

Diss. ETH No. 13704

Regulation of Insulin-like Growth Factor Type 1  
Receptor Expression in A549 non-small Cell Lung  
Cancer and Saos-2/B-10 osteoblastic Osteosarcoma  
Cells and its Implication in Tumor Cell Apoptosis

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

Katalin TISA BOSTEDT  
Federal diploma for pharmacists  
born 3rd August, 1970  
Citizen of Zurich, ZH

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Kaspar H. Winterhalter, examiner  
Prof. Dr. Jürgen Zapf, co-examiner

Zurich 2000

## Summary

Insulin-like growth factor I (IGF I) acts via its receptor, the insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF 1R), which mediates IGF I-stimulated cell proliferation and protection from apoptosis. Since IGF 1R may play an important role in tumor growth, the aim of this work was to investigate whether and how IGF 1R is regulated by IGF I in two human tumor cell lines. A549 non-small cell lung cancer cells of epithelial origin and Saos-2/B-10 osteoblastic osteosarcoma cells of mesenchymal origin were compared with regard to their growth rates, their IGF I binding characteristics and their IGF 1R protein and mRNA levels after treatment with serum-free medium with or without 5 nM IGF I (SFM/ IGF I or SFM) or with growth medium containing 5% fetal calf serum (FCS).

In contrast to A549 cells which produce IGF I, survival and proliferation of Saos-2/B-10 cells which do not produce IGF I were dependent on the presence of exogenous IGF I. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) secretion into the conditioned medium varied in a time- and treatment dependent manner for both cell lines. In A549 cells mainly IGFBP 2 and IGFBP 3 were expressed, IGFBP 4 only after serum-free treatment. Saos-2/B-10 cells seemed to produce no detectable IGFBPs after FCS-treatment.

After incubation of the cells with exogenous IGF I, a decreased number of specific binding sites and down-regulated IGF 1R protein expression were observed in both cell lines. IGF 1R mRNA levels in A549 cells were not affected by any of the applied conditions. In contrast, IGF 1R mRNA levels of Saos-2/B-10 cells were increased under serum-free condition compared to the condition with 5 nM IGF I in serum-free medium or growth medium with 5%FCS. The observed discrepancies between levels of IGF 1R mRNA and IGF 1R protein suggest translational and/or posttranslational regulation of IGF 1R protein or even an altered IGF 1R state on the cell surface of both cell lines. Reduction of IGF 1R binding and down-regulation of IGF 1R protein by its ligand in the tumor cell lines used indicates that these cells may still be able to counteract

overstimulation of growth by IGF I and to regulate IGF 1R expression depending on the environmental conditions.

Acute stimulation of the cells by IGF I after pretreatment with the three test media (SFM, IGF I/ SFM or FCS) resulted in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation except for IGF I pretreated cells, where IRS-1 phosphorylation was higher than with acute IGF I-stimulation. IRS-1 activation after the three treatments showed the same pattern for A549 and Saos-2/B-10 cells and no correlation with the amount of receptor protein on the cell surface.

IGF 1R protected Saos-2/B-10 cells from apoptosis when activated by its ligand. Protection from apoptosis was even more pronounced with IGF I than with growth medium with 5%FCS. In contrast, enrichment of oligonucleosomes in the cytoplasm as an indicator for apoptosis was increased massively in cells grown in serum-free medium.

Transfection of the tumor cells with antisense oligodesoxynucleotides (ODN) against IGF 1R mRNA in combination with liposomes revealed a down-regulation of the cell surface receptor to 50%. Thus, A549 cells with down-regulated IGF 1R showed an increase in caspase-3 activity, which confirmed that cells with down-regulated IGF 1R become apoptotic.

## *Zusammenfassung*

Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor I (Insulin-like growth factor I, IGF I) stimuliert über den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Typ 1 Rezeptor (Insulin-like growth factor type 1 receptor, IGF 1R) die Zellproliferation und schützt die Zellen vor dem programmierten Zelltod (Apoptose). Da der IGF 1R eine wichtige Rolle im Tumorwachstum spielen könnte, ging die vorliegende Arbeit der Frage nach, ob und wie der IGF 1R in zwei menschlichen Tumorzelllinien durch seinen Liganden, IGF I, reguliert wird. An A549 nicht-kleinzelligen Lungenkrebszellen epithelialen Ursprungs und Saos-2/B-10 osteoblastischen Knochenkrebszellen mesenchymalen Ursprungs wurden daher nach Behandlung mit serum-freiem Medium mit oder ohne 5 nM IGF I (SFM/ IGF I oder SFM) oder mit Wachstumsmedium in Gegenwart von 5% fötalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS) Wachstumsraten, IGF I-Bindungseigenschaften und die Menge an IGF 1R Protein und mRNA untersucht.

Im Gegensatz zu den A549 Zellen, die IGF I sezernieren, war das Überleben und die Proliferation der Saos-2/B-10 Zellen, die kein IGF I produzieren, abhängig von zugesetztem IGF I. IGF Bindungsproteine (IGF binding proteins, IGFBPs) wurden von A549 und Saos-2/B-10 Zellen zeit- und Testmedium-abhängig in das konditionierte Medium abgegeben. In A549 Zellen wurde vor allem IGFBP 2 und IGFBP 3 nachgewiesen, IGFBP 4 nur in serum-freiem Medium. Bei Saos-2/B-10 Zellen waren im Medium keine IGFBPs nachweisbar.

Nach Inkubation der Zellen mit zugesetztem IGF I wurde eine Abnahme der spezifischen IGF I Bindungsstellen und der Expression des IGF 1R Proteins für beide Zelllinien beobachtet. Die mRNA des IGF 1R in A549 Zellen blieb unbeeinflusst durch alle drei Testmedien. Im Gegensatz dazu war die IGF 1R mRNA Expression in Saos-2/B-10 Zellen nach Behandlung in serum-freiem Medium erhöht verglichen mit der Expression in Gegenwart von 5 nM IGF I und 5%FCS. Die Diskrepanz zwischen der IGF 1R mRNA und den IGF 1R

Proteinniveaus lässt auf eine translationale und/oder eine posttranslationale Regulation des IGF 1R Proteins oder auf einen veränderten IGF 1R Zustand an der Zelloberfläche beider Zelllinien schliessen. Die Abnahme der IGF 1R Bindung und IGF 1R Proteinexpression in Gegenwart seines Liganden deutet darauf hin, dass die untersuchten Tumorzellen einer Ueberstimulation des Wachstums durch IGF I entgegenwirken und ihre IGF 1R Proteinexpression abhängig von den umgebenden Bedingungen regulieren können.

Akute IGF I-Stimulation der Zellen resultierte in einer Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1) Phosphorylierung nach Vorinkubation mit den drei Testmedien (SFM, IGF I/ SFM oder FCS), ausser für IGF I-vorinkubierte Zellen, bei welchen die IRS-1 Phosphorylierung stärker war als mit akuter IGF I-Stimulation. Die IRS-1 Aktivierung nach den drei Behandlungen zeigte das gleiche Bild für A549 und für Saos-2/B-10 Zellen und keine Korrelation mit der Menge an IGF 1R Protein an der Zelloberfläche.

Die Interaktion von IGF I mit dem IGF 1R schützte Saos-2/B-10 Zellen vor Apoptose. IGF I war dabei sogar noch wirksamer als Wachstumsmedium mit 5%FCS. Im Gegensatz dazu war nach Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium die Anreicherung von Oligosomen im Cytoplasma stark erhöht, was ein Indikator für apoptotische Zellen ist.

Die Transfektion der Tumorzellen mit Antisense-Oligonucleotiden (ODN) gegen die IGF 1R mRNA bewirkte eine 50%-ige Abnahme des IGF 1R an der Zelloberfläche. Die A549 Zellen mit herunterreguliertem IGF 1R zeigten eine Zunahme der Caspase-3 Aktivität, was darauf schliessen lässt, dass Zellen mit vermindertem IGF 1R eher zur Apoptose neigen.