



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Characterization of M-CSFR in tumorigenesis and the interactions  
between tumor cells and monocyte-derived macrophages *in vitro***

Autor: Flora Rey-Giraud  
Institut / Klinik: Institut für Molekular und Zellbiologie der Hochschule Mannheim  
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Interest in understanding the role of the tumor microenvironment in tumorigenesis arose from numerous studies linking immune cell infiltrate to clinical outcome. In this context, tumor-associated macrophages which biology is closely associated with M-CSF and its receptor M-CSFR represent key players. The work described here aimed to study the role of the cytokine in the interactions between malignant cells and tumor-associated macrophages *in vitro*.

Altogether, M-CSF was shown as a direct player in M-CSFR expressing lines by activating their survival, differentiation and migration/invasion properties. While each model responded to M-CSF stimulation in a specific manner, the effect of the growth factor on tumor cell lines as reported elsewhere could not be fully reproduced such as the effect of M-CSF on colony formation. Also, significance of the effect observed on migration/invasion needs to be confirmed due to variable results in reproduced experiments.

On the other hand, data confirmed the importance of M-CSF (or GM-CSF) as survival factors for monocytes *in vitro* and demonstrated the influence of the culture conditions on MDM phenotype and more importantly functionality, as a result of their high plasticity. Indirect co-culture methods were applied to assess the interaction between tumor cells and MDM by culturing tumor cell lines in MDM (M1, M2a or M2c) conditioned media (CM) and vice versa freshly-isolated monocytes in tumor cell conditioned media.

Inhibition of tumor cell growth occurred in about 70% cases via a TNF- $\alpha$  dependent mechanism, suggesting the presence of unidentified factors in MDM conditioned media inhibiting cell proliferation. On the other hand, tumor cells expressing either GM-CSF or M-CSF could sustain monocyte survival and subsequent differentiation into M1 or M2 macrophages. In turn, conditioned media from two of these MDM induced an increase in tumor cell proliferation, indicating that soluble factors secreted by MDM could activate tumor cell growth. It appears that GM-CSF was a more potent factor than M-CSF since low concentrations of GM-CSF could induce survival compared to M-CSF. Also, phenotype of M-CSF MDM and sensitivity of MDM towards neutralizing M-CSFR antibody was abolished in the presence of GM-CSF even at low concentration. In the light of the results described in this work, M2c macrophages represent the subpopulation depending the most on M-CSF. Since this population resembles the most, according to its phenotype, tumor-associated macrophages *in situ*, targeting M-CSFR could result in eliminating specifically pro-tumoral macrophages.

Da viele Studien eine Korrelation des Immunzellinfiltrates mit klinischen prognostischen Parametern in Patienten nachweisen konnten, ist das Interesse groß die Rolle des Tumor Stroma, das von nicht malignen Zellen gebildet wird, besser zu verstehen. In diesem Zusammenhang spielen Makrophagen, und deren Differenzierungs-/Wachstumsfaktor M-CSF eine entscheidende Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von Zytokinen in der Interaktion von malignen Zellen und tumorassoziierten Makrophagen *in vitro* untersucht werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass M-CSF in M-CSFR exprimierenden Zelllinien einen direkten Einfluss hat, indem es deren Überleben, sowie Migrations- und Invasionseigenschaften reguliert. Da jedes Modell in spezifischer Weise auf die Stimulation mit M-CSF reagiert, konnten von anderen Arbeitsgruppen publizierte Effekte bezüglich der Wirkung des Wachstumsfaktors auf Tumorzelllinien, (z.B. der Effekt von M-CSF auf die Bildung von Kolonien) nicht in vollem Umfang reproduziert werden. Auch der Einfluss von M-CSF auf die Migration/Invasion muss auf Grund von variierenden Ergebnissen bei reproduzierten Experimenten noch bestätigt werden.

Andererseits bestätigen die hier erhobenen Daten die Bedeutung von M-CSF (oder GM-CSF) für das Überleben von Monozyten *in vitro* und zeigen zudem den Einfluss der Kulturbedingungen auf den MDM Phänotyp und besonders auf dessen plastische Funktionalität. In dieser Arbeit wurden indirekte Ko-Kulturmethode zur Beurteilung der Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und MDM angewendet: Tumorzelllinien wurden in MDM (M1, M2a oder M2c) konditioniertem Medium kultiviert und umgekehrt frisch isolierte Monozyten in konditioniertem Medium von Tumorzellen.

In ca. 70% der Fälle ist die Inhibition des Tumorwachstums TNF- $\alpha$  vermittelt. Allerdings spielen für diesen Prozess noch weitere bis jetzt nicht identifizierte Faktoren eine Rolle. Andererseits könnten entweder GM-CSF oder M-CSF produzierende Tumorzellen das Überleben von Monozyten und die spätere Differenzierung zu M1 oder M2 Makrophagen unterstützen. Im Gegensatz dazu, verursachten konditionierte Medien von zwei der untersuchten MDM eine Zunahme der Tumorzellproliferation, was darauf hinweist, dass von MDM sezernierte lösliche Faktoren das Tumorwachstum aktivieren können. GM-CSF scheint ein potenterer Faktor als M-CSF zu sein, da niedrige Konzentrationen von GM-CSF (in Vergleich zu M-CSF) ein Überleben bewirkten. Außerdem wurde der M-CSF MDM Phänotyp und die Sensitivität von MDM gegenüber dem neutralisierenden M-CSFR-Antikörper auch bei niedriger Konzentration von GM-CSF aufgehoben. In dieser Arbeit erhobene Daten belegen, dass M2c Makrophagen die Subpopulation darstellen, die am meisten von M-CSF abhängig ist. Da *in situ* diese Population bezüglich ihres Phänotyps tumorassozierten Makrophagen am ähnlichsten ist, könnte die Hemmung von M-CSFR zu einer spezifischen Eliminierung von pro-tumoralen Makrophagen führen.