidder større selvfornylsessevne end andre. I hjernetumorer beskrives disse som CSC'er.(Singh et al. 2003) Ifølge Reya et al. 2001 hypotiseres det, at der i normale stamceller er bestemte signalveje, som styrer cellernes selvfornyelse. Hvis CSC'er har samme grundlæggende egenskaber som normale stamceller, vil det betyde, at CSC'er kan have samme egenskaber til at styre selvfornylsen. Dette kan blandt andet være et højt niveau af anti-apoptotiske proteiner, hvilket vil gøre CSC'erne svære at bekæmpe. Det hypotiseres desuden at CSC, ligesom normale stamceller, er mere resistente over for kemoterapi end modnede celler/tumorceller, formentlig på grund af det høje niveau af anti-apoptotiske proteiner. Dette vil betyde, at selvom kemoterapien bekæmper de mere differentierede tumorceller, er der fortsat risiko for recidiv via CSC. (Reya et al. 2001)

I litteraturen beskrives diverse faktorer, der har vist sig at have betydning for den terapeutiske resistens ved GBM in vitro og in vivo. Der findes ikke fuld enighed om faktorerne, dog beskrives særligt MGMT(O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferase) -enzymet som en vigtig modulator af kemoresistensen i GBM, ved at MGMT-udtrykkelse øger resistensen af cancerceller.(Beier et al. 2011) Kemoterapi med temozolomid (TMZ) fungerer ved, at TMZ alkylerer DNA'et på O⁶-positionen på guanin, hvilket inducerer dobbeltstrenget DNA til at bryde og aktiverer apoptose af cellen. Denne DNA-skade kan repareres gennem MGMT-enzymet ved, at det fjerner alkylgruppen og dermed modvirker effekten af TMZ.(Bleau et al. 2009) Denne effekt skulle teoretisk set være ligefrem korreleret med graden af MGMT-udtrykkelsen og dermed øge gennemsnitlig overlevelse hos GBM-patienter med øget MGMT-udtrykkelse, hvilket der også konkluderes i nogle studier(Sonoda et al. 2009; Hegi et al. 2005; Zhang et al. 2013). Dog er der også fund, som indikerer, at graden af MGMT-udtrykkelse ikke har en indvirkning på terapiresponsen, hvorfor MGMT-status ikke er en pålidelig markør for kemoresistensen(Costa et al. 2010; Park et al. 2009).

En biomarkør for den terapeutiske resistens vil kunne give onkologen et styrket grundlag for at tilpasse behandlingen til den enkelte patient og dermed øge den gennemsnitlige overlevelse og progressionsfrie overlevelse for GBM-patienten. Biomarkører er per definition objektive, kvantificerbare karakteristika af biologiske processer (Strimbu & Tavel 2010). WHO definerer en biomarkør som "næsten enhver måling som afspejler en vekselvirkning mellem et biologisk system og en potentiel fare, som kan være kemisk, fysisk eller biologisk. Den målte respons kan være funktionel og fysiologisk, biokemisk på celleniveau, eller en molekylær interaktion" (WHO 1993). Hvis der ud fra biomarkørresultatet skal foretages behandlingsmæssige beslutninger er det særligt afgørende, at validiteten af biomarkøren er høj og det er derfor vigtigt at fastlægge det præcise forhold mellem den målte biomarkør og det kliniske udfald. (Strimbu & Tavel 2010)

Ved planlægning af GBM-patienters behandlingsforløb anvender onkologen flere relevante faktorer, som har betydning for valg af stråleområde og stråle- og kemoterapidosis. De relevante faktorer er patientens performancestatus (PS), tumorstørrelse, antal tumorer, baselineadministration af binyrebarkhormon og kliniske faktorer som patientens alder, sundhedstilstand og samtidige sygdomme. (Dansk Neuro Onkologisk Gruppe 2014b) Disse faktorer og en biomarkør for effekten af behandlingen vil være stærke værktøjer for onkologen ved planlægning af den enkelte patients behandlingsforløb (Gorlia et al. 2012).

En nyopdaget mulig medspiller og mulig biomarkør for den terapeutiske resistens er gap junction-proteinet Cx43. Connexiner er integralmembran proteiner som, ved at reagere med hinanden, oligomere og danner intercellulære kanaler, gap junctions (GJ). Kanalerne skaber celle-celle kontakt og tillader passage af ioner, intercellulære metabolitter og signalmolekyler fra cytoplasma i en celle til nabocellen. Cx43 er bredt udtrykt i flere organer og celletyper, og er det vigtigste GJ-protein i hjertet. (InterPro 2016) Cx43 i GBM menes at kunne yde terapeutisk resistens gennem opregulering af proteinet i GJ, hvorigennem blandt andet multicellulær kommunikation kan foregå og dermed give kollektiv terapeutisk resistens blandt tumorcellerne (Osswald et al. 2015).

2.6 Terapeutisk resistens ved Cx43

Cx43 er udtrykt i både astrocytter og neurale progenitorceller, som begge menes at tage del i udviklingen af GBM. Flere studier viser, at en nedsat udtrykkelse af Cx43-proteinet generelt er associeret med en stigning i celleproliferation og en højere tumorgrad (Huang et al. 1999;

Soroceanu et al. 2001; Pu et al. 2004; Caltabiano et al. 2010). Genomisk data om Cx43 og GBM fra The Cancer Genome Atlas (TCGA) database viser, at et tab af Cx43 betyder øget vækst af tumor og at Cx43 fungerer som væksthæmmer. Dog er dette ikke altid tilfældet. Fra TCGA-databasen viser det sig også, at 57% af primære GBM tumorer udtrykker et reduceret niveau af Cx43, hvor de resterende 43% udtrykker et forhøjet niveau. Udtrykkelsen af Cx43 understreger heterogeniteten af GBM-tumorer og at tumor-mikromiljøet kan have indvirkning på Cx43-udtrykkelsen. Ligeledes udtrykkes Cx43 også i ikke-neoplastiske astrocytter, hvilket betyder, at Cx43's funktion afhænger af tumors cellulære status. (Sin et al. 2012)

Cx43 menes at have flere egenskaber, som beskytter og styrker tumoren til vækst. Gennem Cx43-GJ har tumorcellerne øget permeabilitet for nogle metabolitter, så som ATP og glutamat, der kan være med til at styrke væksten af tumor (Goldberg et al. 2002; Goldberg et al. 1999). Cx43 er også permeabel for glukose, som kan påvirke cancer-celle-metabolismen (Rouach et al. 2008; Herrero-gonzález et al. 2009). Der kan dog også ske en nedregulering af cellevækst ved Cx43 gennem påvirkning af interagerende proteiner, fx CCN3. CCN3 er særlig interagerende med Cx43's C-terminal og det hypotiseres at tilstedeværelsen af Cx43 forebygger translokationen af CCN3 til nukleus, som ellers ville stimulere til cellevækst (Sin et al. 2008; Fu et al. 2004).

I modsætning til celleproliferation, hvor en nedsat udtrykkelse af Cx43 kan fremme celleproliferation, menes en øget Cx43-udtrykkelse at være med til at fremme cellemigration (Xu et al. 2006). Mekanismerne bag migrationsegenskaberne er fortsat uklare, men det menes at dannelsen af GJ mellem gliomaceller og astrocytter kan have en kritisk rolle i gliomainvasion. Ligeledes menes det, at cellemigration styrkes, når GJ-dannelse er lav mellem gliomaceller, men høj mellem gliomaceller og astrocytter. En lav GJ-kobling mellem gliomaceller fremmer altså cellemigration, hvilket også er i overensstemmelse med, at en nedsat Cx43-udtrykkelse korrelerer med øget glioma malignitet. (Sin et al. 2015) I et studie lavet på rotter er Cx43-udtrykkelse blevet vist til at gøre GJ-dannelse mellem gliomaceller og astrocytter mulig og at tumorcelleinvasion i hjerneparenkymet bliver hjulpet på vej af Cx43-udtrykkelse i cancercellerne. Desuden viste studiet at antallet af Cx43-udtrykkende celler steg med ca. en faktor 30 i det normale hjerneparenkym, allerede 4 dage efter indlejring af GBM-tumor i rask rotte-hjernevæv. (Lin et al. 2002) Det hypotiseres, at særligt de migrerende og prolifererende cancerceller er CSC og at det særligt er CSC'er, der er stærkt resistente over for stråle og kemoterapien, hvilket vil øge risikoen for recidiv af sygdommen. (Reya et al. 2001)

Som beskrevet anvender GBM-celler GJ til proliferation og migration. GJ er også med til at sammenkoble med andre celler over store afstande. Dette netværk af GJ anvendes til multicellulær kommunikation blandt tumorcellerne og som beskyttelse mod stråleterapidrevet apoptose. GJ-forbundne cancerceller er blevet undersøgt, og blandt andet i et studie af Osswald et al. 2015 var disse celler stort set beskyttet mod apoptose, hvorimod cancerceller uden GJ døde efter stråleterapi. Som følge af strålingen steg desuden cancercellernes antal af GJ og dermed også kommunikationen med kalcium mellem cellerne. (Osswald et al. 2015) Let øgede kalciumkoncentrationer er involveret i GBM-apoptose (Mcferrin et al. 2012), hvilket er tilfældet ved stråle-induceret cytotoxicitet (Tombal et al. 2002). Sådanne koncentrationer neutraliseres ved tilstedeværelsen af GJ, formentlig ved at fordele calciumbølgen mellem de forbundne celler, for derved at øge resistensen af behandlingen. (Osswald et al. 2015)

Cx43 kan have stort potentiale som biomarkør for den terapeutiske resistens ved GBM-behandlingen, hvorfor det er vigtigt at få afklaret tilstedeværelsen af Cx43 i cancercellelinjer in vitro og dermed muliggøre videre forskning på disse.

Forskning omkring Cx43 i GBM har indtil videre mest foregået på diverse cancercellelinjer og på mindre grupper af GBM-patienter. Tumors yderst heterogene sammensætning og potentialer inden for vækst, differentiering og migration, som også især ses i GBM, er med til at gøre forskning i cancer meget omfangsrig. Det er derfor nødvendigt at fastlægge tilstedeværelsen af Cx43 i cancercellelinjer, som så kan være grundlag for videre forskning med henblik på fastlæggelse af Cx43-egenskaber, mulige anvendelighed som biomarkør for den terapeutiske resistens og som guide til planlægning af behandlingen.

3. Problemafgrænsning

GBM er en aggressiv cancerform med dårlig prognose. Den gennemsnitlige overlevelse for GBM-patienter er 14,6 måneder med behandling og i Danmark overlever kun 48 % det første år med sygdommen, som er reduceret til 21 % efter 2 år.(Stupp et al. 2005; Tran & Rosenthal 2010; Dansk Neuro Onkologisk Gruppe 2014a) Behandlingen for GBM er gennem de sidste to årtier kun blevet forbedret ved tilføjelsen af konkomitant kemoterapi, som har givet patienterne gennemsnitlig 2,5 måned længere at leve i(Stupp et al. 2005). En mulig forklaring kan være at nogle af tumorcellerne kan være resistente overfor den behandling der gives. Særligt MGMT-genet menes at have betydning for den terapeutiske resistens, men forskningsresultaterne på området er delte(Costa et al. 2010; Park et al. 2009), hvorfor det ny opdagede GJ-protein, Cx43, får opmærksomheden som en mulig biomarkør for den terapeutiske resistens. Cx43 menes at have indvirkning på tumorvækst, migration af tumorceller og kommunikation mellem tumorceller. Egenskaber som er med til at beskytte og styrke tumoren.(Goldberg et al. 2002; Lin et al. 2002; Osswald et al. 2015) Trods variationen i udtrykkelse af Cx43 i GBM formodes det dog, at en opregulering af Cx43 har en indvirkning på den terapeutiske resistens ved GBM, formentlig gennem øget proliferation i nogle tumorceller og øget migration i andre. I fremtiden tænkes denne opregulering af Cx43 at kunne blive anvendt som en biomarkør for den terapeutiske resistens hos den enkelte patient.

4. Formål

Dette projekt tester første skridt i en ny biomarkør-drevet-teknologi, med henblik på fremtidig implementering og anvendelse i behandlingen af GBM-patienter.

Med projektet søges at afdække tilstedeværelsen af Cx43 i to cellelinjer in vitro. Af cellelinjer er udvalgt C16 og U87MG, hvilke begge er udledt fra mandlige patienter med grad IV GBM.

U87MG er kommercielt tilgængelig og C16 er udledt på Aalborg Universitet til forskningsbrug.

U87MG menes at udtrykke Cx43 i modsætning til C16, som menes ikke at udtrykke Cx43.

Med den teoretiske forudsætning, at Cx43 er en pålidelig biomarkør for den terapeutiske resistens, søges det at belyse Cx43-proteinets anvendelighed som biomarkør for den terapeutiske resistens ved behandling af GBM-patienter og vurdere hvordan onkologer kan bruge sådan en ny teknologi til at træffe beslutninger omkring behandlingen af deres patient i fremtiden.

4.1 Problemformulering

Er Cx43 udtryk i cellelinjerne C16 og U87MG og hvordan kan Cx43-ekspressionen anvendes som biomarkør for den terapeutiske resistens ved behandlingen af glioblastom i fremtiden?

5. Metode

I det følgende afsnit beskrives den litteratursøgning, der er foretaget i projektet. Desuden beskrives projektets eksperimentelle opsætning og den anvendte metode i nærværende projekt, hvilket, til identificering af Cx43, omfatter celledyrkning, epidermal vækstfaktor(EGF)-stimulering, mRNA-oprensning, cDNA-syntese, real time polymerase kædereaktion(Rt-PCR), immunfluorescensfarvning og dot blot.

5.1 Litteratursøgning

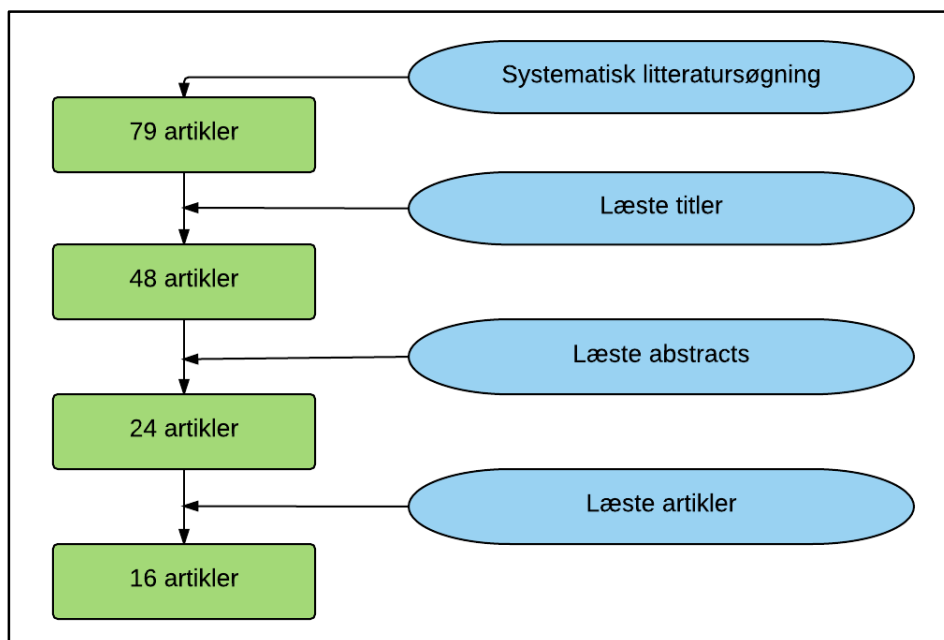
Litteratursøgningen i projektet blev indledt med fritekstsøgninger for at afdække og fokusere projektets problemstilling. Der blev anvendt databaser som Pubmed, Aalborg Universitetsbibliotek og Google Scholar. Fritekstsøgningerne bestod af ord som "glioblastoma", "treatment outcome", "drug resistance" og "Connexin 43". Efterfølgende blev der foretaget nye strukturerede litteratursøgninger, som havde udgangspunkt i problemformuleringen og resultaterne fundet gennem den anvendte metode. Af teknikker blev der blandt andet anvendt boolske operatører for enten at indsnævre (AND) eller udvide (OR) søgningerne i de videnskabelige databaser. Derudover blev der anvendt tesaurus, for at sikre inklusionen af indbyrdes relaterede synonymer (Rienecke & Jørgensen 2006). Litteratursøgningerne blev foretaget i databaser som Pubmed og Scopus. De studier, der blev inkluderet, blev udvalgt på baggrund af deres relevans og kvalitet for projektets emne og gennemgået ved hjælp af en kritisk litteraturvurdering. I tabel 2 ses et eksempel på en bloksøgning foretaget ved en systematisk litteratursøgning i Pubmed.

OR	AND	OR	AND	OR
"Glioma"[Mesh]		"Connexin 43"[Mesh]		"Cell Proliferation"[Mesh]
"Glioblastoma"[Mesh]		"GJA1 protein, mouse" [Supplementary Concept]		"Cell Communication"[Mesh]
		"GJA1 protein, human" [Supplementary Concept]		"Gap Junctional Intercellular Communication*"
		"Cx43*"		"Cell Movement"[Mesh]
				"Cell migration*"

Tabel 2: Eksempel på en bloksøgning, som er foretaget i Pubmed.

Bloksøgningen i tabel 2 giver følgende søgestreng: (((("Glioma"[Mesh]) OR "Glioblastoma"[Mesh])) AND (((("Connexin 43"[Mesh]) OR "GJA1 protein, mouse" [Supplementary Concept]) OR "GJA1 protein, human" [Supplementary Concept]) OR "Cx43*")) AND (((("Cell Movement"[Mesh]) OR "Cell Proliferation"[Mesh]) OR "Cell Communication"[Mesh]) OR "Cell migration*") OR "Gap Junctional Intercellular Communication*").

D en 25/5-16 gav søgningen 79 resultater i pubmed, hvor første sortering skete ved titelgennemgang. Dernæst blev abstrakt på de titel-udvalgte artikler læst, hvorfra artikler til fuld gennemlæsning blev valgt. Processen ses i skema 1.



Skema 1: Proces over litteraturgennemgang

5.2 Projektopsætning

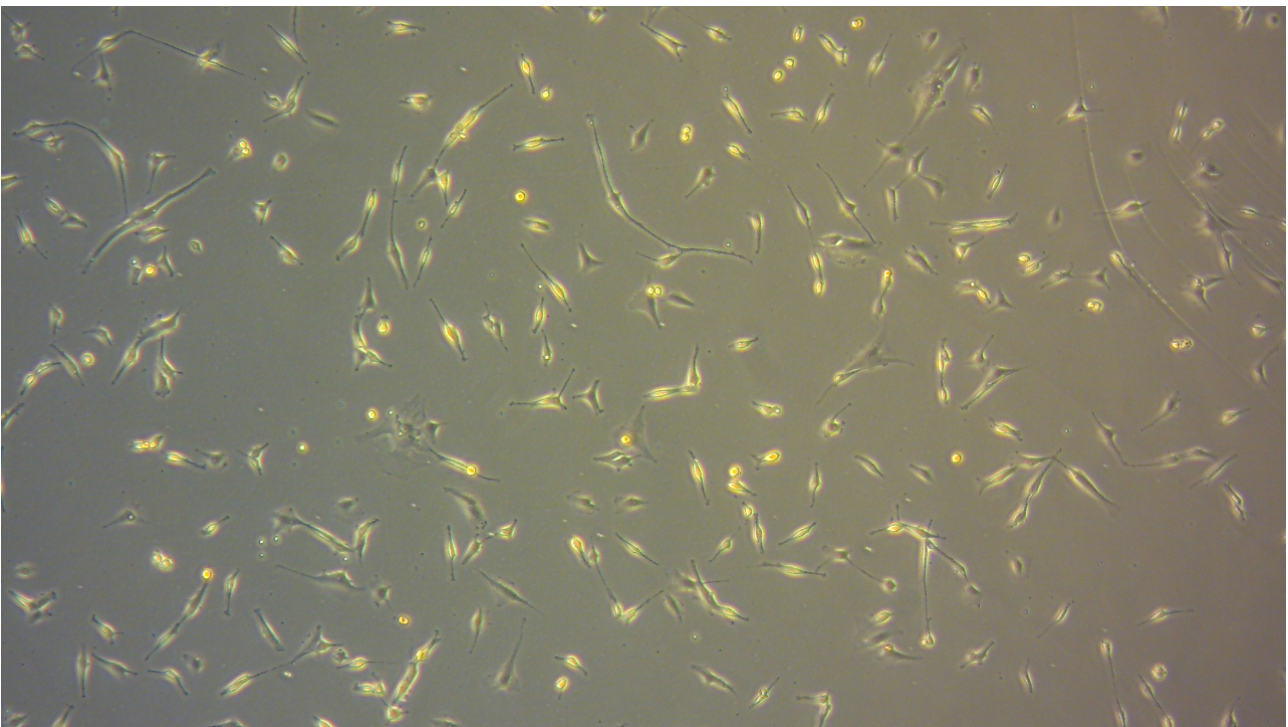
Studiet bygger på in vitro celledyrkning af cellerlinjerne U87MG og C16 i monolag. Der foretages stimulering af cellerlinjerne med EGF. Tilstedeværelsen af Cx43 undersøges ved udførelse af RT-PCR på begge cellerlinjer. Desuden mærkes Cx43 med fluorescens med henblik på at identificere proteinets expression og position i cellerne. Der udføres også et dot blot, til verificering af Cx43-proteinets udtrykkelse i cellerlinjerne.

Til vurdering af Cx43 som mulig biomarkør for den terapeutiske resistens ved GBM-behandlingen, anvendes resultaterne af in vitro laboratorieforsøgene sammenholdt med videnskabelig litteratur på området.

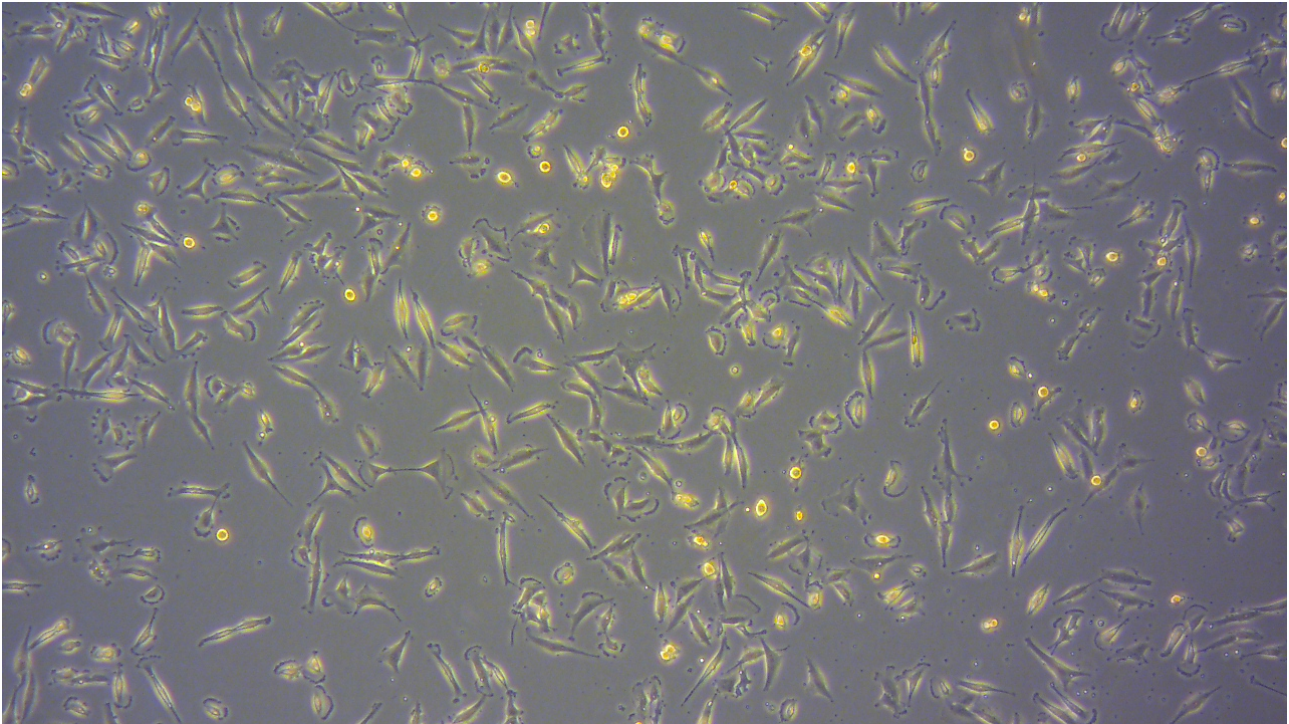
5.3 Analyser

5.3.1 Celledyrkning

I projektet blev cellelinjerne U87MG og C16 anvendt. U87MG stammer fra en caucasisk 44-årig mand med glioblastom grad IV astrocytom, som er kommercielt tilgængeligt. C16 er oprenset på Aalborg Universitet og stammer fra en 43 årig mand med diagnosticeret glioblastom. Cellelinjerne, U87MG(passage 5) og C16(passage 6), blev optøet fra - 140 °C og dyrket i T175-flasker tilsat et dyrkningsmedie indeholdende Dulbecco's modifikation af Eagle's Medium(DMEM)(Corning), 10 % føtal kalveserum(FCS), 1 % penicillin/streptomycin(PS)(Gibco) og 0,5 % gentamycin(GEN)(Gibco) og opbevaret i varmeskab ved 37 °C og 5% CO². For at opretholde levedygtige cellelinjer blev der løbende skiftet medie og udført passager af cellerne, når det blev nødvendigt. Billede 1 og 2 viser henholdsvis U87MG- og C16-celler ved dyrkning.



Billede 1: Cellelinje U87MG(passage 7) ved dyrkning, x4. 30 % konfluens.



Billede 2: Cellelinje C16(passage 8) ved dyrkning, x4. 50 % konfluens.

5.3.2 Epidermal vækstfaktor-stimulering

Stimulering af cellelinjerne skete med EGF. Ved en passende konfluens (60-90%) blev cellerne høstet ved hjælp af trypsin/EDTA(T/E). Cellerne blev inkuberet med T/E i varmeskab (37 °C) i ca. 4 min til cellerne havde løsnet sig. T/E blev inaktiveret med dyrkningsmedie og suspensionen blev overført til plastrør og centrifugeret ved 300 g i 5 min ved 20 °C. Herefter blev cellerne resuspenderet i 1 mL medie og talt ved hjælp af tællekammer.

EGF-stimulering af C16-cellelinjen blev udført i en 6-brøndsplade, hvor cellerne blev udsået i en koncentration på 5000 celler/cm². Se udregning i appendix 1. Ved opnåelse af monolag, blev der i brønd 1-3 stimuleret med EGF (20 ng/mL). Brønd 4-6 fungerede som kontrol og fik derfor blot skiftet medie.

Samme proces blev udført på U87MG-cellelinjen, dog blev disse udsået i to T25-flasker (en EGF-stimuleret (20 ng/mL) og en kontrol), da de ved udsåning i 6-brøndspladen løsnede sig fra pladen ved EGF-stimulering. Her blev der udført viabilitetstest af U87MG-cellerne fra 6-brøndspladen for at undersøge om cellerne døde ved EGF-stimulering. Se appendix 2 for fremgangsmåde og udregning af viabilitetstesten.

5.3.3 Identificering af Cx43 mRNA

Til identificering af Cx43 mRNA i cancercellelinjerne blev der anvendt RT-PCR. Da der i projektet er fokus på cancercellernes udtrykkelse af proteinet Cx43 blev mRNA oprenset fra cellelinjerne, som derefter blev oversat til cDNA for herpå at køre RT-PCR.

5.3.3.1 mRNA-oprensning

mRNA blev oprenset fra cancercellelinjerne ved anvendelse af Aurum™ Total RNA Mini Kit(Bio-rad). Producentens protokol (se bilag 1) blev fulgt ud fra spin-proceduren beskrevet til oprensning af mRNA fra dyrkede cellelinjer. Denne proces bestod af flere på hinanden følgende trin. Gennem processen blev cancercellerne lyseret for at få adgang til mRNA'et. mRNA'et blev efterfølgende oprenset i en oprensningssøjle som mRNA'et binder til og alt andet cellemateriale vaskes væk. Afslutningsvis blev mRNA'et løsnet fra oprensningssøjlen med en elueringsopløsning og overført til et mikrorør. Et nanophotometer (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) blev anvendt til kvantificering af det oprensede mRNA (se tabel 3), som efterfølgende blev opbevaret ved -80 °C.

Cellelinje	mRNA-template koncentration (ng/mL)	Konc.-ratio, 280 nm	Konc.-ratio, 230 nm
U87MG – EGF	566,8	2,09	2,09
U87MG - CTRL	554,8	2,06	2,02
C16 – EGF	355,1	2,01	2,18
C16 – CTRL	348,5	2,07	2,14

Tabel 3: Oversigt over opnåede koncentrationer af mRNA-template og dertilhørende koncentrationsratioer ved 280 og 230 nanometer.

5.3.3.2 cDNA-syntese

For at kunne anvende mRNA-templaten til PCR-analysen blev denne konverteret til kopi-DNA(cDNA). Til denne proces blev iScript™ cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad) anvendt, se bilag 2. Kittet bestod af reaktionsmix (indeholdende oligo(dT) og vilkårlige hexamer primere), reverse transkriptase og nukleasefrit vand, som blev blandet i det forhold, der er vist i tabel 4. Mængden af nukleasefrit vand afhang af koncentrationen af mRNA template.

Bestanddele	Mængde (µL)
Reaktionsmix	4
Reverse transkriptase	1
Nukleasefrit vand	X
mRNA template	X
ialt	20

Tabel 4. Oversigt over blandingsforholdet af bestanddelene til cDNA-syntesen med iScript™ cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad).

I nedenstående tabel (tabel 5) fremgår det hvor mange µL mRNA-template, der blev anvendt til hver cDNA syntese-reaktion og hvor meget vand, der blev tilført hver cDNA syntese-reaktion.

Cellelinje/ cDNA syntese- reaktion	mRNA- template til iScript(x µL) (=1000 µL/mRNA- template)	Vandmængde: (20-1-4-x) µL
U87MG – EGF	1,76	13,24
U87MG - CTRL	1,8	13,2
C16 – EGF	2,82	12,18
C16 – CTRL	2,87	12,13

Tabel 5: Oversigt over mængde af mRNA-template anvendt til hver cDNA syntese-reaktion og mængde af tilført nukleasefrit vand til hver cDNA syntese-reaktion. Mængde af anvendte mRNA-template er beregnet som angivet i parentes i tabellen.

cDNA syntese-reaktionerne blev inkuberet i et termisk cykliseringsapparat som var indstillet efter protokollen i iScript™ cDNA Synthesis Kittet. Se tabel 6.

Tid (min)	Temperatur (°C)
5	25
30	42
5	85

Tabel 6: Inkuberingstider og -temperaturer til konverteringen af mRNA til cDNA efter iScript™ cDNA Synthesis Kittet.

Efter endt protokol blev prøverne, indeholdende cDNA, anbragt på frys (-18 °C) til senere RT-PCR-analyse.

5.3.3.3 Real time polymerase kædereaktion

cDNA fra cellelinjerne C16 og U87MG, EGF-stimuleret og kontrol, blev fortyndet med nukleasefrit vand til en koncentration på 0,5 ng/μL. RT-PCR amplifikationer blev udført med Techne³Prime Thermal Cyclers, hver i en opløsning med en total volumen på 25 μL indeholdende 12,5 μL DreamTaq Green PCR MasterMix (Thermo Scientific), 4 μL cDNA-temple, 0,5 μL af hver primer (10 mM) og 7,5 μL nukleasefrit vand. DreamTaq Green PCR MasterMix indeholdte DreamTaqTM DNA polymerase, DreamTaq Green buffer, 4 mM MgCl₂ og dNTP'er (dATP, dCTP, dGTP og dTTP på hver 0,4 mM). RT-PCR amplifikationer blev udført med dobbeltbestemmelse og en negativ kontrol ved anvendelse af nukleasefrit vand som temple. Hver RT-PCR amplifikation indeholdte en intern positiv kontrol i form af housekeeping genet glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH). Specifikationer for primere anvendt ses i tabel 7. RT-PCR amplifikationer blev udført gennem 40 cyklusser, se tabel 8 for temperatur og tid for hver trin i en RT-PCR amplifikationscyklus.

Gen	Primere	T _m , °C
Cx43	Forward: 5'-TAC CAA ACA GCA GCG GAG TT-3'	59,2
	Reverse: 5'-TGG GCA CCA CTC TTT TGC TT-3'	59,9
GAPDH	Forward: 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3'	57,5
	Reverse: 5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG- 3'	58,6

Tabel 7: Primerspecifikationer for Cx43(connexin 43) og GAPDH(glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) primerssekvenser(Cheng et al. 2015) og disses optimale temperatur (T_m) forhold(Thermo Fisher Scientific 2016b).

Trin	Temperatur(°C)	Tid(sec)
Denaturering	95	30
Annealing	57	30
Extention	72	30

Tabel 8: Temperaturer og tid for trin i hver RT-PCR-cyklus.

Til visualisering af RT-PCR produkterne blev fremstillet en 2% agarosegel (1g agarosepulver opløst i 50 mL Tris-acetat-EDTA(TAE)-buffer, som efter opvarmning blev tilsat 4 µL ethidium bromid. Ethidium bromid binder til dobbeltstrenget DNA og fluorescere ved 600 nm. I den afkølede gel blev RT-PCR produkterne loadet sammen med en Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), som gjorde det muligt at størrelsesestimere dobbeltstrenget DNA 100-3000 basepar. Gelelektroferesen blev kørt ved 100 V i ca. 20 min.

Der blev udført testkørsler af RT-PCR-analysen for at finde den rette mængde template til analysen, optimal housekeeping gen og for at forbedre kompetencen i at anvende analysemetoden. Opsætning og resultat af testkørslerne kan ses i appendix 3.

5.3.4 Identificering af Cx43-proteinets ekspresion og lokalitet

Til identificering af Cx43-proteinets ekspresion og lokalitet i U87MG- og C16-cellelinjerne blev der anvendt immunfluorescensfarvning. Efterfølgende blev tilstedeværelsen af Cx43-proteinet verificeret med et dot blot.

5.3.4.1 Immunfluorescensfarvning

Til immunfluorescensfarvning blev U87MG- og C16-cellelinjerne fremdyrket i en 24-brøndsplade, hvor 3 brønde for hver cellelinje blev stimuleret med EGF og 5 brønde for hver cellelinje fungerede som kontrol. Se fordeling i skema 2. Ved en cellekonfluens på ca. 60% blev cellerne fikseret med 4% formaldehyd og immunfarvet ved at følge fremgangsmåden her til, se appendix 4. Til blokering af baggrundsstøj og øge cellernes permeabilitet for antistofferne, blev der anvendt en PBS buffer tilsat 5% BSA (bovine serum albumin) og 0,1% SAP (saponin). Antistofferne anvendt til den indirekte immunfluorescensfarvning var et primært kanin polyklonalt antistof specifikt for Cx43 (abcam 2016a) og et sekundært æsel-anti-kanin IgG polyklonalt antistof med Alexa fluor-555 konjugat (abcam 2016b). Antistofferne blev anvendt i en koncentration på 1:1000. Til kernefarvning blev anvendt Hoechst33342 Live Stain i en 1:2000 koncentration (Thermo Fisher Scientific 2016a).

C16			U87MG		
EGF	EGF	EGF	EGF	EGF	EGF
CTRL	CTRL	CTRL	CTRL	CTRL	CTRL
CTRL	CTRL(neg)	Cellestok	CTRL	CTRL(neg)	Cellestok
Cellestok	Cellestok	Cellestok	Cellestok	Cellestok	Cellestok

Skema 2: Fordeling af cellelinjer i 24-brøndspladen til immunfluorescensfarvning. Den sorte indramning indikerer pladen med den 24 brønde. Den grønne farve viser de brønde der er udsået med C16 cellelinjen og den orange farve viser de brønde der er udsået med U87MG cellelinjen. Brønde udfyldt med "EGF" indikerer at celler i denne brønd er stimuleret med EGF. Brønde udfyldt med "CTRL" indikerer at celler i denne brønd er kontrolbrønde. "CTRL"-brønde, som også er markeret med "(neg)", er brønd som er anvendt som negativ kontrol ved immunfluorescensfarvning. Brønde udfyldt med "cellestok" indikerer at celler i denne brønd er cellestok af den pågældende cellelinje.

Til visualisering af immunfluorescensen blev anvendt Zeiss Axio Observer Z.1. Mikroskopet belyser de immunfluorescensfarvede celler gennem et filter, som kun tillader udvalgte bølgelængder af lys. Herved kan lyset tilpasses de anvendte immunfluorescenser, som ved belysningen reflekterer lyset og et billede dannes (Zeiss 2006). Kernefarvningen belyses med ultraviolet lys og reflekterer blått ved 460-490 nm (Thermo Fisher Scientific 2016a). Det sekundære antistof reflekterer rødt lys ved 555-565 nm (abcam 2016b).

5.3.4.2 Dot blot

Der blev udført dot blot til semikvantitativ verificering af Cx43-protein-udtrykkelsen i U87MG- og C16-cellelinjerne. Protein i cellelinjerne blev oprenset ved at inkubere disse med radioimmunoprecipitation assay (RIPA) -buffer (Thermo Scientific) tilsat proteinaseinhibitor (cOmplete Tablets Mini, Roche). Cellesuspensionerne blev herefter faseopdelt ved centrifugering og supernatanten, indeholdende proteinet fra cellelinjerne, blev anvendt til dot blot-analysen. Fremgangsmåden for udførelse af dot blot ses i appendix 5.

Den semikvantitative identificering af Cx43-protein udtrykt i U87MG- og C16-cellelinjerne blev udført ved at dotte 1,5 µL protein-supernatant på en nitrocellulosemembran. På membranen blev angivet et gitter med 4 kolonner og 2 rækker. Rækkerne repræsenterede de to cellelinjer og i de 4 kolonner blev der sat dots med en faktor 2. Antallet af dots sat i samme område i gitteret ses i tabel 9.

Cellelinje	Antal dots			
	8	6	4	2
U87MG				
C16				

Tabel 9: Skematisk angivelse af antal dots sat for hver position på nitrocellulosemembranen. Den grønne indramning symboliserer nitrocellulosemembranen.

Til visualisering af Cx43-proteinet blev anvendt samme primært antistof som til immunfluorescensfarvningen, kanin polyklonalt antistof specifik for Cx43(abcam 2016a). Det sekundære antistof, IRDye 800CW ged anti-kanin polyklonalt antistof(LI-COR 2016), havde en 800 nm fluorophor, som var med til at øge specificiteten og nedbringe baggrundsstøj.

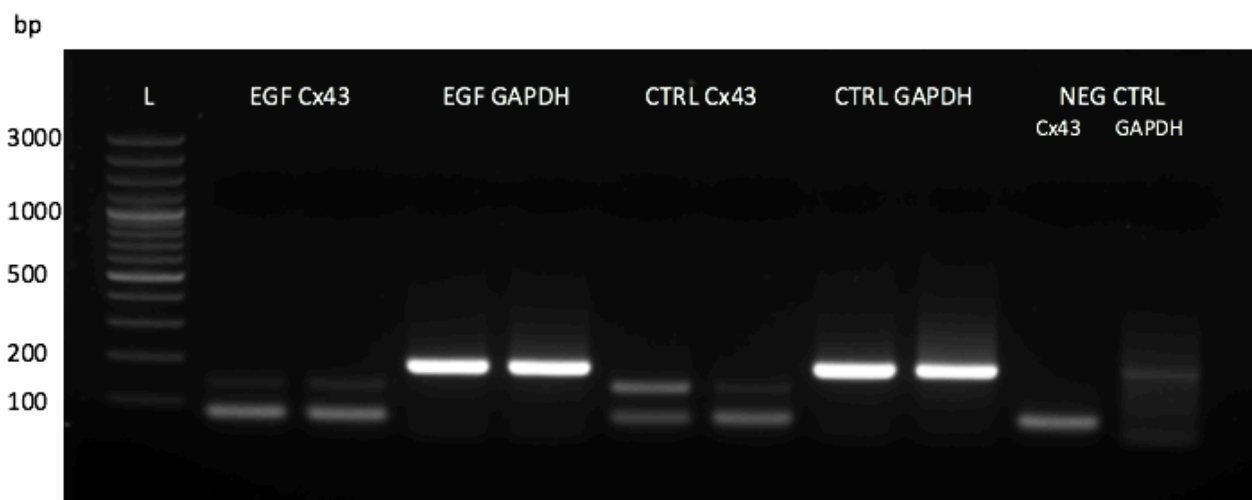
6. Resultater

I dette afsnit opstilles resultaterne af analyser anvendt til identificering af Cx43 i GBM cellelinjerne U87MG og C16.

6.1 Undersøgelse af Cx43 mRNA i GBM-celler in vitro

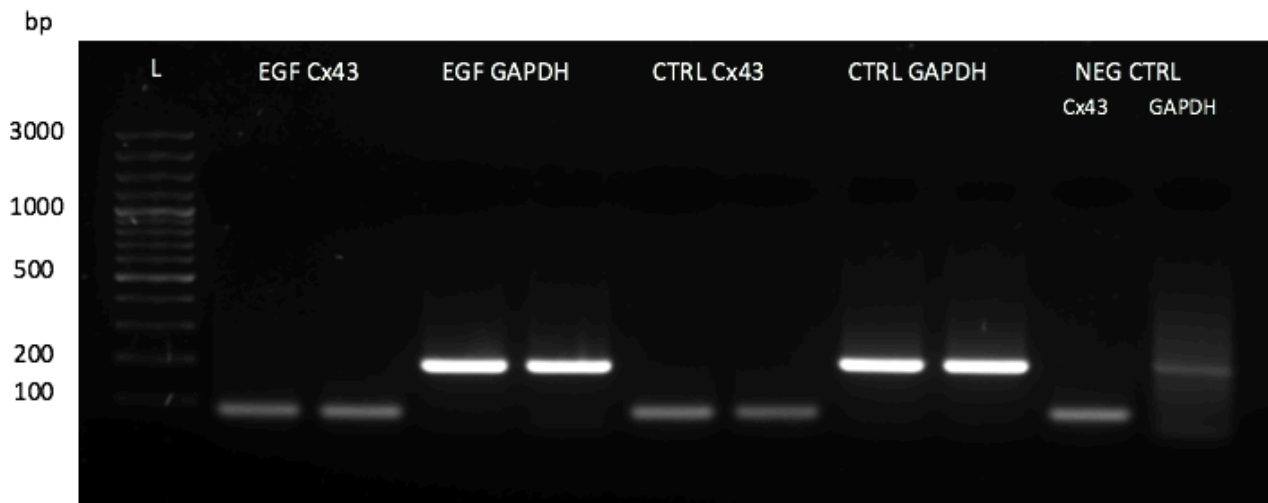
Tilstedeværelsen af Cx43 mRNA blev undersøgt ved RT-PCR på begge cellelinjer. RT-PCR blev for begge cellelinjer udført på cDNA konverteret fra udvundet mRNA. For at validere tilstedeværelsen af tilstrækkelig mRNA, blev mængden af mRNA bestemt med et nanophotometer (tabel 3). Det fremgår, at U87MG-cellelinjen udtrykte Cx43 i de EGF-stimulerede celler og i kontrollen, dog ser det ud til at den ene duplikat af kontrollen indeholder mere Cx43 mRNA end de andre duplikater for Cx43-udtrykkelse (billede 3). Det nederste bånd i kolonnerne med Cx43 er primerdimere. Der er en stærk og ens udtrykkelse af GAPDH-genet, den interne positive kontrol, og kun udtrykkelse af primerdimere i den negative kontrol, dog med smear for GAPDH-genet. For C16-cellelinjen ses ingen udtrykkelse af Cx43, stærk udtrykkelse af GAPDH-genet og ingen udtrykkelse i den negative kontrol (billede 4). Dog ses samme smear for GAPDH-genet i den negative kontrol ved C16 som ved U87MG.

U87MG:



Billede 3: Gel indeholdende RT-PCR produkt fra U87MG-cellelinjen. DNA ladder(L) indikerer at Cx43 RT-PCR-produkter for både EGF-stimulerede celler (EGF Cx43) og kontrol-celler (CTRL Cx43) ligger mellem 100 og 200 basepar(bp). GAPDH RT-PCR-produkterne for både EGF-stimulerede celler (EGF GAPDH) og kontrol-celler (CTRL GAPDH) ligger på 200 bp. Den negative kontrol (NEG CTRL) viser primerdimer-dannelse, dog med smear ved GAPDH.

C16:



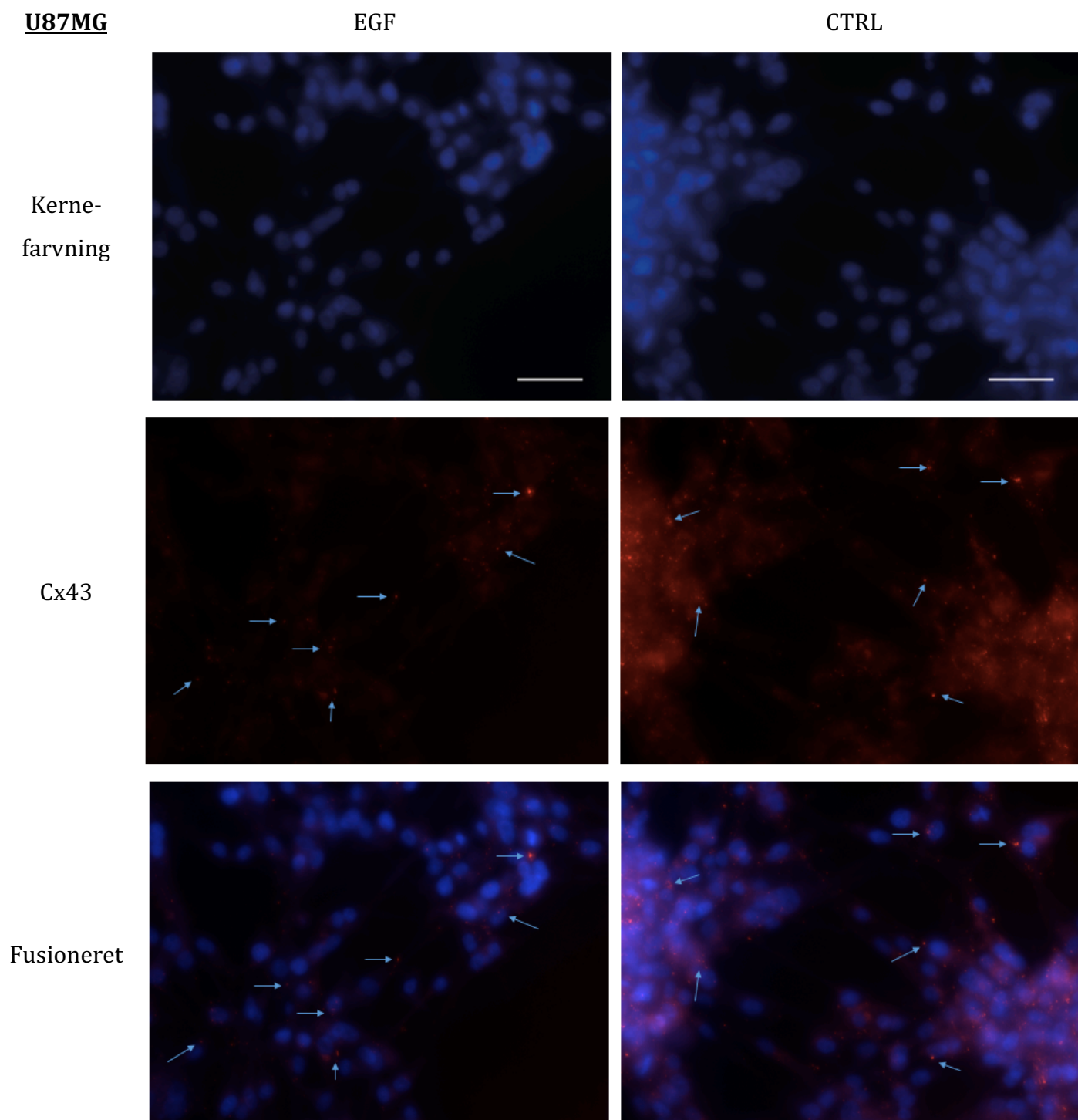
Billede 4: Gel indeholdende RT-PCR produkt fra C16-cellelinjen. DNA ladder(L) viser, at der ikke var Cx43 RT-PCR-produkter hverken ved EGF-stimulerede celler (EGF Cx43) eller kontrol-celler (CTRL Cx43). GAPDH RT-PCR-produkterne for både EGF-stimulerede celler (EGF GAPDH) og kontrol-celler (CTRL GAPDH) ligger på 200 basepar (bp). Den negative kontrol (NEG CTRL) viser primerdimer-dannelse, dog med smear ved GAPDH.

6.2 Ekspresion og lokalisering af Cx43-protein i GBM-celler in vitro

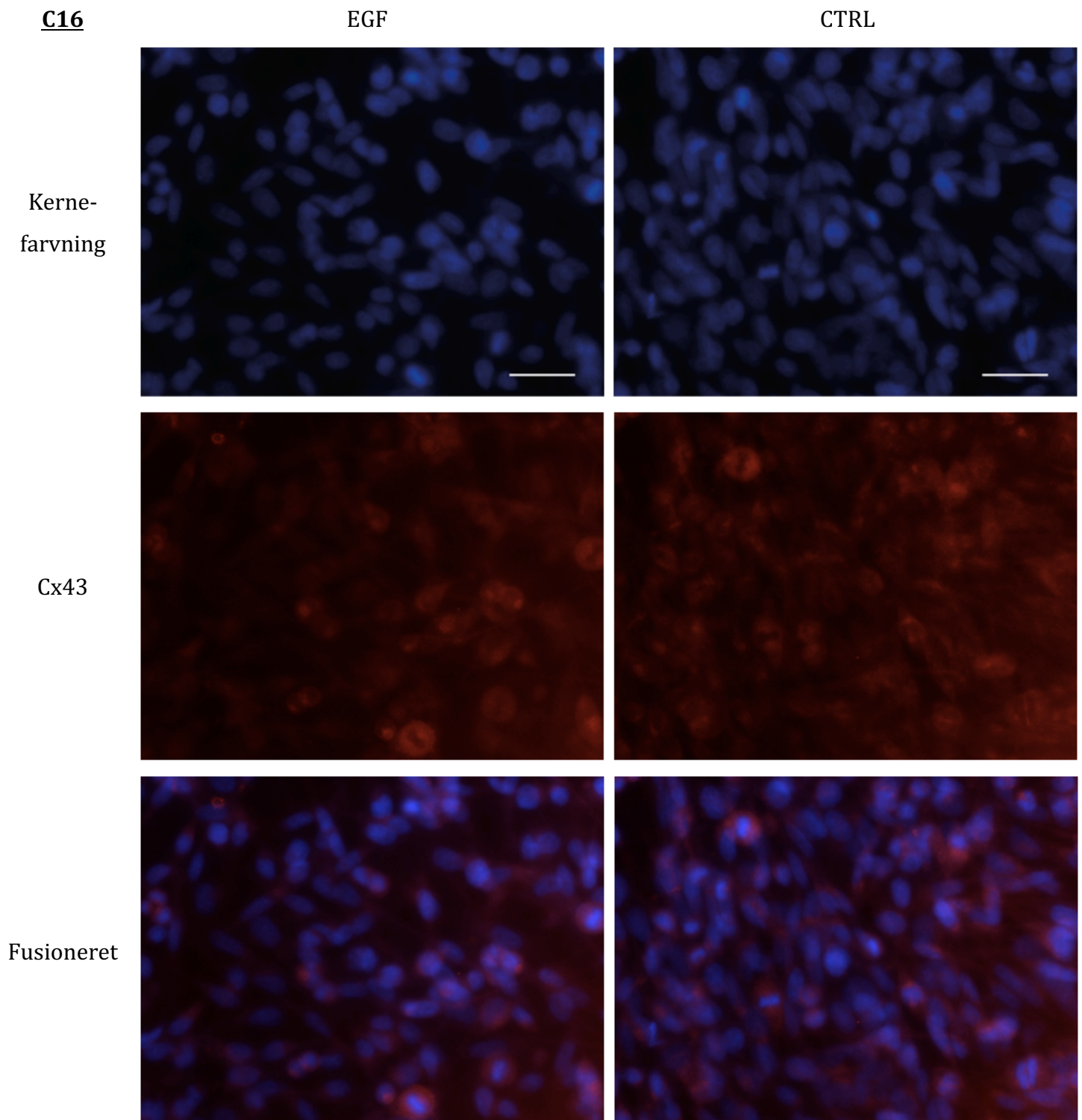
For at identificere Cx43-proteinet udtrykt i GBM-celler blev celler fra U87MG og C16 farvet med immunfluorescens.

U87MG-cellerne viste tydelig respons på immunfluorescensfarvningen af Cx43-proteinet, dog med en anelse mindre udtrykkelse af Cx43 i de EGF-stimulerede celler i forhold til kontrollen. Eksempler på udtrykkelsen af Cx43-proteinet er indikeret med blå pile i nedenstående billede (Billede 5). Det er ikke muligt at vurdere om Cx43-proteinernes lokalisering i cellerne er fortrinsvis cytoplasmisk eller membranrelateret, formentlig på grund af at cellerne koloniserede og lå i lag, i stedet for at danne et monolag.

Der ses også en vis uspecifik baggrundsfarvning ved Cx43 immunfluorescensfarvningen af U87MG-cellerne, hvilket også er den reaktion, der ses ved Cx43-immunfluorescensfarvningen af C16-cellerne (Billede 6). I C16-cellerne ses ikke specifik Cx43-respons.



Billede 5: Resultatet af immunfluorescens af U87MG-celler(EGF-stimulerede(EGF) og kontrol(CTRL)) opdelt i kernefarvning, Cx43 og fusion af kernefarvning og Cx43. Ved Cx43 er der med blå pile angivet eksempler på den tydelige udtrykkelse af Cx43-protein i U87MG-cellerne. I fusionen af kernefarvning og Cx43 er der med blå pile angivet de samme eksempler på Cx43-protein. Scalebar = 40 μ m.



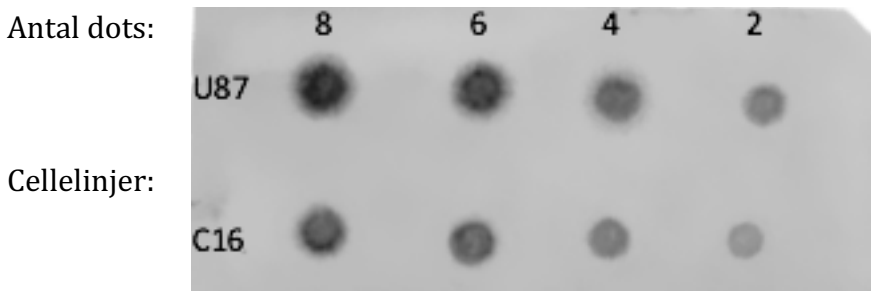
Billede 6: Resultatet af immunfluorescens af C16-celler(EGF-stimulerede(EGF) og kontrol(CTRL)) opdelt i kernefarvning, Cx43 og fusion af kernefarvning og Cx43. Her ses ikke specifik udtrykkelse af Cx43-protein. Scalebar = 40 μ m.

6.3 Semi-kvantitativ undersøgelse af Cx43-protein

Til at verificere identifikationen af Cx43 i U87MG- og C16-cellelinjerne, blev protein oprenset af cellelinjerne og et dot blot blev udført med antistoffer specifik for Cx43.

Ud fra dot blottet, billede 7, ses det, at protein-expressionen stiger for begge cellelinjer i takt med, at antallet af dots stiger. Cx43-proteinet ses desuden at være tilstede i større grad i U87MG-cellerne end i C16-cellerne.

Cx43-dot blot



Billede 7: Dot blot over Cx43-protein i U87MG- og C16-cellelinjerne udtrykt på nitrocellulosemembran fordelt på antal dots.

7. Diskussion

Dette afsnit er opdelt i to dele, en metodediskussion og en resultatdiskussion. I den første del diskuteres relevante punkter fra den anvendte metode og derefter, i del to, diskuteres projektets resultater og deres anvendelighed.

7.1 Metodediskussion

I dette afsnit diskuteres den anvendte metode ud fra relevante punkter.

7.1.1 Projektopstilling

De anvendte cellelinjer i dette projekt blev udvalgt fordi, det til videre forskningsbrug, var nødvendigt at få bekræftet tilstedeværelsen eller fraværet af Cx43 i U87MG- og C16-cellelinjerne. Forskning af Cx43 i GBM er stadig i sin meget tidlige stadie, hvorfor identificering af Cx43 i cellelinjerne blev udført på flere niveauer. Dette for at styrke evidensen af resultaterne og dermed være bedre i stand til at drage en korrekt konklusion på emnet om Cx43-udtrykkelse i GBM-cellelinjer. For at undersøge om DNA'et i de valgte cellelinjer indeholdte sekvenser for Cx43-proteinet, blev det valgt at udføre RT-PCR på cDNA, kopieret fra cellelinjernes mRNA. mRNA er et udtryk for det som cellen er kodet til at udtrykke, hvorfor RT-PCR vil give et udtryk for hvor meget mRNA for det pågældende gen er udtrykt i cellerne (Buckingham & Flaws 2007). For derefter at undersøge om mRNA'et også blev udtrykt i proteinet blev dette visualiseret med immunfluorescensfarvning af proteinet og gennem semikvantificering ved dot blot.

7.1.2. Undersøgelse af Cx43 mRNA

Ved oprensning af mRNA, syntesen af cDNA og til selve RT-PCR analysen blev der anvendt kits fra Bio-Rad, som er standardiserede og kontrollerede, hvilket højner validiteten og reproducerbarheden af resultatet (Bio-Rad 2016). Desuden er dobbeltbestemmelsen, anvendt ved RT-PCR, ligeledes med til at højne validiteten af resultatet, da det dermed sikres, at det fundne resultat ikke er tilfældigt (Kimberlin & Winterstein 2008).

Derudover blev der udført testkørsler af RT-PCR for at optimere proceduren i forhold til valg af intern positiv kontrol og input af cDNA. Disse testkørsler gjorde også at projektforfatteren blev

fortrolig med analysemetoden, hvilket er med til at højne reliabiliteten (Kimberlin & Winterstein 2008).

Som intern positiv kontrol for tilstedeværelsen af cDNA, og dermed mRNA, i RT-PCR-analyserne blev GAPDH-genet anvendt. Housekeeping-genet GAPDH er vurderet til at være det optimale valg som positiv kontrol ved blandt andet RT-PCR (Said et al. 2007), hvorfor identificering af GAPDH mRNA i cellerlinjerne anvendt i dette projekt vil give et positivt resultat. I den negative kontrol på nukleasefrit vand, som ikke indeholdte cDNA, var det forventet at resultatet af RT-PCR blive primer-dimer. Dog ses der smear af primerne i den negative kontrol med GAPDH-genet og ikke rene primer-dimer. Dette kan skyldes kontaminering eller at primerne binder til hinanden i brudstykker og dermed danner forskellige længder af primer-dimere, hvorved smear forekommer. Ved primerdannelse er der flere ting, der skal tages højde for, for at få et godt og specifikt resultat. De anvendte primere skal have tilnærmelsesvis samme smeltetemperatur for, i RT-PCR-analysen, at kunne indstille en ideel annealingtemperatur, hvor alle primere hybridiserer optimalt med target. Desuden skal der være opmærksomhed på risikoen for primer-dimer-dannelse, som kan opstå hvis forward- og reverse-primerne har interne homologe sekvenser. (Buckingham & Flaws 2007) Dette kan være tilfældet ved den smear, der ses ved GAPDH i den negative kontrol, hvor primerne tilnærmelsesvis komplementerer hinanden i brudstykker og derved skaber forskellige længder af primer-dimerer, som giver smear.

7.1.3 Expression af Cx43-protein

Der fremkommer en del baggrundsstøj ved detektion af Cx43-proteinet med immunfluorescens. Steps i fremgangsmåden, som kan være skyld i baggrundsstøjen, er fikseringsmetode, blokeringsmetoden og de anvendte antistoffer. I dette projekt blev cellerne fikseret med 4 % formaldehyd i 20 min og blokering for baggrundsstøj skete med PBS-buffer tilsat 5 % BSA. Zhang et al. 2010 og Cottin et al. 2011 fikserer begge med 4 % paraformaldehyd, hvor Zhang et al. 2009 blokerer med PBS-buffer tilsat 3 % BSA og Cottin et al. 2011 blokerer med PBS-buffer tilsat 10 % gedeserum (Zhang et al. 2010; Cottin et al. 2011). Som eksempel på andre fikserings- og blokeringsmetoder kan fremhæves Shinoura et al. 1996, der fikserer med 100% acetone i 2 min og tørret i 15 min, men beskriver ikke om der er udført blokering (Shinoura et al. 1996). Hao et al. 2012 fikserer ved -20 °C i methanol og blokerer med 1 % BSA, og Gagliano et al. 2009 fikserer med 4 % paraformaldehyd i PBS indeholdende 2 % sukrose i 5 min og postfikserer med ethanol ved -20 °C. Ingen af fremgangsmåderne resulterede i

baggrundsstøj. Det vil derfor være relevant at undersøge om andre fikserings- og blokeringsmetoder, end dem udført i dette projekts fremgangsmåde for immunfluorescensfarvning, kan fjerne baggrundsstøjen.

Ved dot blot-analysen reagerede de anvendte antistoffer med protein fra C16-cellerne, selvom RT-PCR-analysen viste, at der ingen Cx43-mRNA er i cellerne. Til dot blot blev anvendt samme primære antistof som til immunfluorescensfarvningen af Cx43, hvorfor det er muligt, at det er det primære antistof mod Cx43-proteinet, der binder uspecifikt og skaber baggrundsstøj i henholdsvis immunfluorescensfarvningen og dot blot-analysen, og dermed giver et falsk positivt resultat. Det vil være relevant at undersøge dette nærmere ved eventuelt at udføre analysen med et andet primært antistof.

Dot blot blev i dette projekt anvendt til semikvantitativ bestemmelse af Cx43-proteinet i de to anvendte cellelinjer. Western blot er den analysemetode som oftest anvendes ved kvantificering af proteiner. Til western blot anvendes samme antistof-teknik som til dot blot, dog separeres proteinerne i forhold til molekylvægt inden antistof-analysen ved western blot. Et studie af Guillemain et al. 2009 sammenligner western blottet med dot blottet i forhold til protein-detektion. De finder, at dot blottet er lige så pålidelig som western blottet, dog med den mulige begrænsning, at det primære antistof har begrænset adgang til proteinet, fordi dette kan være maskeret bag større proteiner. (Guillemain et al. 2009) I dette projekt blev dot blottet valgt, da formålet med analysen var at lave en hurtig semikvantitativ verificeringsanalyse for tilstedeværelsen af Cx43-protein i cellelinjerne.

7.2 Resultatdiskussion

Resultaterne af de udførte forsøg viser, at i U87MG-cellerne er Cx43 udtrykt ved mRNA og protein. Desuden er Cx43-proteinets udtrykkelse i U87MG-cellerne vist ved immunfluorescensfarvning. Cx43-proteinets lokalisation var ikke mulig at bestemme. Ved EGF-stimulering af U87MG-cellerne er resultatet, at det lader til, at Cx43-udtrykkelsen falder. I C16-cellelinjen er Cx43-mRNA og -protein ikke blevet fundet udtrykt. Hvordan disse resultater kan være grobund for Cx43 som biomarkør for den terapeutiske resistens, afhænger af definitionen på en biomarkør. Diskussionen af dette foretages efter diskussionen af projektets resultater.

7.2.1 Effekten af EGF på U87MG-cellelinjen

I det nærværende projekt synes det umiddelbart, at Cx43-udtrykkelsen er større i de ikke EGF-stimulerede U87MG-celler end i de EGF-stimulerede. EGF-stimuleringens effekt på Cx43-udtrykkelsen i U87MG GBM-celler er ikke fundet undersøgt i litteraturen, men i et studie af Ueki et al. 2001 finder de, at ved EGF-stimulering af astrocytter nedsættes udtrykkelsen af Cx43-mRNA og -protein(Ueki et al. 2001). Modsat finder Chen et al. 2012, at i C6-celler, rotte gliom, stiger Cx43-udtrykkelsen ved EGF-stimulering(Chen et al. 2012).

Et andet studie af McDonough et al. 1999, hvor de undersøger tre hjerneområder (tumorkerne, grå og hvid substans) i en hund med astrocytom for cellernes migrationsevne, finder de, at EGF-stimulering resulterede i øget migration samtidig med nedsat Cx43-udtrykkelse i de stimulerede celler (McDonough et al. 1999). Derudover finder Lund-Johansen et al. 1992 og Brockmann et al. 2003 også, at EGF kan stimulere GBM-celler til at migrere(Lund-Johansen et al. 1992). Denne mulige egenskab ved U87MG-cellerne skal dog verificeres gennem yderligere undersøgelser, da det kan være et tilfælde, at det kun var det ene bånd i U87MG-kontrollen, der viste øget Cx43-udtrykkelse.

7.2.2 Udtrykkelsen af Cx43 i U87MG- og C16-cellelinjerne

C16 er en cellelinje, som er udledt på Aalborg Universitet og ikke kommercielt tilgængelig, hvorfor det ikke er muligt at finde andre undersøgelser/resultater at sammenligne med. Som det belyses i metodediskussionen, menes det at det Cx43-udtryk, der ses i C16-cellelinjen ved immunfluorescensfarvning og dot blot, kan være baggrundsstøj. Er dette ikke tilfældet vil det være relevant at undersøge C16-cellelinjen nærmere i forhold til udtrykkelse af Cx43.

Eventuelt med yderligere analyser, som fx et western blot.

U87MG-cellelinjen bliver ofte anvendt i forskningen af GBM, hvorfor udtrykket af Cx43 i U87MG-celler er undersøgt i tidligere studier, men graden af ekspressionen er der ikke enighed om. Både Murphy et al. 2016 og Shinoura et al. 1996 finder, at U87MG-celler udtrykker et højt niveau af Cx43(Murphy et al. 2016; Shinoura et al. 1996). Til gengæld finder Gagliano et al. 2009 og Uhl et al. 2005 en næsten ikke detekterbar udtrykkelse af Cx43 i U87MG-celler(Gagliano et al. 2009; Uhl et al. 2005).

Som tidligere beskrevet er GBM-tumorer heterogene, hvilket også afspejler sig i deres udtrykkelse af Cx43. Studiet af Shinoura et al. 1996 finder ved undersøgelse af forskellige grader af astrocytomer, at særligt i højgrads-astrocytomer er udtrykkelsen af Cx43 meget varieret(Shinoura et al. 1996). Murphy et al. 2016 undersøger Cx43-niveauet i humane GBM-

tumorer og finder, at Cx43-niveauet er 6-14 gange højere end i normalt hjernevæv (Murphy et al. 2016). I en undersøgelse af Ye et al. 2015 finder de lignende resultater ved undersøgelse af 4x20 GBM-tumorer fra hver tumorgrad I-IV. Resultatet er, at Cx43-udtrykkelsen er omvendt korreleret med GBM-tumorgrad. (Ye et al. 2015) Derimod finder et studie af Huang et al. 1999 blandt andet, ved undersøgelse af 6 GBM-tumorer, at Cx43-udtrykkelsen i disse næsten ikke er målbar (Huang et al. 1999). Cottin et al. 2011, finder ved undersøgelse af 74 humane GBM-tumorer, at Cx43-proteinet er tilstede i 77 % af tumorerne. De underbygger GBM-tumorerers heterogene udtryk ved, at Cx43-udtrykkelsen i deres undersøgelse enten var uændret, nedsat eller ikke tilstede. (Cottin et al. 2011)

Det heterogene udtryk af Cx43 i GBM kan skyldes tumorers generelt cellulære heterogene sammensætning. Der er vist sammenhæng mellem øget celleproliferation og lav Cx43-udtrykkelse (Huang, 1999), og øget migrationsevne er korreleret med øget Cx43-udtrykkelse. Dette åbner op for en hypotese om, at Cx43-udtrykkelsen i GBM kan være relateret til tumorcellens overordnede funktion i tumor.

7.2.3 Cx43-proteinets funktioner i forhold til øget terapeutisk resistens ved GBM

7.2.3.1 Funktion: Intercellulær kommunikation

Ved identificering af Cx43-proteinets lokalitet i cellerlinjerne med immunfluorescens var formålet at finde ud af om Cx43-proteinet kunne lokaliseres til membranen eller cytoplasmaet i cellerne, hvilket dog ikke var muligt. I et studie af Cottin et al. 2011 finder de i 4 ud af 8 GBM-cellekulturer, at Cx43 hovedsagelig er lokaliseret i cellernes cytoplasma. I de resterende 4 GBM-cellekulturer udviste tre af dem membranrelateret Cx43-udtrykkelse og den sidste udviste næsten ingen Cx43-udtrykkelse. Cytoplasmisk lokalisering af Cx43-proteinet reducerede, i studiet, GJ-intercellulær kommunikation med 50-75 % sammenlignet med GBM-cellekulturer med membranrelateret Cx43-udtrykkelse. (Cottin et al. 2011)

Cx43-medieret GJ-intercellulær kommunikation er blandt andet undersøgt i studiet af Osswald et al. 2015, hvor denne funktion har stor betydning for beskyttelse af tumorceller mod apoptose ved stråleterapi, da den øgede koncentration af Ca^{2+} , induceret af stråleterapien, fordeles mellem cellerne via GJ og dermed mister sin effekt (Osswald et al. 2015).

Desuden viser Chen et al. 2015, at astrocytter ved hjælp af Cx43-GJ intercellulær kommunikation reducerede apoptose af gliomaceller i en in vitro co-kultur af astrocytter og

gliomaceller behandlet med TMZ og vincristin. Ved undersøgelse af humane GBM-tumorer finder de også, at aktive astrocytter infiltrerer rundt om tumor, hvilket bekræfter in vitro forsøget. (Chen et al. 2015)

Ved en membranrelateret position af Cx43-proteinet vil tumorcellerne have øget resistens over for stråle- og kemoterapi, hvorfor information om Cx43-proteinets lokalisation i GBM-cellerne er en vigtig viden i forhold til vurdering af den terapeutiske resistens.

7.2.3.2 Funktion: migration/invasion

Osswald et al. 2015 viser, at ved GBM-tumorprogression stiger antallet af lange membran-rør, som blandt andet bliver brugt til at flytte cellekerner ved fx mitose. Langs disse membran-rør viser artiklen desuden, at GJ kan dannes. (Osswald et al. 2015) I et studie af Hong et al. 2015 vises, at en høj GJ-dannelse mellem U87MG-celler og astrocytter øger gliomacelleinvasionen (Hong et al. 2015). Dette tilsammen muliggør øget tumorcelleinvasion gennem membran-rør med GJ til astrocytter i hjerneparenkymet. Da Cx43 er et udtryk for GJ, kan en øget Cx43-udtrykkelsen i GBM være en indikator for øget GJ-dannelse og dermed øget migration. Ved en nedsat Cx43-udtrykkelse viser Bates et al. 2007 desuden, at gliomcellers mobilitet bliver nedsat og at C-terminalen på Cx43-proteinet kan have en vigtig rolle i glioma-mobiliteten (Bates et al. 2007). Sin et al. 2015 viser i deres studie, at glioma-invasion ikke er GJ-afhængig, men at det derimod er en funktionel C-terminal på Cx43, der er involveret i migration ud i hjerneparenkymet (Sin et al. 2015). Et andet studie af Crespín et al. 2010 har fundet, at C-terminalen alene kan fremme motilitet, men også, at Cx43 kan øge migration uden C-terminalen (Crespín et al. 2010). Funktionen af cellemigration i GBM kan være en kombination af dannelsen af GJ mellem membran-rør og astrocytter og en fuld funktionel C-terminal på Cx43-proteinet. Tilsammen kan en øget Cx43-udtrykkelse være relateret til en øget grad af tumorinvasion i hjerneparenkymet. Tumorinvasion af hjerneparenkymet øger patientens risiko for recidiv, da de migrerende celler ikke kan fjernes ved operation. Yderligere behandles migrerende tumorceller i hjerneparenkymet ikke ved den efterfølgende stråleterapi, da denne er lokaliseret til selve tumoren, for at bestråle så lidt normalt hjernevæv som muligt. (Dansk Neuro Onkologisk Gruppe 2014b)

Cx43-udtrykkelse i forhold til GJ-intercellulær kommunikation og migration kan betyde, at de GBM-tumorer, der har en høj udtrykkelse af Cx43, er mere infiltrerende og modstandsdygtige over for stråleterapi end GBM-tumorer med lav Cx43-udtrykkelse. Hermed er der mulighed for,

at en høj Cx43-udtrykkelse kan bruges som en biomarkør for øget terapeutisk resistens i GBM-tumorer. Ved øget terapeutisk resistens vil tumor være mindre modtagelig over for den behandling, der gives til GBM-patienter i dag. Dette kan være en relevant information for onkologen i forbindelse med formidling af sygdommens aggressivitet og planlægning af patientens behandlingsforløb.

I forhold til en mulig ændring af behandlingen hos den enkelte patient ved øget terapeutiske resistens, ses dette ikke som en mulighed ud fra den viden der er på nuværende tidspunkt om den behandling der gives. Primært behandles GBM-patienter med stråleterapi og ændring i dosis af stråleterapi er blevet undersøgt i et fase 3 og er ikke blevet fundet til at forbedre udfaldet hos GBM-patienter. Dog beskrives det, at der ved forventet kort restlevetid kan gives hypofraktioneret strålebehandling som et alternativ. Særligt de ældre patienter (>60 år) kan have gavn af en behandling, hvor toxiciteten er opvejet mod outcome og livskvalitet. (Dansk Neuro Onkologisk Gruppe 2014b) Her kan en biomarkør som Cx43 komme ind i billedet. Da øget Cx43-udtrykkelse har indikationer for at være relateret til øget terapeutiske resistens, kan denne information være til gavn for onkologen i planlægningen af behandlingen af ældre patienter.

7.2.4 Cx43 som biomarkør i fremtiden

For at kunne vurdere Cx43 som potential biomarkør er det nødvendigt at definere, hvad en biomarkør er. Der findes ikke en universel definition på, hvad en biomarkør er. Som tidligere beskrevet har WHO og Strimbu og Tavel 2010 frembragt definitioner på hvad en biomarkør er (WHO 1993; Strimbu & Tavel 2010). For at skabe klarhed om emnet blev der nedsat en Biomarkers Definition Working Group (BDWG), bestående af 8 læger og 4 Ph.D'er fra National Institutes of Health, US Food and Drug Administration (FDA) og universiteter i USA. I 2001 fremlagde de en definition på en biomarkør og et klinisk endpoint. (Biomarkers Definitions Working Group 2001) Disse kan ses i tabel 10.

Biomarkør	Klinisk endpoint
En karakteristika, der er objektivt målt og evalueret som en indikator for en normal biologisk proces, patogenisk proces eller farmakologisk respons til en terapeutisk intervention.	En karakteristika eller variabel, der reflekterer hvordan en patient føler eller fungerer, eller hvor lang tid en patient overlever.

Tabel 10: Biomarkers Definition Working Group definitioner på hhv. en biomarkør og et klinisk endpoint. (Biomarkers Definitions Working Group 2001)

Udfra denne definition vil Cx43-proteinet være en biomarkør på baggrund af, at Cx43-proteinet er en indikator for en normal biologisk eller patologisk proces. I dette tilfælde vil et øget Cx43-niveau og membranlokalisering i tumorcellen være en indikator for øget terapeutisk resistens ved GBM, en patologisk proces. Det kliniske endpoint vil i dette tilfælde være kortere overlevelse på grund af øget terapeutisk resistens ved øget Cx43-udtrykkelse. Denne sammenhæng er stadig hypotetisk og skal valideres inden der kan drages nogle endelige konklusioner.

Ved anvendelse af Cx43 som biomarkør i forskningsregi er hensigten at undersøge Cx43-proteinets egenskaber og funktioner i biologiske processer. Dette adskiller sig fra anvendelsen i det kliniske regi, hvor formålet er at relatere biomarkørens udtryk til en sygdoms sværhedsgrad, en forudsigelse af sygdomsforekomst eller en reaktion på en intervention (Mayeux 2004). Fælles for forsknings- og klinisk anvendelsesregi må være, at der kan udføres interventioner på baggrund af biomarkørens resultat.

Ved en fremtidig implementering af Cx43 som biomarkør for den terapeutiske resistens, vil det være nærliggende at foretage denne undersøgelse i forbindelse med diagnosticering og klassificering af den resekerede tumor på patologisk afdeling. Undersøgelsen for Cx43 i tumorvævet vil kunne udføres med immunhistokemisk farvning. Denne metode anvendes på nuværende tidspunkt ved forskningsmæssig identificering af proteinet (Osswald et al. 2015). Desuden anvendes immunhistokemisk farvning i bred udstrækning i rutinearbejdet på patologiske afdelinger, hvorfor en implementering af Cx43 vil være let tilgængelig og ikke være forbundet med store økonomiske udgifter idet alt udstyr og procedure er tilgængelig og personalet er oplært i dens anvendelse.

Før en biomarkør kan bruges klinisk, er det nødvendigt at validere denne. Vigtigt for validiteten er ifølge Mayeux 2004, at have et klart og grundigt evidensgrundlag for hvad biomarkøren relaterer til (Mayeux 2004). Colburn 2000 beskriver, at valideringen af en biomarkør handler om, at hensigten med biomarkøren skal klarlægges for så at udvikle standard operating procedures (SOP) for proceduren, hvor Good Laboratory Practice (GLP)-kriterier skal være opfyldt. Dette skal sikre fastsættelsen af grænser for detektion og kvantifikation, foruden kørslen af kontrolprøver. Med denne valideringsproces evalueres, ifølge Colburn 2000, stabilitet, linearitet, præcision, akkuratess, specificitet og reproducerbarhed. (Colburn 2000)

Udfordringen i forhold til at anvende Cx43-proteinet som biomarkør for den terapeutiske resistens er, at der endnu ikke er bevist en definitiv sammenhæng mellem Cx43 og den terapeutiske resistens, hvormed evidensgrundlaget endnu ikke findes. Trods indikationer, fremført i dette projekt, for at der er en mulig sammenhæng, er der fortsat mange ubekendte faktorer som spiller ind og GBM-tumors heterogene cellulære udtryk er et særlig fokuspunkt der skal tages højde for i beskrivelsen af en mulig sammenhæng. Heterogeniteten kan være med til at styrke Cx43 som biomarkør for den terapeutiske resistens, ved at forskelle i Cx43-udtryk og deres sammenhæng med sygdommen kan højne Cx43-proteinets relevans som biomarkør, da der gennem Cx43-udtrykket er mulighed for inddele patienterne i grupper. En stor forskel på grupperne vil øge anvendeligheden af biomarkøren (Mayeux 2004). Viser fremtidig forskning, at der er et evidensgrundlag stærk nok til at bevise en sammenhæng mellem Cx43 og den terapeutiske resistens ved GBM, er Cx43 som biomarkør kommet et langt stykke af vejen.

Dernæst er reliabilitet og reproducerbarhed altafgørende ved analysering af en biomarkør (Mayeux 2004). Ved en eventuel fremtidig implementering af Cx43 som biomarkør, skal der derfor være klare, validerede procedurer for fremgangsmåden af analysering af biomarkøren, som skal anvendes punktligt ved hver analyse. Desuden skal personalet være grundigt oplært i anvendelse af sådanne analyser for at mindske fejl (Hollensead et al. 2004). Ligeledes skal personalet som vurderer analysesvaret være oplært i dette og kende biomarkørens egenskaber og referenceramme, for at kunne lave en valid vurdering og undgå fejlfortolkning og bias (Mayeux 2004). I den forbindelse skal der være fokus på risici for falsk positive og falsk negative svar. For Cx43 som biomarkør, implementeret på en patologisk

afdeling og analyseret ved immunhistokemisk farvning, vil der kunne opstå fejl som falsk negative og falsk positive svar, som patologerne og onkologen skal være opmærksomme på:

Falsk negativt svar:

- Da det er de migrerende GBM-celler, der har et højt udtryk af Cx43, er det muligt, at det er i tumorkanten og i hjerneparenkymet, der vil være størst mulighed for at detektere Cx43-proteinet. Ved klassificering og Cx43-undersøgelse af GBM-tumor er det derfor vigtigt at undersøge både tumorkernen og tumorkanten, på den resekerede tumor, for at få et så præcist analysesvar på Cx43-udtrykkelsen som muligt. Hvis den diagnosticerende patolog ikke er opmærksom på dette, er der risiko for et falsk negativt analysesvar og dermed fejlvurdering af den terapeutiske resistens.

Falsk positivt svar:

- Da Cx43 også er udtrykt i astrocytter og endotelceller(Larson et al. 1990) kan dette give risiko for falsk positivt svar. Dette kan der visuelt sikres imod ved anvendelse af immunhistokemisk farvning.
- Desuden skal der være opmærksomhed på GJ-dannelsen mellem gliomceller, da denne kobling hæmmer invasion(Hong et al. 2015) og er dermed ikke relateret til øget terapeutisk resistens. Dette kan muligvis undersøges ved immunhistokemisk farvning.

8. Konklusion

Formålet med dette projekt var at teste første skridt i en ny biomarkør-drevet-teknologi gennem afdækningen af tilstedeværelsen af Cx43 i cellelinjerne C16 og U87MG. På baggrund af den teoretiske forudsætningen at Cx43 er en pålidelig biomarkør for den terapeutiske resistens, blev dennes anvendelighed belyst.

Projektets problemformulering:

Er Cx43 udtryk i cellelinjerne C16 og U87MG og hvordan kan Cx43-ekspressionen anvendes som biomarkør for den terapeutiske resistens ved behandlingen af glioblastom i fremtiden?

Trods uenighed om Cx43-udtrykkelsen i GBM og U87MG-cellelinjen kan det i dette projekt konkluderes, at U87MG-cellelinjen udtrykker Cx43. Desuden kan det konkluderes, at Cx43 ikke er udtrykt i C16-cellelinjen. EGF-stimulering viste at denne muligvis kan nedsætte Cx43-udtrykkelsen i U87MG-celler.

Det kom frem at membranlokalisering af Cx43 er relateret til øget terapeutisk resistens af stråle- og kemoterapi på grund af GJ-medieret intercellulær kommunikation. Desuden kan øget Cx43-udtrykkelse være relateret til øget tumorinvasion af hjerneparenkymet.

På nuværende tidspunkt kan information om øget terapeutisk resistens være relevant for ældre GBM-patienter i forhold til planlægning deres behandlingsforløb.

Ved en mulig fremtidig anvendelse af Cx43 som biomarkør for den terapeutiske resistens i GBM, skal denne grundigt valideres, først og fremmest i forhold til evidensgrundlag. Ved validitet af Cx43 som biomarkør i denne kontekst kan denne implementeres på patologiske afdelinger og analyseres med immunhistokemisk farvning, hvor fokus på falsk positive og falsk negative analysesvar er vigtigt.

Hermed konkluderes det, at en øget Cx43-udtrykkelse i fremtiden har mulighed for at blive anvendt som biomarkør for den terapeutiske resistens i GBM-tumorer

9. Perspektivering

På baggrund af dette projekts resultater vil det næste skridt i udviklingen være en nærmere undersøgelse af Cx43 i U87MG-cellelinjen i forhold til migration, lokalisation i cellen og GJ-medieret intercellulær kommunikation.

I forhold til C16-cellelinjen skal dennes Cx43-udtryk valideres, hvorefter cellelinjen kan anvendes til sammenligning ved Cx43-undersøgelser med U87MG. Dette vil være relevant i forhold til bestemmelse af Cx43's egenskaber ved migration, lokalisation i cellen og GJ-medieret intercellulær kommunikation. Udtrykker C16-cellerne ikke Cx43, men har nogle af de samme egenskaber som U87MG, der udtrykker Cx43, kan der sås tvivl om Cx43's forbindelse til den terapeutiske resistens ved GBM. Modsat kan forbindelsen også bekræftes, hvilket vil være grobund for yderligere undersøgelser med andre GBM-cellelinjer og senere sammenlignes med undersøgelser på friske GBM-tumorer.

Det vil efterfølgende være interessant at udføre en retrospektiv undersøgelse på en patologisk afdeling, hvor der udføres undersøgelser af Cx43-udtrykkelsen i tumorvæv fra GBM-patienter med kort overlevelse, for at se om der kan være en sammenhæng mellem Cx43-udtrykkelsen, den terapeutiske resistens og patienternes korte levetid med GBM.

Det ultimative mål for anvendelsen af Cx43 som biomarkør for den terapeutiske resistens ved GBM er, at den kan forudsige om behandlingen vil have en effekt på den pågældende patients GBM-tumor. Dette vil, som tidligere beskrevet i diskussionen, kræve grundig validering og blandt andet klarlæggelse af biomarkørens specificitet og sensitivitet. Kulasingam og Diamandis 2008 beskriver, at sensitivitet er andelen af patienter med bekræftet diagnose, som testes positiv for biomarkøren og specificiteten er den andel af raske mennesker(kontrol) der testes negative for biomarkøren(Kulasingam & Diamandis 2008). Det store problem her vil være at bestemme specificiteten, da adgang til analyse materialet(hjernevæv) til forskningsbrug er yderst begrænset for raske mennesker. Derudover er der risiko for bias i forbindelse med bestemmelse af sensitiviteten, da Cx43 er udtrykt i rask hjernevæv gennem blandt andet astrocytter, hvorfor en biomarkør for Cx43 nemt kan tillægges et falsk positivt resultat. Der til er der problematikken om GBM-tumorerers heterogene udtryk, hvilket skal valideres og sættes i relation til Cx43-udtrykkelse og terapeutiske resistens.

10. Referenceliste

- abcam, 2016a. Anti-Connexin 43/ GJA1 antibody ab11370. Available at: <http://www.abcam.com/connexin-43--gja1-antibody-ab11370.html>.
- abcam, 2016b. Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor(R) 555) (ab150074). Available at: <http://www.abcam.com/donkey-rabbit-igg-hl-alexa-fluor-555-ab150074.html>.
- Athanassiou, H., Synodinou, M., Maragoudakis, E., Paraskevaidis, M., Verigos, C., Misailidou, D., Antonadou, D., Saris, G., Beroukas, K. & Karageorgis, P., 2005. Randomized phase II study of temozolomide and radiotherapy compared with radiotherapy alone in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Oncology*, 23(10), s.2372–2377.
- Bates, D.C., Sin, W.C., Aftab, Q. & Naus, C.C., 2007. Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. *Glia*, 55(15), s.1554–64.
- Beier, D., Schulz, J.B. & Beier, C.P., 2011. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. *Molecular Cancer*, 10(1), s.128.
- Bio-Rad, 2016. Certificate of Analysis. Available at: <http://www.bio-rad.com/en-dk/life-science-research/support/certificate-of-analysis>.
- Biomarkers Definitions Working Group, 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3), s.89–95.
- Bleau, A., Huse, J.T. & Holland, E.C., 2009. The ABCG2 resistance network of glioblastoma. *Cell Cycle*, 8(September), s.2937–2945.
- Buckingham, L. & Flaws, M.L., 2007. *Molecular Diagnostica; Fundamentals, Methods, & Clinical Applications* L. Buckingham & M. L. Flaws, red., Philadelphia: F. A. Davis Company.
- Caltabiano, R., Torrisi, A., Condorelli, D., Albanese, V. & Lanzafame, S., 2010. High levels of connexin 43 mRNA in high grade astrocytomas. Study of 32 cases with in situ hybridization. *Acta histochemica*, 112, s.529–35.
- Cancerregisteret, 2014. Nye kræfttilfælde i Danmark - 2014. , s.1–51.
- Chen, V.C., Kristensen, A.R., Foster, L.J. & Naus, C.C., 2012. Association of Connexin43 with E3 Ubiquitin Ligase TRIM21 Reveals a Mechanism for Gap Junction Phosphodegron Control. *Journal of Proteome Research*, 11, s.6134–6146.
- Chen, W., Wang, D., Du, X., He, Y., Chen, S., Shao, Q., Ma, C., Huang, B., Chen, A., Zhao, P., Qu, X. & Li, X., 2015. Glioma cells escaped from cytotoxicity of temozolomide and vincristine by communicating with human astrocytes. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 32(43), s.1–13.
- Cheng, J.-C., Chang, H.-M., Fang, L., Sun, Y.-P. & Leung, P.C.K., 2015. TGF- b 1 Up-Regulates Connexin43 Expression : A Potential Mechanism for Human Trophoblast Cell Differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, (January), s.1558–1566.
- Colburn, W. a, 2000. Optimizing the use of biomarkers, surrogate endpoints, and clinical endpoints for more efficient drug development. *Journal of clinical pharmacology*, 40, s.1419–1427.
- Costa, B.M., Caeiro, C., Guimarães, I., Martinho, O., Jaraquemada, T., Augusto, I., Castro, L., Osório, L., Linhares, P., Honavar, M., Resende, M., Braga, F., Silva, A., Pardal, F., Amorim, J., Nabiço, R., Almeida, R., Alegria, C., Pires, M., Pinheiro, C., Carvalho, E., Lopes, J.M., Costa, P., Damasceno, M. & Reis, R.M., 2010. Prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide-based chemoradiation : A Portuguese multicentre study. *Oncology reports*, 23, s.1655–1662.
- Cottin, S., Gould, P. V, Cantin, L. & Caruso, M., 2011. Gap junctions in human glioblastomas: implications for suicide gene therapy. *Cancer gene therapy*, 18(9), s.674–81.
- Crespin, S., Bechberger, J., Mesnil, M., Naus, C.C. & Sin, W., 2010. The Carboxy-Terminal Tail of Connexin43 Gap Junction Protein Is Sufficient to Mediate Cytoskeleton Changes in Human Glioma Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110, s.589–597.

- Crocetti, E., Trama, A., Stiller, C., Caldarella, A., Soffietti, R., Jaal, J., Weber, D.C., Ricardi, U., Slowinski, J. & Brandes, A., 2012. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *European Journal of Cancer*, 48(10), s.1532–1542.
- Dansk Neuro Onkologisk Gruppe, 2014a. *Dansk Neuro Onkologisk Register - Årsrapport 2014*, Dansk Neuro Onkologisk Gruppe, 2014b. *Retningslinjer for behandling af interkranielle gliomer hos voksne*,
- Fu, C.T., Bechberger, J.F., Ozog, M.A., Perbal, B. & Naus, C.C., 2004. CCN3 (NOV) Interacts with Connexin43 in C6 Glioma Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), s.36943–36950.
- Gagliano, N., Costa, F., Cossetti, C., Pettinari, L., Bassi, R., Chiriva-Internati, M., Cobos, E., Gioia, M. & Pluchino, S., 2009. Glioma-astrocyte interaction modifies the astrocyte phenotype in a co-culture experimental model. *Oncology Reports*, 22(06), s.1349–1356.
- Goldberg, G.S., Lampe, P.D. & Nicholson, B.J., 1999. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nature Cell Biology*, 1(November), s.457–459.
- Goldberg, G.S., Moreno, A.P. & Lampe, P.D., 2002. Gap Junctions between Cells Expressing Connexin 43 or 32 Show Inverse Permselectivity to Adenosine and ATP *. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(39), s.36725–36730.
- Gorlia, T., Stupp, R., Brandes, A.A., Rampling, R.R., Fumoleau, P., Dittrich, C., Campone, M.M., Twelves, C.C., Raymond, E., Hegi, M.E., Lacombe, D. & Van Den Bent, M.J., 2012. New prognostic factors and calculators for outcome prediction in patients with recurrent glioblastoma : A pooled analysis of EORTC Brain Tumour Group phase I and II clinical trials. *European Journal of Cancer*, 48, s.1176–1184.
- Guillemin, N., Meunier, B., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J.-F., Leveziel, H. & Picard, B., 2009. Validation of a dot-blot quantitative technique for large scale analysis of beef tenderness biomarkers. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60(3), s.91–97.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. a, 2000. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. *Cell*, 100, s.57–70.
- Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M., Tribolet, N. De, Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E.C., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, G., Janzer, R.C. & Stupp, R., 2005. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10), s.997–1003.
- Herrero-gonzález, S., Valle-casuso, J.C., Sánchez-alvarez, R., Giaume, C., Medina, J.M. & Taberner, A., 2009. Connexin43 Is Involved in the Effect of Endothelin-1 on Astrocyte Proliferation and Glucose Uptake. *Glia*, 57, s.222–233.
- Hollensead, S.C., Lockwood, W.B. & Elin, R.J., 2004. Errors in pathology and laboratory medicine: Consequences and prevention. *Journal of Surgical Oncology*, 88, s.161–181.
- Hong, X., Sin, W.C., Harris, A.L. & Naus, C.C., 2015. Gap junctions modulate glioma invasion by direct transfer of microRNA. *Oncotarget*, 6(17), s.15566–15577.
- Huang, R.P., Hossain, M.Z., Sehgal, A. & Boynton, A.L., 1999. Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells. *Journal of surgical oncology*, 70(1), s.21–4.
- InterPro, 2016. Gap Junction alpha-1 protein (Cx43). Available at: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR002261>.
- Kiebert, G.M., Curran, D., Aaronson, N.K., Bolla, M., Menten, J., Rutten, E.H., Nordman, E., Silvestre, M.E., Pierart, M. & Karim, A.B., 1998. Quality of life after radiation therapy of cerebral low-grade gliomas of the adult: results of a randomised phase III trial on dose response (EORTC trial 22844). EORTC Radiotherapy Co-operative Group. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 34(12), s.1902–9.
- Kimberlin, C.L. & Winterstein, A.G., 2008. Validity and reliability of measurement instruments used in research. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 65, s.2276–2284.

- Kulasingam, V. & Diamandis, E. p, 2008. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature Clinical Practice Oncology*, 5, s.588–599.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. & Aster, J., 2010. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* 8th udg., Saunders, Elsevier Inc.
- Larson, D.M., Haudenschild, C.C. & Beyer, E.C., 1990. Gap junction messenger RNA expression by vascular wall cells. *Circulation research*, 66(4), s.1074–1080.
- LI-COR, 2016. IRDye 800CW Secondary Antibodies. Available at: https://www.licor.com/bio/products/reagents/secondary_antibodies/irdye_800cw.html.
- Lin, J.H.C., Takano, T., Cotrina, M.L., Arcuino, G., Kang, J., Liu, S., Gao, Q., Jiang, L., Li, F., Lichtenberg-Frate, H., Haubrich, S., Willecke, K., Goldman, S.A. & Nedergaard, M., 2002. Connexin 43 Enhances the Adhesivity and Mediates the Invasion of Malignant Glioma Cells. *Journal of Neuroscience*, 22(11), s.4302–4311.
- Lund-Johansen, M., Forsberg, K., Bjerkvig, R. & Laerum, O.D., 1992. Effects of growth factors on a human glioma cell line during invasion into rat brain aggregates in culture *. *Acta Neuropathologica*, 84, s.190–197.
- Mayeux, R., 2004. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1, s.182–188.
- Mcdonough, W.S., Johansson, A., Joffee, H., Giese, A. & Berens, M.E., 1999. GAP JUNCTION INTERCELLULAR COMMUNICATION IN GLIOMAS IS INVERSELY RELATED TO CELL MOTILITY. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 17, s.601–611.
- Mcferrin, M.B., Turner, K.L., Cuddapah, V.A. & Sontheimer, H., 2012. Differential role of IK and BK potassium channels as mediators of intrinsic and extrinsic apoptotic cell death. *American Journal Physiol Cell Physiol*, 303, s.1070–1078.
- Murphy, S.F., Varghese, R.T., Lamouille, S., Guo, S., Pridham, K.J., Kanabur, P., Osimani, A.M., Sharma, S., Jourdan, J., Rodgers, C.M., Simonds, G.R., Gourdie, R.G. & Sheng, Z., 2016. Connexin 43 Inhibition Sensitizes Chemoresistant Glioblastoma Cells to Temozolomide. *Cancer research*, 76(1), s.139–49.
- Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., Weil, S., Horstmann, H., Wiestler, B., Syed, M., Huang, L., Ratliff, M., Karimian Jazi, K., Kurz, F.T., Schmenger, T., Lemke, D., Gömmel, M., Pauli, M., Liao, Y., Häring, P., Pusch, S., Herl, V., Steinhäuser, C., Kronic, D., Jarahian, M., Miletic, H., Berghoff, A.S., Griesbeck, O., Kalamakis, G., Garaschuk, O., Preusser, M., Weiss, S., Liu, H., Heiland, S., Platten, M., Huber, P.E., Kuner, T., von Deimling, A., Wick, W. & Winkler, F., 2015. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*, 528(7580), s.93–98.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N.E., Kruchko, C. & Barnholtz-sloan, J.S., 2013. NEURO-ONCOLOGY CBTRUS Statistical Report : Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Stetson, L., Virk, S.M. & Barnholtz-sloan, J.S., 2015. Epidemiology of Gliomas. I *Current Understanding and Treatment of Gliomas*. s. 1–14.
- Park, C., Park, S., Lee, S., Kim, C., Kim, D., Paek, S.H., Kim, D.G., Heo, D.S., Kim, I.H. & Jung, H., 2009. Methylation status of the MGMT gene promoter fails to predict the clinical outcome of glioblastoma patients treated with ACNU plus cisplatin. *Neuropathology*, 29, s.443–449.
- Pu, P., Xia, Z., Yu, S. & Huang, Q., 2004. Altered expression of Cx43 in astrocytic tumors. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 107, s.49–54.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L., 2001. Stem cells, cancer , and cancer stem cells. *Nature*, 414, s.105–111.
- Rienecke, L. & Jørgensen, P., 2006. *Den gode opgave* 3th udg., København: Samfundslitteratur.
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K. & Giaume, C., 2008. Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. *Science*, 322(December), s.1551–1556.

- Said, H.M., Hagemann, C., Stojic, J., Schoemig, B., Vince, G.H., Flentje, M., Roosen, K. & Vordermark, D., 2007. GAPDH is not regulated in human glioblastoma under hypoxic conditions. *BMC Molecular Biology*, 8(55), s.1–13.
- Shinoura, N., Chen, L., Wani, M.A., Kim, Y.G., Larson, J.J., Warnick, R.E., Simon, M., Menon, A.G., Bi, W.L. & Stambrook, P.J., 1996. Protein and messenger RNA expression of connexin43 in astrocytomas: Implications in brain tumor gene therapy. *Journal of Neurosurgery*, 84(5), s.839–846.
- Sin, W.C., Aftab, Q., Bechberger, J.F., Leung, J.H., Chen, H. & Naus, C.C., 2015. Astrocytes promote glioma invasion via the gap junction protein connexin43. *Oncogene*, 35, s.1504–1516.
- Sin, W.C., Bechberger, J.F., Rushlow, W.J. & Naus, C.C., 2008. Dose-Dependent Differential Upregulation of CCN1 / Cyr61 and CCN3 / NOV by the Gap Junction Protein Connexin43 in Glioma Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103, s.1772–1782.
- Sin, W.C., Crespín, S. & Mesnil, M., 2012. Opposing roles of connexin43 in glioma progression. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(8), s.2058–2067.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J. & Dirks, P.B., 2003. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *CANCER RESEARCH*, 63, s.5821–5828.
- Sonoda, Y., Kumabe, T., Watanabe, M., Nakazato, Y., Inoue, T., Kanamori, M. & Tominaga, T., 2009. Long-term survivors of glioblastoma : clinical features and molecular analysis. *Acta Neurochir*, 151, s.1349–1358.
- Soroceanu, L., Manning, T.J. & Sontheimer, H., 2001. Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia*, 33(2), s.107–117.
- Strimbu, K. & Tavel, J.A., 2010. What are Biomarkers? *current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), s.463–466.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., European Organisation for, R., Treatment of Cancer Brain, T., Radiotherapy, G. & National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G., 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10), s.987–996.
- Thermo Fisher Scientific, 2016a. Hoechst 33342 Solution(20 mM). Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/62249>.
- Thermo Fisher Scientific, 2016b. Tm Calculator. Available at: <https://www.thermofisher.com/dk/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>.
- Tombal, B., Denmeade, S.R., Gillis, J. & Isaacs, J.T., 2002. A supramicromolar elevation of intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) is consistently required to induce the execution phase of apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 9, s.561–573.
- Tran, B. & Rosenthal, M.A., 2010. Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. *Journal of Clinical Neuroscience*, 17(4), s.417–421.
- Ueki, T., Fujita, M., Sato, K., Asai, K., Yamada, K. & Kato, T., 2001. Epidermal growth factor down-regulates connexin-43 expression in cultured rat cortical astrocytes. *Neuroscience Letters*, 313, s.53–56.
- Uhl, M., Weiler, M., Wick, W., Jacobs, A.H., Weller, M. & Herrlinger, U., 2005. Migratory neural stem cells for improved thymidine kinase-based gene therapy of malignant gliomas. *Biochemical and biophysical research communications*, 328(1), s.125–9.
- Weinberg, R.A., 2014. *The Biology of Cancer* 2nd udg., Garland Science.
- WHO, 1993. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. *WHO International Programme on Chemical Safety*. Available at:

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>.

- Xu, X., Francis, R., Wei, C.J., Linask, K.L. & Lo, C.W., 2006. Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. *Development*, 133, s.3629–3639.
- Ye, X., Jiang, Q., Hong, T., Zhang, Z., Yang, R.-J., Huang, J., Hu, K. & Peng, Y.-P., 2015. Altered expression of connexin43 and phosphorylation connexin43 in glioma tumors. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(5), s.4296–4306.
- Zeiss, C., 2006. *Operating Manual Axio Observer Inverted microscope*,
- Zhang, B., Feng, X., Wang, J., Xu, X., Liu, H. & Lin, N., 2010. Adenovirus-mediated delivery of bFGF small interfering RNA increases levels of connexin 43 in the glioma cell line, U251. *Journal of experimental clinical cancer research CR*, 29(1), s.3.
- Zhang, G., Cui, X., Sui, D., Ren, X., Zhang, Z., Wang, Z. & Lin, S., 2013. Differential molecular genetic analysis in glioblastoma multiforme of long- and short-term survivors : a clinical study in Chinese patients. *Journal of Neuro-Oncology*, 113, s.251–258.