



Saverio Bettuzzi, PhD

Associate Professor of Biochemistry, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Biochimica, Biochimica Clinica e Biochimica dell'Esercizio Fisico, Università degli Studi di Parma, Via Volturno 39, 43100 Parma, Italy (saverio.bettuzzi@unipr.it).

Conference date and venue: 21st May 2003, "C Hall", Faculty of Medicine, University of Parma, Parma. Introduced by Prof. Amos Casti, Department of Biochemistry, University of Parma, Parma, Italy

The new anti-oncogene Clusterin and the molecular profiling of Prostate Cancer progression and prognosis

Prostate cancer (CaP) incidence is steadily increasing in Western countries. When CaP spreads to local as well as distant sites, often become androgen-independent and refractory to hormonal therapy, finally resulting in recurrence. Because of unfavourable prognosis of extra-prostatic disease, detection of CaP at curable stage is desirable, but the screening methods actually available present limitations. Thus, new markers to guide CaP management are urgently needed.

Clusterin is an ubiquitously distributed glycoprotein in mammals that was originally cloned as the most potently induced gene during rat prostate involution following androgen deprivation (1) and found involved in many patho-physiological processes (2). In spite of the increasing amount of experimental evidences accumulated by many laboratories, its biological significance has not clearly established yet, particularly with regard to apoptosis. Its expression is cell cycle dependent, being enhanced during cell quiescence, but repressed following induction of cell proliferation (3). Clusterin transient over-expression was previously shown to block cell cycle progression of SV40-immortalized human prostate epithelial cell lines PNT1A and PNT2 (4). Consistently, we found that clusterin was down-regulated in human

Il nuovo anti-oncogene Clusterina e il profilo molecolare della progressione e della prognosi del cancro prostatico

L'incidenza del cancro prostatico (CaP) aumenta costantemente nei paesi occidentali. Quando il CaP diffonde a livello locale, così come a distanza, spesso diventa androgeno-indipendente e di conseguenza refrattario alla terapia ormonale, e si ha ricaduta della malattia. Poiché la malattia extra-prostatica ha spesso prognosi infausta, è necessario diagnosticare il CaP quando è ancora curabile, ma i metodi di screening attualmente disponibili presentano delle limitazioni. Ecco perché sono necessari nuovi marker per guidare la gestione clinica di tale malattia.

La clusterina è una glicoproteina distribuita in modo ubiquitario nei mammiferi il cui gene è stato originariamente clonato come il più potentemente indotto durante l'involuzione della prostata causata dalla deprivazione androgenica (1). Questo gene è poi stato trovato coinvolto in molti processi pato-fisiologici (2). A dispetto del continuo aumento di evidenze sperimentali prodotte da vari laboratori, il suo significato biologico non è ancora stato chiaramente stabilito, in particolare per quanto riguarda l'apoptosi. La sua espressione è dipendente dal ciclo cellulare, e si trova aumentata nella fase di quiescenza ma repressa in seguito a stimolo proliferativo (3). La sovraespressione transiente della clusterina ha provocato il blocco nella progressione del ciclo cellulare nelle cellule PNT1A e PNT2, che sono cellule epiteliali prostatiche umane immortalizzate con SV40 (4). Coerentemente con questo dato, abbiamo recente-

CaP (5). Clusterin expression was further studied in CaP specimens of different degrees of malignancy by Northern and Western analysis, *in situ* hybridization and immunohistochemistry, in comparison with Gas1 and histone H3 mRNAs, that are known to be markers of cell quiescence and S-phase of the cell cycle, respectively (Scaltriti et al, Int J Cancer 2003, in press). In low grade CaP, clusterin co-localized with Gas1 to the stromal compartment and, in some glands, the basal lamina was heavily stained. In high grade CaP clusterin stained the remnants of stromal matrix, while histone H3 localized to cancer cells, which were very rarely clusterin-positive. We suggested that the periglandular clusterin expression found in low grade CaP could result from induction of quiescence and/or apoptosis of prostatic fibroblasts lining those glands in which tumour invasion is at an initial stage, involving basal lamina. In advanced CaP, the staining of the remnants of the extra-cellular matrix suggests a role for clusterin in the process of dismantling the stromal organization caused by cancer progression.

In any case, clusterin role in cell survival, cell death and neoplastic transformation is still debated (6). To understand more about clusterin functions in prostate cells, we have investigated the cell fact of human prostate epithelial cells constitutively over-expressing clusterin. PC-3 tumour cells were substantially more sensitive to clusterin expression than non-malignant PNT1A cells, showing clonogenic toxicity and multiple phenotypic changes including cell cycle arrest and increased apoptosis. These results are consistent with the hypothesis that clusterin expression is pro-apoptotic in prostate epithelial cells. Moreover, expression of exogenous clusterin in both cell types resulted in nuclear accumulation of the protein. Nuclear localization of clusterin was previously hypothesized, but our work brought the first experimental evidences so far of this phenomena (Scaltriti et al, submitted). To survive clusterin expression, the PC-3 tumour cells developed apoptosis-inhibitory properties. This even could be important for the understanding of how prostate cancer cells acquire the resistance to chemo/radiotherapy. In fact, under this condition, clusterin over-expression was frequently observed.

mente dimostrato che la sua espressione è repressa nel cancro prostatico (5). L'espressione della clusterina è stata ulteriormente studiata in campioni di CaP con diverso grado di malignità per mezzo di analisi Northern e Western, ibridizzazione in situ e immunohistochimica, a confronto con i livelli di mRNA per Gas1 e istone H3, che sono noti per essere dei marcatori specifici rispettivamente della fase di quiescenza e della fase S del ciclo cellulare (Scaltriti et al, Int J Cancer 2003, in press). In CaP di basso grado Gleason, la clusterina co-localizzata con Gas1 nel comparto stromale e, in alcune ghiandole, la lamina basale risultava intensamente positiva. Nel CaP di alto grado la clusterina risultava legata ai residui della matrice stromale, mentre l'istone H3 era localizzato nelle cellule cancerose che erano molto raramente positive per la clusterina. Abbiamo quindi suggerito che l'espressione periglandolare della clusterina che abbiamo trovato nel CaP di basso grado potesse essere il risultato dell'induzione della quiescenza e/o di apoptosi nei fibroblasti prostatici che circondano quelle ghiandole la cui lamina basale sta subendo gli stadi iniziali dell'invasione tumorale. Nel CaP avanzato, la positività dei residui della matrice extra-cellulare suggerisce un ruolo per la clusterina nel processo di demolizione dell'organizzazione stromale causata dalla progressione del cancro.

In ogni caso, il ruolo della clusterina nella sopravvivenza e morte cellulare o nella trasformazione neoplastica è ancora ampiamente dibattuto (6). Per comprendere di più riguardo alle funzioni della clusterina nelle cellule prostatiche che abbiamo studiato il destino di cellule epiteliali prostatiche umane che sovraesprimono clusterina in modo costitutivo. Le cellule tumorali PC-3 mostravano tossicità clonogena e modificazioni fenotipiche multiple che comprendevano anche arresto del ciclo cellulare ed aumento dei livelli di apoptosi, ed era sostanzialmente più sensibili alla espressione di clusterina rispetto alle cellule non maligne PNT1A. Questi risultati sono compatibili con l'ipotesi che l'espressione di clusterina abbia un effetto pro-apoptotico nelle cellule epiteliali prostatiche. Inoltre, l'espressione di clusterina esogena in entrambi i tipi cellulari ne ha provocato l'accumulo nel nucleo. La localizzazione nucleare della clusterina era stata ipotizzata precedentemente, ma il nostro lavoro ha portato alle prime evidenze sperimentali di questo fenomeno (Scaltriti et al, submitted). Per sopravvivere alla espressione della clusterina, le cellule tumorali PC-3 hanno sviluppato proprietà inibitorie dell'apoptosi. Questo evento potrebbe essere importante per comprendere come le cellu-

In a different experimental system we found that the accumulation of a nuclear 45kDa clusterin isoform was capable to cause cell detachment-induced apoptosis (ANOIKIS) in PNT1A cells when grown under serum-free condition (Caccamo et al, submitted). The early events following nuclear translocation of clusterin were decreased proliferation and cell cycle arrest at G_0/G_1 -S phase checkpoint, then followed by cell detachment and apoptosis induction. Accumulation of the 45kDa isoform was found in detached cells and in apoptotic bodies, confuting that clusterin over-expression could increase cell survival, at least in human prostate epithelial cells. These experimental evidences are again consistent with a possible pro-apoptotic role for clusterin, that could be a slow-acting, anti-proliferative and anoikis-promoting gene in the prostate cells.

Molecular profiling or CaP progression and prognosis was obtained in 23 patients (Bettuzzi et al, Cancer Res 2003, in press). The level of expression of clusterin was studied in parallel with 7 other genes that we found as deeply involved in tumour progression. In the search for correlations between patients gene profiling and recurrence, we performed a 5-year follow-up study on the same cohort of patients in which the molecular data were obtained. The gene expression profiling that we obtained, probably because focused on a selected group of genes, when used in combination with standard clinical information, actually provided reliable prognostic prediction of CaP. Prognosis was first assessed on the basis of gene expression profiling alone, then the result was compared to the prediction obtained using clinical and pathological information (Gleason score, TNM staging, prostate volume or PSA levels at the time of diagnosis). The best result was obtained with a selected combination of gene profiling and clinical/pathological parameters, which resulted in prediction of recurrence in 95.7% of patients (22 out of 23).

Thus, molecular characterization of CaP, one of the most elusive type of cancer, is actually feasible. The bridging of the gap between laboratory and clinical research is the most important goal of translational research and should be rapidly achieved. Gene expression analysis is a powerful tool that potentially

le di cancro prostatico acquisiscono resistenza alla chemio o radioterapia. Infatti, in queste condizioni, la sovraespressione di clusterina è stata osservata frequentemente.

In un diverso sistema sperimentale abbiamo visto che l'accumulo di una isoforma nucleare della clusterina di 45kDa di peso molecolare è stato in grado di provocare apoptosi indotta da perdita di adesione (ANOIKIS) nelle cellule PNT1A cresciute in condizioni serum-free (Caccamo et al, submitted). Gli eventi precoci che hanno seguito l'accumulo nucleare di clusterina sono stati diminuzione della proliferazione, blocco del ciclo cellulare in corrispondenza del checkpoint G_0/G_1 -S, seguiti dal distacco delle cellule dal substrato e dall'induzione di apoptosi. L'accumulo dell'isoforma di 45kDa è stato evidenziato nelle cellule distaccata e nei corpi apoptotici. Questa evidenza contrasta con l'ipotesi che la sovraespressione di clusterina possa favorire la sopravvivenza cellulare, almeno nelle cellule epiteliali prostatiche umane. Queste evidenze sperimentali sono invece coerenti con un possibile ruolo pro-apoptotico della clusterina, la quale potrebbe essere un gene ad azione lenta che produce effetti anti-proliferativi ed induce anoikis nelle cellule prostatiche.

Il profilo molecolare della progressione del CaP e della sua prognosi è stato ottenuto in 23 pazienti (Bettuzzi et al, Cancer Res 2003, in press). Il livello di espressione della clusterina è stato studiato in parallelo con altri 7 geni che sono profondamente coinvolti nella progressione tumorale. Per cercare una correlazione tra il profilo di espressione genico dei pazienti e la ricaduta della malattia, abbiamo eseguito uno studio di follow-up durato 5 anni nello stesso gruppo di pazienti nei quali abbiamo ottenuto precedentemente i dati molecolari. Il profilo di espressione genica che abbiamo ottenuto, forse perché focalizzato su un gruppo selezionato di geni, si è dimostrato capace di fornire una predizione affidabile della progressione del CaP quando usato in combinazione con le informazioni standard di tipo clinico. La prognosi è stata prima di tutto stabilita a priori sulla base del solo profilo di espressione genica, poi i risultati sono stati confrontati con la predizione ottenuta utilizzando le informazioni cliniche e patologiche (Gleason score, TNM staging, volume prostatico o livello di PSA alla diagnosi). Il miglior risultato di predizione è stato ottenuto con una combinazione selezionata di valori di espressione genica e parametri clinici e patologici, fino ad ottenere la predizione della ricaduta nel 95,7% dei pazienti (22 su 23).

Quindi la caratterizzazione molecolare del CaP, uno dei tipi di cancro più elusivi, è effettivamente possibile. L'o-

could increase our knowledge about biology of CaP. The purpose of our study was to show that gene expression profiling, when focused on a selected group of genes, provides reliable prognostic prediction of CaP that can be further enhanced when used in combination with standard clinical information. These evidences show that this approach can be of great value, and that the implementation of these information will probably help in the clinical managing of prostate cancer in the next future.

biiettivo più importante della ricerca traslazionale consiste nel colmare la frattura che spesso esiste tra la ricerca di laboratorio e quella clinica, e dovrebbe essere raggiunto prima possibile. L'analisi dell'espressione genica è uno strumento potente, che potenzialmente può aumentare la nostra conoscenza della biologia del CaP. Lo scopo del nostro studio è stato quello di dimostrare che il "gene expression profiling", se focalizzato su un gruppo di geni ben selezionati, può fornire una affidabile predizione prognostica del CaP, predizione che può essere ulteriormente migliorata se usata in combinazione con le informazioni cliniche standard. Queste evidenze mostrano che questo approccio può essere di grande valore pratico, e che l'applicazione di queste informazioni sarà probabilmente di aiuto nella gestione del cancro prostatico nell'immediato futuro.

References

1. Bettuzzi S, Hiipakka RA, Gilna P, Lia ST. Identification of an androgen-repressed mRNA in rat ventral prostate as coding for sulphated glycoprotein 2 by cDNA cloning and sequence analysis. *Biochem J* 1989; 257: 293-6.
2. Rosenberg ME, Silkensen J. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27: 633-45.
3. Bettuzzi S, Astancolle S, Guidetti G, Moretti M, Tiozzo R, Corti A. Clusterin (SGP-2) gene expression is cell cycle dependent in normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett* 1999; 448: 297-300.
4. Bettuzzi S, Scorcioni F, Astancolle S, Davalli P, Scaltriti M, Corti A. Clusterin (SGP-2) transient overexpression decreases proliferation rate of SV40-immortalized human prostate epithelial cells by slowing down cell cycle progression. *Oncogene* 2002; 21: 4328-34.
5. Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, et al. Tumor progression is accompanied by significant changes in the levels of expression of polyamine metabolism regulatory genes and clusterin (sulfated glycoprotein 2) in human prostate cancer specimens. *Cancer Res* 2000; 60: 28-34.
6. Koch Brandt C, Morgans C. Clusterin: a role in cell survival in the face of apoptosis? *Prog Mol Subcell Biol* 1996; 16: 130-49.