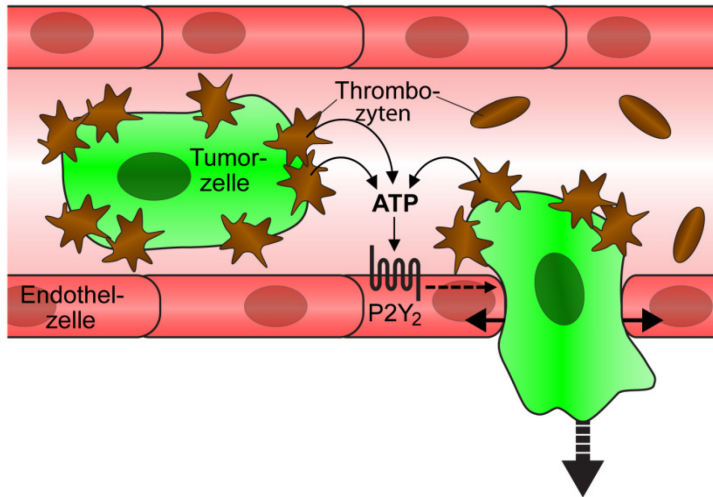


## Nukleotide aus Thrombozyten steigern transendotheliale Tumorzellmigration

Krebserkrankungen sind eine der weltweit führenden Todesursachen und die Metastasierung in distale Organe ist hauptsächlich verantwortlich für einen tödlichen Verlauf. In den letzten beiden Jahrzehnten wurden wesentliche Fortschritte im Verständnis des Metastasierungsprozesses gemacht [1]. Leider konnten diese Erkenntnisse noch nicht erfolgreich in therapeutische Anwendung umgesetzt werden. Studien ab den 1970er Jahren, in denen Thrombozyten in murinen Tumormodellen pharmakologisch oder genetisch depletiert wurden, zeigen eine drastische (>90%) Reduktion der Metastasierung [2,3]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen Thrombozyten aktivieren können und dass diese Eigenschaft mit der Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen korreliert [4]. Eine aktuelle Meta-Analyse klinischer Studien fand eine reduzierte Metastasierungswahrscheinlichkeit unter Thrombozytenfunktionshemmung durch Acetylsalicylsäure [5]. Trotz des etablierten Beitrags von Thrombozyten zur Bildung von Metastasen sind bisher wenige Mechanismen und noch weniger molekulare Einzelheiten dazu bekannt.

In unseren Versuchen [6] wollten wir deshalb detaillierter untersuchen, wie Thrombozyten die Metastasierung von Tumorzellen beeinflussen. Wir konzentrierten uns auf den wichtigen Schritt, in dem Tumorzellen durch die Gefäßwand in das Organ-Gewebe eintreten. Dabei spielt die Passage der innersten Zellschicht der Gefäße, der Endothelzellen, eine wesentliche Rolle. In einem *in vitro*-Modell zeigte sich, dass die Transmigration der Tumorzellen durch eine Endothelzellschicht in Anwesenheit von Thrombozyten um das Zwei- bis Dreifache verstärkt war. Dies war auch der Fall, wenn statt Thrombozyten der Überstand von zuvor durch Tumorzellen stimulierten Thrombozyten zu den Tumorzellen gegeben wurde. ATP ist wie andere Nukleotide und kleine Moleküle in sogenannten „dense granules“ der Thrombozyten enthalten und wird nach Aktivierung freigesetzt. Durch Zugabe von Apyrase, einem Enzym, das ATP und ADP zu AMP abbaut, konnten wir den Effekt der Thrombozyten auf Tumorzellen neutralisieren. Umgekehrt konnten wir eine vergleichbare Steigerung der Transmigration von Tumorzellen nach Zugabe von ATP alleine erreichen, dies traf weniger auf ADP zu. Um zu klären, ob ATP/ADP die Tumorzellmigration durch Öffnung der Endothelbarriere verstärken, führten wir Permeabilitäts-, morphologische und immunhistochemische Untersuchungen durch und fanden nur nach Zugabe von Tumorzellen mit Thrombozyten erhöhte Permeabilität und Bildung von gestörten „adherens junctions“ bei Endothelzellen. Um diese *in vitro*-Befunde unter *in vivo*-Bedingungen zu überprüfen, untersuchten wir die Metastasierung von Tumorzellen in Wildtyp-Mäusen sowie in *Unc13d<sup>Jinx</sup>*-Mäusen, die in Vorversuchen einen fast vollständigen Defekt in der Sekretion von „dense granules“ und damit von Nukleotiden aufwiesen. Histologisch fanden wir in *Unc13d<sup>Jinx</sup>*-Mäusen eine stark reduzierte Metastasierung in der Lunge nach Ausbildung eines Primärtumors in der Flanke oder nach intravenöser (i.v.) Injektion von B16F10-Melanomzellen oder LLC1-Lungenkarzinomzellen. Als Rezeptoren für das von Thrombozyten freigesetzte ATP kommen ionotrope (P2X) oder metabotrope (P2Y) purinerge Rezeptoren infrage. *In vitro* konnten wir herausarbeiten, dass die durch Thrombozyten gesteigerte Tumorzelltransmigration durch endotheliale P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt ist. Da es für P2Y<sub>2</sub> keinen spezifischen Inhibitor gibt, untersuchten wir die Metastasierung nach i.v. Injektion von Tumorzellen in P2Y<sub>2</sub>-defizienten Mäusen und fanden ein vergleichbar reduziertes Level wie bei den *Unc13d<sup>Jinx</sup>*-Tieren. Außerdem waren die vaskuläre Permeabilität nach i.v. Injektion von Tumorzellen sowie die Extravasation von Tumorzellen in P2Y<sub>2</sub>-defizienten und *Unc13d<sup>Jinx</sup>*-Mäusen stark reduziert im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Thrombozyten in der Mikrozirkulation von Endorganen durch Tumorzellen aktiviert werden; das freigesetzte ATP beeinflusst über P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren die Permeabilität und Barrierefunktion der Endothelzellschicht und erleichtert so den Tumorzellen die Passage in das Gewebe des Endorgans (s. Abbildung). Dies deckt sich mit Studien, die eine lokale Assoziation von Thrombozyten mit Tumorzellen in der Mikrozirkulation finden [7, 8] und mit Studien, die zeigen, dass Thrombozyten und endotheliale P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren an der Transmigration verschiedener Immunzellen beteiligt sind [9]. Unsere Studie liefert starke Hinweise für einen wichtigen Signalweg über Thrombozyten in der Metastasierung, der mit dem endothelialen P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor einen vielversprechenden neuen Therapieansatzpunkt bietet.



**Abb.:** Tumorzellen aktivieren Thrombozyten in der Mikrozirkulation des Endorgans, dies führt zur Freisetzung von ATP. Die Bindung von ATP an endotheliale P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren beeinträchtigt die Barrierefunktion von Endothelzellen und erleichtert die Tumorzelltransmigration in das Gewebe.

#### Preisträgerin Rudolf-Buchheim-Preis 2014

Dagmar Schumacher  
 Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg  
 AG Freichel  
 Im Neuenheimer Feld 366  
 69120 Heidelberg  
 dagmar.schumacher@pharma.uni-heidelberg.de



Die genannte Studie wurde durchgeführt in der AG Stefan Offermanns, Max-Planck-Institut Bad Nauheim.

#### Kurzlebenslauf

Jahrgang 1978. Vordiplom Psychologie an der Universität Bremen. Biotechnologiestudium an der Hochschule Mannheim. 2006-2012 Promotionsstudien in der Arbeitsgruppe von Stefan Offermanns (Universität Heidelberg 2006-2009, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim 2009-2012), Promotion 2013, seit 2013 Postdoc in der Arbeitsgruppe von Marc Freichel, Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg

1. Chaffer, C. L. and R. A. Weinberg (2011). "A perspective on cancer cell metastasis." *Science* 331(6024): 1559-1564.
2. Pearlstein, E., P. L. Salk, et al. (1980). "Correlation between spontaneous metastatic potential, platelet-aggregating activity of cell surface extracts, and cell surface sialylation in 10 metastatic-variant derivatives of a rat renal sarcoma cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(7): 4336-4339.
3. Camerer, E., A. A. Qazi, et al. (2004). "Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis." *Blood* 104(2): 397-401.
4. Gasic, G. J., T. B. Gasic, et al. (1973). "Platelet-tumor-cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease." *Int J Cancer* 11(3): 704-718.
5. Rothwell, P. M., M. Wilson, et al. (2012). "Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials." *Lancet* 379(9826): 1591-1601.
6. Schumacher D, Strilić B, et al. (2013). „Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor." *Cancer Cell* 24(1), 130-137.
7. Crissman, J. D., J. S. Hatfield, et al. (1988). "Morphological study of the interaction of intravascular tumor cells with endothelial cells and subendothelial matrix." *Cancer Res* 48(14): 4065-4072.
8. Im, J. H., W. Fu, et al. (2004). "Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation." *Cancer Res* 64(23): 8613-8619.
9. Kukulski, F., F. Ben Yebdri, et al. (2010). "Endothelial P2Y2 receptor regulates LPS-induced neutrophil transendothelial migration *in vitro*." *Mol Immunol* 47(5): 991-999.