

# **Ionotrope Glutamatrezeptoren als Targetstrukturen zur Modulation der Strahlenwirkung bei Glioblastomzellen**

**Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt**

**zur**

**Erlangung des akademischen Grades**

**eines Doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

**genehmigte Dissertation von**

**Dipl.-Biol. Adriana Gabriele Längle**

**aus Ludwigshafen am Rhein**

**Darmstadt 2014**

**D17**

1. Referent: Prof. Dr. Bodo Laube

2. Referent: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 27. März 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Mai 2014



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>X</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Glioblastoma Multiforme</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Therapie von Glioblastoma Multiforme .....	2
1.1.2 Invasion und Migration von Glioblastomzellen.....	3
1.1.3 Wirkung von Glutamat auf Glioblastomzellen .....	4
<b>1.2 Glutamatrezeptoren</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 NMDA Rezeptoren .....	7
1.2.2 Die Rolle der NMDA Rezeptor Signalübertragung bei der Entscheidung über das Sterben oder Überleben von Neuronen.....	9
1.2.3 Non-NMDA Rezeptoren.....	12
1.2.4 Die Rolle von Glutamatrezeptoren bei Glioblastomen .....	14
<b>1.3 Strahlenwirkung auf Glioblastomzellen</b> .....	<b>15</b>
1.3.1 DNA Reparatur von Glioblastomzellen .....	16
1.3.2 Rolle der Glutamat Signalübertragung bei der DNA Reparatur.....	19
<b>1.4 Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>21</b>
<b>2 MATERIALIEN</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Substanzen zur Behandlung von Zellen</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 Antikörper</b> .....	<b>23</b>
2.2.1 Primärantikörper.....	23
2.2.2 Sekundärantikörper .....	24
<b>2.3 Längenstandard</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4 Chemikalien</b> .....	<b>24</b>
<b>2.5 Zelllinien</b> .....	<b>26</b>
<b>2.6 Lösungen, Puffer und Medien</b> .....	<b>26</b>
<b>2.7 Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>29</b>
<b>2.8 Geräte</b> .....	<b>30</b>
<b>2.9 Kits</b> .....	<b>31</b>

<b>2.10 Software .....</b>	<b>31</b>
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>32</b>
3.1.1 Auftauen von humanen Zelllinien .....	32
3.1.2 Kultivierung von humanen Zelllinien .....	32
3.1.2.1 Passagieren von humanen Zelllinien.....	32
3.1.2.2 Zellzahlbestimmung .....	32
3.1.2.3 Aussäen der humanen Zelllinien .....	33
3.1.3 Röntgenbestrahlung .....	33
3.1.4 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen .....	34
3.1.4.1 Thymidin-Analogen zur Markierung von S-Phase Zellen .....	34
3.1.4.1.1 BrdU .....	34
3.1.4.1.2 EdU .....	34
3.1.4.2 Agonisten zur Aktivierung von Glutamatrezeptoren.....	34
3.1.4.2.1 Glutamat und Glyzin .....	34
3.1.4.2.2 NMDA .....	35
3.1.4.2.3 AMPA .....	35
3.1.4.2.4 Kainsäure .....	35
3.1.4.3 Antagonisten zur Inhibition von Glutamatrezeptoren .....	35
3.1.4.3.1 Ifenprodil.....	35
3.1.4.3.2 Memantin Hydrochlorid .....	35
3.1.4.3.3 MK-801 .....	36
3.1.4.3.4 NBQX .....	36
3.1.4.3.5 Gyki-52466 .....	36
3.1.4.4 Calcium-Chelator .....	36
3.1.4.4.1 Bapta-AM.....	36
3.1.4.5 pCREB Inhibitor .....	37
3.1.4.5.1 KG-501 .....	37
3.1.5 Durchflusszytometrische Methoden.....	37
3.1.5.1 Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie.....	37
3.1.5.2 Propidiumiodid-Färbung.....	37
3.1.5.3 Messung am Durchflusszytometer .....	38
3.1.6 Immunologische Methoden .....	38
3.1.6.1 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen .....	39
3.1.6.2 EdU/ $\gamma$ H2AX-Färbung.....	39
3.1.6.3 Auswertung der immunologischen Methoden.....	40
3.1.7 Proteinanalytische Methoden .....	40
3.1.7.1 Zellyse.....	40
3.1.7.2 BCA Proteinbestimmung.....	40
3.1.7.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
3.1.7.4 Western Blot .....	41
3.1.8 Migrations- und Invasions-Analyse.....	42
3.1.8.1 Migrationsanalyse mittels Wundheilungsassay .....	42
3.1.8.2 Matrigel Invasions Assay.....	43
3.1.9 Bestimmung der Glutamat Konzentration mittels Glutamat Assay .....	44
3.1.10 <i>In vitro</i> Messung der Chemosensitivität.....	45
3.1.10.1 MTT-Assay .....	45
3.1.10.2 Klonogener Assay ( <i>clonogenic cell survival assay</i> ) .....	46
3.1.11 Elektrophysiologische Analyse .....	46
3.1.11.1 Port-a-Patch.....	46
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>

<b>4.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren bei der Glioblastomzelllinie LN-229 .....</b>	<b>48</b>
4.1.1 Expression und Funktionalität von ionotropen Glutamatrezeptoren .....	48
<b>4.2 Einfluss von Glutamat auf die Glioblastomzelllinie LN-229.....</b>	<b>51</b>
4.2.1 Einfluss von Glutamat auf die Zellebensfähigkeit von LN-229 Glioblastomzellen.....	51
4.2.2 Einfluss von Glutamat auf die Zellmigration und Invasion.....	52
4.2.3 Glutamatfreisetzung bei der Glioblastomzelllinie LN-229.....	53
<b>4.3 Einfluss von Glutamatrezeptor-Antagonisten auf LN-229 Zellen .....</b>	<b>55</b>
4.3.1 Einfluss von Glutamatrezeptor-Antagonisten auf die Zellebensfähigkeit von LN-229 Zellen.....	55
4.3.2 Einfluss von Glutamatrezeptor-Antagonisten und dem Ca <sup>2+</sup> -Chelator Bapta-AM auf die Zellmigration und Invasion.....	58
<b>4.4 Einfluss von ionisierender Bestrahlung auf das glutamaterge System der Glioblastomzelllinie LN-229 .....</b>	<b>61</b>
4.4.1 Einfluss von ionisierender Bestrahlung auf die Glutamatfreisetzung von LN-229 Zellen .....	61
4.4.2 Einfluss von ionisierender Bestrahlung und NMDAR-Hemmung auf das Zellüberleben von LN-229 Zellen.....	62
4.4.3 Einfluss von ionisierender Bestrahlung und Glutamat auf die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur und den Zellzyklus von LN-229 Zellen.....	63
4.4.4 Einfluss von ionisierender Bestrahlung auf die Migration und Invasion von LN-229 Zellen nach Behandlung mit iGluR-Antagonisten und Bapta-AM.....	71
<b>4.5 CREB Aktivität und Hemmung der CREB Signaltransduktionskaskade .....</b>	<b>75</b>
4.5.1 Aktivierung von CREB durch Glutamat und ionisierende Bestrahlung .....	75
4.5.2 Einfluss der CREB Hemmung auf die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur .....	77
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>80</b>
5.1 Rolle von iGluRs bei der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden.....	80
5.2 Rolle von iGluRs bei der Migration und Invasion von Glioblastomzellen .....	81
5.3 Der Einfluss von Glutamat auf die Zellebensfähigkeit von LN-229 Zellen.....	84
5.4 Glutamat aktiviert ionotrope Glutamatrezeptoren bei LN-229 Zellen.....	85
5.5 Die Rolle von CREB bei der DNA-Schadensantwort in Glioblastomzellen .....	86
5.6 Modell.....	89
5.7 Schlussfolgerung mit Ausblick .....	90
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY.....</b>	<b>93</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>97</b>
<b>8 ANHANG.....</b>	<b>106</b>
8.1 Veröffentlichungen.....	106
8.2 Lebenslauf.....	107

<b>8.3</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>108</b>
<b>8.4</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>109</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
	Rezeptor
APE1	<i>Apurinic Endonuclease 1</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaMK	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin-abhängige Kinase
CBP	<i>creb-binding protein</i>
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CREB	<i>cAMP-response-element-binding-protein</i>
CTX	Chlorotoxin
DDR	DNA-Schadensantwort ( <i>DNA damage response</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK <sub>cs</sub>	DNA-abhängigen Proteinkinase
DSBs	Doppelstrangbrüche
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ESBs	Einzelstrangbrüche
et al.	et altera (und andere)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma Multiforme
GluRs	Glutamatrezeptoren
GSH	Glutathion
Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis)
G $\Omega$	Gigaohm
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HR	Homologe Rekombination
IR	ionisierende Bestrahlung ( <i>ionizing radiation</i> )
iGluRs	ionotrope Glutamatrezeptoren
IgG	Immunglobulin G
I <sub>max</sub>	Maximalstrom
JSTx	<i>Joro spider toxin</i>
K <sup>+</sup>	Kalium
Kainat	2-Carboxy-3-Carboxymethyl-4-Isopropenylpyrrolidon
KARs	Kainatrezeptoren
kDa	Kilodalton
M	Mol pro Liter
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
mGluRs	metabotrope Glutamatrezeptoren
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin Methyltransferase

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
N	Anzahl der Experimente
n.d.	nicht definiert
Na <sup>+</sup>	Natrium
ng	Nanogramm
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	potentium Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA ( <i>single stranded DNA</i> )
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMZ	Temozolomid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Spannung
UE	Untereinheit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
x <sub>c</sub> <sup>-</sup>	Cystin-Glutamat Austauscher
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
μA	Mikroamper
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm

Die Gewichts- bzw. Mengeneinheiten entsprechen den SI-Einheiten.



---

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1: Modell der Zellinvasion durch Volumenänderungen .....	4
Abb. 1.2: Darstellung des synaptischen Spalts als Verbindung zwischen zwei Nervenzellen.	7
Abb. 1.3: Topologie einer iGluR-Untereinheit und eines tetrameren iGluRs.....	8
Abb. 1.4: Entgegengesetzte Effekte von synaptischem und extrasynaptischem NMDARs auf die Expression von pro-Überlebens und pro-Zelltod Genen. ....	12
Abb. 1.5: Prä- und postsynaptische Kainat Rezeptoren.....	13
Abb. 1.6: Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch NHEJ und HR.....	17
Abb. 1.7: Strahlenresistenz und DNA Reparatureffizienz von Glioblastomzellen .....	19
Abb. 1.8: Erhöhung der APE1 Expression durch Glutamat induzierten oxidativen DNA Schaden in Neuronen.....	20
Abb. 3.1: Zellzyklusverteilung nach 60-minütiger Pulsmarkierung mit BrdU und Färbung mit PI. ....	38
Abb. 3.2: Blotaufbau schematisch dargestellt. ....	42
Abb. 3.3: Zellkultureinsatz von Ibidi für Migrations-Assay. ....	43
Abb. 3.4: Zellkultureinsatz mit Matrigel Matrix für Invasionsanalysen .....	44
Abb. 3.5: Whole Cell Messung mit dem Port-a-Patch. ....	47
Abb. 4.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der NMDAR-Untereinheiten NR1, NR2A und NR2B.....	50
Abb. 4.2: Zellviabilität von LN-229 Zellen nach Behandlung mit Glutamat. ....	51
Abb. 4.3: Zellmigration und Invasion von LN-229 Zellen nach Glutamat Behandlung. ....	53
Abb. 4.4: Messung der Glutamat Konzentration von LN-229 Zellen im extrazellulären Medium. ....	54
Abb. 4.5: Zellviabilität und Überlebensfähigkeit von LN-229 Zellen nach Inhibition von AMPARs und NMDARs. ....	57
Abb. 4.6: Zellmigration und Invasion von LN-229 Zellen nach Behandlung mit iGluR-Antagonisten und Bapta-AM.....	60
Abb. 4.7: Messung der Glutamat Konzentration von LN-229 Zellen im extrazellulären Medium nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy. ....	61
Abb. 4.8: Zellviabilität von unbestrahlten und bestrahlten LN-229 Zellen und Überlebensfähigkeit nach Bestrahlung und Behandlung mit Memantin Hydrochlorid.....	63
Abb. 4.9: Einfluss von Glutamat auf die Reparatur von strahleninduzierten DSBs in der S/G2-Phase.....	65
Abb. 4.10: Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung und Behandlung mit Glutamat und MK-801. ....	67
Abb. 4.11: Zellzyklusverteilung von unbestrahlten und bestrahlten LN-229 Zellen nach Behandlung mit Glutamat oder MK-801.....	68
Abb. 4.12: Reparatur von strahleninduzierten DSBs während der S/G2-Phase nach Behandlung mit iGluR-Antagonisten und Bapta-AM. ....	70
Abb. 4.13: Einfluss von ionisierender Bestrahlung auf die Migration und Invasion von LN-229 Zellen nach Behandlung mit iGluR-Antagonisten und Bapta-AM. ....	74
Abb. 4.14: Detektion des pCREB Levels mittels Western Blot nach Glutamat-Behandlung und IR. ....	77
Abb. 4.15: Detektion des $\gamma$ H2AX Levels mittels Western Blot nach IR und Behandlung mit iGluR-Antagonisten und KG-501. ....	78
Abb. 5.1: Phosphorylierung von CREB durch Glutamat und IR. ....	88
Abb. 5.2: Modell des Mechanismus bei dem die Aktivierung von iGluRs zur verbesserten DNA Reparatur nach Bestrahlung und zum invasiven Wachstum von Glioblastomen beisteuert. ....	90

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 3.1: Zellzahlen zum Aussäen in 96-Loch-, 24-Loch-Platten, 6 cm- und 10 cm Zellkulturschalen .....	33
Tab. 3.2: Zusammensetzung für ein 14 % Trenn- und 4 % Sammelgel .....	41
Tab. 4.1: Pharmakologische Untersuchung von Glutamatrezeptoren der Glioblastomzelllinien LN-229, U-87 MG, T98-G und LN-428.....	49

## 1 Einleitung

### 1.1 Glioblastoma Multiforme

Tumore glialen Ursprungs werden im Allgemeinen Gliome genannt, wobei die Mehrheit dieser Tumore die Astrozytome und Glioblastome ausmachen, welche sich aus Astrozyten entwickeln sollen (Kleihues et al., 1995). Glioblastoma Multiforme (GBM) ist einer der aggressivsten malignen Gehirntumore des Menschen. Aus diesem Grund wird er laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Grad IV Tumor eingestuft (Kleihues et al., 1993). Die mittlere Überlebensrate von Patienten mit GBM liegt bei 15 Monaten trotz stetiger Therapieoptimierungen. Durch das infiltrative Wachstum der Tumorzellen entlang von Nervenbahnen und Blutgefäßen ist eine vollständige Resektion des Tumors nahezu unmöglich (Kaba and Kyritsis, 1997; Laerum et al., 1984; Zalutsky, 2005). Ein anderes Kennzeichen dieses Tumors ist die Strahlen- und Chemoresistenz, welche die Überlebenschance von GBM Patienten zusätzlich minimiert. Sie bilden auch Metastasen, wenn auch nicht in umliegenden Organen. Aber innerhalb des Gehirns und des Rückenmarks lassen sich Metastasen von Gliomen finden, die eine Rückkehr des Tumors zur Folge haben (Sontheimer, 2008). Das Glioblastom besteht aus einem heterogenen Satz an Tumorzellen, die sich morphologisch unterscheiden und unterschiedliche Rollen bei der Tumorgenese haben (Yuan et al., 2004). Unter den Tumorzellen gibt es ausdifferenzierte Tumorzellen und Zellen mit Stammzellcharakter, die weniger ausdifferenziert sind. Diese Krebsstammzellen, auch bekannt als Tumor initiiierende Zellen, sind hoch invasiv, sowie strahlen- und chemoresistent (Oh et al., 2012).

Der zelluläre Ursprung von Glioblastomen ist kontrovers. Es wird beschrieben, dass sie sich aus differenzierten Gliazellen oder glialen Vorläuferzellen entwickeln. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass Gliome von Stamm- oder neuronalen Vorläufer-Zellen stammen (Bachoo et al., 2002; Dai et al., 2001). Die Gründe für die Transformation dieser Zellen zu malignen Tumorzellen ist noch unklar, Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie p53 oder die Amplifikation von Onkogenen wie dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR) scheinen jedoch eine große Rolle zu spielen (Maher et al., 2001). Allgemein zeigen Glioblastome eine Vielzahl an genetischen Mutationen (The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network 2008).

### **1.1.1 Therapie von Glioblastoma Multiforme**

Mögliche Therapieformen für GBM sind operative Resektion, Strahlentherapie, Chemotherapie und zielgerichtete molekulare Therapien (Cheng et al., 2011). Trotz dieser zahlreichen Optionen ist die Prognose für GBM Patienten schlecht. Durch das infiltrative Verhalten der Zellen ist eine vollständige Entfernung des Tumors nahezu unmöglich. Als Standardtherapie erfolgt nach der maximalen Resektion eines Glioblastoms eine Strahlentherapie und als Ergänzung die Behandlung mit Temozolomid (TMZ), einem oral verabreichten alkylierenden Agens, das die DNA beschädigt (Perry et al., 2012). Die Strahlentherapie verbessert zwar die Überlebenschance, GBM Patienten erleiden jedoch nach Bestrahlung oft einen Rückfall durch erhöhte Tumor Migration und Invasion (Kesanakurti et al., 2012). Allgemein erschwert die Strahlen- und Chemoresistenz dieser Zellen die Therapie. Die Strahlenresistenz ergibt sich dabei aus der begünstigten DNA-Schadensantwort und die Chemoresistenz aus der Überexpression von z.B. O<sup>6</sup>-Methylguanin Methyltransferase (MGMT) und der Apoptoseinhibition (Dean et al., 2005; Liu et al., 2006). Durch die Ergänzung mit TMZ konnte die mittlere Überlebensrate jedoch von 12 auf 15 Monate erhöht werden (Stupp et al., 2005). Die Effektivität von TMZ in Kombination mit Bestrahlung hängt jedoch davon ab, ob die Tumorzellen das DNA Reparatur Enzym MGMT exprimieren. Die Therapie mit TMZ schlägt nur bei Patienten an, die eine epigenetische Stilllegung des MGMT Gen Promotors durch eine Methylierung haben, wodurch DNA-Basen Schäden nur noch unzureichend repariert werden können und es zum strahleninduzierten Zelltod kommt (Hegi et al., 2005; Weller et al., 2010).

Die Art der Bestrahlung scheint auch ein Ansatz für die Optimierung einer Therapie zu sein. Eine Therapie mit Kohlenstoff Ionen zeigt bei einer Phase II Studie ein höheres Überleben von Patienten mit GBM (Mizoe et al., 2007). Die lokale Strahlendosis ist limitiert, da durch eine Erhöhung vermehrt Nekrose im umliegenden Nervengewebe auftritt (Short et al., 2007).

Bei der Tumorgenese und der Behandlungsresistenz von GBM sind viele Signalwege involviert, weshalb die zielgerichtete molekulare Therapie immer wichtiger wird. Zielgerichtete Therapien haben den Vorteil selektiv Tumorzellen zu töten und das gesunde Gewebe zu schonen (Perry et al., 2012). Ein vielversprechendes Ziel einer molekularen Therapie könnte das Onkogen EGFR sein. Eine Phase II Studie mit dem

Inhibitor Erlotinib, der die Thyrosinkinase-Domäne des EGFR bindet, zeigte jedoch keinen therapeutischen Nutzen bei GBM (van den Bent et al., 2009).

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Invasion von Glioblastomzellen (Vehlow and Cordes, 2013). Ziel der Therapie können z.B. Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sein, welche die Invasion von Glioblastomzellen vermitteln. *In vitro* Studien und Mausmodelle zeigen, dass die Inhibition von MMPs eine geeignete Möglichkeit ist. In einer Phase II Studie zeigt die Kombination des MMP Inhibitors Marimastat mit TMZ ein gesteigertes Überleben der GBM Patienten (Mizoe et al., 2007; Noha et al., 2000; Price et al., 1999; Tonn et al., 1999). Auch Chlorotoxin (CTX), ein Skorpiongift, hemmt die Invasion von Gliomzellen, indem es zu einer verringerten Oberflächenexpression der Matrix Metalloproteinase-2 führt (Deshane et al., 2003). Gliomzellen exprimieren Glioma-spezifische Chloridkanäle (GCCs), die sensitiv für CTX sind und nicht im gesunden Gehirngewebe exprimiert werden (Soroceanu et al., 1998). CTX inhibiert GCCs direkt, was elektrophysiologische Studien zeigen konnten (Ullrich et al., 1996; Ullrich and Sontheimer, 1996). Diese Studien offenbarten zudem eine entscheidende Rolle von Ionenkanälen bei der Proliferation und Invasion von Gliomzellen.

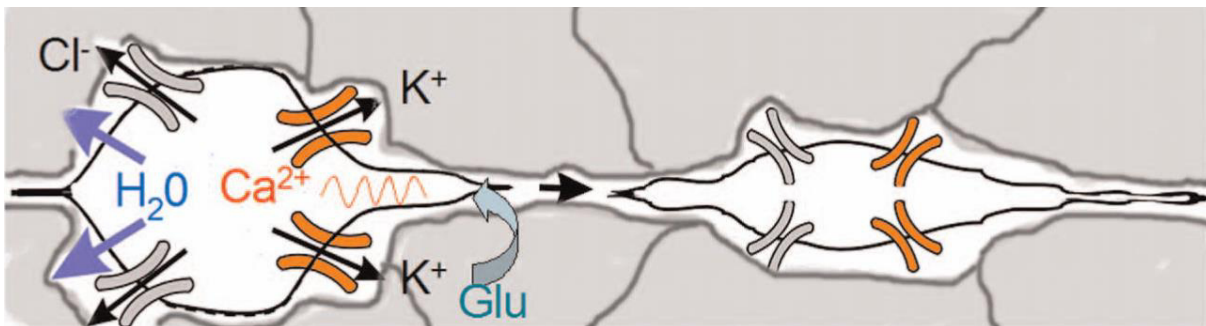
### **1.1.2 Invasion und Migration von Glioblastomzellen**

Maligne Tumorzellen sind in der Lage in das umliegende gesunde Gewebe einzudringen und so Metastasen zu bilden. Die Tumorzellen müssen dazu die extrazelluläre Matrix (EZM) durchlässig machen um sie dann durch Zellbewegung passieren zu können. Hierzu benötigen sie EZM-degradierende Enzyme wie die MMPs. Das Anheften an die EZM wird durch Integrine gewährleistet (Crowe and Shuler, 1999).

2008 zeigte Sontheimer, dass Ionenkanäle nicht nur bei der elektrischen Signalweiterleitung, sondern auch bei der Zellmigration und Metastasierung von Tumorzellen eine Rolle spielen. Die Ionenkanäle sind dabei für Zellvolumenänderungen verantwortlich. Die Aktivität von Kalium ( $K^+$ ) und Chlorid ( $Cl^-$ ) Kanälen scheint die Invasion von Gliomzellen und die Bildung von Metastasen im Gehirn zu fördern. Vor allem Calcium ( $Ca^{2+}$ )-aktivierende  $K^+$ - (BK-Kanäle) und  $Cl^-$ -Kanäle (ClC-3-Kanäle). Bei einem Anstieg von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  werden diese Kanäle aktiviert und entlassen  $K^+$  und  $Cl^-$  Ionen zusammen mit Wasser, was zu

einem schnellen Schrumpfen der Zelle führt, wodurch die Invasion durch die EZM erleichtert wird.

Bei der neuronalen Entwicklung spielt die Zellmigration ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Bildung der synaptischen Vernetzung und die funktionelle Interaktion der Zellen. Dabei ist der Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels entscheidend für die Zellbewegung von Granularzellen (Komuro and Rakic, 1996). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx wird unter anderem durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen NMDA Rezeptor gewährleistet, einem Mitglied der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle, der über Glutamat aktiviert wird. Lyons et al. zeigte 2007, dass Gliomzellen durch Glutamat eine erhöhte Migration aufweisen, erklärte dies jedoch unter anderem durch die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen AMPA-Rezeptoren, die ebenfalls zur Familie der Glutamat-gesteuerten Ionenkanälen, auch Glutamatrezeptoren (GluRs) genannt, gehören (Lyons et al., 2007). Dieses Modell (Abb. 1.1) vermutet, dass spezifische Inhibitoren dieser Kanäle und Transporter die Zellinvasion von Gliomzellen beeinträchtigt.



**Abb. 1.1: Modell der Zellinvasion durch Volumenänderungen**

Durch die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen iGluRs, wie den AMPA Rezeptoren, kommt es zur Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Kanälen. Der Efflux von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$  Ionen bewirkt gleichzeitig den Austritt von Wasser, was eine Volumenänderung der Zelle zur Folge hat. Die Zellschrumpfung ermöglicht eine erleichterte Zellinvasion (Sontheimer, 2008).

### 1.1.3 Wirkung von Glutamat auf Glioblastomzellen

Glutamat ist einer der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem von Mammalia und ist für Vorgänge wie Lernen und Gedächtnisbildung essentiell (Collingridge and Bliss, 1995). Es wirkt agonistisch auf GluRs und wird seit einiger Zeit auch mit Krebs in Verbindung gebracht. Rzeski et al. veröffentlichte 2001, dass Glutamat das Wachstum von A549 Lungenkrebszellen und anderen malignen Tumorzellen begünstigt. Ebenfalls 2001 veröffentlichte Takano et al., dass Glutamat eine Rolle beim Wachstum von Gliomen spielt. Es wurde gezeigt,

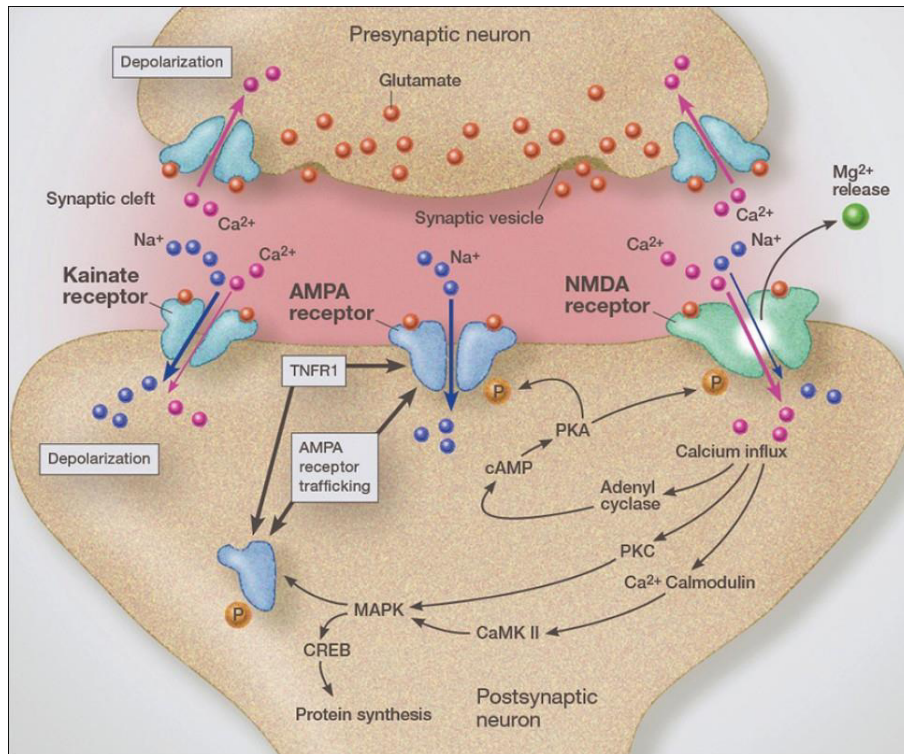
dass Gliomzellen Glutamat sekretieren, was das Tumorwachstum fördert. Das sekretierte Glutamat führt bei 40-60 % der GBM Patienten zu epileptischen Anfällen als Folge der Überaktivierung von GluRs (Kerkhof et al., 2013; Oberndorfer et al., 2002). Des Weiteren wirkt Glutamat in hohen Konzentrationen auf das umliegende Nervengewebe exzitotoxisch. Die Nervenzellen sterben durch die extrazelluläre Glutamat Anreicherung und bieten so mehr Raum für das Tumorwachstum (Ye and Sontheimer, 1999). Die Anreicherung von Glutamat im Bereich des Tumors erklärt sich dadurch, dass maligne Gliome nur minimale Level an astrozytischen Glutamat Transportern wie dem exzitatorischen Aminosäure Transporter-2 (EAAT-2) exprimieren. Astrozyten, welche als mögliche Ursprungszellen von Glioblastomen angenommen werden, nehmen Glutamat über Transporter auf, um eine exzitotoxische Anreicherung zu verhindern (Anderson and Swanson, 2000). Der GLAST Transporter wurde bei Gliomzellen im Zellkern detektiert anstatt in der Plasmamembran und zeigt somit eine veränderte Lokalisation. Die Na<sup>+</sup>-abhängige Glutamat Aufnahme bei Gliomen durch diese Transporter ist dadurch 100mal geringer als bei Astrozyten (Ye et al., 1999). Des Weiteren überexprimieren Gliomzellen den Cystin–Glutamat Austauscher, auch System x<sub>c</sub><sup>-</sup> genannt. Dieser Transporter sekretiert Glutamat im Austausch mit Cystin, welches wichtig ist für die Synthese des Antioxidants Glutathion (GSH). Es wird vermutet, dass das erhöhte Level an GSH Gliomzellen resistenter für oxidativen Stress, Chemotherapeutika und Bestrahlung macht (Mitchell et al., 1989). Eine Erhöhung der Glutamattransporter Expression bei Astrozyten durch Propentofyllin zeigt eine Steigerung der Apoptoserate von Gliomzellen (Jacobs and De Leo, 2013). Im Hinblick darauf sind Glutamattransporter und GluRs interessante Ziele für eine Therapie von GBM.

## **1.2 Glutamatrezeptoren**

Die Leistungsfähigkeit des menschlichen Gehirns beruht auf dem Netzwerk an synaptischen Verbindungen, die eine Kommunikation zwischen den Neuronen gewährleisten. Chemische Neurotransmitter werden an den präsynaptischen Enden eines Neurons sekretiert. Diese überwinden den synaptischen Spalt und binden an Neurorezeptoren der postsynaptischen Membran des nachfolgenden Neurons. So kann die Information von einem zum anderen Neuron weitergeleitet werden (Abb. 1.2). Glutamat ist einer der wichtigsten Neurotransmitter für die Aktivierung von exzitatorischen Membranproteinen, den so genannten GluRs (Sobolevsky et al.,

2009). Es werden zwei Klassen von GluRs unterschieden. Die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs) und die ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluRs) (Dingledine et al., 1999). mGluRs sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die durch Glutamat aktiviert werden, was intrazelluläre Signalkaskaden induziert, bei denen *second messenger* und Proteinkinasen involviert sind. Unter anderem werden dadurch Ionenkanäle aktiviert. iGluRs gehören neben den Cys-Loop- und P2X-Rezeptoren zur Familie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle, welche die schnelle Neurotransmission zwischen Neuronen im zentralen Nervensystem (ZNS) durch Ligandenbindung, Kanalaktivierung, Ioneneinstrom und Membrandepolarisation gewährleisten. Es sind drei Klassen von iGluRs bekannt: N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-, alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionsäure (AMPA)- und 2-Carboxy-3-Carboxymethyl-4-Isopropenylpyrrolidon (Kainat)-Rezeptoren (NMDARs, AMPARs und KARs) (Abb. 1.2). Diese sind für die exzitatorische Signaltransduktion verantwortlich und wurden nach ihren spezifischen synthetischen Agonisten benannt. Die iGluRs werden durch Glutamat aktiviert und sind permeabel für Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  und Natrium ( $\text{Na}^+$ ). AMPARs und KARs, auch non-NMDARs genannt, sind permeabler für  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$ , während NMDARs permeabler für  $\text{Ca}^{2+}$  sind (Hollmann and Heinemann, 1994; Seeburg, 1993). Das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  fungiert als wichtiger *second messenger*, der nachgeschaltete Signalkaskaden einleitet. Ein entscheidender  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Signalweg ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *cAMP-response-element-binding-protein* (CREB), der eine regulierende Funktion für die neuronale Entwicklung, Funktion und das Zellüberleben hat (Lonze and Ginty, 2002).





**Abb. 1.2: Darstellung des synaptischen Spalts als Verbindung zwischen zwei Nervenzellen.**

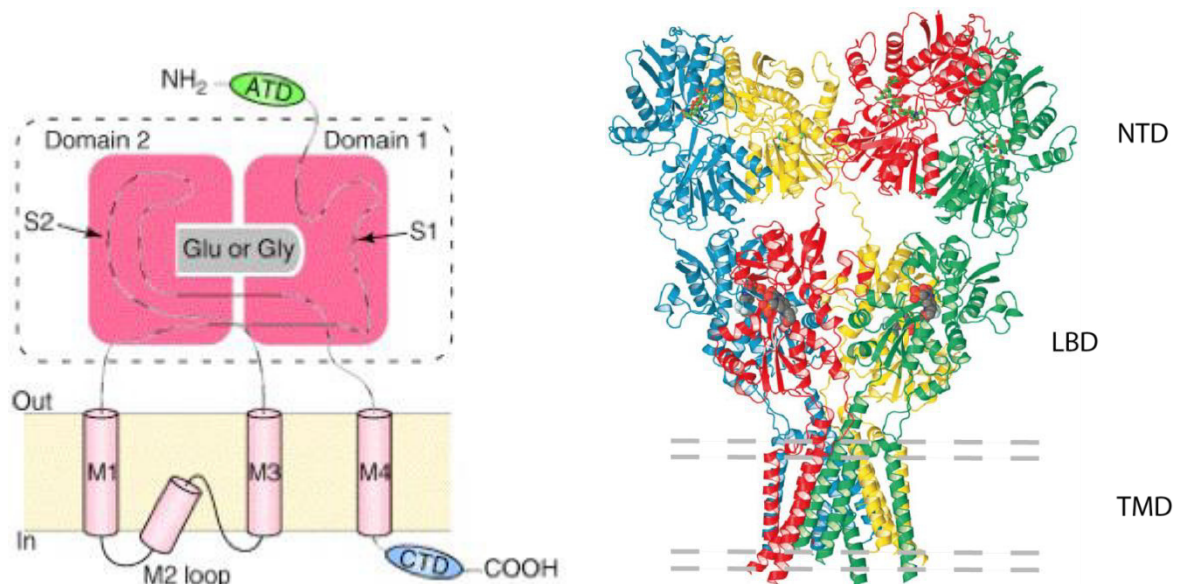
Glutamat wird vom präsynaptischen Terminus über Vesikel ausgeschüttet, welches dann an postsynaptisch lokalisierten iGluRs (NMDARs, AMPARs und KARs) bindet und zu deren Aktivierung führt. Durch Aktivierung öffnen sich die Ionenkanäle, welche für Kationen permeabel sind. Es kommt zur Depolarisation der Membran. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx führt über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *cAMP-response-element-binding-protein* (CREB) (Blaylock, 2013).

### 1.2.1 NMDA Rezeptoren

NMDARs spielen eine wichtige Rolle bei Prozessen wie Lernen, Gedächtnisbildung und synaptischer Plastizität (Collingridge and Bliss, 1995; Yashiro and Philpot, 2008). Bei Krankheiten wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Epilepsie oder Schizophrenie sind NMDARs mit veränderter Funktion oder Expression involviert (Dingledine et al., 1999).

NR1/NR2-NMDARs, werden als „konventionelle NMDARs“ bezeichnet und setzen sich aus zwei NR1- und NR2-Untereinheiten (UEs), oft auch als GluN1 und GluN2 bezeichnet, zusammen. Es existieren bis jetzt vier NR2-UEs, die jeweils durch ein Gen kodiert werden (NR2A-D) (Cull-Candy et al., 2001; Dingledine et al., 1999). Die NR1-UE wird nur durch ein Gen kodiert, jedoch werden aus diesem Gen durch alternatives Spleißen acht verschiedene Spleißvarianten gebildet (NR1-1a - NR1-4b) (Monyer et al., 1994). In den Arbeiten von Laube et al. (1998), Rosenmund et al. (1998) und Furukawa et al. (2005) wurde postuliert, dass zwei Glyzin-bindende NR1-

und zwei Glutamat-bindende NR2-UEs einen heterotetrameren Rezeptorkomplex bilden. Die UEs von iGluRS haben alle die gleiche Transmembran-Topologie mit drei Transmembrandomänen (TM1, TM3 und TM4) und einer Wiedereintrittsschleife (M2), (Dingledine et al., 1999). Die M2s der vier UEs kleiden die Membranpore des Tetramers aus und bedingen die Permeabilität des Ionenkanals. Der extrazelluläre Bereich der NMDARs, aber auch AMPARs und KARs, gliedert sich in zwei aneinandergereihte Domänen: die N-terminale Domäne (NTD oder ATD) (Masuko et al., 1999; Paoletti et al., 2000) und die Ligandenbindungsdomäne (LBD), die sich aus dem Loop zwischen NTD und TM1 (S1) sowie dem Loop zwischen TM3 und TM4 (S2) bildet. Im Anschluss an die TM4 folgt noch die intrazelluläre C-terminale Domäne (CTD) (Dingledine et al., 1999) (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Topologie einer iGluR-Untereinheit und eines tetrameren iGluRs.**

Von den vier hydrophoben Segmenten sind TM1, TM3 und TM4 membrandurchgängig, während M2 eine Wiedereintrittsschleife auf der zytoplasmatischen Seite bildet. Die S1- und S2-Subdomänen bilden die Ligandenbindungsdomäne (S1/S2-Komplex als gestrichelte Linien gezeigt). Bei non-NMDA und den NR2-UEs bildet der S1/S2-Komplex die Glutamatbindungsstelle, während die NR1-Untereinheit die Glyzinbindungsstelle enthält. Die langen ATD/NTD und CTD sind verkürzt dargestellt (links). Rechts ist die Architektur, basierend auf der homomeren GluR2 Kristallstruktur, eines tetrameren iGluRs dargestellt ohne CTD. (Sobolevsky et al., 2009; Wollmuth and Sobolevsky, 2004)

Die Ionenkanalaktivierung von NR1/NR2-Rezeptoren benötigt die simultane Bindung von zwei Ko-Agonisten: den Aminosäuren Glutamat und Glyzin (Johnson and Ascher, 1987; Laube et al., 1997). Glyzin bindet an die NR1-UE (Kuryatov et al.,

1994) und Glutamat an die NR2-UE (Laube et al., 1997). Durch die alleinige Bindung beider Agonisten wird der Ionenkanal jedoch noch nicht geöffnet. Voraussetzung dafür ist eine Vordepolarisierung der Postsynapse durch AMPARs und KARs, welche die Aufhebung des Magnesium ( $Mg^{2+}$ )-Blocks in der NMDAR-Kanalpore bedingt. Erst dann ist der Ionenkanal für  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Ca^{2+}$  durchlässig. Da die NMDARs spannungsabhängig und ligandengesteuert sind, werden die Rezeptoren auch als Koinzidenzdetektoren bezeichnet (Dingledine et al., 1999). Durch die hohe  $Ca^{2+}$ -Permeabilität und die 10fach langsamere Aktivierung gegenüber AMPARs sind die NMDARs essentiell für aktivitätsabhängige Langzeitveränderungen der synaptischen Stärke (Langzeitpotenzierung, LTP). Es ist bekannt, dass sie die funktionelle und strukturelle Plastizität von Synapsen, Dendriten und Neuronen durch die Aktivierung spezifischer  $Ca^{2+}$ -abhängiger Signalkaskaden regulieren (Collingridge and Bliss, 1995; Yashiro and Philpot, 2008).

### **1.2.2 Die Rolle der NMDA Rezeptor Signalübertragung bei der Entscheidung über das Sterben oder Überleben von Neuronen**

Der Verlust von Neuronen ist bei vielen neurodegenerativen Krankheiten üblich, wie auch bei der Glioma-induzierten Neurodegeneration. Aber nicht nur die Überaktivierung von NMDA Rezeptoren durch einen Glutamat Überschuss kann zu neuronalem Zelltod durch Apoptose führen. Auch eine zu geringe NMDAR Aktivierung scheint schädlich für Neurone zu sein. Interessanterweise spielt zusätzlich die UE-Zusammensetzung und Lokalisierung von NMDARs eine Rolle, ob Neurone überleben oder sterben. NMDARs befinden sich nicht nur an der postsynaptischen Membran, sondern sind auch extrasynaptisch lokalisiert und haben dadurch unterschiedliche physiologische Rollen (Hardingham and Bading, 2003; Nicotera et al., 1999). Die physiologische NMDAR Aktivierung an Synapsen ist wichtig für das Überleben von Neuronen. Diese neuroprotektive Wirkung ergibt sich nachweislich durch den  $Ca^{2+}$ -Influx. Dies spielt vor allem bei der Entwicklung eine große Rolle. Blockt man NMDARs während der Entwicklung *in vivo* führt dies zu einer erhöhten Apoptose (Ikonomidou et al., 1999; Monti and Contestabile, 2000). Der Mechanismus des NMDAR-abhängigen Überlebens ist noch nicht vollständig verstanden. Bekannt ist jedoch, dass der Transkriptionsfaktor CREB unter anderem über einen NMDAR-abhängigen Signalweg phosphoryliert wird, wodurch *pro-survival* Gene aktiviert werden. Durch den  $Ca^{2+}$ -Einstrom über den synaptischen Glutamat-

gesteuerten NMDAR werden zwei Signalwege aktiviert, welche die Phosphorylierung von CREB an der Aminosäure Serin 133 zur Folge hat. Einer der Wege führt über die *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK 1/2), der andere über die *Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent kinase IV* (CaM Kinase IV). Nach Phosphorylierung an Ser133 wird der Coaktivator *creb-binding protein* (CBP) an den Promotor rekrutiert und die Transkription startet (Hardingham and Bading, 2003). Für die Aktivierung von CREB ist zusätzlich die *Ca<sup>2+</sup>-abhängige* Aktivierung von *transducer of regulated CREB* (TORC) entscheidend (Abb. 1.4 A) (Hardingham and Bading, 2010).

Dadurch wird z.B. der pro-Überlebensfaktor *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) exprimiert. Dieser Faktor gilt als stark neuroprotektiv (Hardingham et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die postnatale Zerstörung des CREB Gens zu einer starken Neurodegeneration im Hippokampus und dorsolateralen Striatum führt (Mantamadiotis et al., 2002). Auch die NMDAR-abhängige Expression anderer pro-Überlebens Gene scheint unter der Kontrolle von CREB zu stehen. Dazu gehören *vasoactive intestinal peptide* (VIP), *hepatocyte growth factor* (HGF), *inhibitors of apoptosis* (IAPs), *manganese superoxide dismutase* (MnSOD), *myeloid cell leukemia-1* (mcl-1), *B-cell leukemia/lymphoma 2* (bcl-2) und weitere (Hardingham and Bading, 2003).

Durch extrasynaptische NMDARs kommt es zur Hemmung des RAS-ERK1/2 Signalwegs und zur Dephosphorylierung von CREB durch *juxtasyntaptic attractor of caldendrin on dendritic boutons protein* (Jacob). Dies führt letztendlich zum Abschalten von CREB. Durch Transkription von pro-Zelltod Genen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors *forkhead box protein O* (FOXO) kommt es zum exzitotoxischen Zelltod (Abb. 1.4 A und B) (Hardingham and Bading, 2010; Hardingham et al., 2002).

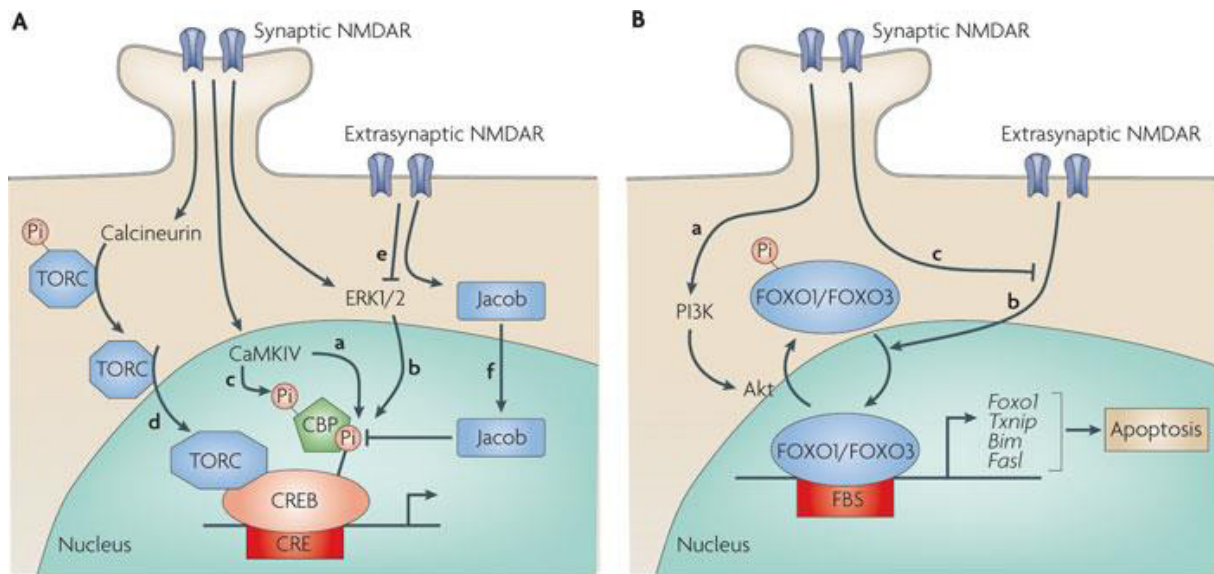
Bei einer Exzitotoxizität werden synaptische und extrasynaptische NMDARs gleichzeitig aktiviert, weshalb die Neurone ein langsames Vorschreiten der Apoptose zeigen und keinen sofortigen nekrotischen Zelltod. Aber die dominante CREB Abschaltung zeigt, dass vorhandene aktivierende Liganden nicht mehr ausreichen. Die Neurone sterben letztendlich, da keine pro-Überlebens Gene mehr exprimiert werden können, aber pro-Zelltod Gene (Dirnagl et al., 1999; Hardingham and Bading, 2010; Hossmann, 1994; Lee et al., 1999).

Die Glutamat Exzitotoxizität lässt sich aber nicht nur durch den allgemeinen Anstieg des intrazellulären *Ca<sup>2+</sup>-Levels* erklären. Eine anhaltende Aktivierung von *Ca<sup>2+</sup>-*

permeablen NMDARs führt zwar zum Zelltod, jedoch werden z.B. die erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Level durch Spannungs-abhängige Kanäle (z.B. L-Typ) toleriert (Sattler et al., 1998; Tymianski et al., 1993). Dies hat damit zu tun, dass das  $\text{Ca}^{2+}$  über NMDARs eher zur mitochondrialen Depolarisation und somit zur ROS Bildung führt (Peng and Greenamyre, 1998).

Der durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über NMDARs eingeleitete Zelltod lässt sich auch durch den am C-terminalen Ende hängenden Komplex aus verschiedenen zytoplasmatischen Proteinen erklären. Es wird vermutet, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über NMDARs direkt zur Aktivierung von C-terminalen Molekülen führt. Diese Moleküle erleichtern dann die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien (Hardingham and Bading, 2003).

Aber wie schon erwähnt spielt auch die UEs-Zusammensetzung der NMDARs eine Rolle. So bestehen extrasynaptische NMDARs aus NR1 und NR2B-UEs, während synaptische NMDARs auch die NR2A-UE beinhalten. Das extrasynaptische Abschalten von CREB kann nachweislich durch den spezifischen Block der NR2B-UE mittels Ifenprodil verhindert werden und somit der Glutamat induzierte Tod. Demnach ist die synaptische NR2A-UE für die CREB-Aktivierung und das neuronale Überleben verantwortlich (Hardingham et al., 2002).



Nature Reviews | Neuroscience

**Abb. 1.4: Entgegengesetzte Effekte von synaptischem und extrasynaptischem NMDARs auf die Expression von pro-Überlebens- und pro-Zelltod Genen.**

A) Durch den NMDAR-vermittelten  $Ca^{2+}$ -Einstrom kommt es zur Phosphorylierung von CREB an Ser133 über zwei Signalwege. Zum einen über den  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-abhängigen Kinase IV (CaMKIV) Signalweg (a) und zum anderen über den RAS-ERK1/2 Signalweg durch die *extracellular-signal-regulated* Kinase ERK1/2 und die Ribosomale-S6 Kinase (RAS) (b). Gleichzeitig wird über den CaMKIV Signalweg auch das CREB *binding-protein* (CBP) an Ser301 phosphoryliert (c). Erst dadurch wird der Coaktivator CBP zum Promotor rekrutiert und die Transkription aktiviert. Weiterhin ist für die CREB Aktivierung die Rekrutierung des *transducer of regulated CREB* (TORC) zum Nucleus notwendig (d). Dies geschieht über synaptische NMDARs durch die  $Ca^{2+}$ -abhängige Dephosphorylierung von TORC durch Calcineurin. Extrasynaptische NMDARs unterdrücken die CREB Aktivität durch Inhibition des RAS-ERK1/2 Signalweg (e). Zusätzlich führt die Translokation von *juxtasyntactic attractor of caldendrin on dendritic boutons protein* (Jacob) zum Nucleus zur Dephosphorylierung von CREB (f). CRE, *cAMP-response element*. B) Die Aktivierung synaptischer NMDARs hemmt die Aktivierung (FOXO) über den Akt Signalweg (a), während die Aktivierung extrasynaptischer NMDARs zur Translokation von FOXO1/FOXO3 zum Nucleus führt und somit zur Transkription von pro-Zelltod Genen (b). Die Aktivität von synaptischen NMDARs kann eine langanhaltende Blockierung auf die extrasynaptischen NMDAR Signale ausüben (c). Bim, *Bcl2-interacting mediator of cell death*; Fasl, *Fas ligand*; FBS, *FOXO binding site*; Pi, *inorganic phosphate*; PI3K, *phosphoinositide 3 kinase*; Txnip, *thioredoxin-interacting protein* (Hardingham and Bading, 2010)

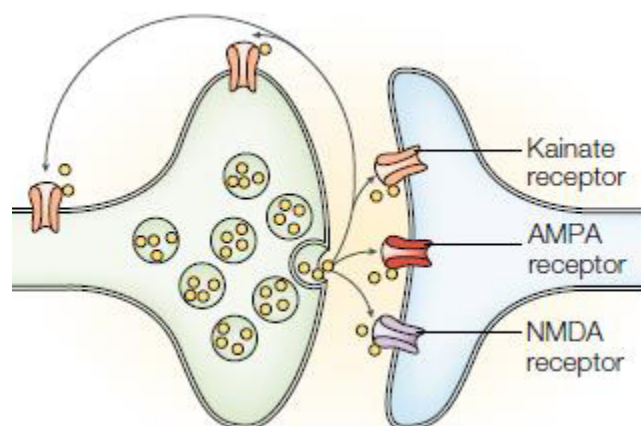
### 1.2.3 Non-NMDA Rezeptoren

Zu den non-NMDA Rezeptoren gehören die AMPARs und die KARs. Sie wurden den NMDARs gegenübergestellt, da viele Agonisten und Antagonisten mit AMPARs und KARs interagieren können, was die pharmakologische Unterscheidung erschwerte

(Lerma, 2003). Der erste Antagonist, der AMPARs von KARs unterscheiden konnte, war GYKI-53655 (Paternain et al., 1995). Dies ermöglichte unter anderem die Unterscheidung der Rollen von AMPARs und KARs in der synaptischen Physiologie (Lerma, 2003).

AMPARs sind für die schnelle exzitatorische, synaptische Transmission im ZNS verantwortlich, was entscheidend für die synaptische Plastizität des Gehirns ist (Hollmann and Heinemann, 1994; Ozawa et al., 1998; Seeburg, 1993). Die Topologie der AMPARs-UEs ist identisch zur Topologie der NMDARs und KARs. Native AMPARs bilden Heterotetramere aus vier homologen UEs: GluA1, GluA2, GluA3 und GluA4 (Abb. 1.3) (Hollmann and Heinemann, 1994; Seeburg, 1993; Sobolevsky et al., 2009). Die Untereinheitenstöchiometrie bedingt verschiedene Rezeptorsubtypen, die sich in einigen Eigenschaften unterscheiden. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der UEs liegt bei 68-74 %. Unterschiede sind unter anderem die Längen der C-Termini, was entscheidend für die Regulation der Rezeptorfunktion ist. Die meisten AMPARs besitzen die GluA2-UE und zeigen somit keine Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  (Song and Huganir, 2002).

KARs modulieren präsynaptisch die Transmitterausschüttung an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen (Abb. 1.5). Postsynaptisch haben sie ähnliche Funktionen wie auch AMPARs und NMDARs (Lerma, 2003). Die fünf bekannten KAR-UEs GluK1-GluK5 bilden Heterotetramere (Sobolevsky et al., 2009).



**Abb. 1.5: Prä- und postsynaptische Kainat Rezeptoren**

Am synaptischen Spalt ausgeschüttetes Glutamat aktiviert prä- und postsynaptisch lokalisierte KARs und postsynaptische AMPA- und NMDA Rezeptoren (Lerma, 2003).

#### **1.2.4 Die Rolle von Glutamatrezeptoren bei Glioblastomen**

Verschiedenste Ionenkanäle spielen bei der Migration, Invasion und Proliferation von Tumorzellen eine Rolle. 2001 zeigte Rzeski *et al.*, dass der NMDAR Antagonist Dizocilpin (MK-801) und der AMPAR Antagonist Gyki-52466 die Zellproliferation von verschiedenen Krebszellen inhibiert. Dazu gehören Zellen, die einen nicht neuronalen Ursprung haben wie Lungen-, Schilddrüsen-, Darm- und Brustkrebszellen, aber auch gliale und neuronale Tumorzellen wie Neuroblastome, Astrozytome und Medulloblastome/Rhabdomyosarcome. Die Rolle von iGluRs bei der Tumorzellmigration konnte mit spezifischen Antagonisten demonstriert werden. Dies zeigt, dass iGluRs in Vorgänge involviert sind, wie der Proliferation und Migration von Krebszellen (Cavalheiro and Olney, 2001). Es wurde gezeigt, dass Glioblastomzellen  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPARs exprimieren, die hauptsächlich aus GluR1 und/oder GluR4 assemblieren (Ishiuchi *et al.*, 2002). Die Umwandlung der  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen AMPARs zu  $\text{Ca}^{2+}$ -impermeablen AMPARs in humanen Glioblastomzellen führte zur Suppression der Zellmigration und induzierte sogar Apoptose bei den Tumorzellen (Ishiuchi *et al.*, 2002; Ishiuchi *et al.*, 2007). Die Permeabilität dieser Rezeptoren für  $\text{Ca}^{2+}$  scheint beim invasiven Wachstum eine entscheidende Rolle zu spielen (Ishiuchi *et al.*, 2002; Maas *et al.*, 2001). So wurde auch gezeigt, dass  $\text{Ca}^{2+}$  das Tumorstadium fördert (Meloni *et al.*, 1998) und bei der Zellteilung, Migration und dem Zellüberleben eine wichtige Rolle spielt (Cavalheiro and Olney, 2001).

Auch Stepulak zeigte, dass NMDAR-Antagonisten wie MK-801, aber auch AMPAR-Antagonisten das Wachstum humaner Tumore *in vitro* unterdrücken (Stepulak *et al.*, 2007; Stepulak *et al.*, 2005). 2009 zeigte Stepulak die Expression verschiedener iGluR-UEs bei verschiedenen humanen Tumorzelllinien. Unter anderem für die Glioblastomzelllinien U87-MG und U343. Die Funktionalität der iGluRs wurde jedoch nicht für beide Zelllinien gezeigt, aber für andere Tumorzellen. Schunemann zeigte 2010 einen Effekt von Glutamat auf die Zellproliferation bei U87-MG Glioblastomzellen. DNQX, ein AMPAR-Antagonist, konnte den Effekt umkehren und die Proliferation verringern, was ein Indiz für funktionelle AMPARs und deren Rolle bei der Zellproliferation sein könnte. 2012 wurde zum ersten Mal veröffentlicht, dass Glioblastom initiiierende Tumorzellen ein höheres Level an funktionellen  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen AMPARs exprimieren als ausdifferenzierte Tumore in Kultur ohne Stammzellen (Oh *et al.*, 2012).



Die Expression von NMDARs in Gliomzellen ist kontrovers. In vielen Gliomzelllinien und Patientenproben konnte die Expression der obligatorischen NR1-UE nicht nachgewiesen werden (Lyons et al., 2007), dennoch scheint die Expression funktioneller NMDARs mit der Malignität von Tumoren zu korrelieren. Die Inhibition von NDMARs konnte bei verschiedenen Xenograft Tumoren einen antitumoralen Effekt zeigen (Li and Hanahan, 2013).

### **1.3 Strahlenwirkung auf Glioblastomzellen**

90 % der GBM Patienten erleiden einen Rückfall in der Nähe des bestrahlten Gehirnareals nach einer postoperativen Strahlentherapie. Eine Erklärung dafür ist, dass subletale Strahlungsdosen die Migration und Invasion von Glioblastomzellen begünstigen. Die Zellen, die am Rand des Hohlraums sitzen, welcher durch das Entfernen des Tumors entstanden ist, wandern nach der Bestrahlung und bilden innerhalb von wenigen Monaten ein zweites Gliom aus. Dieser Effekt ist p53 unabhängig und beinhaltet die verstärkte Expression oder Aktivität von Integrinen, MMPs und einer veränderten Expression in der Bcl-2 Familie, was die Apoptoseresistenz von Glioblastomzellen begünstigt (Wild-Bode et al., 2001).

Strahlungs-induzierte DNA Schäden können Basenverluste, Basenmodifikationen und Einzelstrangbrüche (ESBs) sein, die durch die Basenexzisionsreparatur (BER) repariert werden können. Gefährlicher sind strahleninduzierte DNA Doppelstrangbrüche (DSBs), also zwei ESBs innerhalb von 10 Basenpaaren (bp) (Charlton and Humm, 1988; Nijjoo et al., 1997). Sie führen zum Zelltod, wenn sie nicht repariert werden. Solche Schäden werden von zwei Reparaturwegen repariert. Der Homologen Rekombination (HR) und dem *Non-Homologous-End-Joining* (NHEJ). Diese Schäden entstehen durch die ionisierende Wirkung von bestimmten Strahlenarten wie der Teilchen- oder Photonenstrahlung. Photone können die DNA direkt oder indirekt über die Radiolyse von Wasser und die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) schädigen.

Glioblastomzellen gelten als sehr strahlenresistent. Bestrahlung induziert zwar Schäden in der DNA von Glioblastomen, aber sie gehen auch bei erhöhten Strahlendosen keine Apoptose ein. Dies hängt unter anderem damit zusammen, dass Glioblastomzellen Mutationen in Apoptose Regulatoren wie dem Protein p53 tragen, aber auch verstärkte Überlebenssignalwege zeigen. Erhöhte Level an Überlebensfaktoren lassen die Zellen besser mit schädlichen Einflüssen umgehen

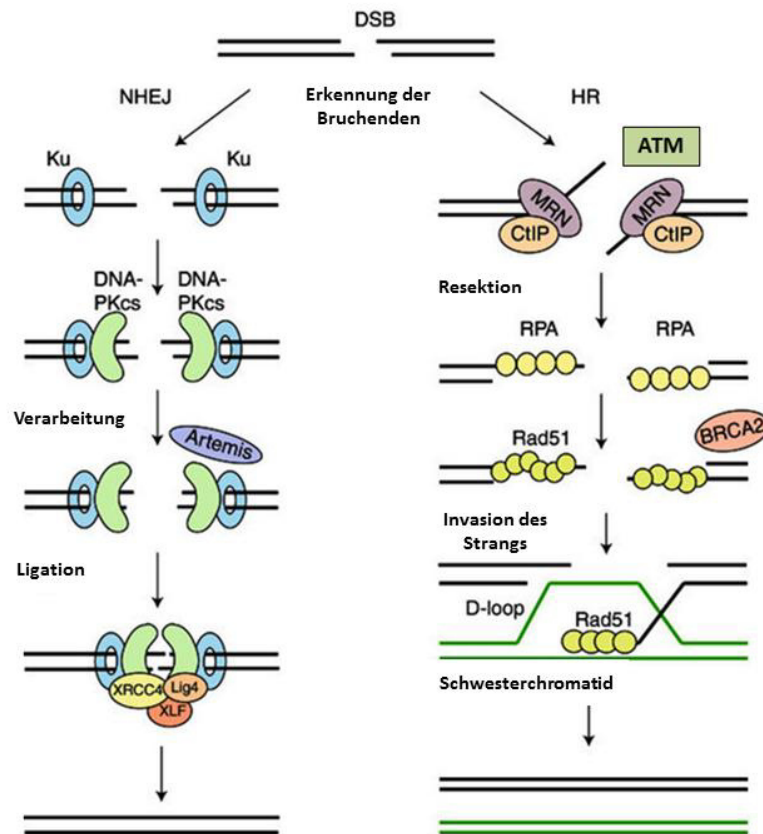
(Krakstad and Chekenya, 2010). Solche Überlebensfaktoren sind z.B. die Klasse IA Phosphatidylinositol- 3-Kinase (PI3Ks), Proteinkinase B (AKT) und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B), die zusammen zur Aktivierung von verschiedenen Genen führen, die für das Zellüberleben und die Proliferation wichtig sind (Krakstad and Chekenya, 2010).

### 1.3.1 DNA Reparatur von Glioblastomzellen

Aufgrund der Strahlenresistenz von Glioblastomzellen ist es entscheidend die DNA Reparaturwege dieser Zellen nach Bestrahlung im Vergleich zu gesunden Zellen zu verstehen, um Agenzien zu finden, die diese Tumorzellen sensitiver für Bestrahlung machen wie z.B. spezifische Inhibitoren von DNA Reparaturenzymen und Zellzyklus-Checkpoint Proteinen (Short et al., 2007).

Im Normalfall werden DSBs über zwei Wege repariert: der HR und dem NHEJ (Abb. 1.6). Bei der HR wird ein Schwesterchromatid benötigt, weshalb diese Form der Reparatur weniger anfällig für Fehler ist und nur während der S und G2 Phase möglich ist.

NHEJ läuft über die katalytische UE der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK<sub>cs</sub>) und wird überwiegend in der G1 Phase aktiv. Bei DNA Schäden wird im Normalfall zügig eine Vielzahl an Proteinen rekrutiert um eine effiziente DNA Reparatur und somit das Überleben der Zelle zu gewährleisten. Eine der ersten Reaktionen auf Bestrahlung ist die Phosphorylierung des Histons H2AX durch die Serin/Threonin-Proteinkinase *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) oder die Kinase DNA-PK<sub>cs</sub> (Fernandez-Capetillo et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass DSBs anhand des phosphorylierten Histons  $\gamma$ H2AX mittels Immunfluoreszenz visuell dargestellt werden können und die Anzahl sogenannter  $\gamma$ H2AX Foci mit dem Ausmaß des DNA Schadens korrelieren. Mit zunehmender Reparaturzeit nimmt die Anzahl an  $\gamma$ H2AX Foci ab. Ein Foci soll dabei einem DSB entsprechen (Fernandez-Capetillo et al., 2004; Polo and Jackson, 2011; Rogakou et al., 1999; Rogakou et al., 1998; Rothkamm and Lobrich, 2003; Sedelnikova et al., 2002). Rekrutiert werden dann Proteine wie ATM, der MRN Komplex und Rad51 bei HR und KU70/80 und DNA-PK<sub>cs</sub> bei NHEJ (Abb. 1.6) (Brandsma and Gent, 2012).

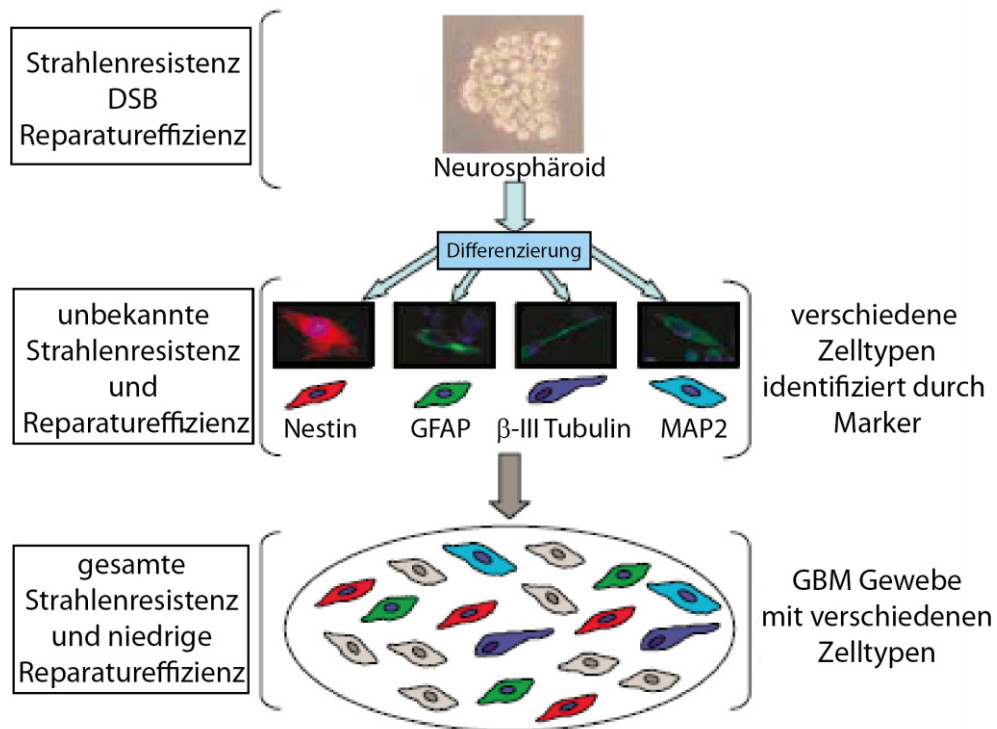


**Abb. 1.6: Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch NHEJ und HR**

Bei der NHEJ werden zuerst die DNA Enden durch das Ku70/80 Heterodimer erkannt, welches die DNA-PK<sub>cs</sub> rekrutiert. Bei inkompatiblen Enden schneidet die Nuklease Artemis die Enden passend. Der XRCC4-DNA Ligase IV-XLF Ligationskomplex dichtet den Bruch ab. Bei der HR erkennt ATM zusammen mit dem MRN-CtIP Komplex den Bruch. Der MRN-CtIP-Komplex beginnt die Resektion der Brüche um einzelsträngige DNA (ssDNA) zu bilden. Nach der Resektion wird die ssDNA sofort durch RPA bedeckt und anschließend durch Rad51 ersetzt mit der Hilfe von BRCA2. Die Rad51 Filamente vermitteln die Invasion des Strangs am homologen *template*. Die Verlängerung des D-loop und das Festhalten des zweiten Endes führt zur Reparatur. (verändert nach Brandsma and Gent, 2012)

Glioma Stammzellen, die zur Strahlenresistenz von Gliomen beitragen, haben eine bevorzugte Aktivierung der DNA-Schadensantwort und eine erhöhte DNA Reparaturkapazität (Bao et al., 2006). Bei einigen Glioblastomzelllinien wurde eine weniger effiziente DNA Reparatur festgestellt. Sie reparieren DSBs langsamer und uneffektiver als gesunde humane Astrozyten (Short et al., 2007), was sich mit dem hohen Level an Reparaturproteinen in erster Linie widersprechen mag. Gliomzellen haben z.B. ein hohes Level an Rad51, einem Reparaturprotein der HR (Raderschall et al., 2002), was mit dem mutierten *TP53* Gen zusammenhängt, da das Level an

Rad51 teilweise von *TP53* kontrolliert wird. Auch die Kinase DNA-PK<sub>cs</sub> wird in vielen Glioblastomzelllinien stark exprimiert (Fischer and Meese, 2007). Glioblastomzellen tragen oft eine Mutation im *TP53* Gen. Das Protein p53 hat eine Vielzahl an Funktionen, zu denen auch die Beteiligung an der DNA-Schadensantwort zählt, weshalb vermutet wird, dass eine Mutation dieses Gens für die Strahlenresistenz von Glioblastomzellen mitverantwortlich ist. Außerdem zeigen die *TP53* mutierten Gliomzellen keinen G1 Zellzyklus Checkpoint nach Bestrahlung, aber einen G2/M Checkpoint. Das bedeutet, dass die Zelle nur in der G2 Phase den Zellzyklusverlauf anhalten kann, um die Schäden zu reparieren bevor sie sich dann in die Mitose begibt (Short et al., 2007). Der strahlenresistente Phänotyp von Glioblastomzelllinien setzt also nicht notwendigerweise eine effiziente DSB Reparatur des Tumors voraus. Der genetische Hintergrund der Zellen muss berücksichtigt werden. GBM Stammzellen scheinen strahlenresistent zu sein und weisen eine effizientere Reparatur auf. Differenzieren diese GBM Stammzellen, so kann deren Strahlenresistenz und Reparatureffizienz variieren. Ein Glioblastom besteht wahrscheinlich aus verschiedenen dieser ausdifferenzierten GBM Zellen, die sich in ihrer Strahlenresistenz und in ihrer Reparatureffizienz unterscheiden (Abb. 1.7). Dennoch zeigt der gesamte Tumor eine allgemeine Strahlenresistenz, bei bisher vier untersuchten Glioblastomen aber auch eine niedrigere Reparatureffizienz (Fischer and Meese, 2007).

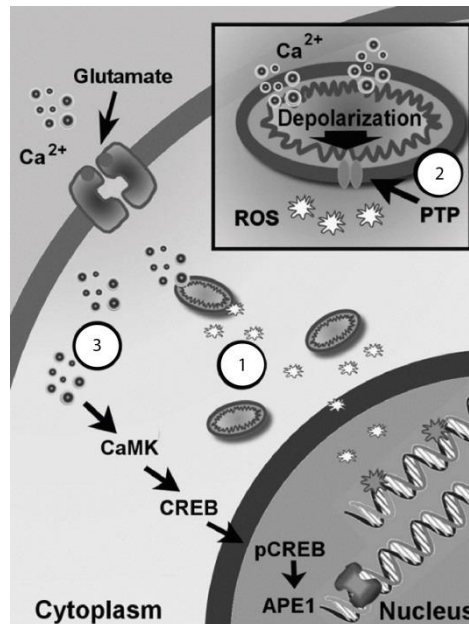


**Abb. 1.7: Strahlenresistenz und DNA Reparatureffizienz von Glioblastomzellen**

GBM Stammzellen, dargestellt als "Neurosphäroid" in Zellkultur, sind wahrscheinlich strahlenresistent und effizient in der DSB Reparatur. GBM Stammzellen können zu verschiedenen Zelltypen mit unbekannter Strahlenresistenz und DSB Reparatureffizienz differenzieren. Während sich die verschiedenen GBM Zelltypen in ihrer DSB Reparatureffizienz unterscheiden, zeigt der vollständige Tumor einen allumfassenden strahlenresistenten Phänotyp. (verändert nach Fischer and Meese, 2007)

### 1.3.2 Rolle der Glutamat Signalübertragung bei der DNA Reparatur

Glutamat kann in Neuronen DNA Schäden verursachen. Durch die Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -permeablen Rezeptoren durch Glutamat kommt es zur  $Ca^{2+}$ -abhängigen Depolarisierung der mitochondrialen Membran, wodurch DNA schädigende ROS entstehen. Neurone reparieren aber gleichzeitig Glutamat induzierte oxidative DNA Schäden effizient durch eine CREB-vermittelte Hochregulierung von *Apurinic Endonuclease 1* (APE1) (Abb. 1.8). APE1 ist ein DNA Reparaturprotein der Basenexzisionsreparatur (BER), die bei oxidativen DNA Schäden aktiv wird (Yang et al., 2011; Yang et al., 2010). Nach Erkennen des Schadens wird die fehlerhafte Nukleotidsequenz ausgeschnitten und durch korrekte Nukleotide ersetzt.



**Abb. 1.8: Erhöhung der APE1 Expression durch Glutamat induzierten oxidativen DNA Schaden in Neuronen**

Die GluR-Aktivierung durch physiologische Glutamat Konzentrationen hat eine Membrandepolarisierung und einen Ca<sup>2+</sup>-Influx in Neuronen zur Folge, was im Nucleus zu oxidativen DNA Schäden führt. Die DNA Schäden werden durch ROS aufgrund der Ca<sup>2+</sup>-vermittelten Membrandepolarisierung in den Mitochondrien verursacht (1 und 2). Parallel aktiviert der Ca<sup>2+</sup>-Influx die Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-abhängige Kinase (CaMK), was eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB zur Folge hat (3). Der aktivierte Transkriptionsfaktor pCREB mediiert eine Hochregulierung des BER Reparaturenzyms APE1 (Yang et al., 2011).

Martin et al. veröffentlichte 2013 einen weiteren Zusammenhang zwischen CREB und der DNA Reparatur. Er zeigte, dass die Phosphorylierung von CREB durch ATM nach Bestrahlung zur Runterregulierung der microRNA miR-335 führt, welche das Level an CtIP, einem DNA Reparaturprotein der HR, kontrolliert. Durch einen geringen Level an miR-335 liegt ein höheres Level an CtIP vor. CtIP spielt eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DSB, insbesondere bei der Initiation der Resektion der DNA Enden. Durch die Interaktion zwischen CtIP und dem MRN Komplex wird die DSB-Resektion durch die Endonukleaseaktivität von Mre11 im MRN-Komplex angeregt (Sartori et al., 2007). Schon 2004 wurde der Signaltransduktionsweg zwischen ATM und CREB beschrieben. ATM phosphoryliert dabei CREB nach ionisierender Bestrahlung oder anderem genotoxischem Stress (Shi et al., 2004).

#### **1.4 Zielsetzung dieser Arbeit**

Maligne Gliome setzen exzitotoxische Glutamat Konzentrationen frei und zeigen einen hohen Grad an invasivem Wachstum, sogar nach Bestrahlung. Patienten mit GBM leiden nach einer Strahlentherapie oft an einem Rückfall, was die hohe Strahlenresistenz zeigt, die auf eine verbesserte DNA Reparatur und anti-apoptotische Mechanismen zurückzuführen ist. Das freigesetzte Glutamat erreicht im peritumoralen Bereich exzitotoxische Konzentrationen, weshalb die Patienten oft epileptische Anfälle erleiden und auch durch neuronalen Zelltod eine Neurodegeneration aufweisen. Für den Tumor scheint das Glutamat eher einen Wachstumsfördernden Effekt zu haben.

In dieser Arbeit sollte zum einen die Rolle des glutamatergen Systems von Glioblastomzellen und zum anderen der Einfluss ionisierender Bestrahlung auf die Glutamat Signalübertragung untersucht werden.

Einer der ersten Schritte war die Expression funktioneller NMDA, AMPA- und Kainat Rezeptoren, die alle der Familie der iGluRs angehören, in verschiedenen Glioblastomzelllinien elektrophysiologisch nachzuweisen. Da die UE-Zusammensetzung von NMDARs entscheidend für Zellüberleben oder Zelltod sein kann, sollten auch verschiedene NMDAR-UEs untersucht werden. Hierzu diente der immunzytochemische Nachweis der Expression verschiedener NMDAR-UE in einer der iGluR-exprimierenden Zelllinien.

Da Glutamat in exzitotoxischen Mengen zum neuronalen Zelltod führt, sollte der Effekt hoher Glutamat Mengen auf die Viabilität der Glioblastomzellen mittels MTT-Assay beobachtet werden. Für die Untersuchung des Effekts von Glutamat auf das Zellüberleben bot sich der Koloniebildungsassay an.

Da Glutamat bekanntermaßen bei der neuronalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt, z.B. bei der Migration glutamaterger Neurone, wurde auch der Effekt von Glutamat auf die Zellmigration und Invasion von Glioblastomzellen untersucht.

Glutamat wirkt bei Glioblastomzellen als para- und autokrines Signal, da sie durch eine Überexpression des Cystin-Glutamat Austauschers enorme Mengen an Glutamat freisetzen. Aus diesem Grund wurde für die zu untersuchende Glioblastomzelllinie die Fähigkeit Glutamat auszuschütten untersucht.

Die Blockade der Glutamat Signalübertragung mittels spezifischen AMPAR- und NMDAR-Antagonisten sollte Aufschluss über die Rolle verschiedener iGluRs für die

Zellviabilität, Zellüberleben und Migration/Invasion von Glioblastomzellen geben. Um die Rolle verschiedener NMDAR-UEs zu identifizieren wurden spezifische Antagonisten für bestimmte UEs verwendet.

Auch die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  war ein Untersuchungspunkt, da NMDA- und AMPA Rezeptoren, bis auf einige Ausnahmen,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabel sind und  $\text{Ca}^{2+}$  als *second messenger* fungiert. Die Untersuchung erfolgte mittels eines Calcium-Chelators.

Nachdem der Einfluss von Glutamat auf Glioblastomzellen untersucht wurde, sollte der Einfluss ionisierender Bestrahlung ermittelt werden. Im Genaueren, ob IR einen Einfluss auf die Glutamatfreisetzung, Zellviabilität und Überleben, sowie die Migration/Invasion hat. Danach sollte die Untersuchung der DNA-Schadensantwort (DDR) nach klinisch relevanten Strahlendosen ionisierender Bestrahlung (IR) und nach Applikation von Glutamat, iGluR-Antagonisten und einem Calcium-Chelator die Frage klären, ob  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable iGluRs an der DDR beteiligt sind. Strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) wurden mittels Immunfluoreszenz des phosphorylierten Histons H2AX ( $\gamma\text{H2AX}$ ) visualisiert und durch Auszählung am Mikroskop quantifiziert. Mittels Zellzyklus-Analyse konnte der Einfluss von Glutamat auf Zellzykluskontrollpunkte geklärt werden. Für die Aufklärung des Mechanismus empfiehlt sich die Inhibition der Glutamat-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen CREB Aktivität.

Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen in erster Linie der Identifizierung der Rolle des glutamatergen Systems für Glioblastomzellen. Zweitens sollte geklärt werden, welchen Einfluss ionisierende Bestrahlung (IR) auf Glioblastomzellen hat und drittens, ob iGluR-Antagonisten die DNA-Reparatur und zusätzlich die Migration/Invasion von Glioblastomzellen nach Bestrahlung beeinträchtigen können und somit eine neue Optimierung therapeutischer Eingriffe darstellen.



## 2 Materialien

### 2.1 Substanzen zur Behandlung von Zellen

S-AMPA	100 µM in externer Lösung, Tocris
Bapta-AM	5 mM in DMSO, Tocris
Glyzin	1 M in ddH <sub>2</sub> O, Roth
Ifenprodil	5 mM in ddH <sub>2</sub> O, Tocris
L-Glutaminsäure Mononatriumsalz	1 M in ddH <sub>2</sub> O, Sigma-Aldrich
Kainsäure (Kainat)	100 µM in externer Lösung, Tocris
KG-501	25 mM in ddH <sub>2</sub> O, Sigma-Aldrich
Memantin-Hydrochlorid	25 mM in ddH <sub>2</sub> O, Tocris
MK-801	25 mM in ddH <sub>2</sub> O, Tocris
NBQX	5 mM in DMSO, Tocris
NMDA	100 µM in externer Lösung, Tocris
Gyki-52466	5 mM in DMSO, Tocris

### 2.2 Antikörper

#### 2.2.1 Primärantikörper

Mouse-anti-BrdU-FITC (monoklonal IgG)	BD Pharmingen
Rabbit-anti-pCREB (Ser133) (WB 1:500) (monoklonal IgG)	Cell Signaling
Mouse-anti-γH2AX (Ser139) (IF 1:1000, WB 1:500) (monoklonal IgG)	Millipore
Rabbit-anti-NMDAR1 (IF 1:50) (monoklonal IgG)	Cell Signaling
Rabbit-anti-GluN2A (IF 1:200) (polyklonal IgG)	Millipore
Mouse-anti-NR2B (1:200) (monoklonal IgG)	StressMarq

Mouse-anti- $\beta$ -Aktin (1:10000) (monoklonal IgG)	Sigma-Aldrich
Rabbit-anti-GAPDH (1:2000) (polyklonal IgG)	Santa Cruz

### 2.2.2 Sekundärantikörper

Goat Anti-Mouse IgG-HRP	Chemicon
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz
Goat Anti-Mouse Alexa 488	Santa Cruz
Goat Anti-Rabbit Alexa 546	Invitrogen
Goat-Anti-Rabbit Alexa 488	Santa Cruz

### 2.3 Längenstandard

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder #SM1811	Fermentas
--	-----------

### 2.4 Chemikalien

Agarose	Applichem
APS	Sigma-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich
CaCl <sub>2</sub>	Roth
BrdU	BD Bioscience
Bromphenolblau	Roth
BSA	Roth
DAPI	Sigma
DOC	Sigma-Aldrich
D-Glucose-Monohydrat	AppliChem
DMSO	Sigma-Aldrich
DTT	Sigma-Aldrich
DMEM	Sigma-Aldrich
EdU	Invitrogen
Essigsäure	Roth

## Materialien

---

Ethanol	Roth
Ethanol, vergällt	Chemielager der TU Darmstadt
EDTA	Roth
EGTA	NeoLab Migge Laborbedarf
FBS	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hepes	Roth
Isopropanol	Sigma-Aldrich
KCl	Roth
KF	Roth
Kristallviolett	AppliChem
Magermilchpulver	Roth
Matrigel	BD Bioscience
MgCl <sub>2</sub>	Roth
Methanol	Roth
Mowiol	Roth
NaCl	Roth
Opti-MEM	Gibco
PBS (10x)	Sigma
Penicillin-Streptomycin	Sigma
PFA	Roth
RNAseA	Sigma
Rothiphorese Gel 30	Roth
SDS	Roth
TEMED	Roth
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Trypsin	Sigma
Tween-20	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

## 2.5 Zelllinien

LN-229: humane Glioblastomzellen, entnommen 1979 aus einer 60-jährigen weißen Patientin mit einem rechts frontalen parieto-occipitalen Glioblastom. Die Zellen weisen eine Mutation im p53 Protein auf und eine homozygote Deletion im p16 und p14ARF kodierenden Tumor-Suppressor Gen auf. Die Kultivierung der Zellen findet in DMEM mit L-Glutamin, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin statt. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Franz Rödel, Universitätsklinik Frankfurt.

T98-G: humane Glioblastomzellen, entnommen aus einem 61-jährigen Weißen, kaukasischem Ursprungs. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Edinger-Institut, Frankfurt.

U-87 MG: humane Glioblastomzellen, entnommen aus einer 44-jährigen weiblichen Kaukasierin. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Edinger-Institut, Frankfurt.

LN-428: Glioblastomzelllinie mit Mutationen im p53 Protein und Deletionen in p16 und p14ARF. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Edinger-Institut, Frankfurt.

## 2.6 Lösungen, Puffer und Medien

### Zellkultur

Trypsin/EDTA:

0,05 % Trypsin  
0,5 mM EDTA in PBS

### Zellaufschluss

Zelllysepuffer:

150 mM NaCl  
0,5 % Triton X-100  
0,5 % DOC  
50 mM Tris (pH7.5)  
complete Protease-Inhibitoren-Cocktail, Roche  
Diagnostics



### **FACS-Analyse**

Permeabilitätslösung:

0,25 % Triton X-100 in PBS

Blockierlösung:

1 % BSA in PBS

PI-Lösung:

0,05 mg / ml Propidiumiodid  
0,5 mg / ml RNase A  
ad. PBS

### **Immunfluoreszenz**

Fixierlösung:

2,5 % Formaldehyd in PBS

Permeabilitätslösung:

0,25 % TritonX-100  
1 % FCS in PBS

Blockierlösung:

5 % BSA  
1 % FCS in PBS

Waschlösung :

1 % FCS in PBS

DAPI-Lösung:

0,2 µg DAPI/ml PBS

### **Port-a-patch**

Intrazelluläre Kalium Lösung:

50 mM KCL (pH 7,2)  
10 mM NaCL  
60 mM K-Fluoride  
20 mM EGTA  
10 mM Hepes  
284 mOsmol

Extrazelluläre Lösung:

4 mM KCL (pH 7,4)  
140 mM NaCL  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
2 mM CaCl<sub>2</sub>  
5 mM D-Glucose monohydrate  
10 mM Hepes  
297 mOsmol

Seal Enhancer Lösung:

3 mM KCL (pH 7,4)  
80 mM NaCL  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
35 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM Hepes  
298 mOsmol

## 2.7 Verbrauchsmaterialien

Cell culture insert 24	Ibidi
Cell culture insert, 24 Löcher (8µm)	BD Bioscience
Companion plate, 24 Löcher	BD Bioscience
Deckgläser, 12x12mm	Roth
Filterpapier	Whatman
µ-slide VI 0.1	Ibidi
Nitrilhandschuhe	Starlab
Objektträger superfrost	Roth
Pasteurpipetten, Glas	Hartenstein
Pasteurpipetten, Kunststoff	Sarsted
Pipettenspitzen	Starlab
Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5 ml, 2 ml	Starlab
Rundbodenröhrchen für FACS	BD Bioscience
Sterilfilter (0,2 µm)	Nalgene
Transfermembranen	Sigma, Whatman Nitrocellulose BioRad, Transblot Turbo Transfer Pack Mini, NC und PVDF
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Sarsted
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Sarsted
Zellkulturschalen 100x20 mm	Sarsted
Zellkulturschalen 35x10 mm	Sarsted
Zellkulturschalen 60x10 mm	Sarsted
Zellkulturplatten, 24 Löcher	Starlab
Zellkulturplatten, 96 Löcher	Starlab
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Starlab

## 2.8 Geräte

Chemilumineszenz-Detektionsgerät	BioRad, ChemiDoc MP
Durchflusszytometer	Becton Dickinson, FACScan
Gelapparatur Mini-Gele	Bio-Rad, Mini-Protean® 3 System
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axio Observer.Z1
Kamerasystem	Zeiss AxioCam MRm
Inkubator	Heraeus, Hera cell 240
Inversmikroskop (Zellkultur)	Will Wetzlar, Wilovert
Plattenlesegerät	Tecan, infinite M200
Power Supply	Bio-Rad, Power Pac 300
Patch Clamp Setup	Nanion Technologies GmbH, Port-a-Patch NPC-1
Rotator	Roth
Sonifikator	
Sterilbank	BDK
Stickstofftank	Thermolyne, Locator 8+
Thermomixer	Eppendorf, Thermomixer compact
Tiefkühlschränke (-20°)	Gram
Tiefkühlschränke (-80°C)	Heraeus, Hera freeze
Tischzentrifuge	Roth
Vortex	Heidolph Instruments
Waagen	Sartorius AG
Wasserbad	Memmert
Western Blot-Apparatur	Bio-Rad, Trans-Blot®SD, Semi-Dry Transfer Cell
Zählkammer	Marienfeld, Neubauer
Zentrifugen	Heraeus, Fresco 21 Heraeus, Multifuge 3S-R



## 2.9 Kits

BCA Assay	Pierce Thermo Fisher Scientific
Click-iT EdU Alexa Fluor 549	Invitrogen, Molecular Probes
ECL Western Blotting Substrate	Pierce Thermo Fisher Scientific
Glutamate Assay Kit	Abnova

## 2.10 Software

CXP, Beckman Coulter	Durchflusszytometrische Messung und Auswertung
Image J	Bildbearbeitung und Quantifizierung
Image Lab, Bio-Rad	Dokumentation von Blots und Quantifizierung
Micro-Manager 1.4	Mikroskopische Aufnahmen
Microsoft Office 2010	Textverarbeitung, Tabellenkalkulation
PatchControl HEKA Electronics	Port-a-patch
PatchMaster, HEKA Electronics	Port-a-patch
ScanJ	Mikroskopische Aufnahmen, Analyse und Relokierung

### 3 Methoden

#### 3.1 Zellbiologische Methoden

##### 3.1.1 Auftauen von humanen Zelllinien

Ein Cryoröhrchen mit tiefgefrorenen Zellen wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, mit 1 ml Medium resuspendiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Weitere 9 ml Medium wurden in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach vollständigem Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 1 ml Medium resuspendiert, in eine kleine Zellkulturflasche mit 4 ml Medium überführt und wie in 3.1.2 beschrieben kultiviert.

##### 3.1.2 Kultivierung von humanen Zelllinien

###### 3.1.2.1 Passagieren von humanen Zelllinien

Lagen die Zellen nach 3-4 Tagen Wachstum 90 % konfluent vor wurde das konditionierte Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA für 3-5 min bei 37°C abgelöst. Um den Trypsinierungsvorgang zu stoppen wurden die abgelösten Zellen mit 8 ml frischem Medium resuspendiert. Nach der Vereinzelnung der Zellen wurden die Zellen 1:10 passagiert.

###### 3.1.2.2 Zellzahlbestimmung

Nach der Vereinzelnung wie in 3.1.2.1 beschrieben wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und auf die Neubauer-Zählkammer gegeben. Anschließend konnten unter dem Lichtmikroskop 4 Großquadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt werden. Nach Berechnung des Mittelwerts der Großquadrate wurde mit folgender Formel die Anzahl der Zellen pro ml berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Mittelwert pro Großquadrat}}{\text{Fläche x Tiefe}} \times 1000$$

$$\text{Fläche} = 1 \text{ mm}^2$$

$$\text{Tiefe} = 0,1 \text{ mm}$$

### 3.1.2.3 Aussäen der humanen Zelllinien

Für die Experimente wurden unterschiedliche Kultivierungsbehälter verwendet. Die Zellzahl musste somit an die verschiedenen Flächengrößen angepasst werden. Für den MTT- und Glutamat-Assay wurden 96-Loch-Platten, für den Invasions- und Migrations Assay 24-Loch-Platten, für die immunologischen Versuche und die FACS-Analyse 6 cm Zellkulturschalen und für Western Blot 10 cm Zellkulturschalen verwendet. In der folgenden Tabelle (Tab.1) sind die Zellzahlen mit den entsprechenden Volumina Medium angegeben.

Tab. 3.1: Zellzahlen zum Aussäen in 96-Loch-, 24-Loch-Platten, 6 cm- und 10 cm Zellkulturschalen

	96 well Platte	24 well Platte	6 cm Schale	10 mm Schale
Zellzahl	$4 \times 10^3$	$2 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$
Volumen	0,1 ml	0,5 ml	2 ml	10ml

### 3.1.3 Röntgenbestrahlung

Die ionisierende Bestrahlung (IR) der Glioblastomzellen erfolgte mit einer Röntgenröhre mit Wolfram-Anode der Firma Philips bei einem Strom von 19 mA und einer Spannung von 90 kV. Die Filterung wurde durch eine 1mm dicke Aluminiumplatte gewährleistet, auf der sich die Proben bei einem Abstand von 30 cm zur Bestrahlungsquelle befanden. Die Dosisleistung betrug dabei 1,96 Gy/min, welche durch Dosimetrie-Messungen (Fricke) regelmäßig kontrolliert wurde. Die Bestrahlungsproben waren zum einen Zellen in Plastik-Zellkulturflaschen und zum anderen Zellen auf Glas-Deckgläschen, wodurch Sekundärelektronen entstehen, welche die Zellen doppelt schädigen. Dies kann jedoch nicht von Dosimetern erfasst werden, weshalb man die applizierte Dosis bei Verwendung von Glas halbiert, um so zwischen auf Glas und Plastik wachsenden Zellen vergleichen zu können.

### **3.1.4 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen**

#### **3.1.4.1 Thymidin-Analogon zur Markierung von S-Phase Zellen**

BrdU oder EdU wird während der Replikation anstelle der Base Thymidin in die DNA eingebaut. Dies wird sich zu Nutze gemacht, um eine Zellpopulation zu markieren und zu verfolgen. Eine einstündige Pulsmarkierung ermöglicht die Detektion von S-Phase Zellen. Durch spezifische Antikörper für BrdU/EdU können die Zellen via Fluoreszenzdetektion analysiert werden.

##### **3.1.4.1.1 BrdU**

Die Zellen wurden nach 3 Tagen Kultivierung mit 10  $\mu\text{M}$  BrdU für 1 h inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

##### **3.1.4.1.2 EdU**

Die Zellen wurden nach 3 Tagen Kultivierung mit 10  $\mu\text{M}$  EdU für 1 h inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

#### **3.1.4.2 Agonisten zur Aktivierung von Glutamatrezeptoren**

##### **3.1.4.2.1 Glutamat und Glyzin**

Glutamat und Glyzin sind wichtige Aminosäuren zur Aktivierung von Glutamat Rezeptoren. Von beiden Substanzen wurden je 1M Stammlösungen angesetzt. Gelöst wurden die beiden Agonisten in  $\text{H}_2\text{O}$  und steril filtriert. Die Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 10 mM Glutamat und 10  $\mu\text{M}$  Glyzin in Medium behandelt. Die Zellen wurden direkt nach Behandlung mit Glutamat und Glyzin wie in 3.1.3 beschrieben bestrahlt. Die Behandlung mit beiden Agonisten dauerte in der Regel mehrere Stunden oder Tage.

Für die elektrophysiologischen Messungen wurden eine Lösung mit 100  $\mu\text{M}$  Glutamat und 10  $\mu\text{M}$  Glyzin in Externer Lösung angesetzt.

#### **3.1.4.2.2 NMDA**

NMDA ist ein spezifischer Agonist für NMDA-Rezeptoren. Für die elektrophysiologischen Messungen am Port-a-Patch System wurde eine Lösung mit 100  $\mu$ M NMDA und 10  $\mu$ M Glyzin in Externer Lösung angesetzt.

#### **3.1.4.2.3 AMPA**

AMPA ist ein spezifischer Agonist für AMPA-Rezeptoren. Für die elektrophysiologischen Messungen am Port-a-Patch System wurde eine Lösung mit 100  $\mu$ M AMPA in Externer Lösung angesetzt.

#### **3.1.4.2.4 Kainsäure**

KA ist ein spezifischer Agonist für Kainat-Rezeptoren. Für die elektrophysiologischen Messungen am Port-a-Patch System wurde eine Lösung mit 100  $\mu$ M KA in Externer Lösung angesetzt.

### **3.1.4.3 Antagonisten zur Inhibition von Glutamatrezeptoren**

#### **3.1.4.3.1 Ifenprodil**

Threo Ifenprodil Hemitartrat, kurz Ifenprodil, ist ein nicht-kompetitiver NR2B Untereinheiten-selektiver NMDA Rezeptor Antagonist. Es wurde eine 5 mM Stammlösung mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und steril filtriert. Behandelt wurden die Zellen mit 25  $\mu$ M Ifenprodil in Medium. Die Zellen wurden direkt nach Behandlung wie in 3.1.3 beschrieben bestrahlt. Die Behandlung mit Ifenprodil dauerte in der Regel mehrere Stunden oder Tage und Glutamat und Glyzin wurden gleichzeitig hinzugegeben (3.1.4.2.1).

Für die elektrophysiologischen Messungen am Port-a-Patch System wurde eine Lösung mit 100  $\mu$ M Ifenprodil in Externer Lösung angesetzt. Die Zellen wurden dabei mit 100  $\mu$ M NMDA für 2 sec vorappliziert.

#### **3.1.4.3.2 Memantin Hydrochlorid**

Memantin Hydrochlorid ist ein NMDA-Rezeptor-Antagonist, der als Kanalblocker wirkt. Hiervon wurde eine 25 mM Stammlösung mit H<sub>2</sub>O angesetzt und steril filtriert. Behandelt wurden die Zellen mit 100  $\mu$ M Memantin hydrochlorid in Medium. Die Zellen wurden direkt nach Behandlung wie in 3.1.3 beschrieben bestrahlt. Die

Behandlung mit Memantin hydrochlorid dauerte in der Regel mehrere Stunden oder Tage und Glutamat und Glyzin wurden gleichzeitig hinzugegeben (3.1.4.2.1).

#### **3.1.4.3.3 MK-801**

MK-801 ist ein NMDA Rezeptor spezifischer Kanalblocker. Es wurde mit MK-801 eine 25 mM Stammlösung mit H<sub>2</sub>O angesetzt und steril filtriert. Behandelt wurden die Zellen mit 10 µM MK-801 in Medium. Die Zellen wurden direkt nach Behandlung wie in 3.1.3 beschrieben bestrahlt. Die Behandlung mit MK-801 dauerte in der Regel mehrere Stunden oder Tage und Glutamat und Glyzin wurden gleichzeitig hinzugegeben (3.1.4.2.1).

#### **3.1.4.3.4 NBQX**

NBQX ist ein kompetitiver AMPA Rezeptor-Antagonist. Es wurde mit NBQX eine 5 mM Stammlösung mit DMSO angesetzt und steril filtriert. Behandelt wurden die Zellen mit 10 µM NBQX in Medium. Die Zellen wurden direkt nach Behandlung wie in 3.1.3 beschrieben bestrahlt. Die Behandlung mit NBQX dauerte in der Regel mehrere Stunden und Glutamat und Glyzin wurden gleichzeitig hinzugegeben (3.1.4.2.1).

#### **3.1.4.3.5 Gyki-52466**

Gyki-52466 ist ein nicht-kompetitiver AMPA Rezeptor-Antagonist. Es wurde eine 5 mM Stammlösung mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und steril filtriert. Behandelt wurden die Zellen mit 10 µM Gyki-52466 in Medium. Die Zellen wurden direkt nach Behandlung wie in 3.1.3 beschrieben bestrahlt. Die Behandlung mit Gyki-52466 dauerte in der Regel mehrere Stunden oder Tage und Glutamat und Glyzin wurden gleichzeitig hinzugegeben (3.1.4.2.1).

### **3.1.4.4 Calcium-Chelator**

#### **3.1.4.4.1 Bapta-AM**

Der Calcium-Chelator Bapta-AM ist zellpermeabel und chelatiert intrazelluläres Calcium von Zellen. Es wurde eine 5 mM Stammlösung mit DMSO angesetzt und steril filtriert. Behandelt wurden die Zellen mit 3 µM Bapta-AM in Medium. Die Zellen wurden direkt nach Behandlung wie in 3.1.3 beschrieben bestrahlt. Die Behandlung

mit Bapta-AM dauerte in der Regel mehrere Stunden oder Tage und Glutamat und Glyzin wurden gleichzeitig hinzugegeben (3.1.4.2.1).

### **3.1.4.5 pCREB Inhibitor**

#### **3.1.4.5.1 KG-501**

KG-501 verhindert die cAMP-induzierte CREB-abhängige Gentranskription durch Verhindern der Bindung zwischen KID Domäne von CREB und der KIX Domäne von CBP. Es wurde eine 25 mM Stocklösung mit H<sub>2</sub>O angesetzt und steril filtriert. Behandelt wurden die Zellen mit 25 µM KG-501 in Medium. Die Zellen wurden direkt nach einer einstündigen Vorbehandlung bestrahlt (3.1.3) und ebenfalls mit Glutamat und Glyzin (3.1.4.2.1) behandelt. Die Behandlung mit KG-501 dauerte in der Regel mehrere Stunden.

### **3.1.5 Durchflusszytometrische Methoden**

Die Durchflusszytometrie wurde zur Untersuchung des G2/M-Checkpoints und des Zellzyklusverlaufs verwendet. Dazu wurden exponentiell wachsende Zellen in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert.

#### **3.1.5.1 Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie**

Die BrdU-markierten Zellen wurden nach verschiedenen Reparaturzeiten (0,5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 10 h) trypsinisiert, in 3 ml Medium aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Nach der 10-minütigen Zentrifugation bei 400 x g und 4°C wurden die Zellen in 2 ml PBS gewaschen und mit Hilfe des Vortexers resuspendiert. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen durch tropfenweises Pipettieren von 2 ml eiskaltem 70 % EtOH auf dem Vortexer fixiert. Die fixierten Proben konnten bei -20°C bis zur Färbung aufbewahrt werden.

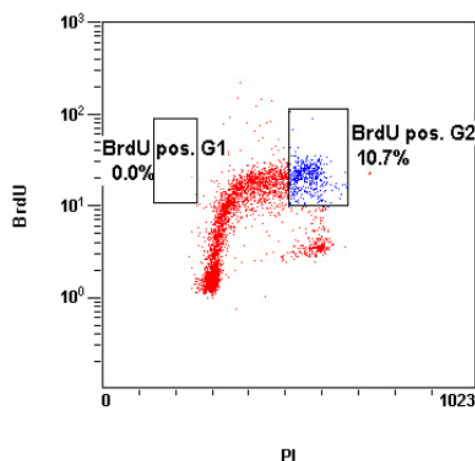
#### **3.1.5.2 Propidiumiodid-Färbung**

Vor der Färbung wurden die Zellen zentrifugiert (400 x g, 10 min, 4°C) und in 2 ml PBS gewaschen. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet mit 1 ml 2 M HCl/PBS resuspendiert. Nach 20 min Inkubationszeit wurde 1 ml PBS-1 % FCS beigefügt und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl 0,1 M Natrium-Tetraborat, pH 8,5 resuspendiert, 2 min inkubiert und anschließend 1 ml PBS-1 %

FCS dazugegeben. Nach Zentrifugation der Zellen wird das Zellpellet in 20  $\mu$ l anti-BrdU-FITC-Antikörperlösung resuspendiert und 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde 1 ml PBS-1 % FCS dazu pipettiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit 500  $\mu$ l PI-Lösung versetzt und resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT konnten die Zellen am Durchflusszytometer gemessen werden.

### 3.1.5.3 Messung am Durchflusszytometer

Zur Messung der Proben wurde das Beckman Coulter FC500 Durchflusszytometer verwendet und mit Hilfe des firmeneigenen Programms CXP ausgewertet. Durch das Interkalieren des BrdUs in die DNA während der S-Phase und der Färbung der gesamten DNA durch PI können mit Hilfe eines *Dot-Plots* die BrdU-positiven Zellen von den BrdU-negativen Zellen unterschieden werden und somit die Zellzyklusphase, in der sie sich befinden, bestimmt werden. Hierzu wird die Fluoreszenzintensität von BrdU (FITC-Kanal, logarithmisch) gegen die von PI (linear) aufgetragen (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Zellzyklusverteilung nach 60-minütiger Pulsmarkierung mit BrdU und Färbung mit PI.**

Zweidimensionaler *Dot-Plot* der BrdU-Intensität (y-Achse) gegen die PI-Intensität (x-Achse) von Zellen.

### 3.1.6 Immunologische Methoden

Durch immunologische Färbungen wurde das Reparaturverhalten von S und G2-Phase Zellen untersucht. Die auf Deckgläschen wachsenden Zellen wurden, wie in 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben, behandelt und bestrahlt.



### **3.1.6.1 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen**

Nach entsprechender Reparaturzeit wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit 4 % PFA/PBS fixiert. Danach folgten drei Waschschriffe mit PBS für je 10 min und die Permeabilisierung durch Zugabe von 0,5 % TritonX-100/PBS für 15 min. Nach drei weiteren Waschschriffen mit PBS folgte die Blockierung über Nacht oder länger bei 4°C mit 5 % BSA/1 % FCS/PBS.

### **3.1.6.2 EdU/ $\gamma$ H2AX-Färbung**

Für die EdU-Detektion wird zunächst eine Reaktionslösung nach Protokoll des EdU Click-iT Reaction Kits (594) der Firma Invitrogen zusammengestellt. Hierzu werden pro Deckgläschen 40  $\mu$ l angesetzt.

#### **Reaktionslösung:**

34,4  $\mu$ l Komponente **D** (Reaktionspuffer)

1,6  $\mu$ l Komponente **E** (CuSO<sub>4</sub>)

0,09  $\mu$ l Komponente **B** (Alexa)

4  $\mu$ l Komponente **F** (1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt)

Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Deckgläschen dreimal 10 min mit 1 % FCS/0,1 % Tween/PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Primärantikörperlösung (Mouse Anti- $\gamma$ H2AX(Ser139) 1:1000) über Nacht bei 4°C. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen dreimal mit 1 % FCS/0,1 % Tween/PBS für je 10 min gewaschen. Danach erfolgte die lichtgeschützte Inkubation mit der Zweitantikörperlösung (Goat Anti-Mouse Alexa Fluor 488, 1:800) für 1 h bei RT. Nach weiteren Waschschriffen mit PBS für je 10 min wurde die DNA 5 min mit DAPI (0,4  $\mu$ g/ml in PBS) gefärbt. Das Eindeckeln der Glas-Deckelchen mit 10  $\mu$ l Mowiol erfolgte nach einem kurzen Waschschriff mit PBS. Nachdem das Mowiol getrocknet war konnten die Objektträger mit den gefärbten Zellen bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop bei 4°C gelagert werden. Für die Aufnahme und Auswertung der immunologischen Färbung wurden die Programme Micro-Manager 1.4 und ScanJ verwendet.

### **3.1.6.3 Auswertung der immunologischen Methoden**

Die gefärbten Zellen auf den Deckgläschen wurden mit Hilfe des Programms ScanJ bei 1000facher Vergrößerung eingescannt. Hierzu wurden Bilder mit dem DAPI- und Texas Red Kanal aufgenommen. In einem *Dot Plot* wurde die EdU (Texas Red)-Intensität gegen die DAPI-Intensität aufgetragen. So wurde die Unterscheidung von EdU-positiven und EdU-negativen Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen gewährleistet. Die EdU-positiven S- und G2-Phase Zellen konnten in der Zellzyklusverteilung markiert werden, sodass durch Relokierung der markierten Zellen eine quantitative Auszählung der  $\gamma$ H2AX foci von EdU-positiven S- und G2-Phase Zellen erfolgen konnte. Die Auszählung von 40-50 Zellen pro Versuch erfolgte dabei manuell bei 1000facher Vergrößerung.

### **3.1.7 Proteinanalytische Methoden**

#### **3.1.7.1 Zelllyse**

Nach Behandlungszeit wurden die Zellkulturschalen auf Eis platziert und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l Zelllysispuffer versetzt, mit einem Zellschaber abgeschabt und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend folgte die Sonifikation der Proben für 30 sec. Die Lysate wurden 10 min bei 13.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand bei – 80°C gelagert.

#### **3.1.7.2 BCA Proteinbestimmung**

Zur kolorimetrischen Bestimmung von Gesamtprotein mittels BCA wurde das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce verwendet und nach Protokoll des Hersteller durchgeführt. Bei dieser Methode wird  $\text{Cu}^{+2}$  zu  $\text{Cu}^{+1}$  durch Proteine in alkalischem Medium reduziert. Durch Chelatierung von zwei BCA Molekülen mit einem dieser Kupferionen kommt es zum Farbumschlag. Die Absorption dieses Komplexes kann bei 562 nm gemessen werden und steigt mit zunehmender Proteinkonzentration linear an.

#### **3.1.7.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Masse wird durch das anionische Detergenz SDS ermöglicht, welches in einem bestimmten Verhältnis an die Proteine bindet und deren Tertiär- und Quatiärstruktur zerstört. Durch seine negative Ladung

überdeckt SDS die Eigenladung der Proteinuntereinheiten. Durch das gleiche Masse-Ladungsverhältnis aller Proteine können sie dann im elektrischen Feld nach der Größe aufgetrennt werden. Das als Trägermatrix verwendete Polyacrylamidgel setzt sich aus Sammel- und Trenngel zusammen. Zur Detektion von kleinen Proteinen wurde ein Trenngel mit höherem Anteil an Acrylamid gegossen. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 3.2 dargestellt. Die verwendeten Puffer wurden in Kapitel 2.6 erwähnt.

Während der Polymerisation wird Acrylamid zu Polyacrylamid. APS dient dabei als Radikalstarter für die Polymerisation von Acrylamid. TEMED dient als zusätzlicher Katalysator, indem es die Radikalbildung von APS erleichtert. Die Überschichtung des frisch gegossenen Gels mit Isopropanol verhindert den Kontakt mit Sauerstoff, das den Polymerisationsvorgang verhindern würde. Die fertigen Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingebaut und diese mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Die Zellysate (3.1.7.2) wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Nach Auftragen des Proteinstandards lief die elektrophoretische Auftrennung der Proteine für 2 h bei 100 V.

**Tab. 3.2: Zusammensetzung für ein 14 % Trenn- und 4 % Sammelgel**

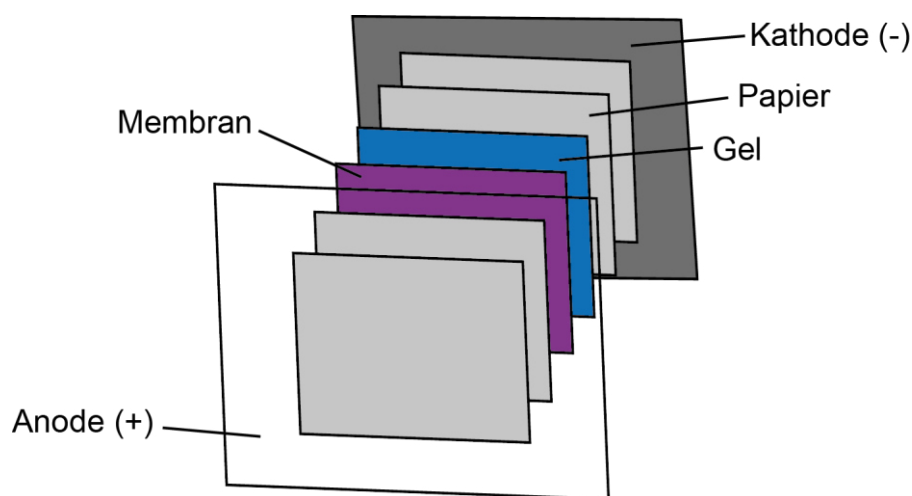
	14% Trenngel	4% Sammelgel
Rotiphorese [ml]	4,64	0,4
1M Tris-HCl pH 8,8 [ml]	2,5	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 [ml]	-	0,75
Aqua dest. [ml]	2,66	1,8
10% SDS [ $\mu$ l]	100	30
10% APS [ $\mu$ l]	65,5	30
TEMED [ $\mu$ l]	5	3

#### 3.1.7.4 Western Blot

Zur Detektion der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blot die Proteine zunächst auf eine Membran überführt. Die Detektion bestimmter Proteine erfolgte dann mit spezifischen Primärantikörpern, welche dann mit

Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpern markiert wurden. Durch Substratzugabe konnte eine durch die Aktivität der Peroxidase erzeugte Chemilumineszenz durch Substratumwandlung nachgewiesen werden (ECL-Reaktion).

Für den Blot wurden das in Transferpuffer befeuchtete Proteingel, Papierstücke, eine Membran (Nitrocellulose oder PVDF) und eine semi-dry Blot-Apparatur benötigt. Eine PVDF-Membran musste vorher mit Methanol behandelt werden. Der Blot wurde wie in Abb. 3.2 gezeigt aufgebaut. Der Transfer lief bei konstanten 15 V für 50 min.



**Abb. 3.2: Blotaufbau schematisch dargestellt.**

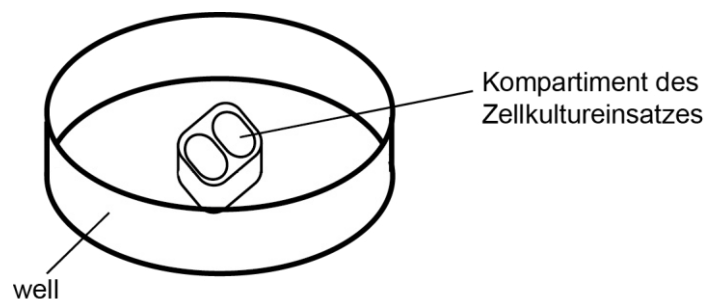
Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h mit einer Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Nach zwei Waschschritten mit TBS-T wurde die Membran mit der Erstantikörperlösung über Nacht bei 4°C in einem Rotator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und dann für 1h bei RT in der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die ECL-Reaktion. Die Detektion erfolgte am ChemiDoc MP von BioRad.

### **3.1.8 Migrations- und Invasions-Analyse**

#### **3.1.8.1 Migrationsanalyse mittels Wundheilungsassay**

Für die Migrationsstudien wurden 24-Loch-Platten mit Zellkultureinsätzen von der Firma Ibidi verwendet. Die Einsätze bestehen aus zwei voneinander abgetrennten Kompartimenten (Abb. 3.3), in die je 20.000 Zellen ausgesät wurden. Nach 24 h wurde der Einsatz mit einer Pinzette entfernt. Die adhärenen Zellen wurden mit PBS

gewaschen und wie in 3.1.3 bestrahlt und behandelt (3.1.4.2 bis 3.1.4.4). Hierzu wurde Serum-freies Medium verwendet, um das Zuwachsen der leeren Fläche durch Zellproliferation zu vermindern. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h) wurde ein mikroskopisches Durchlichtbild bei 100facher Vergrößerung gemacht, um zu dokumentieren wie schnell die leere Fläche zwischen den Kompartimenten von den Zellen bewandert wird. Die Fläche, die von migrierenden Zellen bedeckt wurde, diente als Maß für die Migrationsrate. Pro Behandlung wurden drei Löcher einer 24-Loch-Platte dokumentiert. Die Auswertung der Durchlichtbilder erfolgte dabei mit ImageJ.

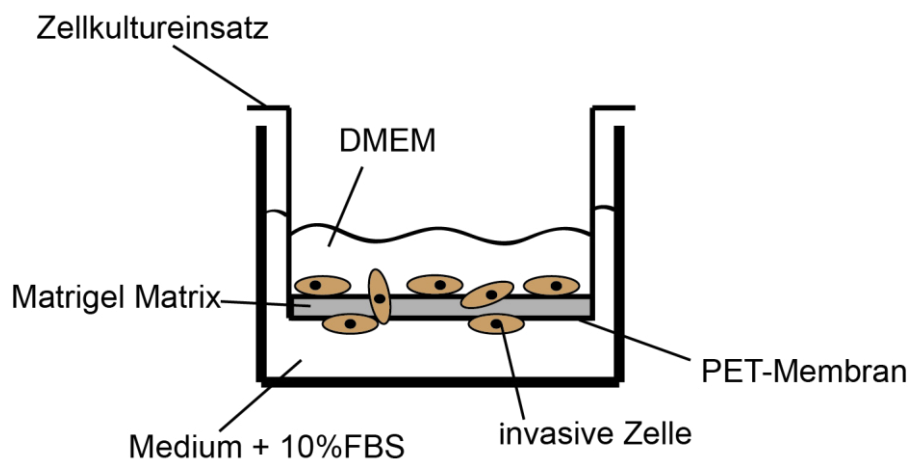


**Abb. 3.3: Zellkultureinsatz von Ibidi für Migrations-Assay.**

### 3.1.8.2 Matrigel Invasions Assay

Bei den Invasions-Analysen wurden Zellkultureinsätze (BD) mit einer PET-Membran mit einem Porendurchmesser von 8  $\mu\text{m}$  verwendet, sowie die dafür vorgesehenen 24-Loch-Platten der Firma BD. Vor der Aussaat der Zellen mussten die Einsätze mit 100  $\mu\text{l}$  BD Matrigel Matrix beschichtet werden (Abb. 3.4). Die Matrigel Matrix dient als Basalmembran für die Zellen und als Messung für die Invasivität der Zellen, da nur invasive Zellen Proteasen sekretieren, die enzymatisch die Matrigel Matrix degradieren und dann durch die Membranporen wandern können. Vor der Beschichtung wurde das Matrigel 1:3 mit Serum-freien Medium verdünnt. Über Nacht wurde die Platte mit den Matrigel-beschichteten Einsätzen bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag musste die Matrigel Matrix mit Serum-freien Medium für 2 h rehydriert werden. Danach wurden die Zellen wie in 3.1.2.1 behandelt. Für das Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wurde jedoch bei diesem Assay EDTA anstatt Trypsin/EDTA verwendet, da die Resuspendierung der Zellen mit Serum-freien Medium erfolgen musste. Schließlich wurden 25.000 Zellen pro Einsatz in einem Volumen von 250  $\mu\text{l}$  ausgesät. Nach 2 bis 4 h wurde das mit verschiedenen Substanzen (3.1.4.2 bis 3.1.4.4) versetzte Serum-freie Medium zu den Zellen dazugegeben, sowie 750  $\mu\text{l}$  des versetzten Mediums mit 10 % FBS in die Löcher der

24-Loch-Platte pipettiert, in denen sich die Einsätze befanden. Somit wurde ein nach unten gerichteter FBS-Gradient errichtet, der die Invasion durch die Matrigel Matrix in Richtung Plattenboden gewährleistet. Nach 48 h wurden die Zellkultureinsätze mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA für 10 min fixiert. Nach zwei Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen mit 0,1 % Kristallviolett in 25 % EtOH für 20 min gefärbt und die nicht invasiven Zellen mit einem Wattestäbchen auf der Matrigel Matrix vorsichtig entfernt. Am Mikroskop wurden bei 100facher Vergrößerung Durchlichtbilder der Zellen gemacht, um so die Anzahl der invasiven Zellen manuell zu bestimmen. Pro Behandlung der Zellen wurden drei Zellkultureinsätze verwendet und pro Einsatz fünf Felder ausgezählt. Als Kontrolle dienten unbeschichtete Einsätze. Die Daten werden als Prozent Invasion durch die Matrigel Matrix und Membran dargestellt, bezogen auf die Migration der Zellen durch die unbeschichteten Membran-Einsätze.



**Abb. 3.4: Zellkultureinsatz mit Matrigel Matrix für Invasionsanalysen**

### 3.1.9 Bestimmung der Glutamat Konzentration mittels Glutamat Assay

Für den Assay wurden die Zellen in 6 cm Schalen kultiviert. Bei 90 % Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 3 ml frisches Medium hinzugegeben. Nach 2 h, 6 h und 24 h wurde das konditionierte Medium in 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und gegebenenfalls bei -20°C gelagert. 100 µl des gesammelten Mediums wurden für 5 min bei 100°C erhitzt, um Enzyme, die den Assay verfälschen könnten zu denaturieren. Um die Glutamatfreisetzung von Zellen nachzuweisen wurde das Glutamat Assay Kit von Abnova verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Das Glutamat Assay Kit basiert auf der Glutamat Dehydrogenase katalysierten Oxidation von Glutamat, wodurch das gebildete NADH das dazu pipettierte Formazan (MTT-Reagenz) reduziert. Die

Farbintensität des Produkts, gemessen bei 565 nm, ist dabei proportional zu der Glutamat Konzentration der Proben. Die optische Dichte (OD) wurde direkt nach Zugabe des MTT-Reagenz ( $OD_0$ ) und nach 30 min ( $OD_{30}$ ) gemessen. Zur Kalibrierung wurde ein Standard mit bekannten Glutamat Konzentrationen verwendet (0 - 2,5 mM). Zur Messung der Konzentration wurde  $OD_0$  von  $OD_{30}$  für den Standard und die Proben substrahiert. Dann wurde der  $OD_{Wasser}$  von  $OD_{Standard}$  und  $OD_{Medium}$  von  $OD_{Probe}$  substrahiert. Die Steigung der Standardkurve wurde für die Umrechnung der  $OD_{Probe}$ -Werte zur Glutamat Konzentration in mM der Proben verwendet. Anhand der gemessenen Glutamat Konzentrationen, des Volumens und der Zellzahl, die für den Assay verwendet wurden, konnte man die Freisetzung des Glutamats pro h für eine gewisse Zellzahl ausrechnen, die auch bei den meisten anderen Assays verwendet wurde.

### **3.1.10 *In vitro* Messung der Chemosensitivität**

#### **3.1.10.1 MTT-Assay**

Der von Mosmann beschriebene MTT-Assay zur Messung des Zellüberlebens, wurde verwendet um quantitativ die Chemosensitivität von Zellen zu untersuchen (Mosmann, 1983). Zur Messung der Zellviabilität wurden die Zellen mit dem Tetrazoliumsalz MTT inkubiert, welches nur von lebenden Zellen in Formazan umgewandelt wird. Dies äußert sich in einem Farbumschlag und kann photometrisch gemessen werden. Die Abnahme des Zellüberlebens kann toxische Effekte von Substanzen feststellen. In einer 96-Loch-Platte wurden pro Loch  $4 \times 10^3$  Zellen in 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit 10 mM Glutamat und 10  $\mu$ M Glyzin behandelt und im Anschluss, wie in 3.1.3 beschrieben bestrahlt. Die Zellen wurden kontinuierlich mit Glutamat für 48 h bei 37°C und 5 %  $CO_2$  behandelt. Danach wurden pro Loch 10  $\mu$ l MTT Reagenz (5 mg/ml) dazugegeben und die Platte bei 37°C für 60 min inkubiert. Das Medium wurde abgekippt und die Formazankristalle mit 150  $\mu$ l Isopropanol/0,04N HCl durch Schwenken oder Resuspendieren gelöst. Schließlich konnte mit einem Plattenlesegerät die OD bei 570 nm bestimmt werden. Als Referenzwert wurde die OD bei 630 nm gemessen. Die Messungen wurden als Triplet durchgeführt. Der Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen wurde aus der Differenz von Messung und Referenzmessung berechnet.

### 3.1.10.2 Klonogener Assay (*clonogenic cell survival assay*)

Die Fähigkeit von Zellen unendlich zu proliferieren und Kolonien zu bilden wird durch den *clonogenic cell survival assay* analysiert. Dies wurde nach Behandlung mit verschiedenen iGluR-Antagonisten (3.1.4.2.3) oder Bestrahlung untersucht. Man gibt die Fraktion von Zellen an, die die Fähigkeit Kolonien zu bilden nicht verloren haben. Hierzu wurden zunächst 500 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz behandelt. Die Zellen wurden weiter bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und ab Tag 5 wurde die Koloniezahl kontrolliert. Die Kolonien wurden nach 7 bis 9 Tagen mit 70 % Ethanol fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Am Mikroskop wurden ausschließlich Kolonien mit mehr als 50 Zellen gezählt. Die Auswertung erfolgte am Binokular. Jede Behandlung wurde im Triplet durchgeführt und auf die verwendete Zellzahl und die Kontrolle abgeglichen. Die Überlebensfraktion wurde mit der folgenden Formel ausgerechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten Kolonien}}{\text{Anzahl an ausgesäten Zellen}} \times \frac{(\text{PE})}{100}$$

Mit Berücksichtigung der unterschiedlichen *plating efficiency* (PE).

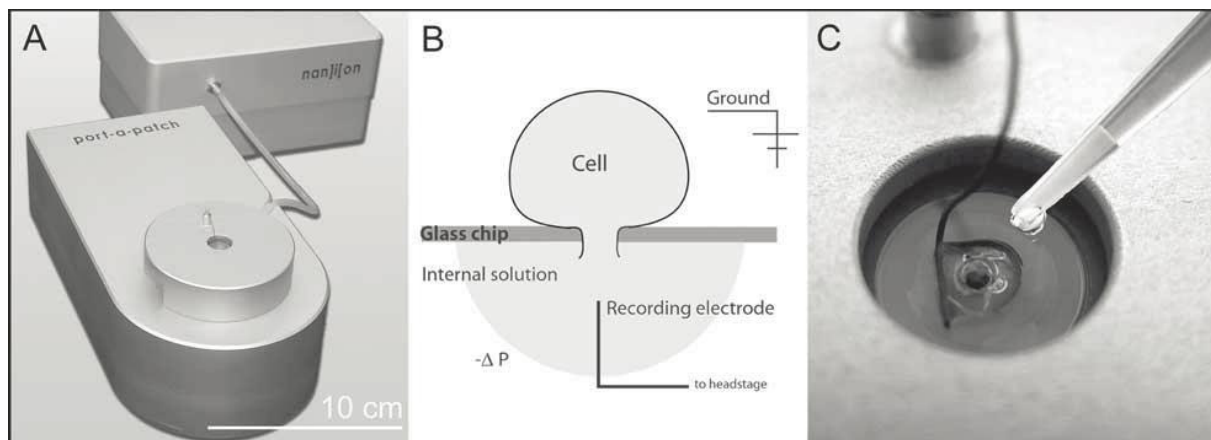
### 3.1.11 Elektrophysiologische Analyse

#### 3.1.11.1 Port-a-Patch

Zur Messung von Liganden-gesteuerten Kanälen an lebenden Zellen wurde die Patch Clamp Methode gewählt. Das Port-a-Patch System von Nanion (Abb. 3.5) ist ein Miniatur Patch Clamp Setup für Ganzzelleableitungen. Die Zellen wurden dabei in der *whole-cell* Konfiguration abgeleitet. Für die Aufnahmen wird ein Borosilikat-Glas-Chip (NPC-1) mit einer Mikro-Öffnung verwendet. Vor der Messung wurden die Zellen enzymatisch mittels Trypsin-EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst. Anschließend folgte ein 5 minütiger Zentrifugationsschritt bei 600 rpm und die anschließende Resuspension in 500 µl externer Lösung. Danach folgten ein zweiter Zentrifugationsschritt und die erneute Aufnahme in externer Lösung. Schließlich wurden 5 µl der internen Lösung vorsichtig auf die Öffnung eines Mikrochips mit einem Widerstand von 1-2 MΩ pipettiert. Beim Einsetzen des Chips geht die Elektrode Kontakt mit der internen Lösung ein. Auf die obere Chipöffnung wurden 5 µL externe Lösung und anschließend 5 µL Zellsuspension pipettiert. Der *whole cell*



Widerstand beträgt dabei mehr als 1 G $\Omega$ . Um schneller die *cell-attached* Konfiguration zu erreichen, wurde Seal-Enhancer Lösung auf den Chip pipettiert. Eine Zelle wird automatisch abgedichtet („sealed“) und angesaugt bis die *whole-cell* Konfiguration erreicht wird (Abb. 3.5). Durch einen Saugdruck wurde die Zellmembran durchbrochen und so die *whole-cell* Konfiguration erreicht. Durch die Verbindung mit der internen Lösung können Stromstärken von einigen pA gemessen werden. Nachdem eine *whole-cell*-Konfiguration hergestellt wurde, konnte mit Hilfe eines externen Perfusion-Systems, welches an das Port-a-Patch Setup angeschlossen wurde, manuell oder automatisch die extrazelluläre Lösung durch andere extrazelluläre Lösungen mit verschiedenen iGluR-Agonisten (3.1.4.2) ausgetauscht werden. Während jedes Lösungswechsels erfolgte eine Messung mit einer konstanten Haltespannung von -70 mV. Zwischen den Lösungswechseln wurde jedes Mal mit extrazellulärer Lösung ca. 30 sec gewaschen. Mit Hilfe des Programms Patchmaster (HEKA Electronics) konnten Stromantworten der Glutamatrezeptoren aufgezeichnet werden.



**Abb. 3.5: Whole Cell Messung mit dem Port-a-Patch.**

A) Das Port-a-Patch ist ein Miniatur Setup für patch clamp Ableitungen. B) Die Zellen werden in Suspension auf die Chipöffnung gegeben und durch automatisches Ansaugen an der Öffnung des Borosilikat Glaschips abgedichtet. Weiteres Ansaugen ermöglicht einen elektrischen Kontakt, wodurch Messungen in der *cell-attached* und *whole-cell* Konfiguration möglich sind. C) Die Applikation der Chemikalien kann manuell erfolgen wie auf dem Bild gezeigt oder durch Verwenden des Perfusionssystems (Farre et al., 2007).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren bei der Glioblastomzelllinie LN-229

#### 4.1.1 Expression und Funktionalität von ionotropen Glutamatrezeptoren

Die Funktionalität der iGluRs wurde elektrophysiologisch bei vier verschiedenen Glioblastomzelllinien (LN-229, U-87 MG, T98-G, LN-428) mittels der Patch-Clamp-Technik untersucht. Hierzu wurden Stromantworten aufgenommen, hervorgerufen durch die Verwendung verschiedener Agonisten. Der Agonist Glutamat wurde zur Aktivierung aller GluRs appliziert. Der Agonist NMDA zur spezifischen Aktivierung von NMDARs, AMPA zur Aktivierung von AMPARs und Kainat zur Aktivierung von KARs. Um auch NR1/NR2-NMDARs aktivieren zu können musste neben Glutamat oder NMDA zusätzlich Glyzin appliziert werden.

Bei der LN-229 Zelllinie zeigten die Glutamat-induzierten Stromantworten einen mittleren Maximalstrom ( $I_{\max}$ ) von  $43 \pm 5$  pA ( $n = 22$ ), wobei bei 65 % aller gemessenen LN-229 Zellen eine Stromantwort auf Glutamat beobachtet werden konnte. Die NMDA-induzierten Maximalströme lagen bei  $50 \pm 5$  pA ( $n = 8$ ). Bei 69 % der gemessenen Zellen konnte eine Stromantwort nach NMDA-Applikation beobachtet werden. 54 % der gemessenen Zellen zeigten einen mittleren Maximalstrom von  $46 \pm 4$  pA ( $n = 6$ ) nach Applikation von AMPA (Tab. 4.1).

Die Zelllinie U-87 MG zeigte Glutamat-, Kainat-, AMPA- und NMDA-induzierte Stromantworten. 68 % der gemessenen Zellen zeigten einen mittleren Maximalstrom ( $I_{\max}$ ) von  $62 \pm 10$  pA ( $n = 21$ ) nach Applikation von Glutamat. 67 % der gemessenen Zellen zeigten einen  $I_{\max}$  von  $61 \pm 8$  pA ( $n = 14$ ) bei Kainat und 55 % der gemessenen Zellen zeigten einen  $I_{\max}$  von  $45 \pm 10$  pA ( $n = 9$ ) nach Applikation von AMPA. Die NMDA-induzierten Maximalströme lagen bei  $27,5 \pm 12,5$  pA ( $n = 2$ ). Bei 33 % der gemessenen Zellen konnte eine Stromantwort nach NMDA-Applikation beobachtet werden (Tab. 4.1).

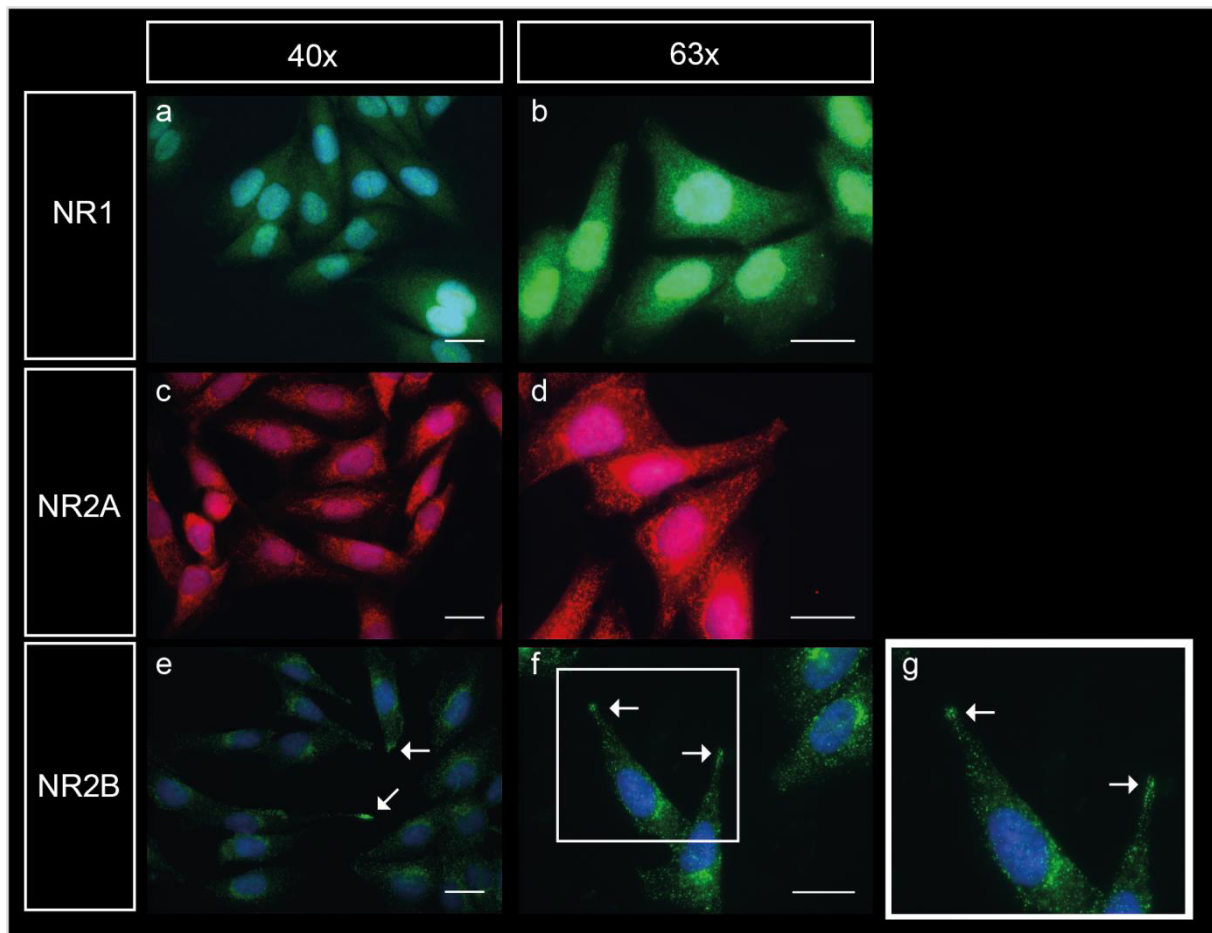
Die Zelllinie T98-G zeigte ebenfalls Stromantwort nach der Applikation von Glutamat Kainat und AMPA. 58 % der gemessenen Zellen zeigten einen  $I_{\max}$  von  $44 \pm 11$  pA ( $n = 10$ ) nach Applikation von Glutamat. 40 % der gemessenen Zellen zeigten einen  $I_{\max}$  von  $58 \pm 22$  pA ( $n = 3$ ) bei Kainat und 33 % der gemessenen Zellen zeigten einen mittleren Maximalstrom von  $35 \pm 15$  pA ( $n = 2$ ) nach Applikation von AMPA (Tab. 4.1).

Die Zelllinie LN-428 war die einzige Zelllinie, die weder auf NMDA noch auf AMPA oder Kainat Stromantworten zeigte.

**Tab. 4.1: Pharmakologische Untersuchung von Glutamatrezeptoren der Glioblastomzelllinien LN-229, U-87 MG, T98-G und LN-428**

	LN-229 $I_{\max}$ [pA]	U-87 MG $I_{\max}$ [pA]	T98-G $I_{\max}$ [pA]	LN-428 $I_{\max}$ [pA]
<b>Glutamat</b>	43 ± 5	62 ± 10	44 ± 11	—
<b>Kainat</b>	n.d	61 ± 8	58 ± 22	—
<b>AMPA</b>	46 ± 4	45 ± 10	35 ± 15	—
<b>NMDA</b>	50 ± 5	27,5 ± 12,5	n.d	—

Von den vier elektrophysiologisch untersuchten Zelllinien wurden die LN-229 Zellen für weitere Experimente ausgewählt. Im nächsten Schritt wurde diese Zelllinie immunzytochemisch auf die Expression von verschiedenen NMDAR-UEs untersucht. Es wurden spezifische Antikörper für die NMDAR-UEs NR1, NR2A und NR2B verwendet. Abbildung 4.1 zeigt repräsentative Beispiele von NR1-, NR2A- und NR2B-positiven Zellen. Die immungefärbten Bilder stellen den DAPI-gefärbten Zellkern in blau und die NR1-UE in grün (a und b), die NR2A-UE in rot (c und d) und die NR2B-UE in grün (e, f und g) dar. Die NR1-UE und die NR2A-UE zeigen eine homogene Expressionsverteilung. Im Vergleich dazu ist eine bevorzugte Ansammlung der NR2B-UEs in den Spitzen der Zellfortsätze zu erkennen (Abb. 4.1 e, f und g; weiße Pfeile).



**Abb. 4.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der NMDAR-Untereinheiten NR1, NR2A und NR2B**

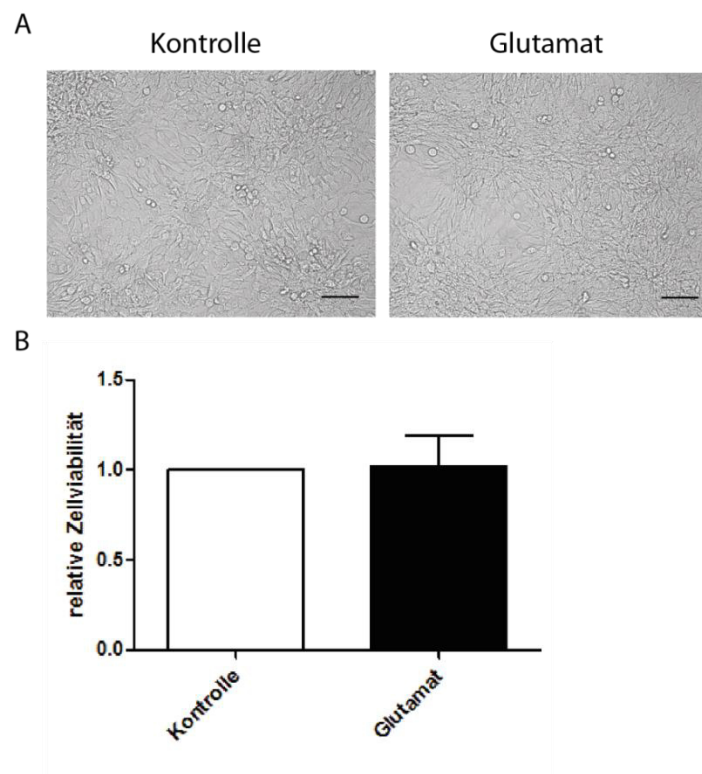
Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen positive Immunfärbungen für die NR1, NR2A und NR2B Untereinheiten in LN-229 Zellen. Die Expression der obligatorischen NR1-UE (grün) ist gleichmäßig in der Zelle verteilt (a und b). Die NR2A-UE (rot) wird ebenfalls homogen in der Glioblastomzelle exprimiert (c und d). Die NR2B-UE (grün) zeigt eine verstärkte Expression an den Spitzen der Glioblastomfortsätze (e, f und g; weiße Pfeile). Der DAPI-gefärbte Zellkern ist in blau dargestellt. Die Vergrößerung erfolgte durch die 40x Objektive (links), 63x Objektive (mittig) und Einzoomen (rechts). Die Skalierung beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

Die immunzytochemischen Färbungen in Abb. 4.1 wurden freundlicherweise von Frau Kerstin Rau erstellt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Die elektrophysiologischen Versuche für die Tab. 4.1 wurden von Frau Katrin Merk vorgenommen.

## 4.2 Einfluss von Glutamat auf die Glioblastomzelllinie LN-229

### 4.2.1 Einfluss von Glutamat auf die Zellebensfähigkeit von LN-229 Glioblastomzellen

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss von Glutamat auf die Glioblastomzelllinie LN-229 untersucht werden. Um die Aktivierung aller GluRs zu ermöglichen wurde eine gesättigte Glutamat Konzentration von 10 mM ausgewählt und zusätzlich 10  $\mu$ M Glyzin. Im ersten Schritt wurden Durchlichtmikroskopische Bilder der Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit Glutamat aufgenommen (Abb. 4.2 A). Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle waren keine Unterschiede bezüglich der Konfluenz oder der Vitalität der Zellen festzustellen. Die Zellviabilität wurde dann quantitativ mit Hilfe des MTT-Assays photometrisch nach Exposition mit Glutamat gemessen. Vergleicht man die unbehandelte Kontrolle mit der Glutamat-behandelten Probe, so ist auch quantitativ kein Unterschied in der Zellviabilität erkennbar (Abb. 4.2 B). Glutamat beeinträchtigt nicht die Zellebensfähigkeit von LN-229 Glioblastomzellen.



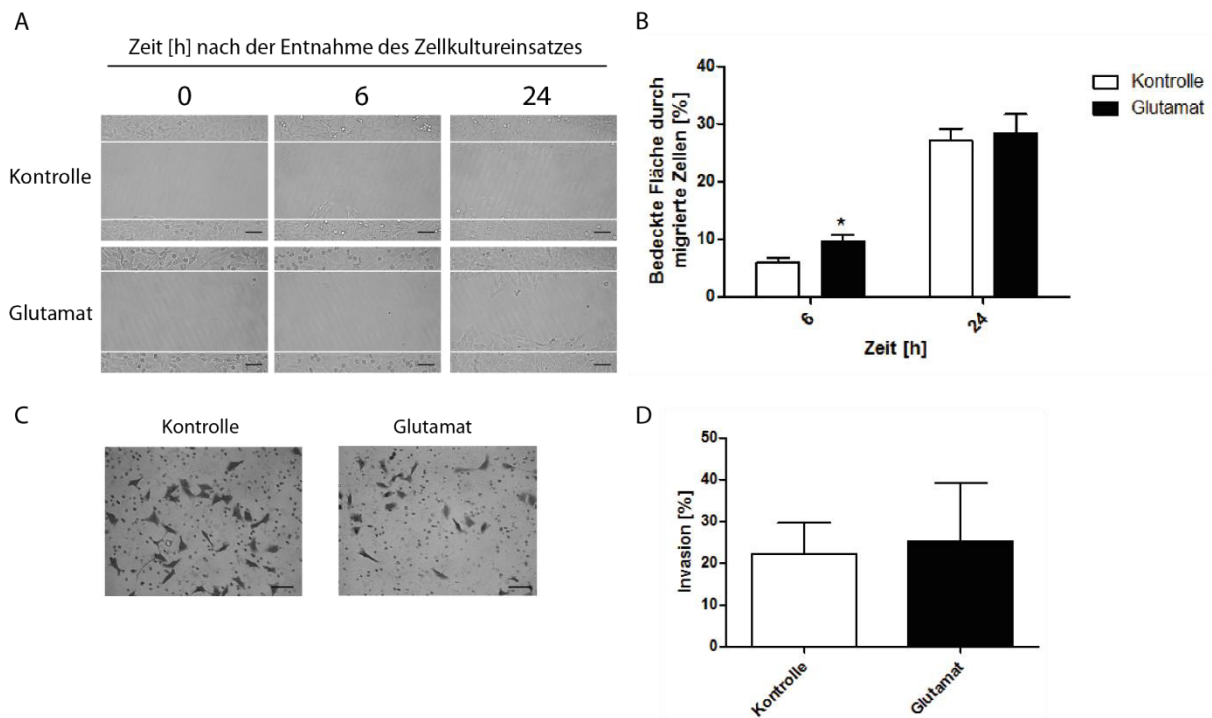
**Abb. 4.2: Zellviabilität von LN-229 Zellen nach Behandlung mit Glutamat.**

A) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und Glutamat-behandelten LN-229 Zellen, 72 h nach Behandlung. B) Messung der Zellviabilität von LN-229 Zellen mittels MTT-Assay. Die Zellen wurden für 48 h mit 10 mM Glutamat und 10  $\mu$ M Glyzin behandelt. Die Kontrolle wurde auf 1 normiert (SEM, n = 5). Glutamat hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität.

#### 4.2.2 Einfluss von Glutamat auf die Zellmigration und Invasion

Für die vorliegende Arbeit wurde weiter der Einfluss von Glutamat auf die Migration und Invasion von LN-229 Glioblastomzellen untersucht. Für die Messung der Zellmigration wurde der Wundheilungsassay mit vorgefertigten Zellkultureinsätzen bevorzugt (Abb. 4.3 A). In Abb. 4.3 B wird die Fläche, die von migrierten Zellen bedeckt wird, in % für zwei Zeitpunkte dargestellt (6 h und 24 h). Verglichen wurden unbehandelte Zellen (Kontrolle) mit Glutamat-behandelten Zellen. 6 h nach der Glutamat Behandlung waren  $10 \pm 1 \%$  ( $n = 4$ ) der Ursprungsfläche mit migrierten Zellen bedeckt, wogegen nur  $6 \pm 1 \%$  ( $n = 4$ ) der Ursprungsfläche durch unbehandelte Zellen bedeckt waren. Somit führte die Applikation von Glutamat zum signifikanten Anstieg der Migration nach 6 h. 24 h nach der Glutamat Behandlung glichen sich die Werte an. Die Kontrollzellen bedeckten  $27 \pm 2 \%$  ( $n = 4$ ) durch Migration und die Glutamat-behandelten Zellen bedeckten  $28 \pm 3 \%$  ( $n = 4$ ) des Spalts durch Zellmigration. Nach 24 h gab es keinen signifikanten Unterschied im Migrationsverhalten zwischen den Glutamat-behandelten und den unbehandelten Zellen.

Die Invasionsfähigkeit der LN-229 Zellen wurde mittels Matrigel Invasions Assay analysiert. Abb. 4.3 C zeigt exemplarisch Membranausschnitte mit invasiven LN-229 Zellen. Die Behandlung mit Glutamat konnte im Vergleich mit den unbehandelten Zellen nach 48 h keine signifikante Steigung der Invasionsfähigkeit der LN-229 Zellen zeigen. Im Mittel waren  $22 \pm 7 \%$  der LN-229 Zellen invasiv und konnten die mit Matrigel beschichtete Membran passieren. Bei den Glutamat-behandelten Zellen zeigten  $25 \pm 14 \%$  ein invasives Verhalten (Abb. 4.3 D).



**Abb. 4.3: Zellmigration und Invasion von LN-229 Zellen nach Glutamat Behandlung.**

A) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen des Migrationsassays, 0 h, 6 h und 24 h nach der Entnahme des Zellkultureinsatzes und der Behandlung mit Serum-freien OptiMEM-Medium (Kontrolle) oder Glutamat/Glyzin (10 mM/10  $\mu$ M). Die Skalierung beträgt 100  $\mu$ m. B) Quantitative Auswertung der mit migrierenden Zellen bedeckten Fläche über die Zeit (SEM, n = 4; \*, p  $\leq$  0,05, Student's *t*-test). C) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen des Membranausschnitts der Matrigel Invasionsanalyse von invasiven LN-229 Zellen nach Behandlung mit Serum-freien OptiMEM-Medium (Kontrolle) oder Glutamat/Glyzin (10 mM/10  $\mu$ M). Die Skalierung beträgt 100  $\mu$ m. D) Matrigel Invasionsanalyse der unbehandelten LN-229 Zellen und nach Behandlung mit Glutamat/Glyzin (10 mM/10  $\mu$ M). Für jedes Experiment wurden pro Behandlung drei Matrigel-beschichtete Zellkultureinsätze verwendet und je 5 Felder pro Einsatz fotografiert und ausgezählt (SEM, n = 3). Glutamat hat keinen Einfluss auf die Migration und Invasion.

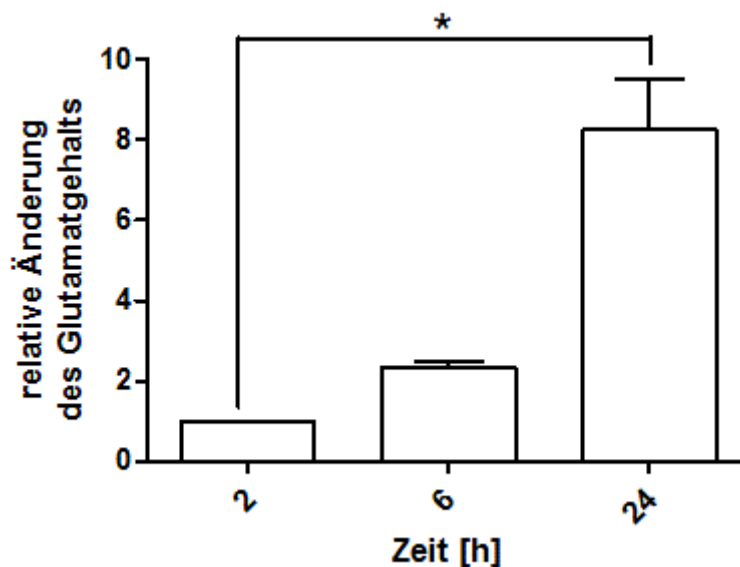
#### 4.2.3 Glutamatfreisetzung bei der Glioblastomzelllinie LN-229

Nachdem Glutamat keinen signifikanten Effekt auf die Zellviabilität und die Migration/Invasion zeigte, aber die Funktionalität von iGluRs bestätigt werden konnte, wurde die LN-229 Zelllinie auf die Fähigkeit Glutamat freizusetzen untersucht. Dies könnte erklären, warum zwischen un behandelter Kontrolle und Glutamat-Behandlung kein Unterschied identifiziert werden konnte.

Für die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie LN-229 wurde noch keine Glutamatfreisetzung untersucht. Mittels Glutamat Assay wurde photometrisch die Glutamat Konzentration bestimmt. In Abb. 4.4 sind die normierten Werte als

Balkendiagramm dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Laufe von 24 h die Glutamat Konzentration im extrazellulären Medium signifikant ansteigt.

Wie in Kapitel 3.1.9 beschrieben konnte man durch den Assay ermitteln, dass  $3,5 \cdot 10^5$  Zellen in 1 h 0,78 mg/dl Glutamat ausschütten. Das entspricht 117  $\mu\text{M}$ . Somit können nach 24 h Konzentrationen von 2,8 mM erreicht werden. Dies könnte erklären, warum man bei den Zellviabilitäts- und Migration/Invasions-Assays (Abb. 4.2 und 4.3) spätestens nach 24 h keinen Unterschied mehr zwischen Kontrollzellen und Glutamat-behandelten Zellen feststellen kann.



**Abb. 4.4: Messung der Glutamat Konzentration von LN-229 Zellen im extrazellulären Medium.**

Die Glutamat Konzentration im Zellkulturüberstand wurde mittels eines photometrischen Enzymtests gemessen. Hierzu wurde das konditionierte Medium der Zellen nach 2 h, 6 h und 24 h gesammelt (SEM;  $n = 2$ ; \*,  $p \leq 0,05$ , Student's *t*-test). Die Glutamat Konzentration steigt im extrazellulären Medium an.

In Kapitel 4.2 wurde gezeigt, dass die Behandlung mit 10 mM Glutamat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität und Migration/Invasion von LN-229 Zellen hat. Andererseits konnte jedoch gezeigt werden, dass die unbehandelten Zellen bereits Glutamat freisetzen und deshalb spätestens nach 24 h kein Unterschied mehr zwischen den unbehandelten und den Glutamat-behandelten Zellen ausgemacht werden kann, da gesättigte Konzentrationen erreicht werden.



### 4.3 Einfluss von Glutamatrezeptor-Antagonisten auf LN-229 Zellen

#### 4.3.1 Einfluss von Glutamatrezeptor-Antagonisten auf die Zellebensfähigkeit von LN-229 Zellen

Da die LN-229 Zellen Glutamat freisetzen und deshalb ein Vergleich zwischen Kontrolle und Glutamat-Behandlung schwer ist, wird in diesem Kapitel die Behandlung mit verschiedenen AMPAR- und NMDAR-Antagonisten im Hinblick auf die Zellebensfähigkeit beschrieben. Durch spezifische Inhibition von AMPARs und NMDARs kann die Rolle von iGluRs für die Zellviabilität erfasst werden. Bei einer 72 h Behandlung mit diversen iGluR-Antagonisten ließen sich anhand von durchlichtmikroskopischen Aufnahmen erste Unterschiede feststellen (Abb. 4.5 A).

Die Zellen wurden zunächst mit 50  $\mu\text{M}$  Gyki-52466 behandelt, einem nicht-kompetitiven AMPAR-Antagonist. Es hatten sich viele Zellen von der Zellkulturflasche abgelöst und es zeigten sich dadurch einige Lücken im Zellrasen. Viele noch adhären wachsende Zellen zeigten eine Abrundung des Zellkörpers (Abb. 4.5 A).

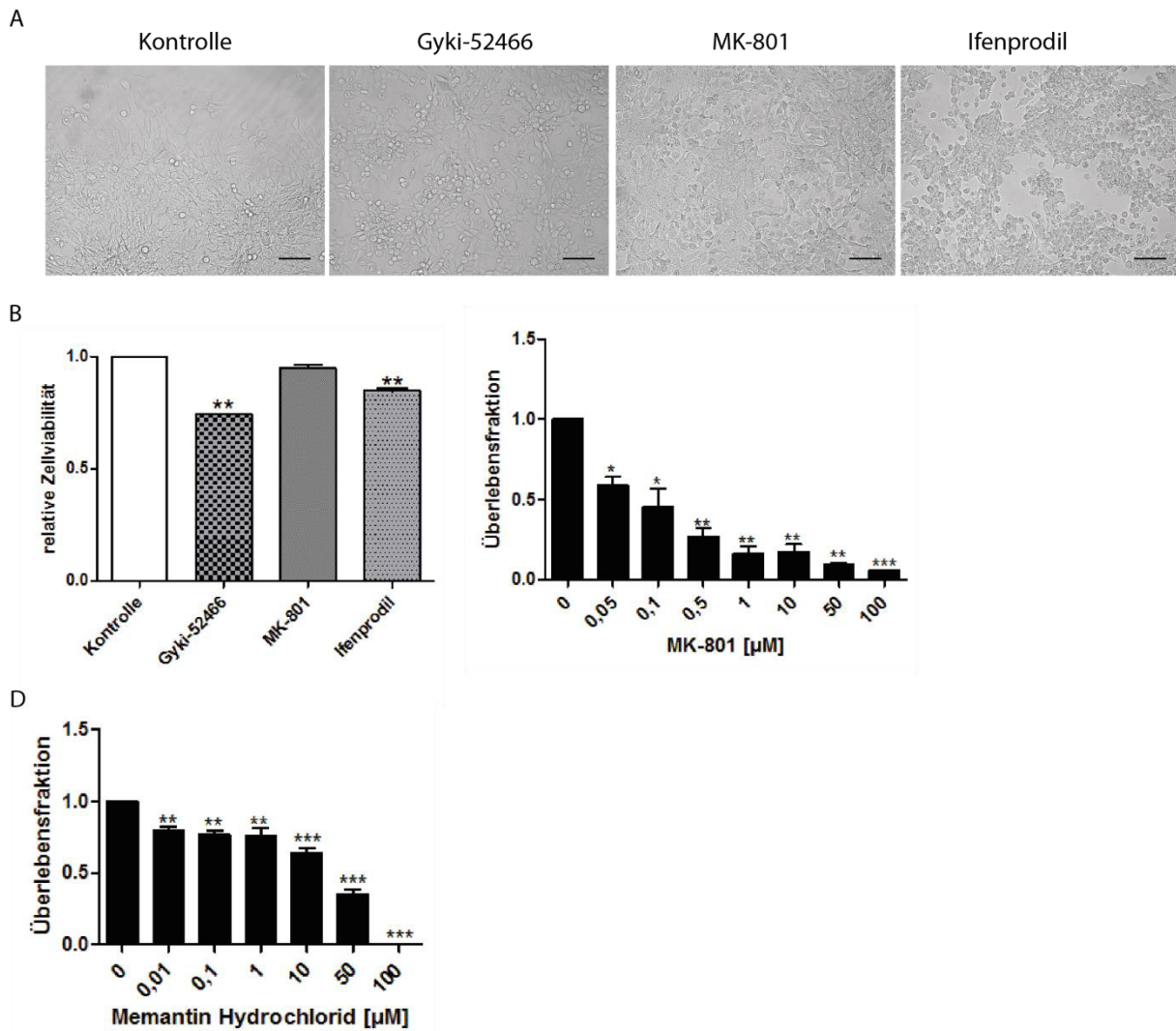
MK-801 ist ein Kanalblocker für NMDARs. Nach der 72 h Behandlung mit MK-801 zeigten die Zellen bereits kugelförmige Zellkörper und es hatten sich schon mehr tote Zellen im Nährmedium abgelöst als bei den unbehandelten Zellen. Die Zellen zeigten aber noch einen durchgehenden Zellrasen ohne Lücken (Abb. 4.5 A).

Im Vergleich zur Kontrolle konnte man bei den Ifenprodil-behandelten (25  $\mu\text{M}$ ) Zellen einen sehr deutlichen Unterschied erkennen. Ifenprodil ist ein spezifischer NR2B-Antagonist. Durch erhöhten Zelltod hatten sich viele Zellen abgelöst und es lag kein konfluenter Zellrasen mehr vor. Es schwebten viele tote Zellen im Nährmedium und auch die noch vorhandenen adhären Zellen zeigten eine kugelförmige Morphologie (Abb. 4.5 A).

Ein MTT Assay sollte die Beobachtungen der Behandlungen mit Gyki-52466, MK-801 und Ifenprodil untermauern. In Abb. 4.5 B sind die normierten Daten als Balkendiagramm dargestellt. Die Gyki-52466- wie auch die Ifenprodil-behandelten Zellen zeigten bereits nach 48 h eine signifikante Abnahme der Zellviabilität. Da MK-801 nach 48 h keine veränderte Zellviabilität zeigte (Abb. 4.5 B), wurde das Zellüberleben mittels *clonogenic cell survival assays* untersucht. Hierzu wurden die Zellen einer Langzeitbehandlung von 7 bis 9 Tagen ausgesetzt und die überlebten Zellkolonien größer als 50 Zellen ausgezählt. Verschiedene Konzentrationen (50 nM bis 100  $\mu\text{M}$ ) wurden untersucht und ausgewertet. In Abb. 4.5 C sind die Resultate in

Form eines Balkendiagramms gezeigt. Mit zunehmender Konzentration an MK-801 nahm die Überlebensfraktion signifikant ab. Schon bei 100 nM wurde nur noch ein halbmaximales Überleben erreicht. Bei 100  $\mu$ M überlebten nur noch 6 % der Kolonien im Vergleich zur Kontrolle. MK-801 beeinflusst das Zellüberleben von LN-229 Zellen in einer Dosis-abhängigen Weise.

Neben MK-801 wurde zusätzlich noch ein anderer NMDAR-Kanalblocker, Memantin Hydrochlorid, untersucht. Memantin Hydrochlorid ist ein klinisch gut verträgliches Medikament, das bereits für Patienten mit Morbus Alzheimer oder Parkinson angewendet wird (Parsons et al., 1999; Witt et al., 2004). Der Koloniebildungsassay zeigte auch für diese Substanz eine signifikante Abnahme des Zellüberlebens mit zunehmenden Konzentrationen. Ein halbmaximales Überleben wurde zwischen 10 und 50  $\mu$ M erreicht. Bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M überlebten keine Kolonien mehr (Abb. 4.5 D). Aufgrund der klinischen Nützlichkeit von Memantin Hydrochlorid wird auch bei anderen Experimenten dieser Antagonist neben MK-801 mituntersucht, auch wenn es sich dabei um einen schwächeren Kanalblocker für NMDARs handelt (Frankiewicz et al., 1996).



**Abb. 4.5: Zellviabilität und Überlebensfähigkeit von LN-229 Zellen nach Inhibition von AMPARs und NMDARs.**

A) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten Zellen (Kontrolle) und Zellen nach einer 72 h Behandlung mit dem AMPAR-spezifischen Antagonisten Gyki-52466 (50 µM), dem NMDAR-spezifischen Antagonisten MK-801 (100 µM) und dem NR2B-spezifischen Antagonisten Ifenprodil (25 µM). Die Skalierung beträgt 100 µm. B) Die Zellen wurden mit Gyki-52466 (50 µM), MK-801 (100 µM) und Ifenprodil (25 µM) behandelt. Nach einer 48 h Inkubation wurde die Zellviabilität mittels MTT-Assay ermittelt (SEM, n = 5; \*\*, p ≤ 0,01, Student's *t*-test). C) Dosis-abhängiger Effekt von MK-801 (0,05 bis 100 µM) auf das klonogene Überleben von LN-229 Zellen (SEM, n = 1; \*, p ≤ 0,05; \*\*, p ≤ 0,01, Student's *t*-test). D) Dosis-abhängiger Effekt von Memantin Hydrochlorid (0,01 bis 100 µM) auf das klonogene Überleben von LN-229 Zellen. Jede Behandlung wurde im Triplet durchgeführt (SEM, n = 1; \*\*, p ≤ 0,01; \*\*\*, p ≤ 0,001, Student's *t*-test). Die Inhibition von iGluRs reduziert die Zellviabilität und das Zellüberleben.

### 4.3.2 Einfluss von Glutamatrezeptor-Antagonisten und dem Ca<sup>2+</sup>-Chelator Bapta-AM auf die Zellmigration und Invasion

In diesem Kapitel wird der Einfluss von verschiedenen iGluR-Antagonisten auf die Migration/Invasion von LN-229 Zellen beschrieben. Da iGluRs Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalwege aktivieren können, wurde auch die Rolle von Ca<sup>2+</sup> bei der Migration/Invasion von LN-229 Zellen durch Chelatbildung mittels der Substanz Bapta-AM untersucht. Mittels eines Wundheilungsassays wurde zunächst der Einfluss verschiedener AMPAR- und NMDAR-Antagonisten auf die Migration von LN-229 Zellen untersucht und mit den unbehandelten Zellen verglichen. Nach 6 h, 24 h und 48 h wurden durchlichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen erstellt.

Die Behandlung mit dem spezifischen AMPAR-Antagonisten Gyki-52466 zeigte bereits nach 6 h eine signifikante Unterdrückung der Zellmigration um 36 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.6 A). Nach 24 h zeigte die Behandlung mit Gyki-52466 eine signifikante Unterdrückung der Zellmigration um 48 % und nach 48 h eine signifikante Unterdrückung der Zellmigration um 58 % im Vergleich zur Kontrolle. Der AMPAR-Antagonist Gyki-52466 ist in der Lage die Migration von LN-229 Zellen zu inhibieren.

Als Vertreter der NMDAR-Antagonisten wurde Memantin Hydrochlorid ausgewählt. Zunächst zeigte die Behandlung mit dem spezifischen NMDAR-Antagonisten Memantin nach 6 h eine Erhöhung der Zellmigration um 29 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.6 A). Nach 24 h zeigte die Behandlung mit Memantin schließlich eine signifikante Inhibition der Zellmigration um 48 % und nach 48 h eine signifikante Unterdrückung der Zellmigration um 66 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Blockierung von NMDARs durch Memantin zeigte deutlich, dass neben AMPAR-Antagonisten auch NMDAR-Antagonisten die Migration von LN-229 Zellen inhibieren können.

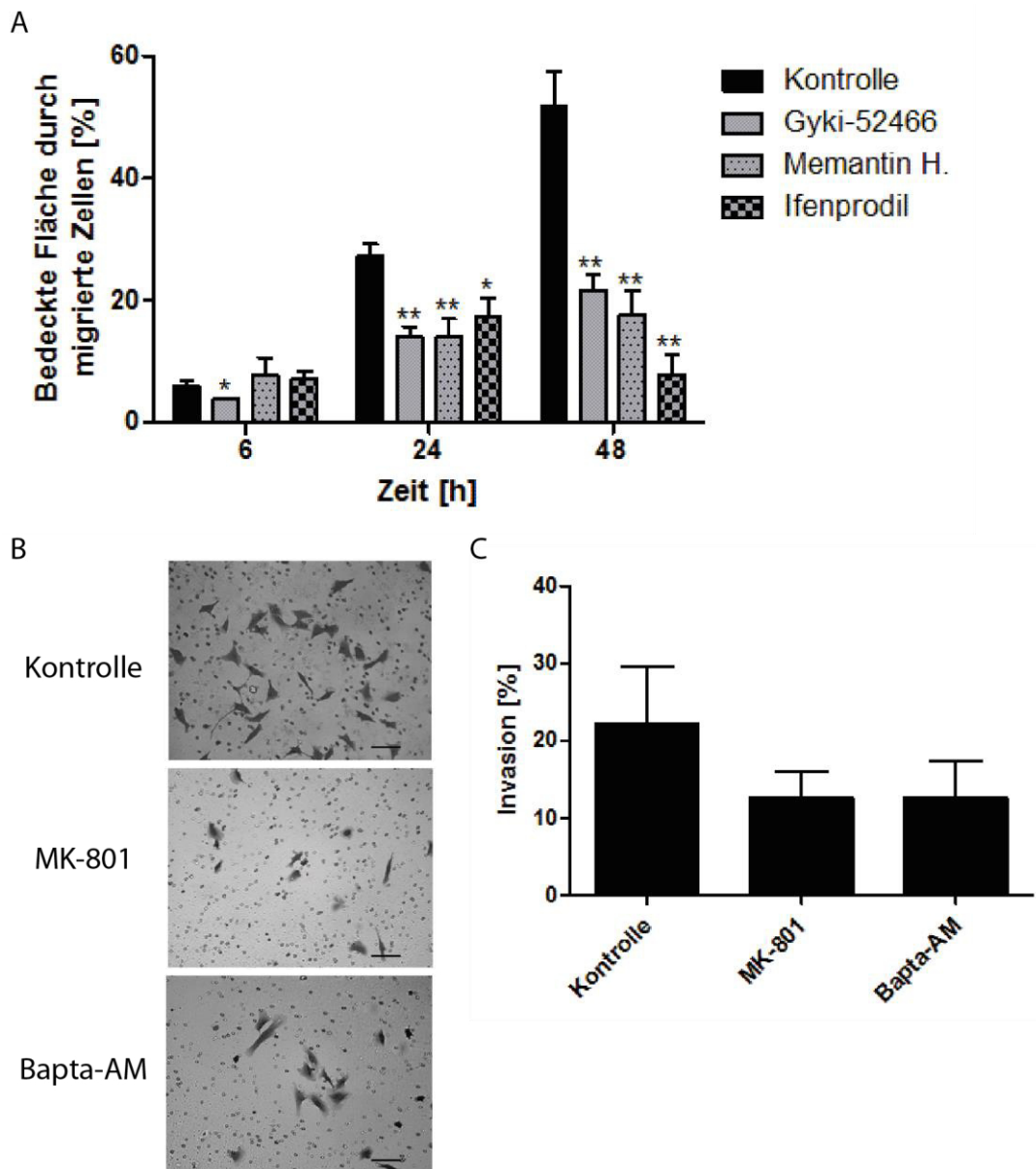
Als dritter Antagonist wurde Ifenprodil ausgewählt, welcher spezifisch NR1/NR2B NMDARs blockiert. Diese Auswahl wurde aufgrund der in Abb. 4.1 gezeigten Ansammlung von NR2B-UEs in den Spitzen der Zellfortsätze getroffen, was Grund zur Annahme gab, dass die NR2B eine entscheidende Rolle bei der Migration von LN-229 Zellen spielen könnte. Die Behandlung mit dem NR2B-spezifischen NMDAR-Antagonisten Ifenprodil zeigte nach 6 h eine Erhöhung der Zellmigration um 19 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.6 A). Nach 24 h zeigte die Behandlung mit Ifenprodil schließlich eine signifikante Inhibition der Zellmigration um 36 % und 48 h nach Behandlung eine signifikante Unterdrückung der Migration um 85 % im Vergleich zur

Kontrolle. Nach 48 h waren die Flächen des zu migrierenden Spalts nach der Behandlung mit Ifenprodil kleiner als die Flächen nach 24 h Behandlung, da durch vermehrten Zelltod die bewanderte Fläche wieder abnahm. Somit wurden nach 48 h zwei Effekte gemessen. Zum einen die Inhibition der Migration und zum zweiten die Abnahme der Zellviabilität durch Ifenprodil, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben wurde (Abb. 4.5 A und B). Dennoch kann man sagen, dass der NR2B-spezifische NMDAR-Antagonist Ifenprodil die Migration von LN-229 Zellen inhibieren kann.

Die Invasionsfähigkeit der LN-229 Zellen wurde mittels Matrigel Invasions Assay analysiert. Abb. 4.6 B zeigt exemplarisch Membranausschnitte mit invasiven LN-229 Zellen. Untersucht wurde MK-801, ein Kanalblocker für  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable NMDARs und der Membran-permeable  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator Bapta-AM, um die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalwegen zu identifizieren.

Die Behandlung mit MK-801 und Bapta-AM konnte im Vergleich mit den unbehandelten Zellen nach 48 h eine leichte, aber nicht-signifikante Abnahme der Invasionsfähigkeit der LN-229 Zellen zeigen. Im Mittel waren  $22 \pm 7$  % der unbehandelten LN-229 Zellen invasiv und konnten die mit Matrigel beschichtete Membran passieren. Bei den MK-801-behandelten Zellen zeigten  $13 \pm 3$  % der Zellen ein invasives Verhalten. Nach Behandlung mit Bapta-AM konnten ebenfalls nur noch  $13 \pm 5$  % der Zellen die Matrigel-Matrix passieren.

Die Blockierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen NMDARs, wie auch die Chelatierung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  resultiert in einer nicht-signifikanten Inhibition der Invasion von LN-229 Zellen um 41 % (Abb. 4.6 B und C).



**Abb. 4.6: Zellmigration und Invasion von LN-229 Zellen nach Behandlung mit iGluR-Antagonisten und Bapta-AM.**

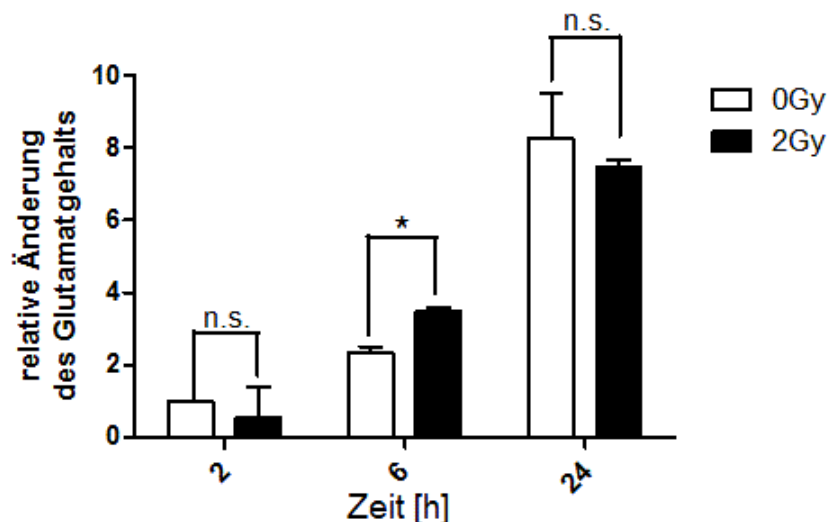
A) Quantitative Auswertung der mit migrierenden Zellen bedeckten Fläche über die Zeit nach Behandlung mit Serum-freien OptiMEM-Medium (Kontrolle), Gyki-52466 (10  $\mu$ M), Memantin Hydrochlorid (100  $\mu$ M) und Ifenprodil (25  $\mu$ M) (SEM,  $n \geq 3$ ; \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ , Student's *t*-test). iGluR-Antagonisten können die Migration inhibieren. B) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen des Membranausschnitts der Matrigel Invasionsanalyse von invasiven LN-229 Zellen nach Behandlung mit Serum-freien OptiMEM-Medium (Kontrolle), MK-801 (10  $\mu$ M) und Bapta-AM (3  $\mu$ M). Die Skalierung beträgt 100  $\mu$ m. C) Matrigel Invasionsanalyse der unbehandelten LN-229 Glioblastomzellen nach Behandlung mit Serum-freien OptiMEM-Medium (Kontrolle), MK-801 (10  $\mu$ M) und Bapta-AM (3  $\mu$ M). Für jedes Experiment wurden pro Behandlung drei Matrigel-beschichtete Zellkultureinsätze verwendet und je 5 Felder pro Einsatz fotografiert und ausgezählt (SEM,  $n = 3$ ). MK-801 und Bapta-AM zeigten keine signifikante Inhibition der Zellinvasion.

In Kapitel 4.3 wurde gezeigt, dass AMPAR- und NMDAR-Antagonisten die Zellviabilität und das Zellüberleben von LN-229 Glioblastomzellen signifikant reduzieren und zusätzlich die Zellmigration signifikant inhibieren können.

#### 4.4 Einfluss von ionisierender Bestrahlung auf das glutamaterge System der Glioblastomzelllinie LN-229

##### 4.4.1 Einfluss von ionisierender Bestrahlung auf die Glutamatfreisetzung von LN-229 Zellen

Eine der ersten strahlenbiologischen Fragen dieser Arbeit war, ob die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen die Glutamatfreisetzung von LN-229 Zellen beeinflusst. Zur Klärung der Frage wurde 2 h, 6 h und 24 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy das konditionierte Medium gesammelt. Mit Hilfe eines Glutamat Tests wurden die Glutamat Konzentrationen im extrazellulären Medium photometrisch ermittelt. Wie in Abb. 4.7 zu sehen, setzten die LN-229 Zellen nach Bestrahlung nur zum 6 h Zeitpunkt signifikant mehr Glutamat frei. Nach 24 h liegt wieder kein signifikanter Unterschied zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten Zellen vor. Es kann davon ausgegangen werden, dass durch Bestrahlung die Glutamatfreisetzung nicht beeinflusst wird.



**Abb. 4.7: Messung der Glutamat Konzentration von LN-229 Zellen im extrazellulären Medium nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy.**

Die Glutamat Konzentration im Zellkulturüberstand wurde mittels eines photometrischen Enzymtests im Triplet gemessen. Das konditionierte Medium wurde nach 2 h, 6 h und 24 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy gesammelt (SEM; n = 2; \*,  $p \leq 0,05$ , Student's *t*-test). IR beeinflusst nicht die Glutamatfreisetzung.

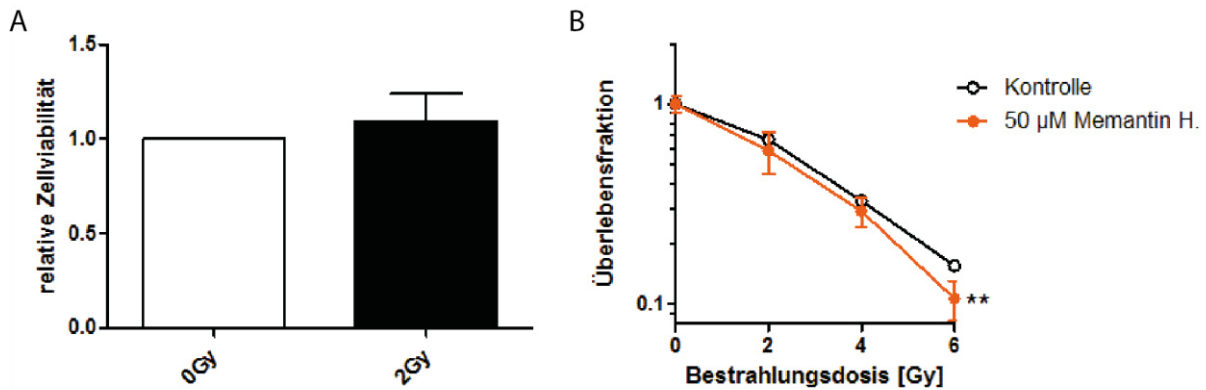
#### **4.4.2 Einfluss von ionisierender Bestrahlung und NMDAR-Hemmung auf das Zellüberleben von LN-229 Zellen**

Inwieweit Bestrahlung die Lebensfähigkeit von LN-229 Zellen beeinflusst, wird in diesem Kapitel beschrieben. Mittels MTT-Assay wurde die Zellviabilität photometrisch 48 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy gemessen. Vergleicht man die unbestrahlte Kontrolle mit der Zellviabilität der bestrahlten Zellen, so konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden (Abb. 4.8 A). IR mit einer Dosis von 2 Gy beeinträchtigt innerhalb von 48 h nicht die Zellviabilität von LN-229 Zellen.

Die Untersuchung des Zellüberlebens von LN-229 Zellen fand durch den *clonogenic survival assay* statt. Der Verlauf der Überlebenskurve der unbehandelten Kontrolle zeigt, dass eine Bestrahlung ab 2 Gy nach 9 Tagen ein vermindertes Zellüberleben zur Folge hat (Abb. 4.8 B). Es konnte eine Dosis-abhängige Abnahme des Zellüberlebens identifiziert werden.

Um einen möglichen Strahlen-sensitierenden Effekt durch NMDAR-Blockung zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem spezifischen NMDAR-Antagonisten Memantin Hydrochlorid behandelt. Vergleicht man die Überlebenskurve der unbehandelten Kontrolle mit den Memantin-behandelten Zellen, so ist nach einer Bestrahlung von 6 Gy ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen (Abb. 4.8 B). Ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  konnten keine Kolonien mehr überleben, mit und ohne Bestrahlung. Memantin Hydrochlorid reduziert somit das Zellüberleben (Kapitel 4.3.1, Abb. 4.5), und sensitisiert LN-229 Zellen bei einer Dosis von 6 Gy und einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  (Abb. 4.8 B).





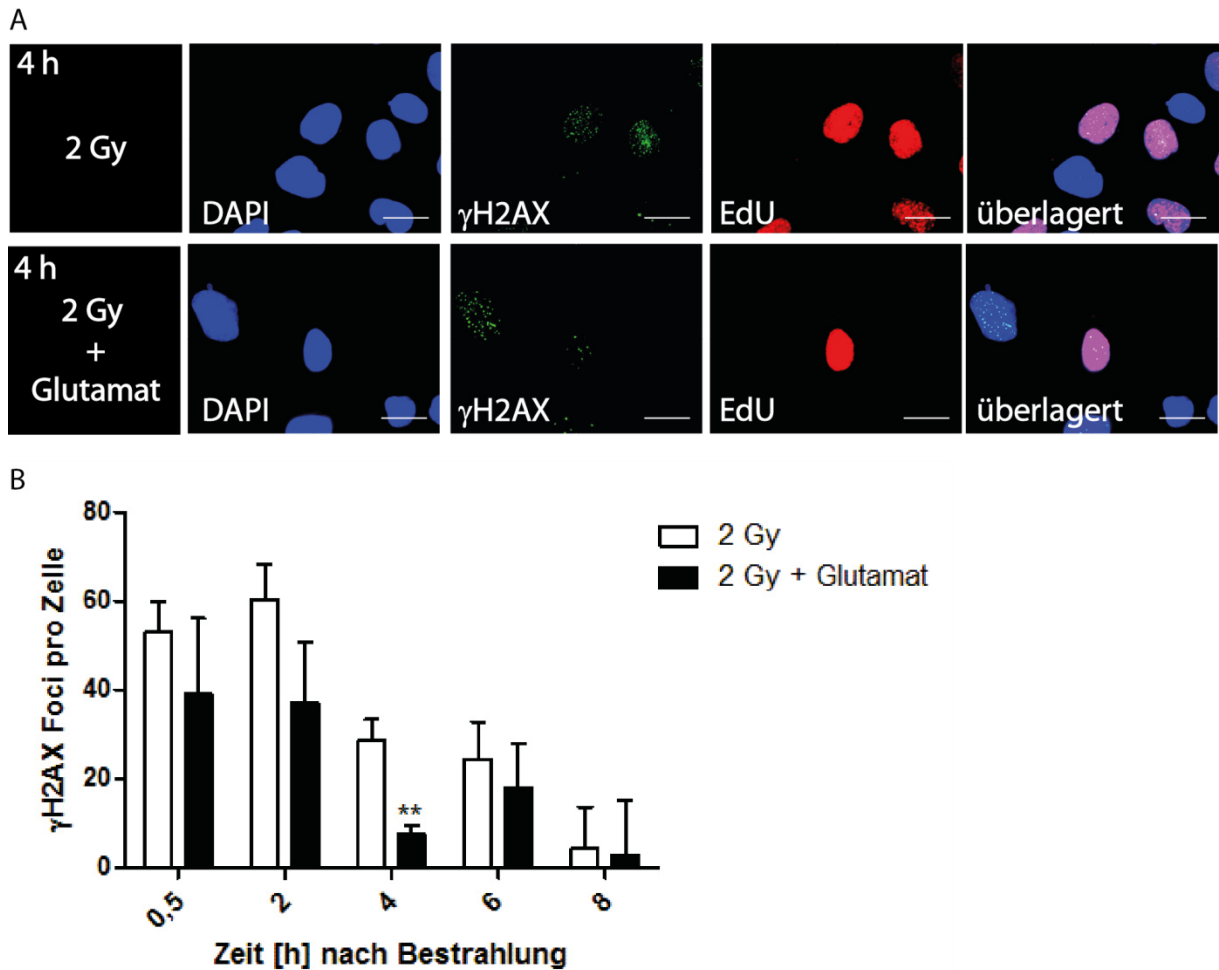
**Abb. 4.8: Zellviabilität von unbestrahlten und bestrahlten LN-229 Zellen und Überlebensfähigkeit nach Bestrahlung und Behandlung mit Memantin Hydrochlorid.**

48 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy wurde die Zellviabilität von LN-229 Zellen mittels MTT-Assay ermittelt (SEM,  $n = 5$ ). IR hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität. B) Klonogenes Zellüberleben von LN-229 Zellen nach Bestrahlung und Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Memantin Hydrochlorid. Die Überlebenskurve mit Überlebensfraktionen normalisiert auf die *plating efficiency* (SD,  $n = 1$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ , Student's *t*-test). Bei einer Dosis von 6 Gy wirkt Memantin Hydrochlorid Strahlen-sensitierend.

#### 4.4.3 Einfluss von ionisierender Bestrahlung und Glutamat auf die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur und den Zellzyklus von LN-229 Zellen

Glioblastomzellen gelten als strahlenresistent und sind auch resistent gegenüber exzitotoxischem Glutamat, welches sie selbst freisetzen. Im Hinblick darauf lag es nahe die Rolle des glutamatergen Systems bei der DNA Schadensantwort zu untersuchen. Hierzu wurden die Zellen mit Röntgenstrahlen bestrahlt, um einen DNA-Schaden zu generieren. Zunächst sollte untersucht werden, ob Glutamat einen Einfluss auf die Reparatur strahleninduzierter DSBs hat. Da die Reparaturmechanismen für DSBs sich in den verschiedenen Zellzyklusphasen unterscheiden, wurden S-Phase Zellen durch eine einstündige Behandlung mit dem Thymidin-Analogon EdU markiert und konnten so in ihrem Zellzyklusverlauf weiterverfolgt werden. In der S-Phase sind die zwei Hauptreparaturwege HR und NHEJ vertreten, sodass allgemeine Effekte auf die Reparatur von strahleninduzierten DSBs untersucht werden konnten. Welcher Reparaturweg explizit eine Rolle spielt war nicht Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Direkt nach Bestrahlung wird bei DNA DSBs das Histon H2AX phosphoryliert ( $\gamma\text{H2AX}$ ) und dient somit als Marker. Durch einen spezifischen Antikörper für  $\gamma\text{H2AX}$  ließen sich nach ionisierender Bestrahlung im Nukleus der LN-229 Zellen  $\gamma\text{H2AX}$  Foci, also DNA-Schäden, vorfinden, die mit der Zeit abgebaut werden. Am Fluoreszenzmikroskop wurden

ausschließlich die  $\gamma$ H2AX Foci der EdU-positiven S/G2-Phase Zellen gezählt. Trotz der Glutamatfreisetzung der Zellen wurde eine gesättigte Glutamat Konzentration von 10 mM appliziert, da zu früheren Zeitpunkten noch keine gesättigte Glutamat Konzentrationen im extrazellulären Medium vorliegt. Nach 4 h Reparaturzeit liegen durch Glutamatfreisetzung etwa 40  $\mu$ M Glutamat im extrazellulären Medium vor. Vergleicht man die Reparatur der strahleninduzierten DSBs während der S-Phase von unbehandelten und Glutamat-behandelten Zellen, fällt auf, dass die Glutamat-behandelten Zellen nach 4 h Reparaturzeit signifikant weniger DSBs aufweisen (Abb. 4.9 A und B). 0,5 h und 2 h nach Bestrahlung konnte noch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der  $\gamma$ H2AX Foci zwischen den bestrahlten Kontrollzellen und den Glutamat-behandelten Zellen ausgemacht werden. Nach 4 h Reparaturzeit hatten die unbehandelten Zellen noch  $29 \pm 5$   $\gamma$ H2AX Foci, während die Glutamat-behandelten Zellen nur noch  $7 \pm 2$   $\gamma$ H2AX Foci zeigten. Die Anzahl an DSBs war somit um 70 % geringer als bei den unbehandelten Zellen und der Unterschied somit hoch signifikant (Abb. 4.9 B). Nach 6 h und 8 h Reparaturzeit glich sich das Level an  $\gamma$ H2AX Foci wieder an. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass nach 8 h etwa 80  $\mu$ M Glutamat im extrazellulären Medium vorlagen und somit schon eine Aktivierung von iGluRs hervorgerufen werden konnte. Nach 8 h waren bei der bestrahlten Kontrolle und den Glutamat-behandelten Zellen wieder fast alle strahleninduzierten DSBs repariert.

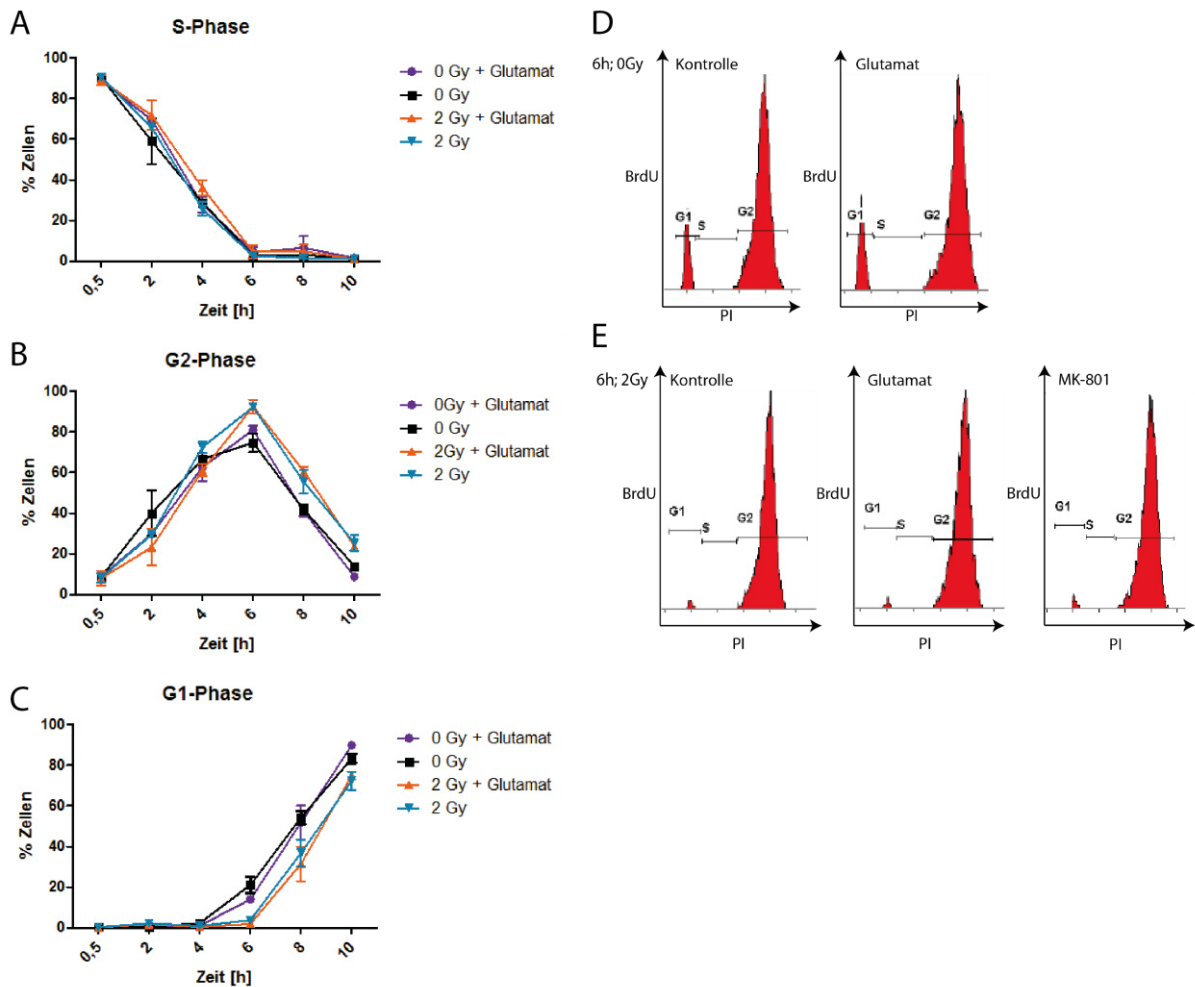


**Abb. 4.9: Einfluss von Glutamat auf die Reparatur von strahleninduzierten DSBs in der S/G2-Phase.**

A) EdU/ $\gamma$ H2AX-Färbung mit bestrahlten (2 Gy) und Glutamat-behandelten LN-229 Zellen nach 4 h Reparaturzeit. Direkt vor Bestrahlung und während der gesamten Reparaturzeit wurden die Zellen mit Glutamat/Glyzin (10 mM/10  $\mu$ M) behandelt. Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die Zellen spezifisch mit einem Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX (grün) und EdU (rot) gefärbt. Der DAPI-gefärbte Zellkern wird in blau dargestellt. Die Skalierung beträgt 25  $\mu$ m. B) Reparaturkinetik von bestrahlten LN-229 Kontrollzellen und Glutamat-behandelten LN-229 Zellen. Die  $\gamma$ H2AX Foci der EdU-positiven S/G2-Phase Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die unbestrahlten Kontrollen wurden identisch behandelt und abgezogen (SEM, n = 3; \*\*, p  $\leq$  0,01, Student's *t*-test). Glutamat hat einen Einfluss auf die Reparatur von strahleninduzierten DSBs.

Ein Grund für eine schnellere DSB-Reparatur könnte ein Einfluss von Glutamat auf die Zellzyklus Kontrollpunkte sein, die bei Schäden zu einem Zellzyklusarrest führen. Aus diesem Grund wurde ein Zellzyklus Assay angewandt, der den Zellzyklusverlauf von unbehandelten und Glutamat-behandelten Zellen ohne und mit Bestrahlung vergleichen sollte. Aufgetragen wurde der Anteil an BrdU-positiven S-, G2- und G1-Phase Zellen in Prozent für die angegebenen Zeitpunkte nach Behandlung (Abb.

4.10 A-E). Vergleicht man den Zellzyklusverlauf der unbehandelten und Glutamat-behandelten Zellen ohne Bestrahlung, so ist kein Unterschied im Anteil der verschiedenen Zellzyklusphasen zu erkennen. Die BrdU-positiven S-Phase Zellen gingen in der gleichen Zeit in die G2-Phase und anschließend in die G1-Phase über (Abb. 4.10 A-C). Dasselbe Ergebnis erhielt man nach Bestrahlung (Abb. 4.10 A-D). Vergleicht man 6 h nach Bestrahlung die unbestrahlten Zellen mit den bestrahlten Zellen in Abb. 4.10 A, B, C und vor allem D und E, so kann man den Eintritt des G2/M-Checkpoints erkennen. Nach 6 h ohne Bestrahlung waren bereits 21 % der BrdU-positiven Zellen in der G1-Phase und noch 75 % der Zellen in der G2-Phase, während nach Bestrahlung erst 4 % in der G1-Phase und noch 92 % der BrdU-positiven Zellen in der G2-Phase waren. Nach Bestrahlung war es zu einem Zellzyklusarrest zwischen der G2 und der M Phase gekommen. Auch nach Behandlung mit dem NMDAR-Blocker MK-801 zeigen die bestrahlten Zellen nach 6 h weiterhin einen G2-Checkpoint. 95 % der BrdU-positiven Zellen waren noch in der G2-Phase. Die Inhibition von NMDARs kann also den Eintritt des G2-Checkpoints nicht verhindern (Abb. 4.10 E).



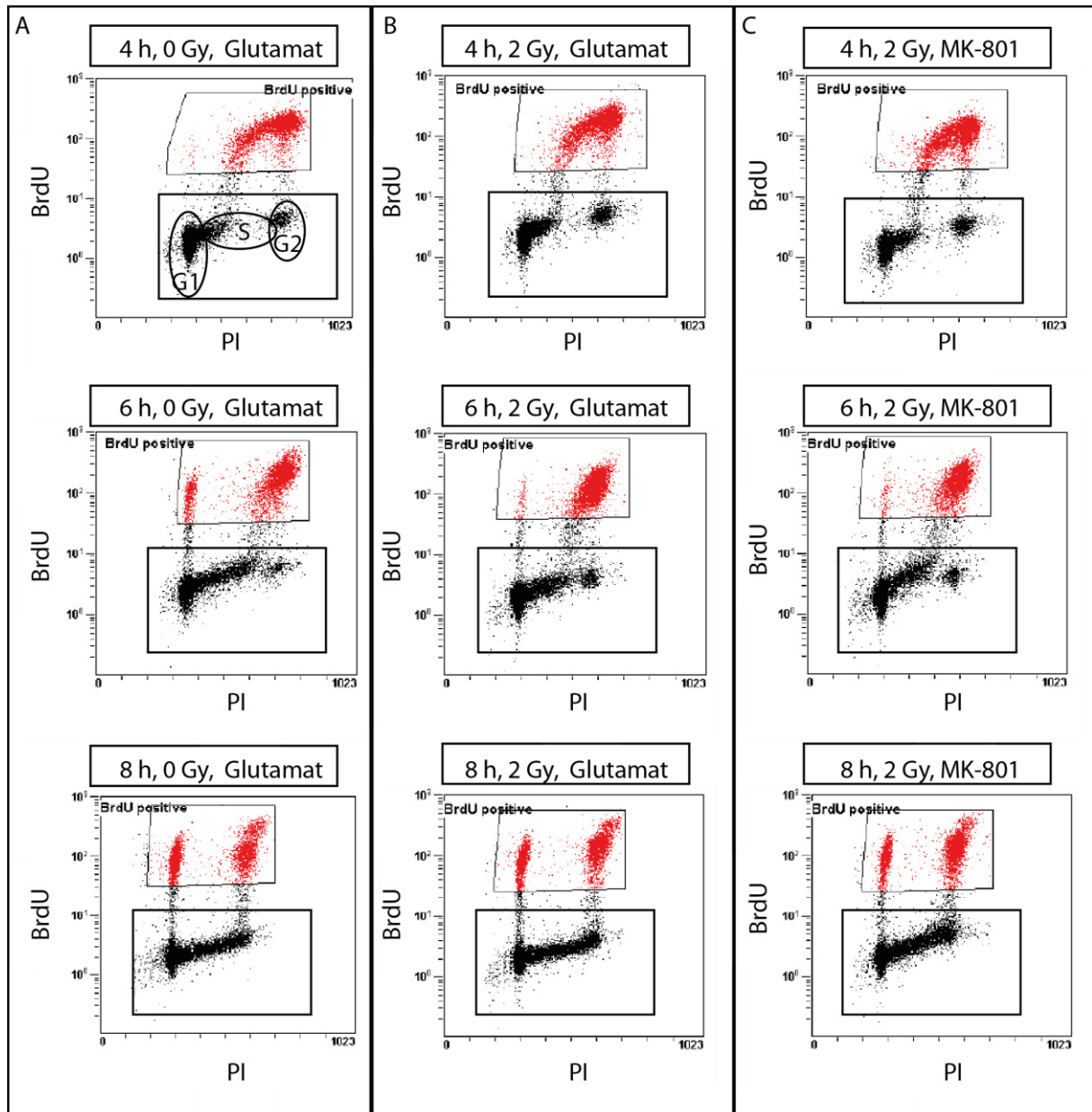
**Abb. 4.10: Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung und Behandlung mit Glutamat und MK-801.**

A-C) Zellzyklusverteilung von bestrahlten (2 Gy) und unbestrahlten LN-229 Zellen nach Bestrahlung und Behandlung mit Glutamat/Glyzin (10 mM/10  $\mu$ M). S-Phase (A), G2-Phase (B), G1-Phase (C) (SEM, n = 3). Die Stimulation mit Glutamat hat keinen Einfluss auf den Zellzyklusverlauf. D-E) Zellzyklusverteilung im Detail von unbestrahlten (D) und bestrahlten (E) LN-229 Zellen 6 h nach Behandlung mit und ohne Glutamat/Glyzin (10 mM/10  $\mu$ M) oder MK-801 (10 mM). Die LN-229 Zellen zeigen nach 6 h einen G2/M-Checkpoint, der durch Glutamat-Stimulation und Blockierung von NMDARs durch MK-801 nicht verändert wird.

Die Glutamat-behandelten LN-229 Zellen zeigten nach Bestrahlung keinen G1/S-Checkpoint, da die BrdU-negativen Zellen (schwarz) ab 4 h nach Bestrahlung ohne einen Zellzyklusarrest aus der G1-Phase in die S-Phase übergingen. Dies ist zu erkennen, wenn man den Zellzyklusverlauf der unbestrahlten mit den bestrahlten Zellen für verschiedene Zeitpunkte (4 h, 6 h, 8 h) vergleicht (Abb. 4.11 A und B).

Auch nach Behandlung mit dem NMDAR-Kanalblocker MK-801 konnte der G1-Zellzyklusarrest nicht eingeleitet werden. Dies ist zu erkennen, wenn man die Zellzyklusverteilung der Glutamat-behandelten Zellen mit den MK-801-behandelten

Zellen für verschiedene Zeitpunkte (4 h, 6 h, 8 h) vergleicht (Abb. 4.11 B und C). Bei einem G1-Zellzyklusarrest würde man eine Anhäufung von G1-Zellen sehen, die nicht in die S-Phase eintreten. Es konnte weder ein Einfluss auf den G2/M noch auf den G1/S Checkpoint identifiziert werden. Somit sind NMDARs nicht an der Zellzykluskontrolle durch Einleitung von Checkpoints nach Bestrahlung beteiligt.



**Abb. 4.11: Zellzyklusverteilung von unbestrahlten und bestrahlten LN-229 Zellen nach Behandlung mit Glutamat oder MK-801.**

A-C) Zellzyklusanalyse von unbestrahlten (A) und bestrahlten (B und C) LN-229 Zellen 4 h, 6 h und 8 h nach Behandlung mit Glutamat/Glyzin (10 mM/10  $\mu$ M) ohne (A und B) und mit (C) MK-801 (10  $\mu$ M). NMDARs haben keinen Einfluss auf den G1/S-Checkpoint.

Da die Glutamat-Behandlung nach 4 h einen hoch signifikanten Effekt auf die Reparatur von strahleninduzierten DSBs zeigte, zu späteren Reparaturzeiten jedoch wahrscheinlich durch die Glutamatfreisetzung keine Signifikanz ermittelt werden konnte, wurden wieder spezifische AMPAR- und NMDA-Antagonisten verwendet.

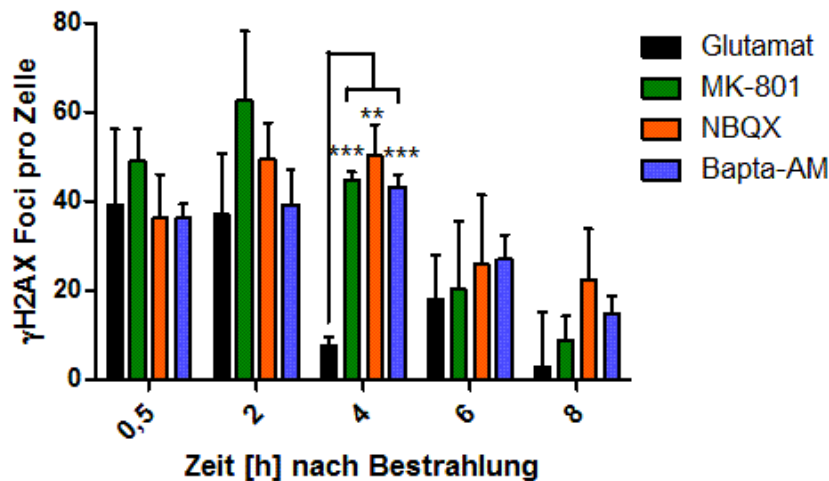
Erneut wurde die Reparaturkinetik der LN-229 Zellen mit dem EdU/ $\gamma$ H2AX Assay untersucht, aber diesmal nach Inhibition der NMDARs durch MK-801 und der AMPARs durch NBQX. Auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator Bapta-AM wurde wieder verwendet. In Abb. 4.12 werden die Glutamat-behandelten Zellen, welche eine schnellere DSB-Reparatur zeigen, mit den Antagonisten-behandelten Zellen verglichen. Die bestrahlte Kontrolle im Vergleich zu Glutamat wurde bereits in Abb. 4.9 B dargestellt. In Abb. 4.12 ist zu erkennen, dass der begünstigende Effekt von Glutamat auf die Reparatur von strahleninduzierten DSBs durch die Inhibition der iGluRs und auch durch Chelatierung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  nach 4 h signifikant aufgehoben werden kann.

0,5 h und 2 h nach Behandlung und Bestrahlung war der Unterschied in der Anzahl an  $\gamma$ H2AX Foci zwischen Glutamat-behandelten und Antagonisten-behandelten Zellen noch nicht signifikant unterschiedlich. 4 h nach Behandlung und Bestrahlung war erstmals mit beiden Antagonisten ein hoch signifikanter Effekt auf die DSB-Reparatur zu sehen. Das Level an DSB war stark erhöht im Vergleich zur Glutamat-Behandlung. Die MK-801-behandelten Zellen hatten noch  $45 \pm 2$   $\gamma$ H2AX Foci, zeigten also ein mehr als 6fach höheres Level an DSBs als die Glutamat-behandelten Zellen. Die NBQX-behandelten Zellen zeigten noch  $50 \pm 27$   $\gamma$ H2AX Foci und hatten somit sogar ein 7fach höheres Level an DSBs.

Nach 6 h glichen sich die Level wieder langsam an. Die MK-801-behandelten Zellen hatten nur noch ein 11 % höheres Level an DSBs und die NBQX-behandelten Zellen noch ein 44 % höheres Level an DSBs im Vergleich zu den Glutamat-behandelten Zellen. Aber auch nach 8 h war das Level an DSBs bei den MK-801- und den NBQX-behandelten Zellen mit  $9 \pm 5$   $\gamma$ H2AX Foci und  $22 \pm 11,5$   $\gamma$ H2AX Foci noch leicht erhöht im Vergleich zu  $3 \pm 12$   $\gamma$ H2AX Foci bei den Glutamat-behandelten Zellen, wenn auch nicht signifikant. Die AMPARs scheinen dabei einen vergleichbar großen Anteil an der DSB-Reparatur zu haben wie die NMDARs, was die Reparaturkinetik im direkten Vergleich verdeutlicht (Abb. 4.12).

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator Bapta-AM zeigte ebenfalls nach 0,5 h und 2 h noch keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Levels an  $\gamma$ H2AX Foci. Aber wie auch bei

den iGluR-Antagonisten konnte mit Bapta-AM ebenfalls nach 4 h ein stark signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Glutamat-behandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 4.12). Nach der Behandlung mit Bapta-AM lag ein 6fach höheres Level an DSBs im Vergleich zu den Glutamat-behandelten Zellen vor. Nach 6 h war das Level an DSBs bei den Bapta-AM behandelten Zellen noch um 50 % höher als das Level an DSBs bei den Glutamat-behandelten Zellen. Und auch nach 8 h Reparaturzeit war das Level an DSBs noch 5fach höher als bei den Glutamat-behandelten Zellen, wenn auch nicht signifikant höher (Abb. 4.12). Die Inhibition von AMPARs und NMDARs, wie auch die Chelatierung von  $\text{Ca}^{2+}$  kann die Reparatur von strahleninduzierten DSBs während der S-Phase beeinträchtigen.



**Abb. 4.12: Reparatur von strahleninduzierten DSBs während der S/G2-Phase nach Behandlung mit iGluR-Antagonisten und Bapta-AM.**

A) Reparaturkinetik nach EdU/ $\gamma$ H2AX-Färbung von bestrahlten (2 Gy) und iGluR-Antagonisten- und Bapta-AM-behandelten LN-229 Zellen. Direkt vor Bestrahlung und während der gesamten Reparaturzeit wurden die Zellen mit Glutamat/Glyzin (10 mM/10  $\mu$ M), MK-801 (10  $\mu$ M), NBQX (10  $\mu$ M) und Bapta-AM (3  $\mu$ M) behandelt. Die unbestrahlten Kontrollen wurden identisch behandelt und abgezogen (SEM, n = 3; \*\*, p  $\leq$  0,01; \*\*\*, p  $\leq$  0,001, Student's *t*-test). iGluRs sind bei der DSB-Reparatur in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Weise beteiligt.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit 10 mM Glutamat 4 h nach Bestrahlung ein signifikant geringeres Level an strahleninduzierten DSBs zur Folge hat als bei den bestrahlten Kontrollzellen. Die Verwendung von iGluR-Antagonisten konnte den Effekt nach 4 h umkehren. Glutamat oder MK-801 hatte dabei keinen Einfluss auf Zellzyklus Kontrollpunkte, die diesen Effekt hätten erklären können. AMPARs und NMDARs nehmen einen vergleichbar großen Einfluss auf die



DSB-Reparatur in S/G2-Phase Zellen und  $\text{Ca}^{2+}$  scheint dabei eine Schlüsselfunktion zu haben. Dies spricht dafür, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPARs und NMDARs an der Reparatur von DSBs beteiligt sind.

#### **4.4.4 Einfluss von ionisierender Bestrahlung auf die Migration und Invasion von LN-229 Zellen nach Behandlung mit iGluR-Antagonisten und Bapta-AM**

In diesem Kapitel wird der Effekt von ionisierender Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy auf die Migration und Invasion von LN-229 Zellen nach Behandlung von iGluR-Antagonisten und Bapta-AM beschrieben. Zunächst sollten die Zellen auf eine strahleninduzierte Zellmigration und Invasion untersucht werden. Der Migrations- und Invasions Assay wurde, wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, durchgeführt.

6 h nach Entfernen des Zellkultureinsatzes bedeckten die unbestrahlten Zellen  $6 \pm 1$  % der Ursprungsfläche durch Migration, während die bestrahlten Zellen bereits  $10 \pm 3$  % der Ursprungsfläche bedeckten (Abb. 4.13 A). Nach 24 h waren  $27 \pm 2$  % der Ursprungsfläche durch unbestrahlte Zellen bedeckt und  $35 \pm 9,1$  % der Fläche durch bestrahlte Zellen. 48 h nach Migrationsstart bedeckten die unbestrahlten Zellen  $52 \pm 6$  % der Fläche und die bestrahlten bereits  $65 \pm 11$  % der Fläche. Somit zeigte die Bestrahlung mit 2 Gy nach 6 h eine 65 %ige, nach 24 h eine 29 %ige und nach 48 h eine 25 %ige Steigerung der Zellmigration im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen. Die Steigungen waren jedoch nicht signifikant (Abb. 4.13 A).

Die invasiven Zellen wurden mit Kristallviolett gefärbt und am Mikroskop ausgezählt. Abb. 4.13 B zeigt exemplarisch Membranausschnitte von invasiven LN-229 Zellen ohne und mit Bestrahlung. Nach Bestrahlung mit 2 Gy zeigte sich eine Erhöhung der Anzahl an invasiven Zellen, die die Matrigel-Matrix überwinden konnten. Ohne Bestrahlung zeigten  $22 \pm 7$  % der Zellen nach 48h ein invasives Verhalten, während 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy  $34 \pm 15$  % der LN-229 Zellen ein invasives Verhalten zeigten (Abb. 4.13 C). Somit rief die Bestrahlung nach 48 h eine Erhöhung der Invasion um 53 % hervor, die jedoch nicht signifikant war.

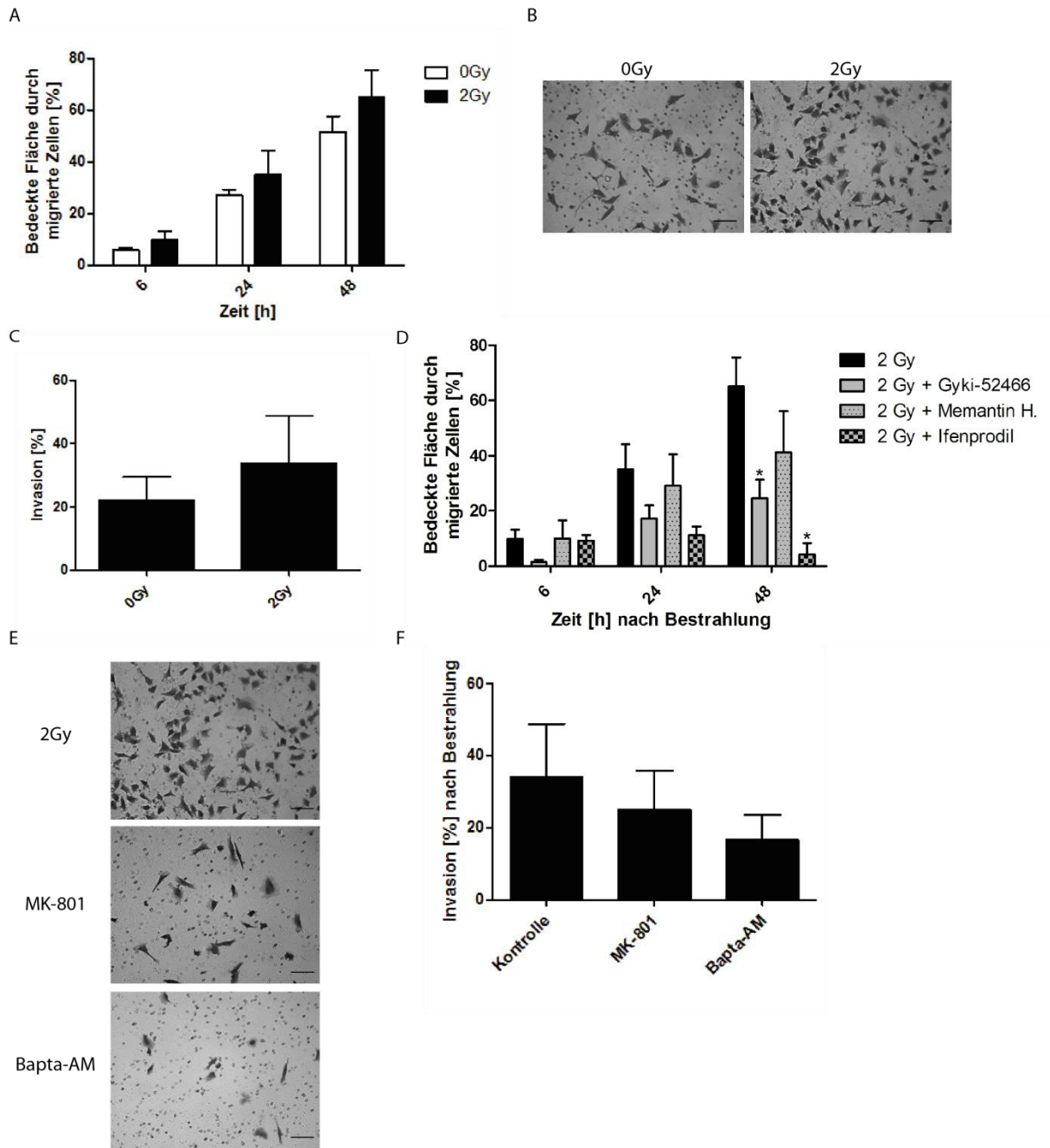
Als nächstes wurde der Einfluss der verschiedenen AMPAR- und NMDAR-Antagonisten auf die Migration von LN-229 Zellen nach Bestrahlung untersucht und mit der bestrahlten Kontrolle verglichen. So konnte die Effektivität der Antagonisten bei der strahleninduzierten Migration analysiert werden.

Die Behandlung mit dem spezifischen AMPAR-Antagonisten Gyki-52466 zeigte 6 h nach Bestrahlung eine Inhibition der Zellmigration um 84 % im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle. Nach 24 h wurden  $35 \pm 9$  % der Ursprungsfläche von den bestrahlten Kontrollzellen durch Migration bedeckt und nur  $17 \pm 5$  % nach Behandlung mit Gyki-52466. Die Behandlung mit Gyki-52466 zeigte 24 h nach Bestrahlung eine Unterdrückung der Zellmigration um 51 % im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle. Nach 48 h wurden  $65 \pm 11$  % der Ursprungsfläche von bestrahlten Kontrollzellen durch Migration bedeckt und nur  $24 \pm 7$  % nach Behandlung mit Gyki-52466. Die Behandlung mit Gyki-52466 zeigte 48 h nach Bestrahlung eine signifikante Unterdrückung der Zellmigration um 38 % im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle. Der AMPAR-Antagonist Gyki-52466 konnte somit 48 h nach Bestrahlung die Migration von LN-229 Zellen signifikant inhibieren.

Als Vertreter der NMDAR-Antagonisten wurde Memantin Hydrochlorid ausgewählt. Die Behandlung mit Memantin zeigte 6 h nach Bestrahlung eine minimale Erhöhung der Zellmigration um 2 % im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle (Abb. 4.13 D). 24 h nach Memantin-Behandlung und Bestrahlung zeigte sich schließlich eine Inhibition der Zellmigration um 17 % und nach 48 h eine Reduktion der Zellmigration um 36,5 % im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle. Die Inhibition der Migration war allerdings nicht signifikant.

Als dritter Antagonist wurde der spezifische NR1/NR2B-Antagonist Ifenprodil verwendet. Die Behandlung mit Ifenprodil zeigte 6 h nach Bestrahlung eine minimale Verringerung der Zellmigration um 6 % im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle (Abb. 4.13 D). 24 h nach Behandlung mit Ifenprodil und Bestrahlung zeigten die Zellen schließlich eine Inhibition der Zellmigration um 68 % und nach 48 h eine signifikante Reduktion um 93 % im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle. 48 h nach der Ifenprodil-Behandlung und Bestrahlung war die Fläche des Assays durch vermehrten Zelltod geringer als 24 h nach Behandlung und Bestrahlung. Es konnten wieder zwei Effekte gemessen werden. Die Inhibition der Zellmigration und die Abnahme der Zellviabilität. Dieser Effekt wurde bereits in Abb. 4.6 A für die unbestrahlten Zellen 48 h nach Ifenprodil-Behandlung gezeigt. Die Inhibition der Zellmigration nach Bestrahlung durch den NMDAR-Antagonisten Ifenprodil verdeutlicht das Potential der spezifischen Inhibition von NR1/NR2B NMDARs als Therapieform gegen GBM in Kombination mit Bestrahlung.

Abb. 4.13 E zeigt exemplarisch Membranausschnitte des Matrigel-Invasionsassays nach Bestrahlung und Behandlung mit MK-801 und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators Bapta-AM. Die Behandlung mit MK-801 und Bapta-AM konnte im Vergleich mit den unbehandelten Zellen 48 h nach Bestrahlung eine Abnahme der Invasionsfähigkeit der LN-229 Zellen zeigen. Im Mittel zeigten  $34 \pm 15$  % der LN-229 Zellen eine strahleninduzierte Invasivität. Bei den MK-801-behandelten Zellen zeigten nur noch  $25 \pm 11$  % der Zellen ein invasives Verhalten nach Bestrahlung. Nach Behandlung mit Bapta-AM konnten noch  $17 \pm 7$  % der Zellen die Matrigel-Matrix passieren. Die Invasion nach Bestrahlung und Behandlung mit MK-801 und Bapta-AM war jedoch nicht signifikant niedriger im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.



**Abb. 4.13: Einfluss von ionisierender Bestrahlung auf die Migration und Invasion von LN-229 Zellen nach Behandlung mit iGluR-Antagonisten und Bapta-AM.**

A) Quantitative Auswertung der mit migrierenden Zellen bedeckten Fläche über die Zeit vor und nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy (SEM,  $n \geq 4$ ). B) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen des Membranausschnitts der Matrigel Invasionsanalyse von invasiven LN-229 Zellen vor und nach Bestrahlung mit 2 Gy. Die Skalierung beträgt 100 µm. C) Matrigel Invasionsanalyse der unbestrahlten LN-229 Glioblastomzellen und 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy. Für jedes Experiment wurden pro Behandlung drei Matrigel-beschichtete Zellkultureinsätze verwendet und je 5 Felder pro Einsatz fotografiert und ausgezählt (SEM,  $n = 3$ ). D) Quantitative Auswertung der mit migrierenden Zellen bedeckten Fläche über die Zeit nach Bestrahlung (2 Gy) und Behandlung mit Serum-freien OptiMEM-Medium, Gyki-52466 (10 µM), Memantin Hydrochlorid (100 µM) und Ifenprodil (25 µM) (SEM,  $n \geq 3$ ; \*,

Student's *t*-test). E) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen des Membranausschnitts der Matrigel Invasionsanalyse von invasiven LN-229 Zellen nach Bestrahlung (2 Gy) und Behandlung mit Serum-freiem OptiMEM-Medium (Kontrolle), MK-801 (10  $\mu$ M) und Bapta-AM (3  $\mu$ M). Die Skalierung beträgt 100  $\mu$ m. F) Matrigel Invasionsanalyse der unbehandelten LN-229 Glioblastomzellen nach Bestrahlung (2 Gy) und Behandlung mit Serum-freiem OptiMEM-Medium (Kontrolle), MK-801 (10  $\mu$ M) und Bapta-AM (3  $\mu$ M). Für jedes Experiment wurden pro Behandlung drei Matrigel-beschichtete Zellkultureinsätze verwendet und je 5 Felder pro Einsatz fotografiert und ausgezählt (SEM, n = 3). IR hat keinen signifikanten Einfluss auf die Migration und Invasion.

In Kapitel 4.4 konnte kein Einfluss von ionisierender Bestrahlung auf die Glutamatfreisetzung der Zelllinie LN-229 nachgewiesen werden. Die Bestrahlung der Zellen mit einer Dosis von 2 Gy zeigte nach 48 h noch keinen Einfluss auf die Zellviabilität, was eine gewisse Strahlenresistenz voraussetzt. Die spezifische Inhibition von NMDARs durch 50  $\mu$ M Memantin Hydrochlorid führte bei einer Dosis von 6 Gy zu einer signifikanten Strahlensensibilisierung. Mit Konzentrationen ab 100  $\mu$ M konnten keine Kolonien mehr überleben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit 10 mM Glutamat und 10  $\mu$ M Glyzin eine schnellere DSB-Reparatur von S-Phase bestrahlten LN-229 Zellen zur Folge hat. Dieser Effekt konnte jedoch nicht durch einen Einfluss auf den Zellzyklusverlauf oder die Zellzykluskontrollpunkte erklärt werden. Durch spezifische Inhibition von AMPARs und NMDARs konnte jedoch die verbesserte DSB-Reparatur wieder aufgehoben werden. Dies gelang auch durch die Chelatierung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ .

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch Behandlung mit spezifischen AMPAR- und NMDAR-Antagonisten die Migration nach Bestrahlung signifikant reduziert werden konnte. Zusammengefasst offenbaren diese Ergebnisse eine wichtige Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen AMPARs und NMDARs für das Überleben, die Migration/Invasion und die Strahlenresistenz von LN-229 Zellen, wie auch eine therapeutische Relevanz von spezifischen AMPAR- und NMDAR-Antagonisten.

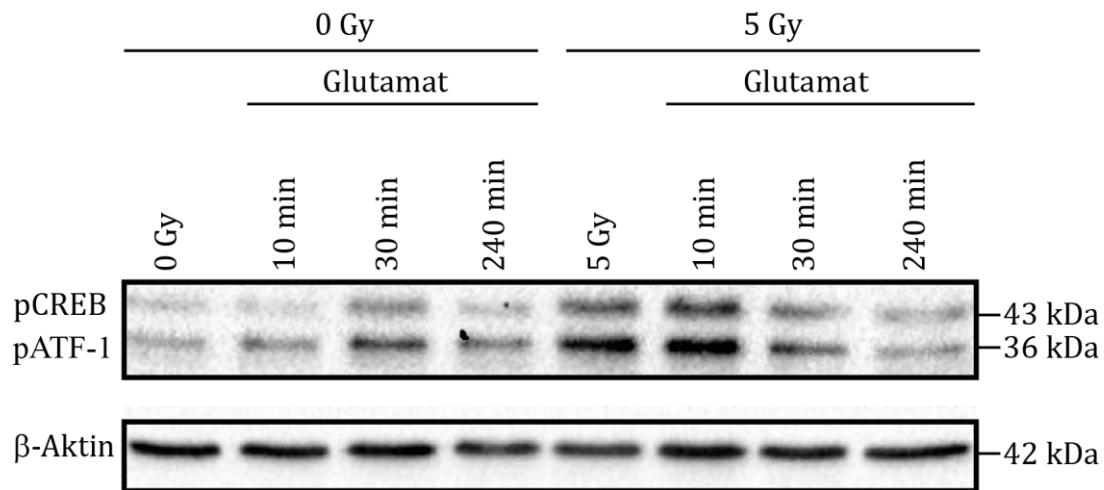
## **4.5 CREB Aktivität und Hemmung der CREB Signaltransduktionskaskade**

### **4.5.1 Aktivierung von CREB durch Glutamat und ionisierende Bestrahlung**

Um einen möglichen Link zwischen der Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen iGluRs und der verbesserten DNA-Reparatur zu identifizieren wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB durch Phosphorylierung an Ser133 untersucht.

Zunächst wurde der Einfluss von Glutamat und IR auf die Phosphorylierung von CREB beschrieben. Hierzu wurden unbestrahlte und bestrahlte Zellen mit 10 mM Glutamat und 10  $\mu$ M Glyzin behandelt und das Level an pCREB (Ser133) für verschiedene Zeitpunkte mittels Western Blot Analyse ermittelt (Abb. 4.14). Der anti-pCREB (Ser133) Antikörper detektierte ebenfalls den phosphorylierten CREB-ähnliche Transkriptionsfaktor *activating transcription factor 1* (pATF-1(Ser63)). CREB und ATF-1 zeigen eine hohe Sequenzhomologie und werden über gleiche extrazelluläre Signale aktiviert, wie z.B. Neurotransmitter und  $Ca^{2+}$  (Peng and Greenamyre, 1998; Sheng et al., 1991).

Vergleicht man das pCREB Level der unbestrahlten Kontrollzellen mit den 30 min Glutamat-behandelten Zellen, so ist das Level an pCREB nach der Behandlung mit Glutamat deutlich erhöht (Abb. 4.14, Spur 1 und 3). Nach 240 min nähert sich das pCREB- Level wieder dem Level der unbestrahlten Kontrolle an (Abb. 4.14, Spur 4). Bestrahlt man die Zellen, so ist ein unmittelbarer Anstieg des pCREB Levels erkennbar, der im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen höher ist (Abb. 4.14, Spur 1 und 5). Nach 10 min Glutamat-Behandlung und Bestrahlung ist das pCREB-Level weiterhin erhöht (Abb. 4.14, Spur 6). Ab 30 min nimmt das Level wieder ab und ist vergleichbar mit dem 30 min Level der unbestrahlten Zellen (Abb. 4.14, Spur 7 und 3). Nach 240 min ist das pCREB-Level wieder vergleichbar mit dem Level der unbestrahlten Kontrollzellen (Abb. 4.14, Spur 1 und 8). Die Phosphorylierung von CREB an Ser133 kann bei LN-229 Glioblastomzellen durch Glutamat und IR erfolgen.



**Abb. 4.14: Detektion des pCREB Levels mittels Western Blot nach Glutamat-Behandlung und IR.**

Western Blot Analyse zum Nachweis von pCREB(Ser133). Die LN-229 Zellen wurden ohne und mit Bestrahlung für 10 min, 30 min und 240 min mit 10 mM Glutamat und 10  $\mu$ M Glyzin behandelt. Die Lysate wurden vorbereitet und einer Western Blot Analyse unterzogen mit einem spezifischen Antikörper gegen den phosphorylierten Transkriptionsfaktor pCREB (Ser133), der gleichzeitig die phosphorylierte Form des CREB-ähnlichen Proteins pATF-1(Ser63) detektiert. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. Glutamat und IR führen zur Phosphorylierung von CREB.

#### 4.5.2 Einfluss der CREB Hemmung auf die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

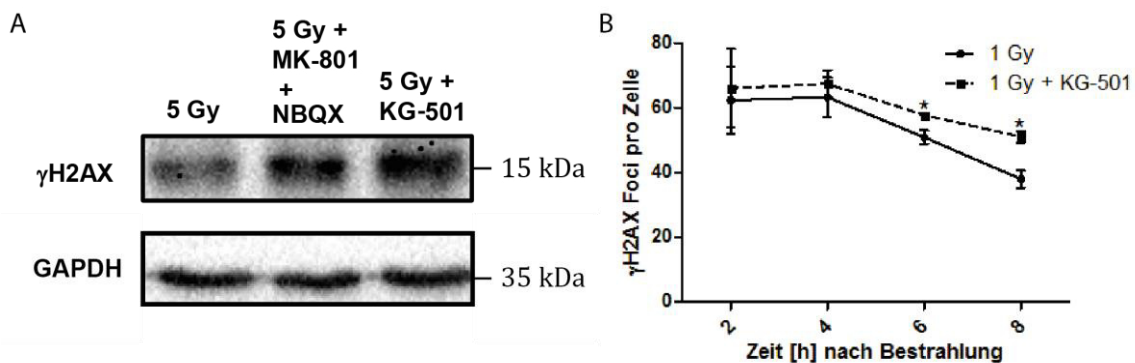
Glutamat fördert die DNA-Reparatur auf eine noch ungeklärte Weise. Ein erster Hinweis war, dass CREB durch Glutamat innerhalb von 30 min an Ser133 phosphoryliert wurde, was für eine Aktivierung der CREB Transkription spricht. IR führt jedoch auch zur Phosphorylierung von CREB an Ser133. Die Phosphorylierung an Ser133 ist zwar obligatorisch für die Aktivierung von CREB, die Aktivierung kann aber auch durch weitere Phosphorylierungen verhindert werden. Bisher wurde beschrieben, dass IR CREB durch Phosphorylierung deaktiviert (Shi et al., 2004). Somit stellte sich die Frage, ob die Aktivierung von CREB durch Glutamat der entscheidende Link zwischen der Glutamat Stimulation und der schnellen DSB-Reparatur ist. Deshalb wurde ein CREB-Inhibitor verwendet um die Rolle der CREB Aktivierung bei der DSB-Reparatur mittels Western Blot und EdU/ $\gamma$ H2AX Färbung zu identifizieren.

Der CREB-Inhibitor KG-501 (Naphthol-AS-E-Phosphat) beeinflusst zwar nicht die Phosphorylierung an Ser133, jedoch wird die Interaktion zwischen CREB und CBP unterbunden, indem es die Bindung zwischen der KID Domäne von CREB und der

KIX Domäne von CBP beeinflusst. Dadurch wird die CREB-vermittelte Genexpression verhindert (Best et al., 2004).

Im Western Blot wurde 30 min nach Behandlung mit KG-501 ein vergleichbar hohes Level an  $\gamma$ H2AX detektiert wie bei der Verwendung der iGluR-Antagonisten MK-801 und NBQX. Im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle waren die Level an  $\gamma$ H2AX nach Inhibition der iGluRs und CREB deutlich erhöht (Abb. 4.15 A). Dies könnte schon ein Hinweis sein, dass die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen AMPARs und NMDARs einen Einfluss auf CREB hat und dadurch die DNA-Reparatur beeinflusst wird.

Vergleicht man die Reparaturkinetik von EdU-positiven S/G2-Phase Zellen vor und nach Behandlung mit KG-501, so ist klar zu erkennen, dass die Reparatur von strahleninduzierten DSBs durch Inhibition der CREB Aktivität langsamer ist (Abb. 4.15 B). 6 h und 8 h nach Bestrahlung und Behandlung mit KG-501 lag eine signifikant höhere Anzahl an  $\gamma$ H2AX Foci im Vergleich zu den bestrahlten Kontrollzellen vor. Nach 6 h Reparaturzeit hatten die KG-501 behandelten Zellen ein noch 13 % und nach 8 h Reparaturzeit ein noch 34 % höheres Level an DSBs im Vergleich zu der bestrahlten Kontrolle. Die CREB-vermittelte Genexpression scheint somit für die schnelle Reparatur von DSBs entscheidend zu sein.



**Abb. 4.15: Detektion des  $\gamma$ H2AX Levels mittels Western Blot nach IR und Behandlung mit iGluR-Antagonisten und KG-501.**

A) Western Blot für das  $\gamma$ H2AX Protein 30 min nach Bestrahlung mit einer Dosis von 5 Gy und Behandlung mit 10 mM Glutamat und 10  $\mu$ M Glyzin (5 Gy), MK-801/NBQX (10  $\mu$ M) und KG-501 (25  $\mu$ M). Es wurden spezifische Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX und GAPDH als Ladekontrolle verwendet. Die Inhibition von iGluRs und die Inhibition der CREB-Aktivität führen zu einem vergleichbar erhöhten Level an  $\gamma$ H2AX. B) EdU/ $\gamma$ H2AX-Färbung mit KG-501 vorbehandelten und bestrahlten (1 Gy) LN-229 Zellen. 1 h vor Bestrahlung und während der gesamten Reparaturzeit wurden die Zellen mit KG-501 behandelt. Die Zellen wurden spezifisch mit einem Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX gefärbt und die Foci von EdU-positiven S/G2-Phase Zellen am Mikroskop ausgezählt (SEM, n = 2, \*, p  $\leq$  0,05, Student's *t*-test). Die CREB-Aktivität spielt eine entscheidende Rolle bei der Reparatur von strahleninduzierten DSBs.



In Kapitel 4.5 konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Glutamat, aber auch IR zur Phosphorylierung von CREB an Ser133 führt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der CREB-vermittelten Genexpression maßgeblich an der schnellen Reparatur von strahleninduzierten DSBs beteiligt ist. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von CREB scheint dabei über die Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen AMPARs und NMDARs durch Glutamat zu erfolgen. Somit konnte ein Link zwischen der Glutamat Stimulation und der verbesserten DSB-Reparatur identifiziert werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Rolle von iGluRs bei der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Glutamat und iGluR-Antagonisten auf die Reparatur von strahleninduzierten DSBs untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Glutamat zu einer schnelleren und effizienteren DSB-Reparatur während der S/G2-Phase führt und durch Inhibition von iGluRs die Reparatur wieder langsamer wird (Abb. 4.9 und 4.12). Auch eine entscheidende Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  bei der DSB-Reparatur konnte identifiziert werden. Die Chelatierung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  durch Bapta-AM zeigte ebenfalls eine Verlangsamung des Reparaturverhaltens (Abb. 4.12). Der Link zwischen der Glutamat-vermittelten iGluR-Aktivierung und der verbesserten DNA-Reparatur konnte im  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Transkriptionsfaktor CREB gefunden werden. Die Inhibition der CREB Aktivierung durch KG-501 zeigte wie auch bei der Verwendung von iGluR-Antagonisten oder Bapta-AM eine langsamere DSB-Reparatur (Abb. 4.12 und 4.15). Die verbesserte Reparatur lässt sich nicht durch veränderte Zellzykluskontrollpunkte erklären (Abb. 4.10). Glutamat scheint einen direkten Einfluss auf den Reparaturmechanismus zu haben. Dabei spielen  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPARs und NMDARs eine Rolle, die durch Öffnung nach Glutamatbindung zur Aktivierung von CREB führen (Abb. 4.9). Zusätzlich konnte eine Strahlen-sensitisierende Wirkung durch den iGluR-Antagonisten Memantin Hydrochlorid festgestellt werden (Abb. 4.8 B). Diese Daten weisen darauf hin, dass das glutamaterge System mit der Malignität von Glioblastoma Multiforme korreliert.

Bei einer Strahlentherapie versucht man in Tumorzellen einen möglichst großen DNA-Schaden hervorzurufen und die DNA-Schadensantwort (DDR) insoweit zu unterdrücken, dass die Zellen Apoptose induzieren. Obwohl Glioblastomzellen als strahlenresistent gelten, reparieren sie DSBs langsamer und ineffizienter als normale Astrozyten. Dies scheint jedoch mit der Heterogenität von Glioblastomen zusammenzuhängen (Short et al., 2007). Bei primären Neuronen verursacht eine andauernde Glutamat Exzitotoxizität DNA Schäden (Didier et al., 1996). Dass dadurch sogar DSBs entstehen können, zeigte Crowe et al. 2006 in kortikalen Neuronen der Ratte. Die Aktivierung von iGluRs resultierte dabei in der Phosphorylierung des Histons H2AX ( $\gamma\text{H2AX}$ ). Dabei entsprach das Ausmaß an DSBs nach Glutamat Exposition einer Gamma-Bestrahlung von 1 Gy. Die Schäden

ergeben sich durch den Glutamat-bedingten  $\text{Ca}^{2+}$ -Überschuss in der Zelle, der zu einer Membrandepolarisation im Mitochondrium führt (Crowe et al., 2006). Durch die mitochondriale Depolarisation kommt es zur ROS Produktion (Krieger and Duchon, 2002). ROS kann wie auch IR zu Schäden in der DNA führen. Obwohl durch den Glutamat-bedingten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx DNA-Schäden entstehen, wird durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Transkriptionsfaktor CREB gleichzeitig die Expression des BER-Reparaturenzym APE1 hochreguliert (Yang et al., 2011).

Für Glioblastome ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF, über den Akt Signalweg zu einer verbesserten DNA-Reparatur und der Strahlenresistenz führen. Dieser Signalweg wird auch durch IR aktiviert (Li et al., 2009). Der Akt-Signalweg führt letztendlich auch zur Aktivierung von CREB durch die Proteinkinase Akt (Du and Montminy, 1998). Es ist deshalb durchaus möglich, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable iGluRs zur effizienten Reparatur von strahleninduzierten DSBs bei Glioblastomzellen beitragen und dabei die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB eine entscheidende Rolle spielt.

## **5.2 Rolle von iGluRs bei der Migration und Invasion von Glioblastomzellen**

Die Verwendung von spezifischen Antagonisten für NMDARs und AMPARs äußerte sich in einer massiven Inhibition der Migration, auch nach Bestrahlung. Vor allem die Hemmung von NR2B-enthaltenden NMDARs, die bei LN-229 Zellen vor allem an den Spitzen der Zellfortsätze exprimiert werden (Abb. 4.1), resultierte in einer starken Inhibition der Zellmigration. Aber auch der Kanalblocker Memantin Hydrochlorid und der AMPAR-spezifische Antagonist Gyki-52466 wiesen einen inhibierenden Effekt auf die Zellmigration auf (Abb. 4.6 und 4.13). Memantin Hydrochlorid wird bereits Parkinson und Alzheimer Patienten als Neuroprotektivum verschrieben und ist gut verträglich, da es wenig Nebenwirkungen zeigt (Parsons et al., 1999; Tariot et al., 2004). Auch in Krebsstudien wurde Memantin untersucht und zeigte z.B. eine Inhibition des Zellwachstums von Prostata-, Brust-, und Darmkrebszellen (Abdul and Hoosein, 2005) oder auch von A549 Lungenkrebszellen und TE671 Rhabdomyosarcoma-/Medulloblastomazellen (Rzeski et al., 2001).

iGluRs scheinen in vieler Hinsicht an der Malignität von Glioblastomzellen beteiligt zu sein, weshalb spezifische Antagonisten sich als Adjuvant konventioneller Therapieformen anbieten.

Die Invasion konnte ebenfalls durch den NMDA-spezifischen Kanalblocker, MK-801, gehemmt werden. Mit der Reduktion der Zellinvasion durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator Bapta-AM konnte die Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen iGluRs bei Vorgängen wie der Invasion nicht identifiziert werden, da sie nicht signifikant war. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch iGluRs soll trotzdem ein Schlüsselfaktor bei der Invasivität von Glioblastomen sein (Ishiuchi et al., 2002; Maas et al., 2001). So wurde gezeigt, dass GBM Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPARs exprimieren und deren Konversion zu  $\text{Ca}^{2+}$ -impermeablen AMPARs, durch die Einbringung der GluR2-UE, zur Inhibition der Migration führt (Ishiuchi et al., 2002). Auch der Block von NR1/NR2-NMDARs durch MK-801 oder Memantin zeigt eine Hemmung des Tumorwachstums bei Gliomen *in situ* (Takano et al., 2001). Die Inhibition von  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen AMPARs durch Gyki-52466 und JSTx in verschiedenen GBM Zellen, die keine GluR2 exprimieren, äußerte sich in einer Inhibition der Migration/Invasion (Lyons et al., 2007).

Es gibt bereits einige Studien, die sich mit möglichen Mechanismen beschäftigten, bei denen die Aktivierung von iGluRs die Migration/Invasion von Gliomzellen fördert. 2009 wurde veröffentlicht, dass AMPARs die perivaskuläre Invasion über die  $\beta 1$  Integrin-abhängige Adhäsion an der EZM fördern (Piao et al., 2009). Die Öffnung von NMDARs soll die MMP-2 Aktivität erhöhen. Die Hemmung von NMDARs durch MK-801 inhibiert diesen Effekt bei U251-MG Zellen (Ramaswamy et al., 2013). Schon vorher wurde eine Überexpression der Matrix Metalloproteinase MMP-2 in Gliomzellen beschrieben (Park et al., 2009; Rao, 2003).

Da der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Transkriptionsfaktor CREB durch  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable iGluRs aktiviert wird, vermuten wir, dass er auch bei der Migration/Invasion von großer Bedeutung ist. CREB wird auch schon mit der verstärkten Expression von MMPs in Tumorzellen in Verbindung gebracht (Nakayama, 2013).

Basierend auf diesen Ergebnissen gehen wir davon aus, dass die Glutamat-abhängige Aktivierung von CREB über  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable iGluRs entscheidend für die Malignität von LN-229 Zellen ist.

2001 wurde bereits veröffentlicht, dass Glutamat sekretierende Gliomzellen *in vivo* ein stärkeres Tumorwachstum zeigen als Gliomzellen, die kein oder nur bedingt Glutamat freisetzen (Takano et al., 2001). 2007 wurde publiziert, dass das von den Gliomzellen freigesetzte Glutamat als essentielles autokrines und parakrines Signal fungiert. Das Glutamat tötet in hohen Mengen das um den Tumor liegende

Hirngewebe durch Exzitotoxizität, was dem Tumor mehr Platz für sein Wachstum ermöglicht. Wachstum, Migration und Invasion werden dabei durch das Glutamat vorangebracht (Lyons et al., 2007; Sontheimer, 2008). Schon 2000 versuchten Behrens et al. die Rolle von exzitotoxischen Aminosäuren wie Glutamat in einem experimentellen Glioma Modell aufzuklären. Die Gruppe stellte fest, dass im peritumoralen Bereich der Gehalt an Glutamat und Glyzin um ein vielfaches erhöht ist. Auch Serin und Alanin, die zusammen mit Glyzin als Agonisten an der Glyzinbindestelle von NMDARs agieren können. Aus diesem Grund stand im Rahmen der vorliegenden Arbeit neben der Untersuchung von AMPAR-Antagonisten vor allem die Untersuchung von NMDAR-Antagonisten im Fokus.

Auch die Untersuchung des Einflusses von IR auf Tumorzellen ist ein wichtiger Forschungsschwerpunkt, da vor allem IR im Kampf gegen Krebs eingesetzt wird. Leider zeigen bei einer Strahlentherapie viele Tumorarten nicht den gewünschten Effekt. Dazu gehören auch Glioblastome, die als sehr strahlenresistent gelten. IR hat dabei verschiedene Effekte auf Glioblastomzellen. Zum einen soll IR die Invasivität von GBM-Zellen steigern. Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen mit einer Dosis von 2 Gy zeigte in dieser Arbeit nach 48 h eine Verstärkung der Migration um 25 % und eine Erhöhung der Invasion um 53 %, was jedoch nicht signifikant war (Abb. 4.13). Zwar publizierte 2012 eine Gruppe, dass weder Röntgen- noch Schwerionen-Bestrahlung (Karbon) eine Auswirkung auf die Migrations- und Invasionsfähigkeit von humanen Glioblastoma Zellen hat, darunter auch die Zelllinie LN-229 (Eke et al., 2012). Eine andere Gruppe konnte jedoch zeigen, dass sublethale Strahlendosen (Gamma-Strahlen) die Migration und Invasion von humanen Gliomzellen begünstigt. Dieser p53-unabhängige Effekt beinhaltet die verstärkte Expression von Integrinen und eine veränderte Expression und Aktivität von MMPs (Wild-Bode et al., 2001). Steinle et al. veröffentlichte 2011 einen Zusammenhang zwischen der strahleninduzierten Migration und Ionenkanälen. Durch IR konnte eine Erhöhung der Kanalaktivität von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierenden  $\text{K}^+$ -Kanälen (BK) durch Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle gemessen werden und gleichzeitig eine Erhöhung der Zellmigration von Glioblastomzellen. Aus diesem Grund ist die pharmakologische Inhibition der Migration/Invasion während der Strahlentherapie entscheidend für das Überleben von GBM-Patienten.

Das glutamaterge System könnte ein potentieller Ansatzpunkt für die Inhibition der strahleninduzierten Migration/Invasion sein.

Zwar konnten bei den Glutamat-Behandlungen ab 24 h keine Unterschiede in der Migration/Invasion oder Zellviabilität zwischen den unbehandelten und den Glutamat-behandelten Zellen festgestellt werden, was sich jedoch auf die kontinuierliche Glutamat Ausschüttung der Zelllinie zurückführen lässt (Abb. 4.4). Somit wurden bei den Migrations/Invasions Assays und auch bei den Zellviabilitätsmessungen gesättigte Glutamat Konzentrationen erreicht. Die Glutamatfreisetzung, die hier für die LN-229 Zellen beschrieben wurde (Abb. 4.4), konnte auch bei anderen humanen Gliomzelllinien und bei isolierten Zellen aus GBM-Patienten gezeigt werden (Ye et al., 1999; Ye and Sontheimer, 1999).

### **5.3 Der Einfluss von Glutamat auf die Zellebensfähigkeit von LN-229 Zellen**

Weiter konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Glutamat *signaling* wichtig für die Zellebensfähigkeit von Glioblastomzellen ist. Die Inhibition des Glutamat *signaling* durch spezifische AMPAR- (Gyki-52466) und NMDAR-Antagonisten (Ifenprodil, MK-801 und Memantin Hydrochlorid) äußerte sich in einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität und des Zellüberlebens. Dies konnte mittels MTT Assay und *clonogenic cell survival assay* gezeigt werden (Abb. 4.5).

Dass Glutamat ein wichtiger Faktor für verschiedenste Tumore ist, zeigte schon Rzeski et al., 2001. Die Behandlung von humanen FTC238 Schilddrüsenkarzinomzellen mit AMPAR- und NMDAR-Antagonisten äußerte sich in morphologischen Veränderungen und in erhöhtem Zelltod, wie auch bei den humanen A549 Lungenkarzinomzellen. Für Gliomzellen konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des Glutamat Gehalts im umliegenden Medium durch Erhöhung der Glutamattransporter-Expression in Astrozyten vermehrt zur Apoptose von CNS-1 und U-251 Gliomzellen führt (Jacobs and De Leo, 2013). Auch die Umwandlung von  $Ca^{2+}$ -permeablen AMPARs zu  $Ca^{2+}$ -impermeablen AMPARs durch Adenovirus-vermittelten Transfer der GluR2 cDNA äußerte sich im Anstieg der Apoptose von vier Glioblastomzelllinien (CGNH-89, CGNH-NM, MRCH-92 und U87-MG) (Ishiuchi et al., 2002). Hier wird schon die Wichtigkeit von  $Ca^{2+}$  angedeutet. Auch Beretta et al. konnte 2009 zeigen, dass die Überexpression der GluR2 AMPAR-UE Apoptose in U87-MG Zellen induziert.

Interessanterweise zeigen GBM-Patienten mit einem hohen Level der NR2B NMDAR-UE ein 4,4 Monate geringeres Überleben als GBM-Patienten mit einer geringen NR2B Expression (Li and Hanahan, 2013). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit mit dem spezifischen NR2B-Antagonisten Ifenprodil für die Zelllinie LN-229 bestätigt werden. Die Glioblastomzellen zeigten im MTT-Assay nach Inhibition der NR2B-UE eine signifikant geringere Zellviabilität, was vor allem auch morphologisch nach 72 h zu erkennen war, da der größte Teil der Zellen schon gestorben war (Abb. 4.5 A und B). Die NR2B-UE ist demnach essentiell für das Zellüberleben von Glioblastomzellen.

Bei Neuronen ist die NR2B vor allem extrasynaptisch lokalisiert und bei anhaltender Aktivierung für den neuronalen Zelltod mitverantwortlich. Die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors CREB über extrasynaptische NR1/NR2B NMDARs kann durch den spezifischen Block mittels Ifenprodil verhindert werden. Dadurch kann auch die Glutamat-induzierte Apoptose verhindert werden (Hardingham et al., 2002). Bei Glioblastomzellen scheint die NR2B-UE eher für pro-Überlebens-Signalwege verantwortlich zu sein, da die Inhibition durch Ifenprodil den Zelltod nicht verhindert, sondern induziert.

#### **5.4 Glutamat aktiviert ionotrope Glutamatrezeptoren bei LN-229 Zellen**

Für die LN-229 Zelllinie konnte zum einen mit der Patch-Clamp Methode die Funktionalität von AMPARs, NMDARs und KARs (Tab. 4.1) und zum anderen immunzytochemisch die Expression der obligatorischen NR1-, sowie der NR2A- und NR2B-NMDAR-UE bestätigt werden (Abb. 4.1). Dabei zeigte ungefähr jede zweite LN-229 Zelle eine Stromantwort von im Mittel 45 pA bei der Applikation der Agonisten Glutamat, AMPA oder NMDA. Man würde eigentlich erwarten, dass die NMDA-induzierten Stromantworten und die AMPA-induzierten Stromantworten zusammen den Maximalstrom der Glutamat-induzierten Antworten ergeben, also etwa 90 pA. Da dies nicht der Fall war, könnte man davon ausgehen, dass die LN-229 Zelllinie heterogen ist und es eventuell NMDAR-exprimierende und AMPAR-exprimierende Zellen gibt.

Die Expression funktioneller iGluRs wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen für verschiedene Gliomzellen bestätigt (Ishiuchi et al., 2002; Labrakakis et al., 1998; Oh et al., 2012; Stepulak et al., 2009; Takano et al., 2001; van Vuurden et al., 2009). So wurde 1998 anhand von elektrophysiologischen Messungen gezeigt, dass

Gliomzellen auch die Fähigkeit haben auf Glutamat zu reagieren. Mit Hilfe von Non-NMDAR-Agonisten und spezifischen Antagonisten konnte ein pharmakologisches Profil von Kainat- und AMPA-Rezeptoren aufgestellt werden (Labrakakis et al., 1998). Die Expression funktioneller AMPARs scheint unumstritten, während die Funktionalität von NMDARs kontrovers betrachtet wird. In vielen Gliomzellen konnte die obligatorische NR1-UE nicht nachgewiesen werden (Lyons et al., 2007; Sontheimer, 2008; Stepulak et al., 2009). Zwar wurde in C6 Gliomzellen die Expression der NR1-UE und auch der NR2B-UE mittels Western Blot Analyse nachgewiesen, jedoch wurde die Funktionalität der Rezeptoren nicht weiter untersucht (Singh and Kaur, 2009). Takano et al. konnte 2001 mit spezifischen NMDAR-Antagonisten einen Effekt auf das Tumorwachstum von C6 Gliomzellen zeigen, weshalb die Gruppe von der Funktionalität der NMDARs ausgeht. In dieser Arbeit konnte erstmals die Expression der obligatorischen NR1 und gleichzeitig die Funktionalität von NMDARs für eine Glioblastomzelllinie nachgewiesen werden.

### **5.5 Die Rolle von CREB bei der DNA-Schadensantwort in Glioblastomzellen**

Durch Inhibition des Transkriptionsfaktors CREB, der bekanntermaßen über iGluRs aktiviert wird, konnte die Reparatur von strahleninduzierten DSBs signifikant verlangsamt werden. Somit konnte der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Aktivierung von CREB eine entscheidende Rolle bei der Reparatur von DSBs zugesprochen werden.

Die Untersuchung der CREB Phosphorylierungsstelle Ser133 mittels Western Blot ergab, dass neben der Stimulation von Glutamat auch IR zur Phosphorylierung von CREB an Ser133 führt. Diese Phosphorylierungsstelle Ser133 wird neben Ser142 und Ser143 zur Aktivierung von CREB benötigt (Kornhauser et al., 2002).

Die Phosphorylierung an Ser133 durch IR scheint nicht automatisch zur CREB-abhängigen Genexpression zu führen, während Glutamat zu einer Aktivierung von CREB führt. Einige Gruppen konnten zeigen, dass extrazelluläre Stimuli zwar zur Phosphorylierung von CREB an Ser133 führten, die Aktivierung von CREB jedoch dadurch nicht eingeleitet wurde (Bito et al., 1996; Bonni et al., 1995; Liu and Graybiel, 1996; Thompson et al., 1995). Die Transkription durch CREB erfolgt wohl nur bei einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Depolarisation (Bonni et al., 1995). Dies würde erklären, dass nach Bestrahlung nur in Kombination mit Glutamat eine schnellere DSB-Reparatur möglich ist. IR würde dann zur Aktivierung von CREB nicht ausreichen, auch wenn Ser133 phosphoryliert ist

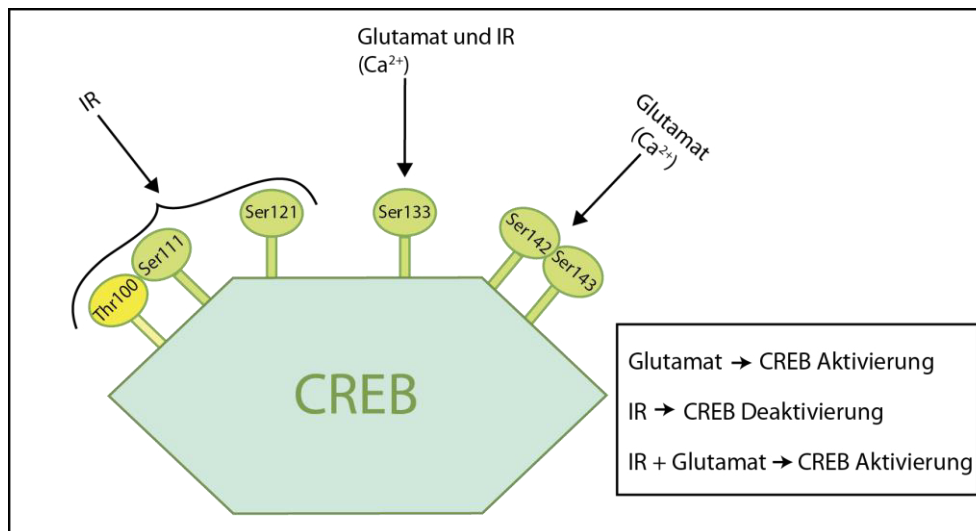


(Abb.5.1). Vermutlich werden die relevanten Phosphorylierungsstellen Ser142 und Ser143 durch IR nicht phosphoryliert. Glutamat hingegen würde die CREB Aktivierung einleiten, da durch den Glutamat-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx neben Ser133 auch Ser142 und Ser143 phosphoryliert werden (Kornhauser et al., 2002).

2004 wurde publiziert, dass CREB direkt an der DNA-Schadensantwort beteiligt ist. Bei DNA-Schäden durch Bestrahlung oder Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) soll es zur Phosphorylierung von CREB durch ATM kommen, was sich in einer reduzierten Transkriptionsaktivität äußern soll. ATM ist ein wichtiger Regulator bei der DNA-Schadensantwort, z.B. bei der Aktivierung von Zellzykluskontrollpunkten und der Einleitung von Apoptose. Die Gruppe konnte keine Phosphorylierung an Ser133 feststellen, aber an Threonin 100 (Thr100), Ser111 und Ser121. Durch diese Phosphorylierungsstellen wird der CREB-CBP Bindung entgegengewirkt. Durch IR soll die CREB Bindung an den Promotor dadurch reduziert werden (Shi et al., 2004). 2013 wurde veröffentlicht, dass die strahleninduzierte Phosphorylierung von CREB durch ATM eine Runterregulation der microRNA miR-335 zur Folge hat, wieder aufgrund einer reduzierten Transkriptionsaktivität. Durch Fehlen der miR-335 wird das Reparaturenzym CtIP nicht mehr runterreguliert, wodurch die DNA Endresektion und Reparatur durch Homologe Rekombination eingeleitet werden kann (Martin et al., 2013).

Im Fall der DSB-Reparatur der LN-229 Zellen stimmt eine Runterregulierung der CREB Transkriptionsaktivität nicht mit der Glutamat-vermittelten Phosphorylierung von CREB überein. Die Phosphorylierung an Ser133, Ser142 und Ser143 durch Kinasen führt zur Aktivierung von CREB während die Phosphorylierungsstellen Thr100, Ser111 und Ser121 die CREB Transkriptionsaktivität inhibiert (Shi et al., 2004; Sun et al., 1994). Da die Inhibition der CREB-Aktivierung durch KG-501 jedoch zu einer schlechteren DSB-Reparatur führt, scheint die CREB-Aktivierung für eine effiziente DSB-Reparatur entscheidend zu sein.

Anhand der vorliegenden Daten dieser Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass IR nur in Kombination mit Glutamat zur Aktivierung von CREB führt, während IR alleine CREB nicht aktivieren kann, da die Phosphorylierungsstellen Ser142 und Ser143 nicht phosphoryliert werden (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1: Phosphorylierung von CREB durch Glutamat und IR.**

Die Stimulation mit Glutamat hat durch den Influx von  $\text{Ca}^{2+}$  die Phosphorylierung von CREB an Ser133, Ser142 und Ser143 zur Folge. Dieses Phosphorylierungstriplet aktiviert CREB. IR führt auch zur Phosphorylierung von CREB an Ser133, jedoch nicht an Ser142 und Ser143, weshalb IR nicht zur Aktivierung von CREB führt. Gleichzeitig werden durch IR die Stellen Thr100, Ser111 und Ser121 phosphoryliert, die als deaktivierend gelten.

Die Aktivierung von CREB ist für Neurone überlebensnotwendig (Mantamadiotis et al., 2002). Deshalb ist nicht auszuschließen, dass Glioblastomzellen die Aktivierung von CREB auch als Überlebensstrategie nutzen.

Es gibt die Hypothese, dass CREB eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese von Gehirntumoren spielt. So soll CREB in das Tumorstadium und die Differenzierung involviert sein (Bidwell et al., 2010; Golan et al., 2011; Kim et al., 2010; Mantamadiotis et al., 2012; Morioka et al., 2010).

Dass das Expressionslevel von CREB mit der Malignität von verschiedenen Tumorarten zusammenhängt ist schon länger bekannt. Brustkrebszellen zeigen z.B. ein erhöhtes Level an CREB mRNA, was mit dem Krankheitsverlauf und dem Überleben der Patienten korreliert (Chhabra et al., 2007). Auch bei Lungenkrebszellen konnte ein Zusammenhang zwischen der niedrigen Überlebensrate und der erhöhten Expression von CREB und pCREB identifiziert werden (Seo et al., 2008). Die onkogenen Eigenschaften von CREB ergeben sich durch die Transkription von Genen, die die Tumorgenese und Proliferation begünstigen. Bekannt ist, dass CREB Zellzykluskontroll-Gene wie Cyclin D1 und D2, Cyclin A1 und A2, bcl-2 und HEC-1 reguliert. Werden diese Gene unkontrolliert exprimiert kommt es zur unkontrollierten Proliferation (Assanah et al., 2006; Cheng et

al., 2007; Desdouets et al., 1995; Pradeep et al., 2004; Shankar and Sakamoto, 2004; Wilson et al., 1996).

Neben der Phosphorylierung von CREB konnte in dieser Arbeit auch die Phosphorylierung von ATF-1 detektiert werden. ATF-1 zeigte nach Glutamat Behandlung oder Bestrahlung ein gleiches Phosphorylierungs-Muster wie CREB (Abb. 4.14). Dies scheint nicht verwunderlich, da CREB und ATF-1 eine hohe Sequenzhomologie zeigen und über gleiche extrazelluläre Signale aktiviert werden, wie z.B. Neurotransmitter und  $\text{Ca}^{2+}$  (Peng and Greenamyre, 1998; Sheng et al., 1991). ATF1 und CREB spielen eine wichtige Rolle während der frühen Mausentwicklung (Bleckmann et al., 2002). In Verbindung mit Tumoren ist bekannt, dass das ATF1 Gen durch Fusion mit anderen Genen für die Aufrechterhaltung der Tumorviabilität verantwortlich ist (Bosilevac et al., 1999). In Melanomazellen ist ATF-1 sogar hochreguliert, und durch Hemmung der ATF-1 Aktivität in diesen Zellen kann die Tumorgenität und die Metastasierung in Nacktmäusen unterbunden werden (Jean et al., 2000). Es ist möglich, dass die Inaktivierung von ATF-1 und CREB in Kombination zu einer stärkeren Beeinträchtigung der Reparatur von strahleninduzierten DSBs führt, als durch die Inaktivierung von CREB alleine (Abb. 4.15). Es wird nämlich vermutet, dass ATF-1 und CREB ihre Funktionen gegenseitig kompensieren können (Bleckmann et al., 2002).

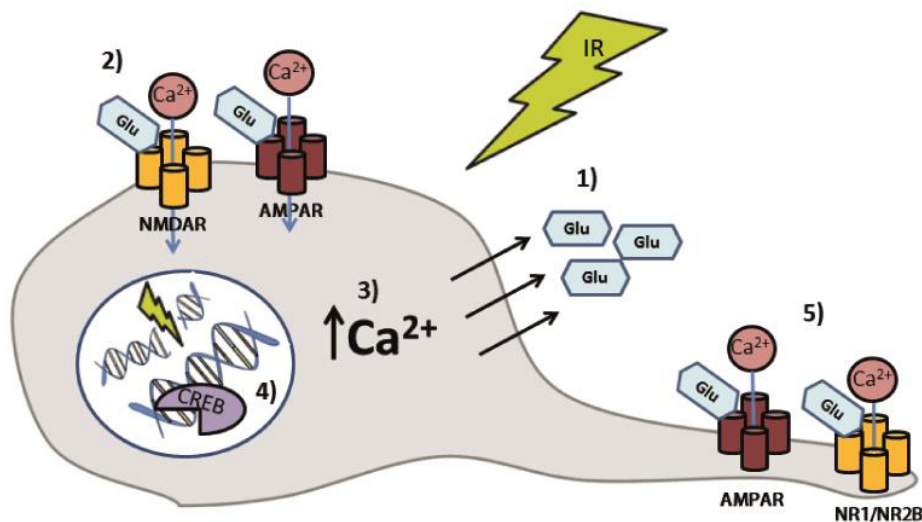
## 5.6 Modell

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse ermöglichten die Erstellung eines Modells des Mechanismus, bei dem die Aktivierung von AMPARs und NMDARs zur verbesserten DNA Reparatur nach Bestrahlung und zur Invasivität von Glioblastomen beisteuert (Abb. 5.2).

Nach einer Strahlentherapie zeigen Glioblastomzellen vermehrt DSBs in der DNA, die auf die IR zurückzuführen sind. Aufgrund der aktiven Glutamatfreisetzung (1) werden Glioblastomeigene AMPARs und NMDARs aktiviert (2). Durch die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Ionenkanälen kommt es zu einer intrazellulären Anreicherung von  $\text{Ca}^{2+}$  (3). Dieser *second messenger* aktiviert  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB durch Phosphorylierung an Ser133 führen (4). Die Transkriptionssteigerung von CREB hat eine effizientere DSB-Reparatur zur Folge. Gleichzeitig werden AMPARs und im besonderen

NR1/NR2B NMDARs aktiviert, die sich an der Spitze der Zellfortsätze befinden (5). Neben der strahleninduzierten Migration/Invasion wird dadurch auch in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Prozess die Migration und Invasion der Zellen gefördert.

Die spezifische Inhibition dieser iGluRs führt zu einer verringerten DSB-Reparatureffizienz, zur Inhibition der Migration/Invasion nach IR und letztendlich zum Absterben der Tumorzellen. Dies könnte zur Optimierung einer Strahlentherapie sehr nützlich sein.



**Abb. 5.2: Modell des Mechanismus bei dem die Aktivierung von iGluRs zur verbesserten DNA Reparatur nach Bestrahlung und zum invasiven Wachstum von Glioblastomen beisteuert.**

Dargestellt ist eine Glioblastomazelle, die nach ionisierender Bestrahlung (IR) DNA-DSBs im Zellkern aufweist. 1) Glioblastoma Zellen setzen Glutamat frei. 2) Das freigesetzte Glutamat aktiviert  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable NMDARs und AMPARs. 3) Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steigt an. 4) Die Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Transkriptionsfaktors CREB leitet eine effiziente Reparatur der strahleninduzierten DNA-DSBs ein. 5)  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable NR1/NR2B NMDARs und AMPARs, die an den Spitzen der Glioblastoma-Zellfortsätze lokalisiert sind, spielen eine entscheidende Rolle bei der Zellmigration und Invasion.

### 5.7 Schlussfolgerung mit Ausblick

Auf Grund der in dieser Arbeit gezeigten Resultate wird vermutet, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPARs und NMDARs eine entscheidende Rolle für das Überleben von Glioblastomzellen spielen. Sie sind an der Migration/Invasion beteiligt, aber auch an der DNA-Schadensantwort. Die Inhibition von AMPARs und NMDARs führte zu einer ineffizienteren DSB-Reparatur und unterdrückte die Migration/Invasion von Glioblastomzellen.

Für den Cystin-Glutamat Austauscher, System  $x_c^-$ , welcher für die Glutamatfreisetzung von Gliomzellen verantwortlich ist, konnte eine Rolle bei der Strahlenresistenz von Glioblastomzellen gezeigt werden. Untersucht wurde, ob der Inhibitor Sulfasalazin Gliomzellen sensibler für IR macht. Man fand heraus, dass die Inhibition des System  $x_c^-$  durch Sulfasalazin nach Bestrahlung in einem erhöhten Level an Zelltod resultierte im Vergleich zu Sulfasalazin oder IR alleine (Sleire et al., 2012, Poster Präsentation). Dies unterstützt die These, dass das glutamaterge System zur Strahlenresistenz beitragen könnte. Es könnte aber auch sein, dass nur der Cystin Einstrom, der für die GSH Produktion notwendig ist, etwas mit dem Effekt zu tun hat. Oder die Kombination aus GSH Produktion und Glutamat *signaling* ist entscheidend für die Strahlenresistenz. In diesem Fall wäre Sulfasalazin als therapeutische Maßnahme ideal. Trotzdem sollte man die Rolle von iGluRs für die Strahlenresistenz von Glioblastomzellen weiter untersuchen. Dies könnte mittels des etablierten *clonogenic survival assays* für verschiedene iGluR-Antagonisten untersucht werden. In Frage kämen der AMPAR-Antagonist Gyki-52466 und die NMDAR-Antagonisten MK-801 und Ifenprodil oder auch andere nicht-kompetitive Antagonisten. Auf Grund der in dieser Arbeit gezeigten Daten wäre eine Strahlensensibilisierende Wirkung von iGluR-Antagonisten nicht unwahrscheinlich.

Ob die Tumorzellen die Fähigkeit behalten sich nach einer iGluR-Antagonisten Behandlung auch in Kombination mit IR zu erholen und erneut Tumore bilden zu können, könnte man mit einem *spheroid recovery assay* untersuchen. So kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob das Glutamat *signaling* ein Schlüsselfaktor bei der Glioblastom Rückkehr nach einer Standardtherapie ist.

*In vivo* Versuche mit Mäusen könnten des weiteren Hinweise geben, welche iGluR-Antagonisten nicht nur im Zellkulturmodell Effekte zeigen. Dies wäre auch in Kombination mit Bestrahlung interessant.

Der Kanalblocker Memantin Hydrochlorid zeigte ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  starke Effekte auf das Zellüberleben bei den LN-229 Zellen. Mittels des Koloniebildungsassays konnte ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keine Kolonie mehr überleben. Memantin Hydrochlorid gilt als neuroprotektiv (Volbracht et al., 2006). Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob in einer Kokultur aus Neuronen und Glioblastomzellen, die Neuronen vor Glutamat Exzitotoxizität geschützt werden können und gleichzeitig die Glioblastomzellen Apoptose induzieren. So könnten

epileptische Anfälle und neuronaler Zelltod bei den GBM-Patienten verhindert werden während gleichzeitig der Tumor behandelt werden kann.

Mit Hilfe des Inhibitors Ifenprodil konnte besonders der NR2B NMDAR-UE eine wichtige Rolle für das Überleben von Glioblastomzellen zugesprochen werden. Unklar ist immer noch der nachgeschaltete Mechanismus, da die NR2B bei Neuronen zu einer Inaktivierung von CREB führt und dadurch pro-Überlebensgene nicht mehr abgelesen werden. Es kommt zum neuronalen Zelltod. Im Falle von Glioblastomzellen wird aber eher eine Aktivierung von CREB vermutet. Um mehr Klarheit zu erhalten müsste man die CREB Aktivität vor und nach Behandlung mit Ifenprodil untersuchen. Mit einem Apoptose Assay könnte man dann genaue Aussagen darüber treffen, ob durch Inhibition der NR2B Apoptose-Signalwege eingeleitet werden und dies mit dem Abschalten von CREB erklärt werden kann.

Immunzytochemische Färbungen zeigten eine überwiegende Expression der NR2B an den Zellfortsätzen von Glioblastomzellen. Es könnte wichtig sein zu untersuchen in wie weit dies eine Rolle für die Malignität von Glioblastomzellen spielt. Hierzu könnte man spezifisch neu synthetisierte NR2B-UE markieren und so die lokale Synthese identifizieren.

Interessant wäre auch NR2B-defiziente Glioblastomzellen in Mäuse zu inokulieren und dann deren Fähigkeit Tumore auszubilden zu untersuchen im Vergleich zu NR2A-defizienten Zellen. So könnte auch die Rolle von verschiedenen AMPAR-UE für die Malignität von Gliomen identifiziert werden. So könnten in ferner Zukunft GBM-Patienten mit NR2B-überexprimierenden Tumorzellen eine zielgerichtete Therapie erhalten.

Ob die NR2A- und NR2B-UEs bei der Reparatur von strahleninduzierten DSBs gleichermaßen beteiligt sind, könnte man mit weiteren DNA-Reparaturkinetiken nach Stilllegung eines der beiden kodierenden Gene (GRIN2A oder GRIN2B) mittels *small interfering* RNA (siRNA) aufklären oder mittels spezifischer Antagonisten wie Ifenprodil.

Inwieweit die Aktivierung von NMDARs die Migration/Invasion von Glioblastomzellen fördert wäre ein weiterer wichtiger Untersuchungsschwerpunkt. Man könnte das Expressionslevel verschiedener MMPs oder Integrine nach Aktivierung oder Block von NMDARs untersuchen. Ist ein Unterschied in der Expression festzustellen, so könnte die Rolle von CREB als Regulator identifiziert werden. Dies kann z.B. mit Hilfe eines CREB Inhibitors erfolgen.

## 6 Zusammenfassung/Summary

Glioblastoma Multiforme (GBM) ist einer der häufigsten und aggressivsten malignen Gehirntumore des Menschen und zeichnet sich durch eine hohe Strahlenresistenz und Invasivität aus. Verschiedene Zelllinien zeigen, dass Glioblastome den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat in Konzentrationen freisetzen, die ausreichen um die Zellproliferation, Infiltration und das Zellüberleben der Tumorzellen zu stimulieren. Zudem verursacht die erhöhte Glutamat Konzentration neuronalen Zelltod im peritumoralen Gewebe. Neben der physiologischen Rolle von Glutamat, die exzitatorische synaptische Transmission nach Bindung an postsynaptischen ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluRs) zu vermitteln, ist es zudem entscheidend für die Gehirnentwicklung und kognitive Funktionen, wie Lernen und Gedächtnisbildung. Unter diesen Bedingungen wird die Aktivierung von iGluRs zum Nukleus durch eine  $Ca^{2+}$ -Signalkaskade übersetzt, welche zur Phosphorylierung des *cAMP-responsive element binding* Protein (CREB) führt. Dies fördert letztendlich das neuronale Überleben und die Plastizität. Seit die Expression von iGluRs in Tumorzellen nachgewiesen wurde, wird vermutet, dass die glutamaterge Signalübertragung in Glioblastomen an der Metastasierung und einer erhöhten Resistenz gegenüber einer Strahlen- und Chemotherapie beteiligt ist.

Dementsprechend war das Ziel dieser Arbeit die Wirkung von Glutamat und ionisierender Bestrahlung (IR) auf das Zellüberleben, die Migration und die DNA-Schadensantwort (DDR) in Glioblastomzellen zu untersuchen. Der Gedanke dahinter war die vermeintliche Interferenz der glutamatergen Signalübertragung und der DDR zu untersuchen, um Strategien zu entschlüsseln, die eine zielgerichtete Therapie für GBM ermöglichen. Der erste experimentelle Schritt bestand darin, die Expression von verschiedenen NMDA-, AMPA- und Kainat Rezeptoren der iGluR-Familie in unterschiedlichen GBM Zelllinien zu untersuchen. Die humanen Grad IV Glioblastomzellen (LN-229) zeigten eine robuste funktionelle Expression von NMDAR und AMPAR mithilfe von Patch Clamp Ableitungen. Bemerkenswerterweise wurde im Hinblick darauf eine unterschiedliche Expression der Glutamat-bindenden NMDAR NR2A und NR2B Untereinheiten im Soma und in Migrationsfortsätzen der Zellen mittels Immunzytochemie gefunden. Interessanterweise waren LN-229 Zellen in der Lage Glutamat in exzitotoxischen Konzentrationen in das extrazelluläre Medium

freizusetzen. Deshalb wurde diese Zelllinie für weiterführende Versuche verwendet und mit Glutamat Konzentrationen von 10 mM, spezifischen Glutamatrezeptor Antagonisten und IR mit klinischen Dosen behandelt. Reparaturkinetiken strahleninduzierter DNA Doppelstrangbrüche (DSBs) wurden durch die Immunfluoreszenz des phosphorylierten Histon H2AX visualisiert und durch zählen von  $\gamma$ H2AX Foci quantifiziert. Die Untersuchung der Anzahl an  $\gamma$ H2AX Foci zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung offenbarte, dass die DDR in Anwesenheit von Glutamat signifikant verbessert wurde. Im Gegensatz dazu verschlechterten der NMDAR Kanalblocker MK-801, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator Bapta-AM und der spezifische AMPAR Antagonist NBQX signifikant die Reparatur von DNA DSBs. Indessen zeigten Zellzyklusanalysen keinen Effekt auf den G2-Zellzykluskontrollpunkt, was darauf hindeutet, dass Glutamat einen spezifischen Effekt auf die DNA Reparatur hat. Im nächsten experimentellen Schritt wurde der Effekt von Glutamat und iGluR Antagonisten auf die Zellmigration untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass iGluR Antagonisten mit einem zerstörenden Effekt auf die DDR auch die Migration von LN-229 Zellen inhibieren, sogar nach Bestrahlung. Übereinstimmend mit der Expression der NR2B Untereinheit in Migrationsfortsätzen mittels Immunzytochemie konnte der NR2B-spezifische Antagonist Iifenprodil die Migration von LN-229 Glioblastomzellen selektiv inhibieren, was zusätzlich komplexe Effekte von Glutamat in LN-229 Zellen andeutet. Da die Wirkung von Glutamat auf iGluRs das neuronale Überleben und die Plastizität durch die Aktivierung des CREB Signalwegs stimuliert, wurde das Expressionslevel von pCREB in LN-229 Zellen analysiert. Western Blot Analysen und die Verwendung eines spezifischen Inhibitors des CREB Signalwegs weisen auf eine verstärkte DDR nach Aktivierung von CREB hin. Erwähnenswert ist die Phosphorylierung von CREB durch IR und Glutamat Behandlung, was CREB als Schlüsselfaktor bei der Glutamat-vermittelten DNA-Reparatur Effizienz erkennen lässt. Um das klinische Potential von iGluR Antagonisten zur Optimierung herkömmlicher Therapien zu verifizieren wurde letztendlich das Medikament Memantin getestet. Memantin ist ein schwach affiner NMDAR Antagonist und wird zur Behandlung von Alzheimer Patienten eingesetzt (in den USA unter dem Namen Namenda verkauft). Die Behandlung von LN-229 Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  Memantin äußerte sich in einer verminderten Überlebensfähigkeit und einer Sensibilisierung gegenüber Bestrahlung durch Blocken der NMDAR-vermittelten glutamatergen Signalübertragung.



Die Daten weisen auf eine bedeutende Rolle des Neurotransmitters Glutamat für die Migration von Glioblastomzellen und die iGluR-aktivierte Effizienz der DDR nach IR hin und heben das klinische Potential von iGluR Antagonisten zur Optimierung einer Strahlentherapie bei GBM hervor.

Summary:

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most common and aggressive malignant primary brain tumors in humans characterized by a high radio-resistance and a high degree of invasive growth. Several lines of evidences indicate that glioblastomas secrete the excitatory neurotransmitter glutamate at concentrations sufficiently to stimulate proliferation, infiltration, and cell survival of the tumor cells. Furthermore, the increased glutamate concentrations in the vicinity of the tumor are assumed to cause excitotoxic neuronal cell death in the surrounding tissue. Beside the physiological role of glutamate to mediate excitatory neuronal transmission upon binding to postsynaptic ionotropic glutamate receptors (iGluRs), it is critically involved in brain development and cognitive functions like learning and memory formation. Under these conditions, activation of iGluRs is translated to the nucleus by a  $Ca^{2+}$ -signaling cascade leading to phosphorylation of the cAMP-responsive element binding protein (CREB) promoting neuronal survival and plasticity. Since these iGluRs have been shown to be expressed in tumor cells, it is assumed that glutamatergic signaling in glioblastomas may be involved in promoting tumor survival, metastasis, and endowing tumors with an enhanced resistance to radiation- and chemotherapy.

Thus, the aim of this work was to examine the impact of glutamate and ionizing radiation (IR) on cell survival, migration, and DNA damage response (DDR) in glioblastoma cells. The rationality behind it was to analyze a putative interference of glutamatergic signaling and DDR to unravel strategies facilitating targeted therapy for GBM. In an early stage of the experiments, the expression of different NMDA-, AMPA- and kainate-receptors of the iGluR-family were analyzed in several GBM cell lines. The human grade IV glioblastoma cells (LN-229) revealed robust functional expression of NMDAR and AMPAR upon patch clamp recording. Remarkably, a distinct expression of the glutamate-binding NMDAR NR2A and NR2B subunits was

found in the soma and in migration-processes of the cells by immunocytochemistry, respectively. Interestingly, LN-229 cells were capable to secrete glutamate into the medium in excitotoxic concentrations. Thus, this cell line was used in the consecutive experiments and treated with glutamate at a concentration of 10 mM, specific glutamate receptor antagonists, and IR at clinical doses. Repair kinetics of induced DNA double-strand breaks (DSBs) were visualized by immunofluorescence of phosphorylated histone H2AX and quantified by counting  $\gamma$ H2AX foci. Analyzing the number of foci at different time points upon radiation revealed that DDR was significantly improved in the presence of glutamate. In contrast, the NMDAR channel blocker MK-801, the  $\text{Ca}^{2+}$ -chelator Bapta-AM and the specific AMPAR antagonist NBQX significantly impaired the repair of DNA DSBs. However, cell cycle analyses revealed no effect on G2 cell cycle checkpoint, indicating a specific effect of glutamate on DNA repair capability. In a following set of experiments, the effect of glutamate and iGluR antagonists were examined on cell migration. The results show that iGluR antagonists disrupting DDR also inhibit cell migration of LN-229 cells, even after radiation. Consistent with the expression of the NR2B subunit found in migrating cell processes by immunocytochemistry, the NR2B-specific antagonist Ifenprodil selectively impaired migration of LN-229 glioblastoma cells, further indicating complex effects of glutamate in LN-229 cells. Since glutamate interacting with iGluRs stimulates neuronal survival and plasticity through activation of the CREB pathway, expression levels of pCREB were analyzed in LN-229 cells. Both western blot analyses and using specific inhibitors of CREB signaling pathways indicate enhanced DDR upon activation of CREB. Remarkably, CREB is phosphorylated by IR and upon glutamate treatment, indicating that CREB can be the key factor for glutamate-mediated DNA repair efficiency. However, to verify whether iGluR-antagonists have the clinical potential in optimizing conventional tumor therapies, the drug memantine was tested finally. Memantine is a low affinity antagonist of NMDARs and is used in the treatment of Alzheimer's disease (sold in the USA as Namenda). Treatment of LN-229 cells with 50  $\mu\text{M}$  memantine resulted in a decreased cell survival and a sensitization to IR by blocking NMDA receptor mediated glutamatergic signaling. Thus, the data presented shows a prominent role of the neurotransmitter glutamate for the migration of glioblastoma cells, the iGluR-mediated efficacy of DDR upon IR and highlight the clinical potential of iGluR-antagonists in optimizing radiation therapy in GBM treatment.

## 7 Literaturverzeichnis

- The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061-1068.
- Abdul, M., and Hoosein, N. (2005). N-methyl-D-aspartate receptor in human prostate cancer. *The Journal of membrane biology* 205, 125-128.
- Anderson, C.M., and Swanson, R.A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1-14.
- Assanah, M., Lochhead, R., Ogden, A., Bruce, J., Goldman, J., and Canoll, P. (2006). Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 6781-6790.
- Bachoo, R.M., Maher, E.A., Ligon, K.L., Sharpless, N.E., Chan, S.S., You, M.J., Tang, Y., DeFrances, J., Stover, E., Weissleder, R., *et al.* (2002). Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer cell* 1, 269-277.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-760.
- Behrens, P.F., Langemann, H., Strohschein, R., Draeger, J., and Hennig, J. (2000). Extracellular glutamate and other metabolites in and around RG2 rat glioma: an intracerebral microdialysis study. *Journal of neuro-oncology* 47, 11-22.
- Beretta, F., Bassani, S., Binda, E., Verpelli, C., Bello, L., Galli, R., and Passafaro, M. (2009). The GluR2 subunit inhibits proliferation by inactivating Src-MAPK signalling and induces apoptosis by means of caspase 3/6-dependent activation in glioma cells. *The European journal of neuroscience* 30, 25-34.
- Best, J.L., Amezcua, C.A., Mayr, B., Flechner, L., Murawsky, C.M., Emerson, B., Zor, T., Gardner, K.H., and Montminy, M. (2004). Identification of small-molecule antagonists that inhibit an activator: coactivator interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17622-17627.
- Bidwell, P., Joh, K., Leaver, H.A., and Rizzo, M.T. (2010). Prostaglandin E2 activates cAMP response element-binding protein in glioma cells via a signaling pathway involving PKA-dependent inhibition of ERK. *Prostaglandins & other lipid mediators* 91, 18-29.
- Bito, H., Deisseroth, K., and Tsien, R.W. (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87, 1203-1214.
- Blaylock, R.L. (2013). Immunoexcitatory mechanisms in glioma proliferation, invasion and occasional metastasis. *Surgical neurology international* 4, 15.
- Bleckmann, S.C., Blendy, J.A., Rudolph, D., Monaghan, A.P., Schmid, W., and Schutz, G. (2002). Activating transcription factor 1 and CREB are important for cell survival during early mouse development. *Molecular and cellular biology* 22, 1919-1925.
- Bonni, A., Ginty, D.D., Dudek, H., and Greenberg, M.E. (1995). Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Molecular and cellular neurosciences* 6, 168-183.
- Bosilevac, J.M., Olsen, R.J., Bridge, J.A., and Hinrichs, S.H. (1999). Tumor cell viability in clear cell sarcoma requires DNA binding activity of the EWS/ATF1 fusion protein. *The Journal of biological chemistry* 274, 34811-34818.
- Brandsma, I., and Gent, D.C. (2012). Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome integrity* 3, 9.
- Cavalheiro, E.A., and Olney, J.W. (2001). Glutamate antagonists: deadly liaisons with cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5947-5948.

- Charlton, D.E., and Humm, J.L. (1988). A method of calculating initial DNA strand breakage following the decay of incorporated <sup>125</sup>I. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* *53*, 353-365.
- Cheng, H.Y., Papp, J.W., Varlamova, O., Dziema, H., Russell, B., Curfman, J.P., Nakazawa, T., Shimizu, K., Okamura, H., Impey, S., *et al.* (2007). microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron* *54*, 813-829.
- Cheng, L., Wu, Q., Guryanova, O.A., Huang, Z., Huang, Q., Rich, J.N., and Bao, S. (2011). Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* *406*, 643-648.
- Chhabra, A., Fernando, H., Watkins, G., Mansel, R.E., and Jiang, W.G. (2007). Expression of transcription factor CREB1 in human breast cancer and its correlation with prognosis. *Oncology reports* *18*, 953-958.
- Collingridge, G.L., and Bliss, T.V. (1995). Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends in neurosciences* *18*, 54-56.
- Crowe, D.L., and Shuler, C.F. (1999). Regulation of tumor cell invasion by extracellular matrix. *Histology and histopathology* *14*, 665-671.
- Crowe, S.L., Movsesyan, V.A., Jorgensen, T.J., and Kondratyev, A. (2006). Rapid phosphorylation of histone H2A.X following ionotropic glutamate receptor activation. *The European journal of neuroscience* *23*, 2351-2361.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current opinion in neurobiology* *11*, 327-335.
- Dai, C., Celestino, J.C., Okada, Y., Louis, D.N., Fuller, G.N., and Holland, E.C. (2001). PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes & development* *15*, 1913-1925.
- Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews Cancer* *5*, 275-284.
- Desdouets, C., Matesic, G., Molina, C.A., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P., Brechot, C., and Sobczak-Thepot, J. (1995). Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. *Molecular and cellular biology* *15*, 3301-3309.
- Deshane, J., Garner, C.C., and Sontheimer, H. (2003). Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *The Journal of biological chemistry* *278*, 4135-4144.
- Didier, M., Bursztajn, S., Adamec, E., Passani, L., Nixon, R.A., Coyle, J.T., Wei, J.Y., and Berman, S.A. (1996). DNA strand breaks induced by sustained glutamate excitotoxicity in primary neuronal cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *16*, 2238-2250.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews* *51*, 7-61.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* *22*, 391-397.
- Du, K., and Montminy, M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *The Journal of biological chemistry* *273*, 32377-32379.
- Eke, I., Storch, K., Kastner, I., Vehlou, A., Faethe, C., Mueller-Klieser, W., Taucher-Scholz, G., Temme, A., Schackert, G., and Cordes, N. (2012). Three-dimensional invasion of human glioblastoma cells remains unchanged by X-ray and carbon ion irradiation in vitro. *International journal of radiation oncology, biology, physics* *84*, e515-523.
- Farre, C., Stoelzle, S., Haarmann, C., George, M., Bruggemann, A., and Fertig, N. (2007). Automated ion channel screening: patch clamping made easy. *Expert opinion on therapeutic targets* *11*, 557-565.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA repair* *3*, 959-967.
- Fischer, U., and Meese, E. (2007). Glioblastoma multiforme: the role of DSB repair between genotype and phenotype. *Oncogene* *26*, 7809-7815.

- Frankiewicz, T., Potier, B., Bashir, Z.I., Collingridge, G.L., and Parsons, C.G. (1996). Effects of memantine and MK-801 on NMDA-induced currents in cultured neurones and on synaptic transmission and LTP in area CA1 of rat hippocampal slices. *British journal of pharmacology* *117*, 689-697.
- Furukawa, H., Singh, S.K., Mancusso, R., and Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* *438*, 185-192.
- Golan, M., Schreiber, G., and Avissar, S. (2011). Antidepressants elevate GDNF expression and release from C(6) glioma cells in a beta-arrestin1-dependent, CREB interactive pathway. *Int J Neuropsychopharmacol* *14*, 1289-1300.
- Hardingham, G.E., and Bading, H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends in neurosciences* *26*, 81-89.
- Hardingham, G.E., and Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature reviews Neuroscience* *11*, 682-696.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature neuroscience* *5*, 405-414.
- Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., *et al.* (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine* *352*, 997-1003.
- Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annual review of neuroscience* *17*, 31-108.
- Hossmann, K.A. (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Annals of neurology* *36*, 557-565.
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vockler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovskaja, V., Turski, L., and Olney, J.W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* *283*, 70-74.
- Ishiyama, S., Tsuzuki, K., Yoshida, Y., Yamada, N., Hagimura, N., Okado, H., Miwa, A., Kurihara, H., Nakazato, Y., Tamura, M., *et al.* (2002). Blockage of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Nature medicine* *8*, 971-978.
- Ishiyama, S., Yoshida, Y., Sugawara, K., Aihara, M., Ohtani, T., Watanabe, T., Saito, N., Tsuzuki, K., Okado, H., Miwa, A., *et al.* (2007). Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *27*, 7987-8001.
- Jacobs, V.L., and De Leo, J.A. (2013). Increased glutamate uptake in astrocytes via propentofylline results in increased tumor cell apoptosis using the CNS-1 glioma model. *Journal of neuro-oncology* *114*, 33-42.
- Jean, D., Tellez, C., Huang, S., Davis, D.W., Bruns, C.J., McConkey, D.J., Hinrichs, S.H., and Bar-Eli, M. (2000). Inhibition of tumor growth and metastasis of human melanoma by intracellular anti-ATF-1 single chain Fv fragment. *Oncogene* *19*, 2721-2730.
- Johnson, J.W., and Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* *325*, 529-531.
- Kaba, S.E., and Kyritsis, A.P. (1997). Recognition and management of gliomas. *Drugs* *53*, 235-244.
- Kerckhof, M., Dielemans, J.C., van Breemen, M.S., Zwinkels, H., Walchenbach, R., Taphoorn, M.J., and Vecht, C.J. (2013). Effect of valproic acid on seizure control and on survival in patients with glioblastoma multiforme. *Neuro-oncology* *15*, 961-967.
- Kesanakurti, D., Chetty, C., Rajasekhar Maddirela, D., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2012). Functional cooperativity by direct interaction between PAK4 and MMP-2 in the regulation of anoikis resistance, migration and invasion in glioma. *Cell death & disease* *3*, e445.
- Kim, Y.H., Joo, H.S., and Kim, D.S. (2010). Nitric oxide induction of IRE1-alpha-dependent CREB phosphorylation in human glioma cells. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* *23*, 112-120.
- Kleihues, P., Burger, P.C., and Scheithauer, B.W. (1993). The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* *3*, 255-268.

- Kleihues, P., Soylemezoglu, F., Schauble, B., Scheithauer, B.W., and Burger, P.C. (1995). Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia* 15, 211-221.
- Komuro, H., and Rakic, P. (1996). Intracellular Ca<sup>2+</sup> fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron* 17, 275-285.
- Kornhauser, J.M., Cowan, C.W., Shaywitz, A.J., Dolmetsch, R.E., Griffith, E.C., Hu, L.S., Haddad, C., Xia, Z., and Greenberg, M.E. (2002). CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron* 34, 221-233.
- Krakstad, C., and Chekenya, M. (2010). Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer* 9, 135.
- Krieger, C., and Duchen, M.R. (2002). Mitochondria, Ca<sup>2+</sup> and neurodegenerative disease. *European journal of pharmacology* 447, 177-188.
- Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H., and Kuhse, J. (1994). Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12, 1291-1300.
- Labrakakis, C., Patt, S., Hartmann, J., and Kettenmann, H. (1998). Glutamate receptor activation can trigger electrical activity in human glioma cells. *The European journal of neuroscience* 10, 2153-2162.
- Laerum, O.D., Bjerkvig, R., Steinsvag, S.K., and de Ridder, L. (1984). Invasiveness of primary brain tumors. *Cancer metastasis reviews* 3, 223-236.
- Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H., and Kuhse, J. (1997). Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18, 493-503.
- Laube, B., Kuhse, J., and Betz, H. (1998). Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 2954-2961.
- Lee, J.M., Zipfel, G.J., and Choi, D.W. (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399, A7-14.
- Lerma, J. (2003). Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nature reviews Neuroscience* 4, 481-495.
- Li, H.F., Kim, J.S., and Waldman, T. (2009). Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. *Radiat Oncol* 4, 43.
- Li, L., and Hanahan, D. (2013). Hijacking the neuronal NMDAR signaling circuit to promote tumor growth and invasion. *Cell* 153, 86-100.
- Liu, F.C., and Graybiel, A.M. (1996). Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum. *Neuron* 17, 1133-1144.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., and Yu, J.S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular cancer* 5, 67.
- Lonze, B.E., and Ginty, D.D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-623.
- Lyons, S.A., Chung, W.J., Weaver, A.K., Ogunrinu, T., and Sontheimer, H. (2007). Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer research* 67, 9463-9471.
- Maas, S., Patt, S., Schrey, M., and Rich, A. (2001). Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14687-14692.
- Maher, E.A., Furnari, F.B., Bachoo, R.M., Rowitch, D.H., Louis, D.N., Cavenee, W.K., and DePinho, R.A. (2001). Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & development* 15, 1311-1333.
- Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Bleckmann, S.C., Kern, H., Kretz, O., Martin Villalba, A., Tronche, F., Kellendonk, C., Gau, D., Kapfhammer, J., *et al.* (2002). Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nature genetics* 31, 47-54.

- Mantamadiotis, T., Papalexis, N., and Dworkin, S. (2012). CREB signalling in neural stem/progenitor cells: recent developments and the implications for brain tumour biology. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* *34*, 293-300.
- Martin, N.T., Nakamura, K., Davies, R., Nahas, S.A., Brown, C., Tunuguntla, R., Gatti, R.A., and Hu, H. (2013). ATM-dependent MiR-335 targets CtIP and modulates the DNA damage response. *PLoS genetics* *9*, e1003505.
- Masuko, T., Kashiwagi, K., Kuno, T., Nguyen, N.D., Pahk, A.J., Fukuchi, J., Igarashi, K., and Williams, K. (1999). A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Molecular pharmacology* *55*, 957-969.
- Meloni, F., Brocchieri, A., Ballabio, P.C., Tua, A., Grignani, G., and Grassi, G.G. (1998). Bombesin, calcium homeostasis and tumour growth. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace / Fondazione clinica del lavoro, IRCCS [and] Istituto di clinica fisiologica e malattie apparato respiratorio, Universita di Napoli, Secondo ateneo* *53*, 405-409.
- Mitchell, J.B., Cook, J.A., DeGraff, W., Glatstein, E., and Russo, A. (1989). Glutathione modulation in cancer treatment: will it work? *International journal of radiation oncology, biology, physics* *16*, 1289-1295.
- Mizoe, J.E., Tsujii, H., Hasegawa, A., Yanagi, T., Takagi, R., Kamada, T., Tsuji, H., and Takakura, K. (2007). Phase I/II clinical trial of carbon ion radiotherapy for malignant gliomas: combined X-ray radiotherapy, chemotherapy, and carbon ion radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* *69*, 390-396.
- Monti, B., and Contestabile, A. (2000). Blockade of the NMDA receptor increases developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat cerebellum. *The European journal of neuroscience* *12*, 3117-3123.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* *12*, 529-540.
- Morioka, N., Sugimoto, T., Tokuhara, M., Dohi, T., and Nakata, Y. (2010). Noradrenaline induces clock gene *Per1* mRNA expression in C6 glioma cells through beta(2)-adrenergic receptor coupled with protein kinase A - cAMP response element binding protein (PKA-CREB) and Src-tyrosine kinase - glycogen synthase kinase-3beta (Src-GSK-3beta). *Journal of pharmacological sciences* *113*, 234-245.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* *65*, 55-63.
- Nakayama, K. (2013). cAMP-response element-binding protein (CREB) and NF-kappaB transcription factors are activated during prolonged hypoxia and cooperatively regulate the induction of matrix metalloproteinase MMP1. *The Journal of biological chemistry* *288*, 22584-22595.
- Nicotera, P., Leist, M., and Manzo, L. (1999). Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends in pharmacological sciences* *20*, 46-51.
- Nikjoo, H., O'Neill, P., Goodhead, D.T., and Terrissol, M. (1997). Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *International journal of radiation biology* *71*, 467-483.
- Noha, M., Yoshida, D., Watanabe, K., and Teramoto, A. (2000). Suppression of cell invasion on human malignant glioma cell lines by a novel matrix-metalloproteinase inhibitor SI-27: in vitro study. *Journal of neuro-oncology* *48*, 217-223.
- Oberndorfer, S., Schmal, T., Lahrmann, H., Urbanits, S., Lindner, K., and Grisold, W. (2002). [The frequency of seizures in patients with primary brain tumors or cerebral metastases. An evaluation from the Ludwig Boltzmann Institute of Neuro-Oncology and the Department of Neurology, Kaiser Franz Josef Hospital, Vienna]. *Wiener klinische Wochenschrift* *114*, 911-916.
- Oh, M.C., Kim, J.M., Safaee, M., Kaur, G., Sun, M.Z., Kaur, R., Celli, A., Mauro, T.M., and Parsa, A.T. (2012). Overexpression of calcium-permeable glutamate receptors in glioblastoma derived brain tumor initiating cells. *PLoS one* *7*, e47846.
- Ozawa, S., Kamiya, H., and Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology* *54*, 581-618.

- Paoletti, P., Perin-Dureau, F., Fayyazuddin, A., Le Goff, A., Callebaut, I., and Neyton, J. (2000). Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* *28*, 911-925.
- Park, M.H., Ahn, B.H., Hong, Y.K., and Min do, S. (2009). Overexpression of phospholipase D enhances matrix metalloproteinase-2 expression and glioma cell invasion via protein kinase C and protein kinase A/NF-kappaB/Sp1-mediated signaling pathways. *Carcinogenesis* *30*, 356-365.
- Parsons, C.G., Danysz, W., and Quack, G. (1999). Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology* *38*, 735-767.
- Paternain, A.V., Morales, M., and Lerma, J. (1995). Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron* *14*, 185-189.
- Peng, T.I., and Greenamyre, J.T. (1998). Privileged access to mitochondria of calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular pharmacology* *53*, 974-980.
- Perry, J., Okamoto, M., Guiou, M., Shirai, K., Errett, A., and Chakravarti, A. (2012). Novel therapies in glioblastoma. *Neurology research international* *2012*, 428565.
- Piao, Y., Lu, L., and de Groot, J. (2009). AMPA receptors promote perivascular glioma invasion via beta1 integrin-dependent adhesion to the extracellular matrix. *Neuro-oncology* *11*, 260-273.
- Polo, S.E., and Jackson, S.P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes & development* *25*, 409-433.
- Pradeep, A., Sharma, C., Sathyanarayana, P., Albanese, C., Fleming, J.V., Wang, T.C., Wolfe, M.M., Baker, K.M., Pestell, R.G., and Rana, B. (2004). Gastrin-mediated activation of cyclin D1 transcription involves beta-catenin and CREB pathways in gastric cancer cells. *Oncogene* *23*, 3689-3699.
- Price, A., Shi, Q., Morris, D., Wilcox, M.E., Brasher, P.M., Rewcastle, N.B., Shalinsky, D., Zou, H., Appelt, K., Johnston, R.N., *et al.* (1999). Marked inhibition of tumor growth in a malignant glioma tumor model by a novel synthetic matrix metalloproteinase inhibitor AG3340. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *5*, 845-854.
- Raderschall, E., Bazarov, A., Cao, J., Lurz, R., Smith, A., Mann, W., Ropers, H.H., Sedivy, J.M., Golub, E.I., Fritz, E., *et al.* (2002). Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. *Journal of cell science* *115*, 153-164.
- Ramaswamy, P., Aditi Devi, N., Hurmath Fathima, K., and Dalavaikodihalli Nanjaiah, N. (2013). Activation of NMDA receptor of glutamate influences MMP-2 activity and proliferation of glioma cells. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*.
- Rao, J.S. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nature reviews Cancer* *3*, 489-501.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology* *146*, 905-916.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* *273*, 5858-5868.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., and Stevens, C.F. (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* *280*, 1596-1599.
- Rothkamm, K., and Lobrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 5057-5062.
- Rzeski, W., Turski, L., and Ikonomidou, C. (2001). Glutamate antagonists limit tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 6372-6377.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* *450*, 509-514.
- Sattler, R., Charlton, M.P., Hafner, M., and Tymianski, M. (1998). Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *Journal of neurochemistry* *71*, 2349-2364.



- Schunemann, D.P., Grivicich, I., Regner, A., Leal, L.F., de Araujo, D.R., Jotz, G.P., Fedrigo, C.A., Simon, D., and da Rocha, A.B. (2010). Glutamate promotes cell growth by EGFR signaling on U-87MG human glioblastoma cell line. *Pathology oncology research : POR* 16, 285-293.
- Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G., and Bonner, W.M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiation research* 158, 486-492.
- Seeburg, P.H. (1993). The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends in neurosciences* 16, 359-365.
- Seo, H.S., Liu, D.D., Bekele, B.N., Kim, M.K., Pisters, K., Lippman, S.M., Wistuba, II, and Koo, J.S. (2008). Cyclic AMP response element-binding protein overexpression: a feature associated with negative prognosis in never smokers with non-small cell lung cancer. *Cancer research* 68, 6065-6073.
- Shankar, D.B., and Sakamoto, K.M. (2004). The role of cyclic-AMP binding protein (CREB) in leukemia cell proliferation and acute leukemias. *Leukemia & lymphoma* 45, 265-270.
- Sheng, M., Thompson, M.A., and Greenberg, M.E. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252, 1427-1430.
- Shi, Y., Venkataraman, S.L., Dodson, G.E., Mabb, A.M., LeBlanc, S., and Tibbetts, R.S. (2004). Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5898-5903.
- Short, S.C., Martindale, C., Bourne, S., Brand, G., Woodcock, M., and Johnston, P. (2007). DNA repair after irradiation in glioma cells and normal human astrocytes. *Neuro-oncology* 9, 404-411.
- Singh, J., and Kaur, G. (2009). Transcriptional regulation of PSA-NCAM expression by NMDA receptor activation in RA-differentiated C6 glioma cultures. *Brain research bulletin* 79, 157-168.
- Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P., and Gouaux, E. (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462, 745-756.
- Song, I., and Huganir, R.L. (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* 25, 578-588.
- Sontheimer, H. (2008). An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 779-791.
- Soroceanu, L., Gillespie, Y., Khazaeli, M.B., and Sontheimer, H. (1998). Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. *Cancer research* 58, 4871-4879.
- Steinle, M., Palme, D., Misovic, M., Rudner, J., Dittmann, K., Lukowski, R., Ruth, P., and Huber, S.M. (2011). Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K(+) channels. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 101, 122-126.
- Stepulak, A., Luksch, H., Gebhardt, C., Uckermann, O., Marzahn, J., Sifringer, M., Rzeski, W., Staufner, C., Brocke, K.S., Turski, L., *et al.* (2009). Expression of glutamate receptor subunits in human cancers. *Histochemistry and cell biology* 132, 435-445.
- Stepulak, A., Sifringer, M., Rzeski, W., Brocke, K., Gratopp, A., Pohl, E.E., Turski, L., and Ikonomidou, C. (2007). AMPA antagonists inhibit the extracellular signal regulated kinase pathway and suppress lung cancer growth. *Cancer biology & therapy* 6, 1908-1915.
- Stepulak, A., Sifringer, M., Rzeski, W., Endesfelder, S., Gratopp, A., Pohl, E.E., Bittigau, P., Felderhoff-Mueser, U., Kaindl, A.M., Buhner, C., *et al.* (2005). NMDA antagonist inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and suppresses cancer growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15605-15610.
- Stupp, R., van den Bent, M.J., and Hegi, M.E. (2005). Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Current neurology and neuroscience reports* 5, 198-206.
- Sun, P., Enslin, H., Myung, P.S., and Maurer, R.A. (1994). Differential activation of CREB by Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes & development* 8, 2527-2539.
- Takano, T., Lin, J.H., Arcuino, G., Gao, Q., Yang, J., and Nedergaard, M. (2001). Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature medicine* 7, 1010-1015.

- Tariot, P.N., Farlow, M.R., Grossberg, G.T., Graham, S.M., McDonald, S., and Gergel, I. (2004). Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* *291*, 317-324.
- Thompson, M.A., Ginty, D.D., Bonni, A., and Greenberg, M.E. (1995). L-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel activation regulates c-fos transcription at multiple levels. *The Journal of biological chemistry* *270*, 4224-4235.
- Tonn, J.C., Kerkau, S., Hanke, A., Bouterfa, H., Mueller, J.G., Wagner, S., Vince, G.H., and Roosen, K. (1999). Effect of synthetic matrix-metalloproteinase inhibitors on invasive capacity and proliferation of human malignant gliomas in vitro. *International journal of cancer Journal international du cancer* *80*, 764-772.
- Tymianski, M., Charlton, M.P., Carlen, P.L., and Tator, C.H. (1993). Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *13*, 2085-2104.
- Ullrich, N., Gillespie, G.Y., and Sontheimer, H. (1996). Human astrocytoma cells express a unique chloride current. *Neuroreport* *7*, 1020-1024.
- Ullrich, N., and Sontheimer, H. (1996). Biophysical and pharmacological characterization of chloride currents in human astrocytoma cells. *The American journal of physiology* *270*, C1511-1521.
- van den Bent, M.J., Brandes, A.A., Rampling, R., Kouwenhoven, M.C., Kros, J.M., Carpentier, A.F., Clement, P.M., Frenay, M., Campone, M., Baurain, J.F., *et al.* (2009). Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *27*, 1268-1274.
- van Vuurden, D.G., Yazdani, M., Bosma, I., Broekhuizen, A.J., Postma, T.J., Heimans, J.J., van der Valk, P., Aronica, E., Tannous, B.A., Wurdinger, T., *et al.* (2009). Attenuated AMPA receptor expression allows glioblastoma cell survival in glutamate-rich environment. *PloS one* *4*, e5953.
- Vehlow, A., and Cordes, N. (2013). Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme. *Biochimica et biophysica acta* *1836*, 236-244.
- Volbracht, C., van Beek, J., Zhu, C., Blomgren, K., and Leist, M. (2006). Neuroprotective properties of memantine in different in vitro and in vivo models of excitotoxicity. *The European journal of neuroscience* *23*, 2611-2622.
- Weller, M., Stupp, R., Reifenberger, G., Brandes, A.A., van den Bent, M.J., Wick, W., and Hegi, M.E. (2010). MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nature reviews Neurology* *6*, 39-51.
- Wild-Bode, C., Weller, M., Rimner, A., Dichgans, J., and Wick, W. (2001). Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer research* *61*, 2744-2750.
- Wilson, B.E., Mochon, E., and Boxer, L.M. (1996). Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Molecular and cellular biology* *16*, 5546-5556.
- Witt, A., Macdonald, N., and Kirkpatrick, P. (2004). Memantine hydrochloride. *Nature reviews Drug discovery* *3*, 109-110.
- Wollmuth, L.P., and Sobolevsky, A.I. (2004). Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends in neurosciences* *27*, 321-328.
- Yang, J.L., Sykora, P., Wilson, D.M., 3rd, Mattson, M.P., and Bohr, V.A. (2011). The excitatory neurotransmitter glutamate stimulates DNA repair to increase neuronal resiliency. *Mechanisms of ageing and development* *132*, 405-411.
- Yang, J.L., Tadokoro, T., Keijzers, G., Mattson, M.P., and Bohr, V.A. (2010). Neurons efficiently repair glutamate-induced oxidative DNA damage by a process involving CREB-mediated up-regulation of apurinic endonuclease 1. *The Journal of biological chemistry* *285*, 28191-28199.
- Yashiro, K., and Philpot, B.D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* *55*, 1081-1094.

Ye, Z.C., Rothstein, J.D., and Sontheimer, H. (1999). Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 10767-10777.

Ye, Z.C., and Sontheimer, H. (1999). Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer research* 59, 4383-4391.

Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L., and Yu, J.S. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23, 9392-9400.

Zalutsky, M.R. (2005). Current status of therapy of solid tumors: brain tumor therapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 46 Suppl 1, 151S-156S.

### Poster Präsentation

AACR 103rd Annual Meeting 2012:

Sleire, L., Wang, J., Heggdal, J., Pedersen, P.H., and Enger, Ø. (2012). Sulfasalazine sensitizes glioblastoma cells to radiation treatment. *Cancer Research* 72, 1456.

## **8 Anhang**

### **8.1 Veröffentlichungen**

#### **In Präparation**

Längle AG, Merk K, Rau K, Laube B (voraussichtlich 2014)  
"The role of calcium-permeable ionotropic glutamate receptors in glioblastoma malignancy"

#### **Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Tagungsbeiträge präsentiert**

Längle AG, Löbrich M, Laube B (2012)  
„Glutamate regulates DNA damage repair in glioblastoma cells,“  
Posterpräsentation, Ion Transport and Cancer International Meeting 2012, Würzburg, Deutschland

Längle AG, Merk K, Laube B (2013)  
"Ionotropic Glutamate Receptors promote radioresistance of glioblastoma cells by increasing DNA repair capacity"  
Posterpräsentation, GBS Jahrestagung 2013, Darmstadt, Deutschland

Längle AG, Merk K, Laube B (2013)  
"Ionotropic Glutamate Receptors promote radioresistance of glioblastoma cells by increasing DNA repair capacity"  
Posterpräsentation, Neuroscience 2013, San Diego, USA

## 8.2 Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

---

Vor- und Nachname	Adriana Gabriele Längle
Geburtsdatum	19.05.1986
Geburtsort	Ludwigshafen am Rhein, Deutschland

### *Promotion*

---

04/2011 – 03/2014	Doktorarbeit in Biologie an der Technischen Universität Darmstadt im Rahmen des von der DFG finanzierten Graduiertenkollegs 1657 am Fachbereich Biologie, Molekulare und Zelluläre Neurophysiologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bodo Laube
-------------------	---

### *Studium*

---

09/2010	Diplom in Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
08/2009 – 05/2010	Diplomarbeit in Biologie an der Technischen Universität Darmstadt und am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main, Abteilung Neurochemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bodo Laube
09/2007	Vordiplom in Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
10/2005 – 09/2010	Biologie-Studium an der Technischen Universität Darmstadt

### *Schulbildung*

---

08/1996 – 03/2005	Eleonoren Gymnasium in Worms, Abschluss Abitur
08/1992 – 06/1996	Heinrich-von-Gagern Grundschule in Monsheim

### **8.3 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den .....

.....

## **8.4 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei Prof. Dr. Bodo Laube bedanken, dass er mir ermöglicht hat die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu schreiben, mich immer unterstützt hat und mir großes Vertrauen geschenkt hat.

Ein Dankeschön gebührt auch Prof. Dr. Gerhard Thiel für die Bereitschaft meine Doktorarbeit zu begutachten und Herrn Prof. Dr. Franz Rödel, wie auch seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der Glioblastomzelllinien.

Der größte Dank geht an meine ganze Arbeitsgruppe. Ein großes Dankeschön vor allem an Wibke, Kirsten, Kiki, Hannah, Katrin, Basti und Tim.

Außerdem danke ich all meinen Freunden, die mich ebenfalls unterstützt haben. Besonderer Dank an Eva-Maria, Lucie, Lena, Katrin, Belle, Britta und an meine verstorbene beste Freundin Julia, die ich nie vergessen und immer vermissen werde.

Zum Schluss möchte ich mich in ganz besonderem Maße bei meinen Eltern Christiane und Frank, meinem Bruder Thimo und seiner Tina bedanken. Ihr seid die beste Familie, die man sich wünschen kann.