



國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

博士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

探討 CTEN 於人類前列腺上皮細胞所扮演的角色

Study on the Role of CTEN

in Human Prostate Epithelial Cells

吳偉銘

Wei-Ming Wu

指導教授：廖憶純 博士

Advisor: Yi-Chun Liao, Ph.D.

中華民國 107 年 8 月

August 2018



摘要

C-terminal tensin like (CTEN) 蛋白質是 tensin 家族的一員，主要存在於細胞的 focal adhesions，CTEN 於前列腺和胎盤等少數器官中有較高的基因表現，而 CTEN 同源蛋白質僅存在於哺乳動物。CTEN 蛋白質於前列腺上皮細胞的含量明顯高於其他型態的前列腺細胞，因此我們推測 CTEN 可能參與前列腺上皮組織的發展。為了探討 CTEN 在前列腺上皮組織中扮演的角色，我們使用非惡性前列腺上皮細胞株 RWPE-1 作為研究平台，以 siRNA 抑制 CTEN 基因表現或誘導外源表現 CTEN，分別於二維和三維培養環境中探討 CTEN 對細胞行為與型態的影響。我們發現於 RWPE-1 細胞中，缺乏 CTEN 會導致細胞停滯於 G1/S 期，並使 CDK 的活性抑制蛋白質 p21 和 p27 含量增加；CTEN 的減少也會抑制 RhoA 活化以及細胞移動能力。此外，我們發現 CTEN 基因座上有許多 Δ Np63 的結合位置， Δ Np63 為影響前列腺發展的重要轉錄因子，能夠正向調控 CTEN 基因表現，並藉由 CTEN 幫助細胞貼附於細胞外基質。透過線上資料庫分析發現 CTEN 在前列腺基底細胞的表現量高於管腔細胞，於是我們將 RWPE-1 培養於以 Matrigel 為基底的三維環境，以模擬前列腺上皮細胞分化與腺泡生成，我們發現隨著時間的增加，CTEN 的表現會受到抑制，而進一步在腺泡形成的過程中誘導外源表現 CTEN，則會破壞腺泡結構與細胞分化，可能是透過維持 FAK Y397 的磷酸化所造成。另一方面，雖然正常前列腺上皮細胞中的 CTEN 表現量很高，然而在中多數前列腺癌組織中 CTEN 表現量非常低，為了解 CTEN 於前列腺癌中的角色，我們外源表現 CTEN 於轉移性前列腺癌細胞株 DU-145，結果顯示過度表現 CTEN 雖然不影響 DU-145 的增生能力，但卻會抑制細胞遷徙能力。整體而言，本研究證實 CTEN 有助於非惡性前列腺上皮細胞的增生、移動和貼附，卻抑制轉移性前列腺癌細胞的移動能力，在分化為管腔細胞的過程中，CTEN 表現受到抑制，此負向調控 CTEN 是維持正常腺泡生成所必需，於前列腺上皮組織中，CTEN 的分布與其表現量的調控對於前列腺上皮組織的成熟與恆定具有重要的生理意義。

關鍵詞：CTEN、前列腺、增生、貼附、移動、腺泡生成、前列腺癌

Abstract

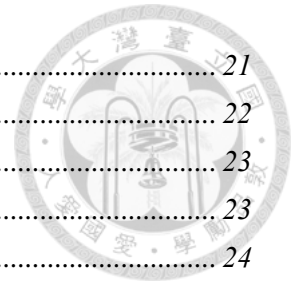
C-terminal tensin like (CTEN) protein is a member of tensin family, mainly localized in focal adhesions. CTEN is enriched in a few tissues, such as prostate and placenta, and CTEN homologies are found only in mammals. The levels of CTEN protein is significantly higher in prostate epithelial cells than other types of prostatic cells, suggesting that CTEN might participate in the development of prostate epithelium. In this study, to elucidate the role of CTEN in prostate epithelium, a non-malignant prostate epithelial cell line, RWPE-1, was used. We manipulated CTEN level by siRNA-mediated gene silencing or inducible ectopic gene expression to examine the effect of CTEN on cell behaviors and morphology in 2D or 3D culture system. Our study shows that loss of CTEN in RWPE-1 leads to accumulation of CDK inhibitors, p21 and p27, and hindrance to cell cycle G1/S transition. Depletion of CTEN also suppresses RhoA activation and cell migration. Additionally, we reveal the Δ Np63 binding region on *CTEN* gene locus and verified Δ Np63, a crucial transcription factor of prostate development, mediates cell-extracellular matrix adhesion through up-regulation of *CTEN*. Moreover, by analyses of publicly available online databases, we found that the level of CTEN expression is higher in prostate epithelial basal cells than in luminal cells. RWPE-1 cells in Matrigel-based 3D cultures were used to investigate the role of CTEN in prostate epithelial cell differentiation and acinar morphogenesis. We demonstrate that CTEN is inhibited during the course of luminal differentiation. Ectopic expression of *CTEN* maintains FAK pY397 level and disturbs the acini formation and luminal differentiation. On the other hand, although CTEN is highly expressed in prostate epithelial cells, it is significantly down-regulated in prostate cancer. To decipher the role of CTEN in prostate cancer, CTEN expression was induced in DU-145, a metastatic prostate cancer cell line. CTEN overexpression in DU-145 cells suppressed cell migration but made little impact on cell proliferation. In summary, our study demonstrates that CTEN facilitates proliferation, migration and adhesion in non-malignant prostate epithelial cells whereas inhibits cell migration in metastatic prostate cancer cells. Our work also strongly suggested that down-regulation of CTEN during luminal differentiation is required for acinar morphogenesis. The distribution and the expression regulation of CTEN in prostate epithelium is physiologically relevant for the development and homeostasis of prostate epithelium.

Keywords: CTEN, prostate, proliferation, adhesion, migration, acinar morphogenesis, prostate cancer

目錄



摘要	I
ABSTRACT	II
目錄	III
圖目錄	V
表目錄	VI
縮寫表	VII
第一章 研究背景	1
1.1 C-terminal tensin-like (CTEN) 蛋白質	1
1.1.1 蛋白質結構與功能性區塊	1
1.1.2 基因表現	3
1.1.3 生物功能	4
1.2 前列腺上皮組織生成與癌化	6
1.3 研究緣起與目標	9
第二章 研究材料與方法	11
2.1 研究材料	11
2.1.1 質體與保存菌株	11
2.1.2 細胞株與培養條件	13
2.1.3 抗體	13
2.2 研究方法	14
2.2.1 質體製備	14
2.2.2 以 siRNA 進行基因靜默 (gene silencing)	16
2.2.3 蛋白質含量分析 (Western blotting)	16
2.2.4 細胞增生能力檢測 (WST-1 assay)	17
2.2.5 細胞週期分析	18
2.2.6 Real-time RT-PCR	18
2.2.7 Chromatin Immunoprecipitation-PCR (ChIP-PCR)	19



2.2.8 細胞貼附能力檢測.....	21
2.2.9 細胞核細胞質分離.....	22
2.2.10 細胞移動能力檢測.....	23
2.2.11 RhoA 活性檢測.....	23
2.2.12 生物資訊分析.....	24
2.2.13 慢病毒顆粒製備與穩定細胞株篩選.....	25
2.2.14 三維空間細胞培養 (腺泡生成).....	25
2.2.15 免疫螢光染色.....	26
第三章 CTEN 缺失對人類前列腺上皮細胞增生、貼附和移動能力的影響.....	27
3.1 CTEN 缺失會阻礙細胞週期 G1/S 期間的轉換.....	27
3.2 CTEN 參與 Δ Np63 α 所調控之細胞貼附.....	29
3.3 CTEN 缺失對 EMT 相關生物標記分子的影響.....	31
3.4 CTEN 缺失抑制細胞遷徙能力與 RhoA 活性.....	32
第四章 CTEN 於前列腺腺泡生成過程中扮演的角色.....	34
4.1 CTEN 高度表現於基底型前列腺上皮細胞.....	34
4.2 CTEN 缺失對前列腺上皮細胞分化的影響.....	35
4.3 過度表現 CTEN 破壞前列腺腺泡生成.....	36
第五章 過度表現 CTEN 對前列腺癌細胞株的影響.....	39
第六章 討論.....	40
參考文獻.....	45
圖與表.....	60
附錄.....	88

圖目錄



圖 1、觀察 CTEN 缺失對前列腺上皮細胞增生能力的影響.....	60
圖 2、CTEN 缺失對前列腺上皮細胞的細胞週期之影響.....	62
圖 3、CTEN 缺失對細胞週期相關調控因子的影響.....	63
圖 4、比較前列腺上皮細胞中 p63 和 CTEN 的基因表現情形.....	64
圖 5、以 ChIP-PCR 分析 Δ Np63 於 CTEN 基因座的結合情形.....	65
圖 6、缺乏 p63 和 CTEN 影響 RWPE-1 貼附於胞外基質 fibronectin 的能力	66
圖 7、CTEN 缺失影響細胞對胞外基質 collagen I 的貼附能力	67
圖 8、CTEN 缺失對 EMT 相關生物指標的影響	68
圖 9、CTEN 缺失對 RWPE-1 移動能力的影響.....	69
圖 10、CTEN 缺失對 RhoA 活化的影響	70
圖 11、以 siRNA 抑制 CTEN 基因表現，觀察對 RWPE-1 腺泡形成的影響...	71
圖 12、於 3D 培養系統下 RWPE-1 的 CTEN 含量變化.....	72
圖 13、比較基底型與管腔型前列腺上皮細胞間 CTEN 基因表現狀況	72
圖 14、CTEN 缺失對分化指標基因表現的影響.....	73
圖 15、比較 aON-EGFP 和 aON-CTEN 於 3D 培養環境下生長狀況與分化情形	74
圖 16、觀察 CTEN 對腺泡生成與細胞分化的影響.....	76
圖 17、於 3D 培養環境下，觀察 CTEN 對 FAK 磷酸化程度的影響	77
圖 18、CTEN 對前列腺癌細胞株 DU-145 增生能力的影響.....	78
圖 19、CTEN 過表現對前列腺癌細胞株 DU-145 移動能力的影響.....	80

表目錄

表 1、引子列表	81
表 2、抗體列表	83
表 3、siRNA 序列	86
表 4、以 ChIP-Seq 分析 p63 於 <i>CTEN</i> 基因座的結合位置之相關研究資料.....	87



縮寫表



縮寫	全名
ABD	actin-binding domain
AR	androgen receptor
BPE	bovine pituitary extract
BSA	bovine serum albumin
CDK 4/6	cyclin-dependent kinase 4/6
CDKI	cyclin-dependent kinase inhibitor
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
ChIP-Seq	chromatin immunoprecipitation-sequencing
CK18	keratin 18
CK5	keratin 5
CK8	keratin 8
Ct	threshold cycle
CTEN	C-terminal tensin-like
DLC-1	deleted in liver cancer-1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
dNTP	deoxy-ribonucleoside triphosphate
dox	doxycycline
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ERK	extracellular signal-regulated kinase



FAB	focal adhesion binding
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
GDP	guanosine diphosphate
GEO	Gene Expression Omnibus
GTP	guanosine-5'-triphosphate
hrEGF	human recombinant epidermal growth factor
IL-6	interleukin-6
ILK	integrin-linked kinase
IP	immunoprecipitation
kDa	kilodalton
KSFM	keratinocyte-serum free medium
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MET	mesenchymal-epithelial transition
MNase	micrococcal nuclease
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF- κ B	nuclear factor kappa B
PARP	poly (ADP ribose) polymerase
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PI	propidium iodide
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PSCA	prostate stem cell antigen
PTB	phosphotyrosine-binding

PTEN	phosphatase and tensin homolog
PVDF	polyvinylidene fluoride
Rb	retinoblastoma protein
RhoGAP	Rho GTPase activating protein
Rhotekin-RBD	Rhotekin-Rho binding domain
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
SH2	Src homology 2
siRNA	small interfering RNA





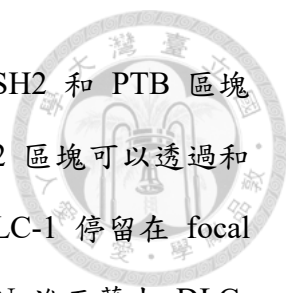
第一章 研究背景

1.1 C-terminal tensin-like (CTEN) 蛋白質

1.1.1 蛋白質結構與功能性區塊

C-terminal tensin like protein 簡稱 CTEN，又名為 tensin4 或 TNS4，為位於 focal adhesion 的 tensin 蛋白質家族成員之一，最初由 Lo 等人 (2002) 藉由搜尋 cDNA 資料庫，比對出與 *tensin1* 和 *tensin2* 相似的 cDNA 序列，並透過 rapid amplification of cDNA ends 分析技術，取得完整 *CTEN* 轉譯區段 (open reading frame) 的 cDNA 序列，該序列可轉譯出 715 個胺基酸，約 76.9 kD 的 CTEN 蛋白質 (Lo *et al.*, 2002)，是 tensin 家族成員中分子量最小的蛋白質，CTEN 蛋白質和 *tensin1*、*tensin2* 與 *tensin3* 一樣在 C 端具有相鄰的 Src homology 2 (SH2) domain 和 phosphotyrosine-binding (PTB) domain，且其胺基酸序列與其他 tensins 具有 45% 以上的相似性，因而被歸類為 tensin 家族的一員，然而 CTEN 卻不似其他 tensin 家族在 N 端具有 actin binding domain，因而命名為 C-terminal tensin-like (附圖 1)。

雖然 SH2 和 PTB 區塊序列在 tensin 家族成員間保有高度相似性，然而 SH2-PTB 區塊的等電點 (isoelectric point; pI) 卻不盡相同，CTEN 該片段的等電點為 6.7，然而 *tensin1*、*tensin2*、*tensin3* 的等電點則大約為 9，推測此差異使 CTEN 在與其他蛋白質的交互作用網絡中，展現有別於其他 tensin 家族成員的結合特性 (Haynie, 2014)，SH2 和 PTB 區塊普遍被認為可以和磷酸化酪胺酸 (phospho-tyrosine) 結合，CTEN 可能透過 SH2-PTB 區塊與 GSTCD、NME4、P4HA2、PIK3R1 和 RPAIN 之間存在著依賴磷酸化酪胺酸的交互作用 (Grossmann *et al.*, 2015)，在 Src 誘發之磷酸化訊息傳導路徑下，可以觀察到 CTEN 的 SH2 區塊與 p130^{Cas} 的結合 (Machida *et al.*, 2007)，另外，CTEN 的 SH2 區塊也可以結合 Y774 磷酸化的 c-Cbl，從而減少表皮生長因子受體 (epidermal growth



factor receptor; EGFR) 的泛素化修飾 (Hong *et al.*, 2013)。然而，SH2 和 PTB 區塊也擁有非依賴磷酸化酪胺酸的交互作用，例如：CTEN 的 SH2 區塊可以透過和 deleted in liver cancer 1 (DLC-1) ⁴⁴⁰SIYDNV 序列結合，促使 DLC-1 停留在 focal adhesions，而此交互作用毋需依賴 DLC-1 Y442 的磷酸化，CTEN 進而藉由 DLC-1 抑制乳癌細胞生長 (Liao *et al.*, 2007)；而 CTEN 的 PTB 區塊則可以結合 integrin $\beta 1$ 的 NPXY 序列 (Katz *et al.*, 2007)。CTEN 胺基酸序列中能與其他蛋白質有交互作用的區域還包含 N 端 168-324 胺基酸片段，此區域含有高度絲胺酸 (serine-rich)，先前研究指出 CTEN 可能藉由此區塊與 14-3-3 σ 結合 (Benzinger *et al.*, 2005)，p130^{Cas} 中的 serine-rich 區塊已被證實可以形成 four-helix bundle，在絲氨酸磷酸化條件下與 14-3-3 ζ 結合 (Briknarova *et al.*, 2005)，但有關 CTEN serine-rich 區塊的構形與功能則還有待進一步探討。


CTEN 透過 PTB 區塊與 integrin 結合並參與位於 focal adhesion 的訊息網絡，focal adhesion 在細胞內、靠近細胞膜的位置，該處集結多種蛋白質，形成以 integrin 為媒介的訊息網絡平臺，影響細胞貼附等多種細胞行為 (Geiger *et al.*, 2001; Horton *et al.*, 2015; Wehrle-Haller, 2012; Wozniak *et al.*, 2004)。在前列腺上皮細胞中，CTEN 主要集中在細胞質，特別是在 focal adhesion 的位置 (Lo *et al.*, 2002)，然而在大腸癌細胞中，CTEN 明顯累積在細胞核 (Liao *et al.*, 2009)，目前已知在 CTEN 的 N 端具有核輸出序列 (nuclear export signal; NES)，剔除該片段可以提升 CTEN 在細胞核中的累積，顯示該 NES 為影響 CTEN 在細胞核、細胞質間分布的重要因子 (李昌恆，2014)。我們最近的研究也發現了細胞核中的 CTEN 透過 C 端的 SH2-PTB 片段，與 NF- κ B 訊息路徑中的 co-activator α -actinin4 有交互作用 (李昌恆，2014；邱品慈，2016)，而且可能直接或間接與 DNA 結合 (莊惟，2015；王乙暄，2017)，其所參與的訊息傳導路徑與功能都正在研究中。



1.1.2 基因表現

CTEN 除了蛋白質結構與其他 *tensin* 家族成員有明顯差異，基因表現圖譜也有別於其他 *tensin* 家族成員，從演化上而言，*tensin1* 在哺乳動物、鳥類乃至於斑馬魚都存在同源基因 (homologous gene)，然而 *CTEN* 同源基因則限縮在哺乳動物，並且以 *CTEN* 基因序列所建立的系統演化樹大致與分類學上的演化關係吻合 (Chen *et al.*, 2013)；就人類器官中的基因表現狀況而言，*tensin* 家族大部分的成員廣泛表現於許多器官當中，然而 *CTEN* 僅於少部分的器官有較高的基因表達，包括前列腺和胎盤 (Chen *et al.*, 2013; Lo *et al.*, 2002)，進一步以冷光報導基因系統分析 *CTEN* 基因的啟動子的活性，發現轉染於前列腺細胞株的啟動子活性明顯高於其他的細胞株，並找出轉錄起始點上游 290 bp 至下游 37 bp 之間的 *CTEN* 基因啟動子片段，為具有調控組織專一性表現的最小片段 (Chen *et al.*, 2013)。特別是本研究室先前針對前列腺當中三種不同型態初代細胞的 *CTEN* 含量進行分析，結果顯示 *CTEN* 明顯存在前列腺上皮細胞，於間質細胞 (stroma cell) 以及平滑肌細胞 (smooth muscle cell) 則無法以 western blotting 方法偵測到 *CTEN* 的存在 (附圖 2)，表示 *CTEN* 基因表達存在細胞特異性。


在前列腺上皮細胞和大腸癌細胞中，*CTEN* 可以受到許多生長因子以及細胞激素正向調控 (Hung *et al.*, 2013)，在子宮頸癌細胞株 HeLa 和乳腺上皮細胞株 MCF10A 當中，*CTEN* 也可以在細胞受到表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF) 的刺激後而提高表現量 (Katz *et al.*, 2007)，我們後續以 HeLa 進行實驗發現，EGF 可以促使組蛋白乙醯轉化酶 (histone acetyltransferase) p300 磷酸化程度提升，從而促進 p300 結合到 *CTEN* 基因啟動子，提升 *CTEN* 基因啟動子上組蛋白質的乙醯化修飾，因而活化 *CTEN* 基因表現 (張佳鈞，2013；劉益洲，2015；林芷萱，2017)。事實上，許多癌症組織中，生長因子或細胞激素所引發的下游訊息傳導路徑往往是被異常活化的，這似乎也反應出 *CTEN* 和癌症間的關係，*CTEN* 在許多癌症組織中是受到正向調控，包括肺癌、乳癌、大腸癌、胰臟癌和胃癌，*CTEN* 含



量或基因表達情形也往往與癌症惡化程度呈現正相關，並進一步促進細胞移動和侵襲能力 (Lo, 2014)，CTEN 作為癌症治療標的或檢測標記分子具有很大的潛力。然而，在前列腺癌當中，CTEN 的基因表現則是受到負向調控 (Chen *et al.*, 2013; Lo *et al.*, 2002)，隨著 Gleason score 愈高、CTEN 含量越低，並且提升 CTEN 基因表現可以促使前列腺癌細胞株 PC-3 和 DU-145 對化療藥物紫杉醇 paclitaxel 的感受性提升 (Li *et al.*, 2010)，推測在前列腺癌發展過程中，CTEN 可能展現有別於其他癌症中所扮演的角色。

1.1.3 生物功能

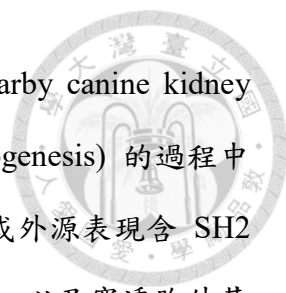
Tensin 家族成員主要調節細胞骨架重組，參與細胞附著與遷移，tensin1、tensin2 與 tensin3 廣泛表現於大部分的器官中，它們的功能已藉由基因剔除或突變小鼠做進一步的分析，tensin1 主要與腎臟與骨骼肌的發育有關 (Ishii *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 1997)，tensin2 也被發現會影響腎臟功能 (Cho *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2008, 2009, 2011, 2014)，而 tensin3 則會影響肺、小腸以及骨骼的發育 (Chiang *et al.*, 2005)。雖然目前尚未建立 CTEN 基因剔除或突變的小鼠，然而已有研究指出在多種癌症組織中，CTEN 的基因表現受到正向調控，以 small interfering RNA (siRNA) 抑制 CTEN 則會降低多種癌細胞株的增生能力，包括大腸癌、肺癌、卵巢癌和胃癌細胞株 (Aratani *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2009; Muharram *et al.*, 2014)。同時，CTEN 可以提升受體酪胺酸激酶 (receptor tyrosine kinase; RTK) 的穩定度，包括 EGFR 和 MET，維持受體酪胺酸激酶下游的訊息傳導路徑的活化，進而提升癌細胞的增生能力 (Hong *et al.*, 2013; Muharram *et al.*, 2014)。CTEN 缺失的狀況下也會導致胃癌細胞中 cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) p21 的累積，進而阻礙細胞週期的運轉 (Aratani *et al.*, 2017)；在人類皮膚角質細胞中，抑制 CTEN 也會降低 focal adhesion kinase (FAK) 和 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 的活化，進而降低 cyclin-D1 的含量，導致細胞增生能力下降 (Seo *et al.*, 2016)。總體而言，CTEN 在多種型態的細胞中扮演促進細胞增生的角色。另一方面，以



staurosporine 誘導前列腺上皮細胞發生細胞凋亡 (apoptosis)，CTEN 在細胞凋亡的過程中會受到活化態 caspase-3 的截切產生 CTEN 571-715 片段，將此片段過度表現在乳癌細胞 MDA-MB-468 則會抑制細胞增生 (Lo *et al.*, 2005)，然而，以 staurosporine 誘導大腸癌細胞株發生凋亡的情況下，過度表現 CTEN 於大腸癌細胞株中卻會提升細胞的存活率 (Albasri *et al.*, 2009)，顯示 CTEN 在不同細胞分子環境中對細胞增生與存活的調控具有多元面向。

許多生長因子與細胞激素被指出可以透過提升 CTEN 蛋白質含量進而促進細胞移動 (Hung *et al.*, 2013)，在乳腺上皮細胞 MCF10A 中，EGF 和 interleukin 6 (IL-6) 可以誘導 CTEN 表現並促進細胞遷徙 (Barbieri *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2012; Katz *et al.*, 2007)，其中在 EGF 誘導的情形下，CTEN 表現量上升同時伴隨 *tensin3* 的表現量下降 (Katz *et al.*, 2007)，CTEN 可取代 *tensin3* 與 DLC-1 結合，並抑制 DLC-1 的 Rho GTPase activating protein (RhoGAP) 功能，進而維持 RhoA 活化態 (RhoA-GTP)，提升細胞的遷徙能力 (Cao *et al.*, 2012)。在大腸癌細胞株中，外源表現 CTEN 則會提升 integrin-linked kinase (ILK) 和 snail，藉此提高細胞的遷徙能力 (Albasri *et al.*, 2011; Thorpe *et al.*, 2017)，另一方面會抑制 E-cadherin (Albasri *et al.*, 2009)，snail 增加與 E-cadherin 的減少皆為 epithelial-mesenchymal transition (EMT) 的重要指標，在肺癌細胞株中，CTEN 可以藉由活化 transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) 訊息傳導路徑促使 EMT 的發生 (Lu *et al.*, 2018)，而 EMT 為器官發展和癌細胞轉移過程中常見的細胞特性轉換，提升 CTEN 基因表現會增加大腸癌細胞與乳癌細胞穿透胞外基質的能力 (Albasri *et al.*, 2009; Barbieri *et al.*, 2010; Thorpe *et al.*, 2017)，抑制 CTEN 也會降低胃癌細胞的移動與遷徙能力 (Aratani *et al.*, 2017)，以大腸癌病患的腫瘤組織進行組織免疫染色分析 (immunohistochemistry)，高 CTEN 含量的癌組織與腫瘤遠端轉移發生呈現高度相關 (Albasri *et al.*, 2011)，因此 CTEN 在多數癌細胞中除了促進細胞遷徙，還能提高細胞的侵襲能力並有助於癌症組織轉移。


CTEN 參與多種細胞行為的展現，包括增生和遷徙等，而組織、器官的形成即



為多種細胞行為統合後的體現，將犬腎臟上皮細胞 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 培養於 collagen 膠體上，在細胞形成管狀構造 (tubulogenesis) 的過程中發現 *CTEN* 基因受到高度正向調控，而抑制 *CTEN* 基因表現或外源表現含 SH2 功能缺失的 *CTEN*，則會抑制管狀構造形成過程中細胞的延展，以及穿透胞外基質層的能力 (Kwon *et al.*, 2011)，顯示 *CTEN* 對於腎臟上皮組織的形成亦扮演重要角色。


1.2 前列腺上皮組織生成與癌化

前列腺 (又稱為攝護腺, prostate) 為雄性哺乳動物的生殖器官之一，位於膀胱下方、環繞於尿道上端的外泌腺體，前列腺器官發展源自於尿殖竇 (urogenital sinus)，經過雌雄異形 (sexual dimorphism)、前列腺組織分芽 (prostate budding)、分支發育 (branching morphogenesis) 等階段，最終上皮細胞分化成具外泌功能的腺體組織 (epithelial differentiation)，過程中主要透過相關轉錄因子、雄性賀爾蒙以及上皮組織和間質組織間多種生長因子的交互作用而逐步發展為成熟的前列腺器官 (Toivanen *et al.*, 2017)。其中 *p63* 為影響前列腺發展的重要轉錄因子之一，*p63* 屬於 *p53* 家族的一員，具有多種異構體 (isoform)，透過不同啟動子而轉錄出具有 transactivation (TA) 區塊的 *TAp63* 以及缺乏 TA 區塊的 $\Delta Np63$ 兩種 pre-mRNA，進一步透過於 3' 端的 alternative splicing，兩種 *p63* pre-mRNA 進而再衍生出 α 、 β 、 γ 三種異構體，在小鼠前列腺中，主要的 *p63* 異構體為 $\Delta Np63\alpha$ ，且僅存在上皮組織的基底細胞 (basal cell) 中，而剔除 *p63* 基因則小鼠無法發展出完整的前列腺 (Signoretti *et al.*, 2000)，此外，將 *p63* 基因剔除小鼠胚胎的尿殖竇移植培養於腎臟 (renal grafting)，其發展出的類前列腺組織則包含管腔細胞 (luminal cell)、神經內分泌細胞 (neuroendocrine cell) 和非典型黏液細胞，但缺乏基底細胞 (Kurita *et al.*, 2004; Signoretti *et al.*, 2005)，顯示 $\Delta Np63\alpha$ 對於前列腺上皮組織發展極為重要，尤其是對基底細胞的維持。



前列腺由多種型態的細胞組成，包括纖維母細胞 (fibroblast)、平滑肌細胞 (smooth muscle cell)、內皮細胞 (endothelial cell)、神經細胞 (neuron) 和上皮細胞 (epithelial cell)，其中上皮細胞隨著組織細胞分化、成熟亦可再分類為多種樣態，包含基底細胞 (basal cell)、中間細胞 (intermediate cell)、管腔細胞 (luminal cell) 以及神經內分泌細胞 (neuroendocrine cell)，前列腺上皮組織主要由基底細胞和管腔細胞組成，在腺體中靠近管腔的細胞層則主要由柱狀管腔細胞組成，並包含少數中間細胞和神經內分泌細胞，外型較為扁平的基底細胞則環繞於管腔細胞外圍，形成基底細胞層，並與基底膜 (basement membrane) 直接接觸 (附圖 3)。基底細胞層中的前驅細胞可分化為中間細胞，或再進一步分化為分泌型管腔細胞，相應的生物分子指標已經被建立，並應用於鑑別不同型態的上皮細胞，integrin $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$ 、keratin 5 (CK5) 和 $\Delta Np63$ 於基底細胞有較高的含量 (Collins *et al.*, 2001; Lawson *et al.*, 2007; Signoretti *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001)，而管腔細胞中 keratin 8 (CK8)、keratin 18 (CK18) 和雄激素受器 (androgen receptor, AR) 有較高含量 (van Leenders *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2001)，中間細胞則有較高含量的 prostate stem cell antigen (PSCA) (Tran *et al.*, 2002)，並同時具有部分基底細胞與管腔細胞所具有的生物分子指標。

當前列腺組織癌化時，上皮組織構造將發生異變，包含細胞異常增生、管腔空間縮小、基底細胞層和基底膜的破壞以及免疫細胞浸潤 (immune cell infiltration)，雖然大部分的前列腺癌病變屬於發展緩慢的腫瘤型態，然而臺灣男性前列腺癌發生率卻是逐年攀升，在西方國家更是僅次於皮膚癌的高發生率癌症，關於前列腺癌發生的研究是不可輕忽的研究課題之一。前列腺癌大多被檢測於前列腺的周邊區 (peripheral zone) (McNeal *et al.*, 1988)，目前認為誘發癌病變的原因很多，內在因素包含分化相關的訊息傳導路徑失控，或是分化、增生的過程中基因體端粒 (telomere) 獲得維持，藉此除了免除細胞衰老 (cell senescence)，還可提供基因體更多複製、分裂的次數，進而提高基因體發生變異的機率；外在因素則是透過飲食、病原菌或病毒長時間誘導發炎反應和免疫細胞浸潤等，使得微環境中 IL-6 和 NF- κ B 相關發炎反應途徑活化，促使細胞轉型與腫瘤產生 (Packer *et al.*, 2016)。



隨著前列腺癌的發展，癌組織可能發生轉移，過程中往往可以觀察到癌細胞由上皮細胞型態轉型為間質細胞型態，此種型態轉換稱之為 EMT，此現象也發生在胚胎發育、器官生成和修復 (Kalluri *et al.*, 2009)。前列腺癌受到微環境中間質細胞外泌的 TGF- β 、IL-6、FGF 和 Wnt 的刺激而誘發 EMT (Lo *et al.*, 2017)，其中 TGF- β 可以誘發提升 EMT 相關轉錄因子 Snail、Slug、Twist 和 ZEB1 的表現，並透過這些轉錄因子抑制 E-cadherin 的基因表現，而 Snail 則能抑制 Zonula Occludens-1 (ZO-1)，E-cadherin 和 ZO-1 是維持上皮細胞間接合的重要蛋白質，降低細胞間的接合程度以及細胞對胞外基質的貼附能力是 EMT 初始的重要現象，而 Wnt 誘發的訊息路徑則可促進間質細胞標記分子 N-cadherin 和 Vimentin 的表現，此外，EMT 相關分子包含 E-cadherin、Twist 和 ZEB1 則被認為與前列腺癌對化療藥物 paclitaxel 或 docetaxel 的感受性有關 (Hanrahan *et al.*, 2017; Ruan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017)，近期有研究指出 CTEN 能夠增加 Snail 蛋白質於大腸癌細胞株中的穩定度 (Thorpe *et al.*, 2017) 並有助於肺癌細胞 EMT 的發生 (Lu *et al.*, 2018)，在前列腺癌中，目前已知外源表現 CTEN 可以提升前列腺癌細胞株對 paclitaxel 的感受性，關於 CTEN 在前列腺癌發展過程中扮演的角色則仍有待進一步的研究說明。

有關前列腺癌細胞的起源有許多爭議，然而不論癌症是源自於基底細胞或管腔細胞轉型而來 (Goldstein *et al.*, 2010; Lawson *et al.*, 2010; Stoyanova *et al.*, 2013; Strand *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014)，普遍認為在完全發展為癌症組織前，細胞大多會分化為管腔細胞型態，事實上，前列腺上皮細胞透過 Myc、p38MAPK、Notch 和 PI3K/PTEN 等訊息傳導路徑調控組織正常發展，然而，當這些訊息傳導路徑調節發生異常，例如：p38 磷酸化比例提升、Myc 基因過度活化和 PTEN 基因缺失等，則被認為與前列腺癌發展有關 (Frank *et al.*, 2013)，而許多調控前列腺正常組織發展的轉錄調控因子，包括 Nkx3.1、FOXA1 和 AR 也參與前列腺癌的發展 (Bhatia-Gaur *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2005; Mirosevich *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2010)，因此，對於前列腺組織發展有更透徹的洞悉，將有助於更清楚解

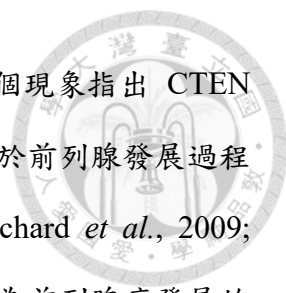
釋前列腺癌的發生。



1.3 研究緣起與目標

細胞的貼附結構包含許多種蛋白質，在此結構中形成以 integrin 為媒介的訊息網絡影響多種細胞行為 (Geiger *et al.*, 2001; Horton *et al.*, 2015; Wehrle-Haller, 2012; Wozniak *et al.*, 2004)，因此，相關訊息傳導路徑的失控會造成許多疾病的產生，探究此處蛋白質成員的功能與訊息網絡成為重要的研究課題。Tensin 家族成員為細胞貼附結構中的重要蛋白質，影響細胞貼附與遷徙，tensin1 和 tensin3 透過 actin binding domain 和 PTB 區塊分別連結細胞骨架 actin filament 和 integrin 以形成張力，促進細胞形成較穩定的貼附結構 fibrillar adhesions，並有助於活化 integrin 相關的訊息傳導路徑 (Georgiadou *et al.*, 2017)，而大部分的 tensin 家族成員都能藉由提升 DLC1 的 Rho GAP 活性進而減低 RhoA 活化態 (Blangy, 2017)，此外，tensin3 能夠提升 DOCK5 GEF 活性，進而提高細胞中 Rac 的活化態 (Touaitahuata *et al.*, 2016)，然而，CTEN 是 tensin 家族中唯一缺乏 actin binding domain 的蛋白質，雖然能結合 DLC1 卻無法促使 DLC1 的 Rho GAP 活化，顯示 CTEN 在細胞貼附結構中的角色可能有別於其他 tensin 家族成員。

CTEN 不似其他 tensin 家族成員廣泛表現於多種人體組織、器官，僅於前列腺等少數器官中有較高度的基因表達，尤其在前列腺中，CTEN 僅存在前列腺上皮細胞，以 real time RT-PCR 分析非惡性前列腺上皮細胞株 RWPE-1 中 tensin 家族的基因表現狀況，CTEN 的 Ct 值小於其他成員 Ct 值至少 5 cycles，表示前列腺上皮細胞中主要的 tensin 成員為 CTEN，然而有關 CTEN 於前列腺上皮組織中的功能尚未釐清。在已發表的文獻中，針對 CTEN 所進行的相關研究與論述大多著墨於癌症課題，儘管許多現象與分子機制仍有待進一步探討，但至今關於 CTEN 的研究成果卻足以顯露 CTEN 在癌症治療標的與檢測開發上的潛力 (Lo, 2014)。有別於 CTEN 在許多癌組織中受到正向調控，前列腺組織中卻幾乎無法偵



測到 CTEN 的存在，相較於在多數癌症中對 CTEN 的認知，這個現象指出 CTEN 在前列腺癌中可能有著截然不同的角色。事實上，有研究指出，於前列腺發展過程中被活化的訊息網絡會在癌症發展過程中再次被利用 (Pritchard *et al.*, 2009; Schaeffer *et al.*, 2008)，與分化相關之訊息傳導路徑的失調則能成為前列腺癌發展的重要利基 (Frank *et al.*, 2013)，因此對於正常組織發展的探討將有助於癌症治療的研究。

本研究藉由多種細胞試驗分析，進而了解 CTEN 於正常前列腺上皮細胞中的功能，同時，透過三維空間培養條件誘導細胞分化與腺泡形成，觀察 CTEN 在過程中扮演的角色。我們使用非惡性前列腺上皮細胞株 RWPE-1 進行研究，RWPE-1 細胞株源自於正常前列腺周邊區的上皮細胞，同時具有基底細胞與管腔細胞 (Bello *et al.*, 1997; Tokar *et al.*, 2005)，培養於三維空間可誘使其細胞分化與腺泡形成 (Bello-DeOcampo *et al.*, 2001; Tyson *et al.*, 2007; Webber *et al.*, 1997)。另一方面，我們藉由外源表現 CTEN 於 CTEN 量低的前列腺癌細胞株 DU-145 進行研究，DU-145 細胞株是源自腦轉移的前列腺癌組織 (Stone *et al.*, 1978)，在老鼠體內可轉移至多種器官 (Bastide *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2007)，為高度惡性的前列腺癌細胞，我們分析 CTEN 對前列腺癌細胞行為的影響，探討 CTEN 與前列腺癌的發生或惡化的關係。



第二章 研究材料與方法

2.1 研究材料

2.1.1 質體與保存菌株

1. 質體

(1) pCMV-FLAG-CTEN (Flag-CTEN) :

由美國加州大學 Davis 分校 Su Hao Lo 教授提供 (Hong *et al.*, 2013)，載體骨架為 pFLAG-CMV-2 (Sigma-Aldrich)，帶有人類 *CTEN* 基因轉譯區段序列 (full length open reading frame)，可表現出 N 端具有 FLAG 標記的 CTEN 蛋白質。

(2) pcDNA3.1- Δ Np63 α -FLAG :

購買自 Addgene (#26979)，載體骨架為 pCDNA3.1-basic，帶有人類 *TP63* 基因 Δ Np63 α 轉譯區段序列，可表現出 C 端具有 FLAG 標記的 Δ Np63 α 蛋白質。

(3) pEGFP-CTEN :

由 Su Hao Lo 教授研究室提供 (Lo *et al.*, 2005)，可表現出 N 端具有 enhanced green fluorescence protein (EGFP) 的 CTEN 蛋白質。

(4) pAS4.1W-Ppuro-aOn :

由臺灣師範大學賴韻如教授提供，具有 tetracycline 可調控之啟動子，另外有人類 *PGK* 基因啟動子，可於哺乳類細胞中穩定驅動啟動子下游 puromycin 抗性基因以及 tetracyclin 活化之轉錄調控因子的表現，運用於誘導表現系統的建立。

(5) pAS4.1W-Ppuro-aOn-EGFP (aON-EGFP) :

藉由 PCR 增殖 pEGFP-CTEN 中的 EGFP 片段 (PCR 引子序列請見表 1)，並以限制酶切位 *NheI* 和 *EcoRV* 將 EGFP 片段轉殖到 tetracycline 可調控之啟動子下游，該質體於哺乳動物細胞株中可經由 tetracyclin 或 doxycycline 誘導表



現 EGFP。

(6) pAS4.1W-Ppuro-aOn-FLAG-CTEN (aON-CTEN) :

藉由 PCR 增殖 pCMV-FLAG-CTEN 中的 FLAG-CTEN 片段 (PCR 引子序列請見表 1)，並以限制酶切位 *NheI* 和 *EcoRV* 將 FLAG-CTEN 片段轉殖到 tetracycline 可調控之啟動子下游，該質體於哺乳動物細胞株中可經由 tetracycline 或 doxycycline 誘導表現 FLAG-CTEN。

(7) pMD.G :

購買自中央研究院 RNAiCore，可表現出 Vesicular Somatitis Virus (VSV) 套膜蛋白，提供病毒顆粒組裝。

(8) pCMVΔR8.91 :

購買自中央研究院 RNAiCore，可表現出 Gag、反轉錄酶 (reverse transcriptase)、Tat 與 Rev 蛋白質，提供病毒顆粒組裝所需。

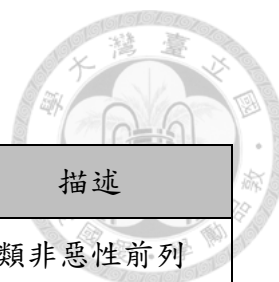
2. 菌株

(1) *Escherichia coli* HIT™-DH5α (RBC bioscience , RH618) :

基因型 F-(80d *lacZ* M15)(*lacZYA-argF*)U169 *hsdR17*(r- m+) *recA1* *endA1* *relA1* *deoR*，用以保存和增殖質體 pCMV-Flag-CTEN、pcDNA3.1-ΔNp63α-Flag 和 pEGFP-CTEN。

(2) *Escherichia coli* SURE (STRATAGENE , #200238) :

基因型 e14(McrA⁻)Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *endA1* *gyrA96* *thi-1* *supE44* *relA1* *lac* *recB* *recJ* *sbcC* *umuC::Tn5* (Kan^r) *uvrC* [F' *proAB* *lacI^fZΔM15* Tn10 (Tet^r)]，具有 Kanamycin 和 tetracycline 抗性，此菌株用以保存和增殖質體 pAS4.1W-Ppuro-aOn、pAS4.1W-Ppuro-aOn-Flag-CTEN、pAS4.1W-Ppuro-aOn-EGFP、pMD.G 和 pCMVΔR8.91。



2.1.2 細胞株與培養條件

名稱	培養條件*	描述
RWPE-1 (ATCC CRL-11609)	Keratinocyte-serum free medium (KSFM) (Gibco®, 17005-042), 含有	人類非惡性前列腺上皮細胞株
PZ-HPV-7 (BCRC 60136)	5 ng/ml human recombinant epidermal growth factor (hrEGF) 和 50 µg/ml	人類非惡性前列腺上皮細胞株
CA-HPV-10 (BCRC 60135)	bovine pituitary extract (BPE), 添加 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Gibco®, 15140122)	人類前列腺癌細胞株
22Rv1 (ATCC CRL-1740)	RPMI 1640 (Gibco®, A10491-01), 添加 10% fetal bovine serum (FBS)	人類前列腺癌細胞株
LNCaP (BCRC 60088)	和 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Gibco®, 15140122)	人類淋巴腺轉移前列腺癌細胞株
DU-145 (ATCC HTB-81)	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco®, 11965084) 添加 10% fetal	人類腦轉移前列腺癌細胞株
PC-3 (ATCC CRL1435)	bovine serum (FBS) 和 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Gibco®,	人類骨轉移前列腺癌細胞株
293T (ATCC CRL3216)	15140122)	人類胚胎腎臟上皮細胞

*: 所有培養環境皆為 37°C、5% CO₂，每 2 - 3 天更換培養基。

2.1.3 抗體

有關本研究所使用之抗體資訊以及施行條件請見表 2。



2.2 研究方法

2.2.1 質體製備

1. 質體純化

使用 Mini Plus™ plasmid DNA extraction system (VIOGENE, GF2002) 純化質體，取得的質體運用於質體建構，或使用 PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen, K210015)，取得的質體運用於動物細胞轉染使用，以上純化方式最終皆將質體流洗於無菌純水中。

2. DNA 接合法 (DNA ligation)

依下表配置 PCR 反應溶液，以 PCR 方式增殖特定基因片段 (PCR 反應條件如下，引子序列請見表 1)，將 PCR 產物以 1.2% 瓊脂膠體電泳進行分離，切下符合片段長度符合預期的膠塊以 Gel/PCRTM DNA isolation system (VIOGENE, GP1002) 進行純化，產物 DNA 先以 Nanodrop 2000 (Thermo) 測定濃度，取適量產物 DNA 以限制酶 NheI-HF 和 EcoRV-HF (NEB) 截切反應 30 分鐘，在以 80°C 加熱 20 分鐘終止限制酶反應，最終取得 insert DNA。

PCR 反應溶液：

5X Phusion Buffer	10 μ l
2.5 mM dNTP	4 μ l
Primer-F (20 μ M)	1.25 μ l
Primer-R (20 μ M)	1.25 μ l
Plasmid	50 ng (x μ l)
Phusion Polymerase (Thermo, F530S)	0.5 μ l
H ₂ O	(33-x) μ l
Total	50 μ l



PCR 反應條件：

	Step	Temp. (°C)	Time (s)	Cycles
1	Initial denature	98	30	1
2	Denature	98	7	29
3	Annealing	68	20	
4	Extension	72	50	
5	Final Extension	72	7 min	1

將質體 pAS4.1W-Ppuro-aOn (作為載體) 以 Nanodrop 2000 測定濃度，使用限制酶 NheI-HF 和 EcoRV-HF (NEB) 截切並反應 30 分鐘，再以 80°C 加熱 20 分鐘終止限制酶反應，然後加入 1 μ l antarctic phosphatase (NEB) 和適量 10x 反應緩衝液，於 37°C 反應 30 分鐘，再以 70°C 加熱 5 分鐘終止限制酶反應，取得載體 DNA。

將載體 DNA 和 insert DNA 以莫爾數 1 : 3 (CTEN insert) 或 1 : 7 (GFP insert) 混合，DNA 總量為 100 ~ 150 ng，加入 1 μ l T4 DNA ligase (NEB) 和 2 μ l 10x T4 DNA ligase buffer，以無菌水調整體積至 20 μ l，於 16°C 反應 16 ~ 18 小時，最後將部分產物進行重組質體之轉型。

3. 重組質體之轉型與篩選

將大腸桿菌勝任細胞 *E. coli* SURE (100 μ l/ tube) 放置於冰上解凍，取一個新的微量離心管並加入 10 μ l DNA ligation 產物，然後加入 100 μ l 解凍之勝任細胞液，靜置於冰上 25 分鐘後，於 42°C 水浴槽中反應 45 秒，再立即靜置於冰上 5 分鐘，然加入 1 ml LB 液態培養液 (1% Bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH7.0) 並置於 37°C 培養箱震盪培養 1 小時。將菌液離心 (4000xg, 5 分鐘) 後移除上清液，加入 200 μ l LB 液態培養基懸浮細胞，然後均勻塗抹再含有 50 μ g/ml ampicillin 的 LB 固態培養基 (1% Bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% Bacto agarose, pH7.0)。將培養皿倒置培養於 37°C 培養箱 14 小時，挑選單顆菌落並培養於 5 ml 含有 100 μ g/ml ampicillin 的 LB 液

態培養液，於 37°C 培養 14 小時。



2.2.2 以 siRNA 進行基因靜默 (gene silencing)

在進行轉染前一天將細胞培養於 6-well 培養盤，使用 Lipofectamine 2000 或 Lipofectamine 3000 (Invitrogen) 將 siRNA (50 pmol) 轉染入細胞中，其餘實驗條件依照廠商建議之操作流程施行。siCTEN-S1 和 siCTEN-S2 (Invitrogen, Stealth RNAi™) 為專一性抑制 *CTEN* 的 siRNA，siCtrl (Sigma-Aldrich) 無專一性抑制任何基因，使用於 knockdown 實驗中的負控制組，siRNA 序列請見表 3。


2.2.3 蛋白質含量分析 (Western blotting)

1. 樣品製備

對於培養於塑膠培養盤的細胞，收取方式利用細胞刮杓或 0.05% trypsin (Gibco™, #25300054)；對於三維空間中培養的細胞，則以 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco™, #25200056) 與細胞在 37°C 反應 10 分鐘，然後添加含有 10% FBS 的 DMEM 終止 trypsin 作用，細胞以 phosphate buffer saline (PBS) 緩衝液清洗一次，離心條件為 400xg、5 分鐘，添加 0.5% (v/v) protease inhibitor cocktail set III (Calbiochem, #539134) 於 cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% TritonX-100)，將離心取得之細胞團塊懸浮於含有蛋白酶抑制劑的 cell lysis buffer，靜置於冰上 10 分鐘，離心 (14000xg, 4°C, 10 分鐘) 後取得細胞粗抽液，取出部分粗抽液進行蛋白質濃度測定 (Bio-Rad, DC™ protein assay, #5000116)，剩餘的加入適量體積 6x SDS 樣品緩衝液 (375 mM Tris, pH6.8, 12% SDS, 12% β-mercaptoethanol, 0.06% bromophenol blue, 30% glycerol)，95°C 反應 10 分鐘後置冰上冷卻，完成蛋白質樣品製備。

2. SDS-PAGE 和 Western blotting

將 10% SDS-polyacrylamide gel 裝置於電泳槽，加入適量電泳緩衝液 (25 mM



Tris, pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS), 取 20 μ g 蛋白質樣品, 以 120 V 進行電泳分析。完成電泳分析後, 取出膠片, 將膠片中的蛋白質轉印到 PVDF 膜 (Merk, IPVH00010) 上, 於轉印緩衝液 (25 mM Tris, pH8.3, 192 mM glycine, 10% methanol) 中以 400 mA 或 60 V 通電 1 小時完成轉印。將轉印完成的 PVDF 膜浸泡於 gelatin-NET (50 mM Tris, pH8.0, 0.25% gelatin, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05% Tween-20) 室溫搖晃反應 1 小時, 之後改以一級抗體反應 (參照表 2), 完成反應後以 TBST (20 mM Tris, pH7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) 清洗膜 3 次、每次 10 分鐘, 再以 gelatin-NET 稀釋之二級抗體於室溫搖晃反應 1 小時, 完成反應再後以 TBST 清洗膜 3 次、每次 10 分鐘, 呈像前以 TBS 潤洗膜 1 次, 再將 ECL 呈色試劑 (Merk, WBKLS0500 或 PerkinElmer, NEL121001EA) 加在 PVDF 膜上, 並以 UVP 影像系統進行分析。

2.2.4 細胞增生能力檢測 (WST-1 assay)

1. RWPE-1

以 Lipofectamine 2000 轉染 siRNA 進入 RWPE-1, 6 小時後將含有轉染試劑的培養基移除, 加入新鮮的培養基後再培養一天, 以 trypsin 將細胞收取下來並稀釋至 4×10^4 cells/ml, 將 100 μ l 稀釋後的細胞液加入 96-well 培養盤 (4000 cells/well), 總共製備 5 盤相同細胞配製的培養盤, 在培養後的 4、24、48、72、96 小時取出一盤培養盤, 移除細胞培養液, 以培養基配製 5% (v/v) WST-1 (Roche, #11644807001), 加入 100 μ l 稀釋後的 WST-1 溶液, 於 37°C 反應 3 小時, 450 nm 吸光值減去 650 nm 吸光值作為細胞增生能力的指標, 於 96-well 培養盤培養二天後, 尚未進行 WST-1 檢測的培養盤需更換培養基。

2. DU-145

細胞先培養於 6-well 培養盤, 並以 doxycycline (dox) 誘導 EGFP 或 CTEN 表現達三天後再進行細胞增生能力檢測, 詳細步驟同 RWPE-1 增生能力檢測方法,

但是進行以下細部調整，細胞稀釋濃度改為 3×10^4 cell/ml，於測試增生能力的時間點直接加入 5 μ l WST-1 試劑反應 30 分鐘。



2.2.5 細胞週期分析

1. 細胞週期同步於 G1 晚期

將 RWPE-1 培養於 6-well 細胞培養盤，隔天以 Lipofectamine 2000 轉染 siRNA 進入 RWPE-1，於轉染過後 6 小時更換新鮮的培養基。再培養 4 小時，加入 100x thymidine (Sigma-Aldrich, T1895, 溶解於 PBS) 溶液使最終濃度為 2 mM 並於細胞生長箱中反應 12 小時，更換新鮮的培養基後再培養 8 小時，然後加入 100x L-mimosine (Sigma-Aldrich, M0253, 溶解於 PBS) 溶液使最終濃度為 400 μ M 並於細胞生長箱中反應 14 小時。

2. 樣品製備與流式細胞儀分析

為了恢復細胞週期運轉，將含有 L-mimosine 的培養基移除並更換新的生長培養基 (此時為時間點 0 小時)，在指定的時間點將細胞以 0.05% trypsin 收取下來，最終懸浮在 70% 冰凍酒精中並儲存在 -20°C 冰箱中隔夜，細胞會重力沉降在離心管底部，請勿擾動，離心 (300xg, 室溫, 5 分鐘) 後移除酒精溶液，以 PBS 清洗殘存的酒精溶液，最後將細胞懸浮於 500 μ l PI/RNasestaining solution (BD Pharmingen, 550825)，避光靜置於室溫 15 分鐘，以 BD FACSCanto II 流式細胞儀偵測每顆細胞中的 propidium iodide (PI) 放射出之螢光強度 (至少分析 10^4 顆細胞)，並藉由 FlowJo 軟體中的 Watson 理論模型分析細胞週期分布狀況。

2.2.6 Real-time RT-PCR

1. RNA 萃取

以 NucleoSpin[®] RNA 試劑套組 (Macherey-Nagel, 740955.50) 進行 RNA 萃取與 DNA 水解，並依廠商建議流程進行操作。



2. 反轉錄

以 NanoDrop2000 超微量分光光度計測定 RNA 濃度，取 1 μg RNA、以 iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, 170-8891) 進行反轉錄，詳細流程依廠商建議進行操作。

3. Real-time PCR

依實驗需求等比例配製 cDNA mix 與 Primer mix (含有 iQTM SYBR[®] Green Supermix, Bio-Rad, 170-8882)，將 5 μl cDNA mix 與 15 μl Primer mix 混合，利用 CFX ConnectTM (Bio-Rad) 進行 PCR 與核酸訊號即時偵測。基因相對表現量以 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 方法計算，並以 18S rRNA 訊號作為歸一化依據。

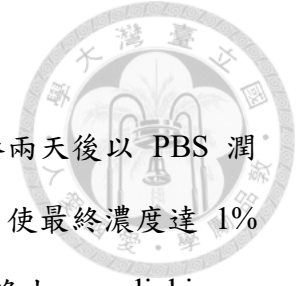
cDNA mix		Primer mix	
cDNA	0.5 μl	SYBR green supermix	10 μl
PCR grade water	4.5 μl	Primer-Forward	0.2 μl
5 $\mu\text{l}/\text{rxn}$		Primer-Reverse	0.2 μl
		PCR grade water	4.6 μl
		15 $\mu\text{l}/\text{rxn}$	

PCR 反應設定如下：

1	95°C, 3 min	
2	95°C, 10 s	39
3	60°C, 30 s	more
4	Plate reads, Go step 2	times
5	Melting Curve	

2.2.7 Chromatin Immunoprecipitation-PCR (ChIP-PCR)

本實驗主要以試劑套組 Pierce Magnetic ChIP Kit (Thermo Scientific, 26157) 進行實驗，流程依廠商建議並略作修改。



1. Crosslinking and Cell Pellet Isolation

將 RWPE-1 細胞以 1:3 繼代培養於 10 cm 培養盤，培養兩天後以 PBS 潤洗一次後加入新鮮培養基，再加入甲醛 (Sigma-Aldrich, F8775) 使最終濃度達 1% 並靜置於室溫反應 10 分鐘，後續步驟依廠商建議以 glycine 終止 crosslinking、冷藏的 PBS 潤洗細胞再將細胞以細胞刮杓收集在 1 ml PBS (含有 protease inhibitor 和 phosphatase inhibitor)。

2. Lysis and Micrococcal Nuclease (MNase) Digestion

上述細胞液離心 (3000xg, 4°C, 5 分鐘) 後取得細胞團塊，以 400 μ l membrane extraction buffer (含有 protease inhibitor 和 phosphatase inhibitor) 充分懸浮細胞團塊，劇烈震盪 15 秒後置冰上 10 分鐘，離心、移除上清液後加入 400 μ l MNase digestion buffer working solution 懸浮細胞核，加入 6 μ l 稀釋過的 MNase (以 MNase digestion buffer 稀釋至 10% [v/v]) 震盪混勻，於 37°C 反應 15 分鐘，期間每 5 分鐘翻轉混勻一次，之後加入 40 μ l MNase stop solution、混勻後置冰上 5 分鐘，離心 (9000xg, 5 分鐘) 後去除上清液，加入 200 μ l IP dilution buffer (含有 protease inhibitor 和 phosphatase inhibitor)，於溶液置於冰上使用超音波均質機 (Hielscher, UP200ST) 打破細胞膜，模式設定為 10 watts、ON time 20 秒、OFF time 40 秒，進行三個循環，離心 (9000xg, 5 分鐘) 取上清液。

3. Immunoprecipitation (IP)、IP Elution、DNA recovery

取 10 μ l 上清液作為 input 樣品，另取 90 μ l 上清液與 410 μ l IP dilution buffer 混合，加入適量 anti- Δ Np63 antibody 或 rabbit IgG (表 2) 之後於 4°C 翻轉反應隔夜，後續步驟包含 IP elution 及 DNA recovery 依廠商建議流程完成，最終取得 50 μ l DNA 產物 (input、rabbit IgG-IP 和 Δ Np63-IP) 進行 real-time PCR 分析。



PCR 樣品製備

cDNA mix		Primer mix	
DNA	1.5 μ l	SYBR green supermix	10 μ l
PCR grade water	3.5 μ l	Primer-Forward	0.2 μ l
5 μ l/rxn		Primer-Reverse	0.2 μ l
		PCR grade water	4.6 μ l
		15 μ l/rxn	

PCR 反應設定如下：

1	95°C, 10 min	
2	95°C, 20 s	39 more times
3	55°C, 30 s	
4	72°C, 30 s	
5	Plate reads, Go step 2	
6	Melting Curve	

2.2.8 細胞貼附能力檢測

1. Fibronectin

將細胞培養於 6-well 培養盤，以 Lipofectamine2000 將 100 pmol siRNA 和 1 μ g 質體 DNA 轉染入細胞，轉染後 4 小時更換新的培養基，培養兩天後進行貼附能力檢測。

將 100 μ l fibronectin 溶液 (Millipore, FC010, 以 PBS 稀釋至 20 μ g/ml) 加入 96-well 培養盤並於 37°C 靜置 1 小時，移除溶液後加入 150 μ l BSA 溶液 (Bionovas, AA0530-0100, 以 PBS 稀釋至 5% [w/v]) 並於 37°C 靜置 1 小時，之後以 150 μ l PBS 潤洗培養盤兩次，加入 100 μ l 細胞液 (2×10^5 cells/ml) 後將培養盤靜置於 37°C 培養箱 1.5 小時，以 PBS 潤洗 2-3 次移除未緊密貼附的細胞，加入 50 μ l 以 PBS 稀釋的 3.7% 甲醛 (Sigma-Aldrich, F8775) 並靜置 10 分鐘，移除甲醛後加入 50 μ l crystal violet 染劑 (0.1% crystal violet, 20% methanol) 並靜置 20 分鐘，以 Q 水潤洗、移除多於染劑，加入 50 μ l 的 0.5% Triton X-100 並

靜置 10 分鐘以溶出細胞內的染劑，測定 595 nm 吸光值作為細胞貼附能力指標。

2. Collagen I

將 100 μ l collagen I 溶液 (Corning, 354236, 以 PBS 稀釋至 50 μ g/ml) 加入 96-well 培養盤並於 4°C 靜置隔夜，移除溶液後加入 100 μ l BSA 溶液 (Bionovas, AA0530-0100, 以 PBS 稀釋至 1% [w/v]) 並於 37°C 靜置 30 分鐘，之後以 100 μ l PBS 潤洗培養盤兩次，加入 100 μ l 細胞液 (4×10^5 cells/ml) 後將培養盤靜置於 37°C 培養箱隔夜，以 PBS 潤洗 1 次並加入 50 μ l 以 PBS 稀釋至 0.025% 的 trypsin-EDTA 溶液，於 37°C 反應 4 分鐘，加入 100 μ l 含有 2% FBS 的 PBS 抑制 trypsin 活性，移除溶液並以 PBS 潤洗 1 次，參考上述之 fibronectin adhesion assay 進行細胞固定、染色與 A₅₉₅ 吸光值檢測。

2.2.9 細胞核細胞質分離

細胞培養於 6-well 培養盤，每個實驗組使用 6-well 培養盤的兩個孔洞進行培養，以 PBS 潤洗細胞後，加入 70 μ l hypotonic buffer A (10 mM HEPES, pH7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% protease inhibitor cocktail, DTT 和 protease 使用前稀釋) 並使用細胞刮杓將細胞收取下來，大約可收集到 150 μ l 的細胞懸浮液，將細胞懸浮液靜置於冰上 15 分鐘，加入 14 μ l 的 5% NP40 (使其最終濃度為 0.47%) 並短暫震盪混合 2 次，離心 (400xg, 4°C, 6 分鐘) 後上清液即為細胞粗抽液的細胞質部分，沉澱則以 1 ml hypotonic buffer A 懸浮，離心後 (400xg, 4°C, 5 分鐘) 去除上清，再以 1 ml hypotonic buffer A 懸浮 (不沖散沉澱)，離心後 (400xg, 4°C, 5 分鐘) 去除上清，加入 75 μ l cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% protease inhibitor, protease 使用前稀釋) 劇烈震盪並充分懸浮，離心後 (14000xg, 4°C, 10 分鐘) 保留上清液，上清液即為細胞粗抽液的細胞核部分。



2.2.10 細胞移動能力檢測

1. FBS 誘導

將 RWPE-1 培養於 6-well 細胞培養盤，使用 lipofectamine 2000 將 siRNA 轉染入細胞，於轉染後 48 小時將細胞收取下來，並以培養基稀釋至 4×10^5 cells/ml，將 800 μ l 含有 0.5% FBS 的培養基加入 24-well 培養盤，以 PBS 和 培養基先後潤洗 Falcon[®] cell culture insert (Corning, 353097)，然後於 Falcon[®] cell culture insert 加入 250 μ l 稀釋後的細胞液，將細胞連同 Falcon[®] cell culture insert 放入加有培養基 (含有 0.5% FBS) 的培養盤孔洞中，然後放置培養盤於細胞培養箱中，培養 24 小時後對細胞進行染色與固定，移除培養基並於 cell culture insert 和 培養盤加入染劑 (0.5% crystal violet, 20% methanol)，在室溫下靜置反應 20 分鐘，移除染劑並以 ddH₂O 清洗多餘染劑，以棉花棒擦拭 cell culture insert 薄膜內側的細胞，再以顯微鏡觀察，隨機選取三個不重疊視野並計算細胞數。

有關 DU-145 (aON-EGFP 和 aON-CTEN) 的移動能力檢測，細胞先以 doxycycline 處理，誘導 3 天後將細胞懸浮於 DMEM (無 FBS) 並稀釋至 3×10^5 cells/ml，加入 24-well 培養盤的培養基為含有 10% FBS 的 DMEM，後續靜置培養時間縮短為 10 小時，其餘步驟請參考上述檢測 RWPE-1 的方式。

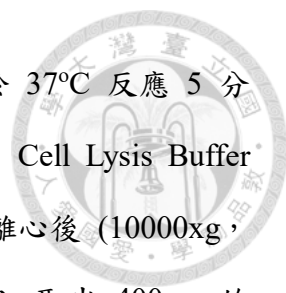
2. EGF 誘導

操作步驟與 FBS 作為誘導物的操作方式類似，只是懸浮細胞的溶液改為不含 hrEGF 的培養基，而加入 24-well 培養盤則改為含有指定濃度 hrEGF (K-SFM 培養基套組中的 hrEGF) 的培養基。

2.2.11 RhoA 活性檢測

1. 細胞粗抽液的製備

將 RWPE-1 培養於 10-cm 細胞培養盤，隔天以 Lipofectamine 2000 轉染 siRNA 進入 RWPE-1，於轉染過後 24 小時將培養基更換為 K-SFM (不含 hrEGF



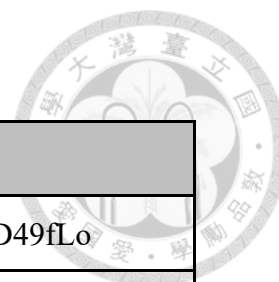
和 BPE)、再培養 24 小時，加入 FBS (最終濃度 10% FBS) 並於 37°C 反應 5 分鐘，以預先冷藏的 PBS 清洗細胞，再加入 300 μ l 冷藏之 Cell Lysis Buffer (Cytoskeleton, Part # CLB01) 於細胞上並以細胞刮杓收取細胞，離心後 (10000xg, 4°C, 1 分鐘) 取出上清液作為細胞粗抽液，進行蛋白質濃度測定，取出 400 μ g 的總蛋白質並以 Rho Activation Assay Biochem Kit (Cytoskeleton, BK036) 進行活化態 RhoA 的 pull down assay。

2. Pull down assay

將 50 μ g Rhotekin-RBD protein beads 加入含有 400 μ g 總蛋白質的細胞粗抽液，並以冷藏之 cell lysis buffer 將反應體積調整至 750 μ l，於 4°C 中翻轉反應 1 小時，離心後 (4000xg, 4°C, 1 分鐘) 移除大部分的上清液，加入 500 μ l wash buffer 清洗 Rhotekin-RBD protein beads，再次離心後 (4000xg, 4°C, 3 分鐘) 移除上清液，加入 15 μ l SDS 樣品緩衝液充分懸浮 Rhotekin-RBD protein beads，另外取部分細胞粗抽液加入適量 6x SDS 樣品緩衝液，然後一併於 95°C 反應 10 分鐘，後續以 SDS-PAGE 和 western blotting 分析 RhoA 含量，並 UVP 影像系統影像系統進行色帶影像強度定量，Pull down assay 的 RhoA 色帶強度除以細胞粗抽液的 RhoA 色帶強度作為 RhoA 活化狀態的指標。

2.2.12 生物資訊分析

本論文分析的三組基因表現資料下載自 Gene Expression Omnibus (GEO)，包含所引編號 GSE89050、GSE86904 和 GSE82071，我們僅擷取良性前列腺組織中基底細胞與管腔細胞的基因表現數據進行分析，原始數據先於網路平台 NetworkAnalyst (<http://www.networkanalyst.ca/faces/home.xhtml>) 中進行 quantile normalization，再將 CTEN 訊號以點狀圖表示。



基底細胞與管腔細胞的分群標準如下：

編號	基底細胞	管腔細胞
GSE89050	CD45-EpCAM+CD49fHi	CD45-EpCAM+CD49fLo
GSE86904	EpCAM+CD44-CD49fHi	EpCAM+CD44+CD49fLo
GSE82071	Trop2+CD49fHi	Trop2+CD49fLo

2.2.13 慢病毒顆粒製備與穩定細胞株篩選


將 293T 細胞培養於 6-well 培養盤，以 Lipofectamine3000 將 0.25 μg pMD.G、1 μg pCMV Δ R8.91 和 1.25 μg aON-EGFP 質體 (或 aON-CTEN 質體) 轉染入細胞 (第 0 天)，培養一天後更換培養基，收取第 2、3 天的培養基，離心後收取大部分的上清液，以 0.22 μm 孔徑濾膜過濾上清液後作為病毒顆粒溶液，保存於 -80°C 。

將細胞培養於 10-cm 培養盤，加入病毒顆粒溶液，培養兩天後將培養基更換為含有 puromycin 的培養基 (DU145: 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; RWPE-1: 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，每 2 天更換培養基，篩選 4 天後將 puromycin 降低至 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，此後培養細胞或進行實驗時皆以含有 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin 的培養基進行。

2.2.14 三維空間細胞培養 (腺泡生成)

實驗方法參考先前研究論文 (Debnath *et al.*, 2003; Tyson *et al.*, 2007) 並略作修改。

將預先冷藏的細胞培養盤置於冰上，加入 matrigel (Corning, 356231) 溶液並以 pipette tip 將 matrigel 均勻塗佈於底部 (8-well chamber slide: 50 μl ; 24-well culture plate: 100 μl)，然後放置培養盤於細胞培養箱中使 matrigel 凝固，等待期間將細胞懸浮於培養基 (5 ng/ml hrEGF, 2% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin, 2% matrigel, 配製於 KSFM)，並稀釋至適當濃度 (8-well chamber slide: 5×10^4 cells/ml;



24-well culture plate: 10^4 cells/ml), 取出含有 matrigel 膠體塗層的培養盤並加入適量細胞液 (8-well chamber slide : 400 μ l ; 24-well culture plate: 800 μ l), 腺泡生成過程中每兩天更換一次培養基, 具有 puromycin 抗性的細胞株則於培養基加入 0.25 μ g/ml puromycin。

2.2.15 免疫螢光染色

將細胞於 8-well chamber slide 進行三維空間細胞培養。

移除培養基後加入 500 μ l 的 2% 甲醛溶液 (Sigma-Aldrich, F8775, 使用前以 PBS 稀釋), 室溫靜置 20 分鐘後小心移除甲醛溶液, 加入 500 μ l 的 0.5% Triton X-100 (Usb, 22686, 以 PBS 稀釋) 並於 4°C 反應 10 分鐘, 然後 100 mM glycine (Omics Bio, BT5031, 以 PBS 稀釋) 潤洗細胞 3 次, 加入 400 μ l IF/BSA blocking buffer (1% BSA, 0.3% Triton X-100, 以 PBS 配製) 於室溫反應 30 分鐘, 再更換為含有 20 μ g/ml goat anti-mouse F(ab')₂ (Jackson, 115-006-006) 的 IF/BSA blocking buffer 於室溫反應 30 分鐘, 移除 blocking buffer 後加入 250 μ l 以 IF/BSA blocking buffer 稀釋的一級抗體溶液於室溫反應隔夜, 以 IF/BSA blocking buffer 潤洗三次後加入 250 μ l 以 IF/BSA blocking buffer 稀釋的二級抗體溶液於室溫反應 1 小時, 再以 IF/BSA blocking buffer 潤洗三次, 為了針對核酸進行染色, 加入 200 μ l Hoechst33342 (2 μ g/ml in PBS) 於室溫反應 15 分鐘, 最後以 PBS 潤洗一次, 移除 8-well chamber 的塑膠外框, 滴加微量 mounting medium (72% glycerol in PBS) 於細胞上, 小心蓋上蓋玻片 (24 x 60 mm)、於室溫避光靜置隔夜, 以指甲油將玻片封存, 使用共軛焦顯微鏡 Zeiss LSM 780 分析螢光影像。




第三章 CTEN 缺失對人類前列腺上皮細胞增生、貼附和移動能力的影響

Focal adhesion 為細胞重要的貼附結構，CTEN 與 integrin 結合並參與 focal adhesion 的訊息網絡，可能影響細胞的貼附與遷徙行為，先前文獻亦指出 CTEN 影響細胞增生與遷徙能力，然而關於 CTEN 於前列腺上皮細胞的功能則還未曾被探討，為了瞭解 CTEN 於人類前列腺上皮細胞中的功能，我們選擇以非惡性前列腺上皮細胞株 RWPE-1 作為研究材料，並透過 siRNA(表 3) 抑制 *CTEN* 基因的表現，藉此觀察 CTEN 缺失對細胞增生、貼附和移動能力的影響。

3.1 CTEN 缺失會阻礙細胞週期 G1/S 期間的轉換

以二段分別辨識 CTEN mRNA 不同位置的 siRNA (siCTEN-S1, S2)(圖 1A)，轉染至 RWPE-1 細胞後，皆可達到顯著抑制 *CTEN* 表現的效果 (圖 1B)，接著藉由細胞對 WST-1 的代謝活性，偵測細胞的增生情形，實驗結果顯示 CTEN 缺失會造成 RWPE-1 增生能力下降 (圖 1C)。細胞週期運轉延滯或細胞死亡都能造成細胞增生能力下降，然而我們透過光學顯微鏡觀察，發現 CTEN 缺失的細胞沒有明顯漂浮、死亡的情形，因此先排除細胞死亡為增生狀況下降的主要原因。

接著，我們針對細胞週期的分布進行分析，一般具有增生能力的細胞，其細胞週期大致可分為 G1、S、G2、M 時期，細胞在 G1 時期生合成代謝反應旺盛、體積增大，進入 S 時期開始進行 DNA 複製，爾後進入第二個生長週期 G2 同時為細胞分裂作準備，最後在 M 時期完成細胞分裂後再次回到 G1 時期。由於每顆細胞所處的細胞週期階段不盡相同，為了清楚觀察 CTEN 缺失對 RWPE-1 細胞週期運行的影響，我們以 siRNA 抑制 *CTEN* 基因表現後，透過 thymidine 和 L-mimosine 將大部分的細胞停在 G1 晚期，隨即在恢復細胞週期運行後的 0、4、8、12、16、24 小時，將細胞以甲醇固定並以螢光染劑 PI 標定 DNA，藉由流式細胞



儀分析每顆細胞中 DNA 的相對含量，以了解每顆細胞的細胞週期狀態。Thymidine 與 L-mimosine 處理後，控制組 (siCtrl) 與 CTEN knockdown (siCTEN-S2) 的細胞皆有約 80% 同步停留在 G1 期 (圖 2, 0 hr)，我們發現在恢復細胞週期 4 小時後，部分細胞由 G1 時期進入 S 時期，此時控制組有 62% 的細胞處於 S 時期，而 siCTEN 的實驗組則僅 35% 的細胞處於 S 時期 (圖 2, 4 hr)，顯示缺乏 CTEN 會阻礙 RWPE-1 由 G1 時期進入 S 時期的過程，接著我們進一步探究 CTEN 缺失造成 G1/S 遲滯的可能原因。


細胞週期的運行過程受到嚴格調控，在 G1、G2 以及 M 時期都存在調節機制定細胞是否往下一階段的細胞週期推進，藉以確保細胞正常的完成生長與分裂，在 G1 晚期 cyclin D1/D3 蛋白質增加並且與 cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK 4/6) 結合，同時 CDK 的活性抑制蛋白質 (cyclin-dependent kinase inhibitor; CDKI) p21^{Cip1/Waf1} 和 p27^{Kip1}，會受到泛素化修飾並且被蛋白酶體降解，此時細胞內 CDK4/6 的活性上升進而提高 Rb (retinoblastoma protein) 的磷酸化修飾程度，高度磷酸化的 Rb 與轉錄因子 E2F 的結合能力下降，此時被釋出的 E2F 則能提升目標基因表現，並確立細胞往 S 時期前進。對此我們在 RWPE-1 細胞中以 siRNA 抑制 CTEN 基因表現，並以 western blotting 分析方法偵測細胞週期相關調控因子的蛋白質含量變化，在 CTEN 缺乏的狀況下，CDK2/4/6、cyclin D1/D3 和 CDK 活性抑制蛋白質 p18 皆不受影響，唯 CDKI p21^{Cip1/Waf1} 和 p27^{Kip1} 則有上升的情形 (圖 3)。另外，我們也在非惡性前列腺上皮細胞株 PZ-HPV-7 和前列腺原位癌細胞株 CA-HPV-10 發現，CTEN 缺失的狀況下同樣能導致 CDKI p21^{Cip1/Waf1} 和 p27^{Kip1} 的蛋白質含量上升 (圖 3)。因此，我們認為在前列腺上皮細胞中，CTEN 的缺乏會導致 CDKI p21^{Cip1/Waf1} 和 p27^{Kip1} 的蛋白質含量上升，推測 CDK 的活性將受其抑制，進而阻礙 G1 時期和 S 時期之間的轉換，造成細胞增生情形下降。



3.2 CTEN 參與 $\Delta Np63\alpha$ 所調控之細胞貼附


由於先前研究指出，於人類皮膚角質細胞株 HaCaT 中發現，*CTEN* 為 p63 轉錄調控的目標基因 (Seo *et al.*, 2012)，而 p63 是影響前列腺器官發展的重要轉錄因子 (Signoretti *et al.*, 2000)，因此我們想探討在前列腺上皮細胞中 p63 和 *CTEN* 之間的關係以及所扮演的角色。由於 p63 蛋白質有二種主要的異構體，分別是保有 N 端的 TAp63 以及缺乏 N 端的 $\Delta Np63$ 蛋白質，而 TAp63 與 $\Delta Np63$ 的 pre-mRNA 皆會經由 alternative splicing 產生 C 端有差異的 α 、 β 、 γ 異構體 (Yang *et al.*, 1998)。因此，我們首先藉由 RT-PCR 檢視 RWPE-1 和前列腺癌細胞株 22Rv1、LNCaP、DU-145、PC-3 中 p63 不同異構基因表現情形 (圖 4A)，我們先分析 TAp63 與 $\Delta Np63$ mRNA 的表現量，結果顯示在 22Rv1 和 LNCaP 中，二種 p63 mRNA 都幾乎無法偵測到，而在 DU-145 和 PC-3 則僅偵測到微量 $\Delta Np63$ mRNA，相較之下，在 RWPE-1 中 $\Delta Np63$ 有非常顯著的基因表達 (圖 4A)，而檢視 C 端差異的三種 α 、 β 、 γ 異構體含量則發現， α 為 RWPE-1 中主要的異構體 (圖 4B)，因此我們認為 RWPE-1 中主要的 p63 異構體為 $\Delta Np63\alpha$ 。另外，我們也分析這些細胞株中 *CTEN* 的基因表達情況，與之前的研究一致 (Lo *et al.*, 2002)，前列腺癌細胞株中只能偵測到微量的 *CTEN* mRNA (圖 4C)，而在 RWPE-1 中有很高的表現量。由此可知 $\Delta Np63\alpha$ 和 *CTEN* 皆在正常前列腺上皮細胞有較高的基因表達，在前列腺癌細胞中則同樣受到強烈的負向調控。透過線上資料庫進行相關的分析比對也發現，*CTEN* 和 p63 的基因表達情形在前列腺良性組織、原位癌組織及轉移癌組織間存在高度正相關 (楊寬，2014)，推測 *CTEN* 在前列腺組織中也可能同樣作為 $\Delta Np63\alpha$ 轉錄調控的目標基因。

為了證實 $\Delta Np63\alpha$ 可於轉錄層次調控 *CTEN* 基因的表現，我們實驗室過去藉由雙色冷光報導基因系統和 ChIP-PCR 等分析方法，找到 $\Delta Np63\alpha$ 轉錄調控 *CTEN* 的重要 180 bp 啟動子片段 (-140 ~ +40)，這個片段剛好位在調控於前列腺細胞株中專一性表現的最小啟動子片段中 (Chen *et al.*, 2013)，接著更進一步證實



$\Delta Np63\alpha$ 結合於 *CTEN* 轉錄起始點 (transcription start site; TSS) 上游 -61 ~ -36 的區域 (楊寬, 2014), 確認 $\Delta Np63\alpha$ 可以結合到 *CTEN* 啟動子並進行轉錄調控。除了此區域以外, 先前有研究利用人類前列腺上皮細胞或皮膚角質細胞為材料, 透過 chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-Seq) 對 p63 於基因體中的結合位置進行分析 (Kouwenhoven *et al.*, 2015; Martynova *et al.*, 2012; McDade *et al.*, 2012; McDade *et al.*, 2014; Olsen *et al.*, 2013), 結果顯示在 *CTEN* 基因座中轉錄起始位點的遠端亦有 p63 的結合位點 (表 4), 於是我們以 RWPE-1 作為研究材料, 藉由辨識 $\Delta Np63$ 的抗體進行 ChIP-PCR 驗證, 我們將已證實不會和 $\Delta Np63\alpha$ 結合的 -2420 ~ -2300 片段 (楊寬, 2014) 作為負控制組, 以其 qPCR 的結果當做一倍 (圖 5, -2.4 kb to TSS), 計算其他片段與 $\Delta Np63$ 結合的相對量, 而以 *p21* 基因啟動子會與 $\Delta Np63\alpha$ 結合的片段 (Westfall *et al.*, 2003) 當做正控制組 (圖 5, p21)。我們發現先前證實會和 $\Delta Np63\alpha$ 結合的 -61 ~ -36 片段 (楊寬, 2014), 其與 $\Delta Np63$ 的結合量只為負控制組的 1.5 倍 (圖 5, -0.1 kb to TSS), 反而是前面提到以 ChIP-Seq 分析到的片段, 分別是位在 *CTEN* 轉錄起始點上游 -36.6、-8.9 kb 以及下游 +7.6、+11.0 的位置, 這些片段與 $\Delta Np63$ 皆有較多的結合量, 和負控制組相比分別提高為 7.5、5.3、2.4 與 2.6 倍 (圖 5), 而多數在皮膚角質細胞中觀測到的 p63 對 *CTEN* 基因座的結合情形, 也在 RWPE-1 中以 ChIP-PCR 偵測到, 顯示在皮膚細胞和前列腺上皮細胞中 p63 對 *CTEN* 的轉錄調控可能存在相似的機制。

$\Delta Np63\alpha$ 為影響上皮細胞貼附的重要因子 (Carroll *et al.*, 2006; Clements *et al.*, 2012; Ihrie *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2013), 而 *CTEN* 存在於 focal adhesion, 可能參與 focal adhesion 中的訊息網絡進而影響細胞對胞外基質的貼附能力, 因此我們推測 *CTEN* 可能作為 p63 訊息路徑的下游因子影響細胞的貼附能力。首先我們於 RWPE-1 細胞中以 siRNA 抑制 *CTEN*, 結果發現 *CTEN* 的缺失導致 RWPE-1 對胞外基質 fibronectin 的貼附能力下降, 僅為控制組的一半 (圖 6, 第二行); 以 siRNA 抑制 $\Delta Np63$ 則不僅促使 *CTEN* 含量下降, 並且抑制細胞的貼附能力 (圖 6, 第三行), 然而抑制 $\Delta Np63$ 所導致的貼附能力下降則可以藉由外源表現




CTEN 而獲得恢復 (圖 6, 第四行), 此外, *CTEN* 缺失同樣抑制 RWPE-1 對胞外基質 collagen I 的貼附能力 (圖 7)。綜理以上的實驗結果, 我們證實 *CTEN* 作為 $\Delta Np63\alpha$ 訊息路徑的下游因子, 參與 $\Delta Np63\alpha$ 所調控之細胞貼附, 在調控前列腺上皮細胞的貼附方面扮演非常關鍵的角色。

3.3 *CTEN* 缺失對 EMT 相關生物標記分子的影響

上皮細胞轉換為間質細胞型態的過程是胚胎發育、器官生成、器官修復和癌症轉移的一個重要機制, 此種細胞型態的轉換稱之為 epithelial-mesenchymal transitions (EMTs), 而間質細胞型態亦能轉換為上皮細胞型態, 稱之為 mesenchymal-epithelial transition (METs)。在 EMT 剛開始發生的時候, 細胞間的接合程度以及細胞對細胞外基質的貼附能力皆會下降, 藉此細胞得以脫離上皮組織, 於 3.2 的研究我們已證實 *CTEN* 缺失會導致非惡性前列腺上皮細胞株 RWPE-1 對細胞外基質 fibronectin 和 collagen I 的貼附能力下降, 因此, 我們假設 *CTEN* 的減少會經由影響細胞貼附而造成細胞轉型與 EMT 的發生, *CTEN* 缺失的細胞可能會失去上皮細胞的特性而轉變為間質細胞, 我們藉由 EMT 發生時相關生物標記分子含量的改變來檢視這個可能性, 包含 E-cadherin 和 ZO-1 的減少、N-cadherin、Vimentin、Snail、Slug 增加以及 β -catenin 在細胞核內的量增加 (Kalluri *et al.*, 2009)。


我們以 siRNA 抑制 *CTEN* 基因表現, 並透過 Western blotting 分析 EMT 相關生物標記分子的蛋白質含量變化, 結果發現於 RWPE-1 細胞中 *CTEN* 缺失不會影響細胞間貼附相關蛋白質 ZO-1 和 E-cadherin, 也不影響 β -catenin 和 Snail 的蛋白質含量 (圖 8A), 僅能些微提升 β -catenin 在細胞核中的累積 (圖 8B), 轉染 siCTEN-S1 雖然會導致 N-cadherin 含量增加, 但是轉染 siCTEN-S2 則不影響 N-cadherin 含量 (圖 8A), 因此在現階段也還無法確認 *CTEN* 缺失對 N-cadherin 的影響, 然而 Slug 的蛋白質含量在 *CTEN* 缺失的情形下明顯減少 (圖 8A), Slug



是促進 EMT 的轉錄因子，過去研究指出 Slug 可以直接結合 *E-cadherin* 基因上的啟動子並抑制基因表現 (Hajra *et al.*, 2002)，但是根據我們的研究結果，CTEN 缺失導致的 Slug 含量下降並未進一步促使 E-cadherin 增加，推測於 RWPE-1 細胞中 CTEN 缺失的情形下，Slug 對下游 EMT 相關因子的基因調控可能還有其他轉錄因子的參與，因此綜合 3.2 和 3.3 的結果我們認為 CTEN 缺失會導致細胞對胞外基質的貼附能力下降，但不影響細胞間的接合情形，亦無法有效促使 RWPE-1 細胞發生 EMT。

3.4 CTEN 缺失抑制細胞遷徙能力與 RhoA 活性

CTEN 在乳腺上皮細胞 MCF10A 和多種癌細胞中皆扮演促進細胞移動的角色 (Albasri *et al.*, 2011; Albasri *et al.*, 2009; Aratani *et al.*, 2017; Barbieri *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2013; Hung *et al.*, 2013; Katz *et al.*, 2007; Muharram *et al.*, 2014; Thorpe *et al.*, 2017)，因此我們以 RWPE-1 作為研究材料，分析 CTEN 在前列腺上皮細胞中是否依然擁有促進細胞移動的能力。我們以兩條不同序列的 siRNA 分別抑制 *CTEN*，在轉染 siRNA 進入 RWPE-1 後的兩天，我們進行 transwell 細胞移動試驗，以 0.5% 胎牛血清 (fetal bovine serum; FBS) 誘導細胞移動達 24 小時後觀察細胞移動情形，轉染 siCTEN-S1 造成細胞遷徙能力相較於控制組下降了 70%，然而轉染 siCTEN-S2 雖然同樣有效抑制 *CTEN* 基因表現，但是對細胞遷徙能力幾乎不影響 (圖 9)，而 Huang 等人 (2013) 也發表了相關的研究，他們以非惡性前列腺上皮細胞 MLC-SV40 進行試驗，在 fibroblast growth factor (FGF) 誘導細胞移動情況下，CTEN 缺失同樣會導致細胞移動能力下降，因此我們認為 CTEN 在前列腺上皮細胞當中具有促進細胞遷徙的能力，然而考慮本研究中增生和貼附能力檢測的結果裡 siCTEN-S1 和 siCTEN-S2 均引發相同趨勢的影響，推測 siCTEN-S2 可能於 RWPE-1 細胞中觸發抑制 CTEN 以外的反應，且該反應在 FBS 誘導狀態下抵銷 CTEN 缺失在遷徙能力上造成的效應。



在前列腺上皮細胞 MLC-SV40 中，透過免疫共沉澱 (immunoprecipitation) 分析試驗證實 CTEN 能夠結合 DLC-1 (Liao *et al.*, 2007) ，DLC-1 蛋白質具有 RhoGAP domain ，Rho 指的是 Ras homolog gene family member 而 GAP 是 GTPase-activating protein 的簡稱，RhoGAP 能與活化態的 Rho 結合並活化其 GTPase 活性，使 Rho 上的 GTP 水解成 GDP 變成不活化態而終止訊息傳導。其他的研究進一步發現在乳腺上皮細胞中，CTEN 藉由抑制 DLC-1 導致與 GTP 結合之活化態 RhoA (Rho-GTP) 含量提升，活化態的 RhoA 進而促進細胞移動 (Cao *et al.*, 2012) ，另一方面，在缺乏 DLC-1 的肺腺癌細胞 A549 中，CTEN 的缺失幾乎不影響細胞遷徙能力 (Cao *et al.*, 2012) ，這些研究顯示 DLC-1 對於 CTEN 調控細胞移動的重要性。因此，我們推測 CTEN 在前列腺上皮細胞中可能藉由與 DLC-1 的結合而抑制其 RhoGAP 活性，使細胞中活化態的 RhoA 增加，進而促進細胞遷移。我們在 RWPE-1 細胞中以 siRNA 抑制 CTEN，在進行 RhoA 活性分析前 24 小時更換為不含 EGF 和 BPE (bovine pituitary extract) 的培養基，以 10% FBS 誘導 RhoA 活化，並透過 Rhotekin pull down assay 分析細胞中活化態 RhoA-GTP 的含量。實驗結果顯示在 CTEN 缺失的情形下，相較於控制組，siCTEN-S1 和 siCTEN-S2 實驗組的活化態 Rho-GTP 分別減少 31% 和 22% (圖 10) ，因此我們認為 CTEN 的缺失削弱了對 DLC-1 RhoGAP 活性的抑制，使活化態 RhoA 的量降低而抑制細胞遷徙。


第四章 CTEN 於前列腺腺泡生成過程中扮演的角色



4.1 CTEN 高度表現於基底型前列腺上皮細胞

先前研究指出，*CTEN* 基因於前列腺組織有較高的表現情形 (Chen *et al.*, 2013; Lo *et al.*, 2002)，而我們實驗室則發現，相較於人類前列腺間質細胞 (stroma cell) 與平滑肌細胞 (smooth muscle cell)，*CTEN* 蛋白質僅於前列腺上皮細胞有較高的含量，顯示 *CTEN* 基因高度表現於前列腺上皮組織，因此我們想進一步探討 *CTEN* 對前列腺上皮組織發展與細胞分化的影響。

前列腺上皮組織依分化狀態不同亦能區分為多種細胞型態，主要由基底細胞 (basal cell) 與管腔細胞 (luminal cell) 構成，先前研究報導，RWPE-1 細胞株同時具有基底細胞與管腔細胞兩種不同型態的上皮細胞 (Bello *et al.*, 1997; Tokar *et al.*, 2005)，將細胞培養於三維空間生長可以模擬腺泡生成並促使其分化為管腔細胞 (Bello-DeOcampo *et al.*, 2001; Tyson *et al.*, 2007; Webber *et al.*, 1997)，為了瞭解 *CTEN* 於前列腺腺泡生成中所扮演的角色，我們首先利用 siRNA knockdown *CTEN* 於 RWPE-1 中的表現，再將 RWPE-1 培養於三維空間，我們使用光學顯微鏡觀察細胞生長狀況，對照組 (siCtrl) 於培養 5 天後形成圓形腺泡構造 (圖 11)，而 *CTEN* 缺失的實驗組 (siCTEN-S2) 依然可以形成與對照組相似的圓形腺泡構造，然而直徑小於 50 μm 腺泡的比例略高於對照組 (圖 11B)，形成的腺泡數量也比對照組少 (圖 11C)，值得注意的是，當我們分別將培養 3、6、9 天的細胞從 Matrigel 中收取出來，透過 Western blotting 方法分析腺泡發展過程中細胞內 *CTEN* 含量的變化時，我們發現在三維空間培養 3 天後 *CTEN* 含量明顯下降，在第 6、9 天幾乎偵測不到 (圖 12)，推測負向調控 *CTEN* 可能與 RWPE-1 分化有關，所以我們推測，在形成腺泡初期，*CTEN* 的缺失可能如同 3.1 所討論的會影響細胞增生，因此 siCTEN-S2 形成的腺泡數量較少，而 *CTEN* 的表現在腺泡生成過程中會下降，所以 knockdown *CTEN* 對腺泡的分化反而沒有影響。



由於 CTEN 含量於腺泡生成過程中下降，而腺泡生成過程中細胞傾向管腔細胞分化，推測 CTEN 很可能與前列腺上皮細胞分化相關，然而有關 CTEN 於不同分化狀態之上皮細胞間的表現情形還尚未被探討，了解 CTEN 與功能分化間的關係將有助於我們進一步釐清 CTEN 於前列腺組織當中扮演的角色。我們於線上資料庫 Gene Expression Omnibus (GEO) 中搜尋到三筆研究資料，包含編號 GSE89050、GSE86904 和 GSE82071，此三筆資料的分析樣品皆包含良性的人類前列腺組織，將組織分離為單一細胞，再以螢光抗體標定相關生物標記分子並透過流式細胞儀進行篩選，在篩選出上皮細胞後，此三筆資料皆以 CD49f 為依據進行基底細胞與管腔細胞的分群，CD49f 亦被稱為 integrin $\alpha 6$ ，為前列腺基底細胞的標記分子 (Guo *et al.*, 2012; Lawson *et al.*, 2007)，CD49f 含量高的細胞為基底細胞、CD49f 含量相對較低的即為管腔細胞，我們針對基底細胞與管腔細胞中 CTEN 基因的表現差異進行分析，結果此三筆研究資料皆顯示相較於 CD49f 低含量的組別 (CD49f-Lo)，CD49f 高含量 (CD49f-Hi) 的細胞也有較高的 CTEN 基因表現 (圖 13)，表示 CTEN 於基底型前列腺上皮細胞有較高的表現。CTEN 於不同分化型態細胞間的表現差異意味著 CTEN 可能參與細胞分化的過程，對此我們提出二個假設，第一、CTEN 缺失促使 RWPE-1 分化為管腔細胞型態，第二、CTEN 缺失有助於形成正常的腺泡構造。

4.2 CTEN 缺失對前列腺上皮細胞分化的影響

為了驗證 CTEN 缺失會促使 RWPE-1 分化為管腔細胞的假設，我們先將 RWPE-1 細胞培養於二維的塑膠培養盤，以 siRNA 抑制 CTEN 基因表現後培養 6 天，觀察 CTEN 缺失對分化指標基因表現狀況的影響，結果顯示缺乏 CTEN 的情況下，基底細胞的標誌分子 $\Delta Np63$ 、CK5 與管腔細胞的標誌分子 CK8、CK18 的基因表現與控制組相比無顯著差異，唯 prostate stem cell antigen (PSCA) 的基因表現明顯高於控制組 (圖 14)，PSCA 於 late intermediate cell 有較高含量 (Tran *et*

al., 2002), 表示 CTEN 缺失在二維的環境中可能無法有效促使 RWPE-1 中具有基底細胞特性的細胞完全分化為管腔細胞，但仍然可以促使其具有部分管腔細胞的特性。



4.3 過度表現 CTEN 破壞前列腺腺泡生成

由於腺泡生成過程中觀察到 CTEN 含量下降 (圖 12), 為了驗證 CTEN 缺失有助於腺泡正常分化的假設, 我們藉由外源表現質體維持腺泡生成過程中 CTEN 的含量, 進一步探討 CTEN 與腺泡生成的關係。首先, 我們選殖 CTEN 基因進入四環黴素可誘導之表現載體 (tetracycline-inducible expression plasmid), 另外選殖綠色螢光蛋白質 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 作為控制組的表現載體, 以慢病毒 (lentivirus) 感染方式將表現載體轉殖入 RWPE-1, 並以嘌呤黴素 (puromycin) 篩選出可穩定誘導表現的細胞群 (stable cell pool), 作為腺泡生成試驗的細胞材料, 並將可誘導表現出 EGFP 和 CTEN 的 RWPE-1 分別命名為 aON-EGFP 和 aON-CTEN。尚未以去氧羥四環素 (doxycycline) 誘導表現的情況下, 將 aON-EGFP 和 aON-CTEN 分別培養於 matrigel 膠床上, 於顯微鏡下觀察此兩株細胞生成腺泡的情形, 我們將型態大致分為三類, 分別是 normal 即為正常球體構造, notched 為略有扭曲的腺泡結構, 以及 deformed 表示不正常組織的細胞團塊, 實驗結果顯示, 於三維環境培養 9 天後, aON-EGFP 和 aON-CTEN 形成的腺泡構造無明顯差異, 且 normal、notched 與 deformed 的結構都分別約佔了 30%、40% 與 30% (圖 15A), 另外, 我們也以 western blotting 分析 CTEN、p63 (basal cell marker) 和 CK18 (luminal cell marker) 的變化, 培養 9 天後, aON-EGFP 和 aON-CTEN 的 CTEN 和 p63 都是減少、CK18 則皆為增加 (圖 15B), 這些結果顯示, aON-EGFP 與 aON-CTEN 二個細胞群應來自特性一致的細胞, 且在腺泡生成過程中, 展現相似的細胞分化特性。

為了解 CTEN 於腺泡生成過程中扮演的角色, 我們接著於腺泡生成試驗中添

加 0.2 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline，誘導 aON-EGFP 和 aON-CTEN 分別生合成 EGFP 和 CTEN，經過 9 天培養，我們以 western blotting 分析過程中 CTEN、p63 和 CK18 的變化，結果發現控制組 (aON-EGFP) 的 CTEN 與 p63 明顯減少，CK18 於 6 和 9 天培養後明顯增加，顯示細胞逐步往管腔細胞型態分化，而誘導 CTEN 表現則減緩 p63 的減少並抑制 CK18 的增加 ((圖 16)


圖 16A)，同時於顯微鏡下觀察此兩株細胞培養 9 天後腺泡生成的情形 ((圖 16) 圖 16B)，並分析腺泡大小與結構型態，首先我們將腺泡依直徑長度 (Φ) 分為三群， $\Phi \leq 50 \mu\text{m}$ 、 $50 \mu\text{m} < \Phi \leq 100 \mu\text{m}$ 以及 $\Phi > 100 \mu\text{m}$ ，結果顯示 aON-EGFP 和 ONCTEN 形成的腺泡直徑長度無明顯差異，大部分的腺泡 (約略 85%) 其直徑介於 50~100 μm ((圖 16)

圖 16C)，在結構分析上我們發現 aON-CTEN 形成 normal 型態的比例較 aON-EGFP 顯著下降 35%，而 deformed 型態的比例則顯著增加 50% ((圖 16)

圖 16D)，顯示維持 CTEN 的存在會破壞 RWPE-1 形成腺泡的能力。另外，我們以免疫螢光標定的方法，透過共軛焦顯微鏡觀察腺泡結構 ((圖 16)

圖 16E)，在 aON-EGFP 組別可以觀察到大部分細胞規則排列成環形，部分腺泡構造有開始形成空腔的狀況，在 aON-CTEN 組別則是觀察到大部分細胞不規則聚集而成的細胞團塊，雖然部分細胞形成具有完整結構的腺泡，然而，其細胞 CTEN 量是相對較低的，綜合上述觀察，CTEN 含量下降有助於 RWPE-1 於三維培養環境中形成腺泡，並增加管腔細胞標誌分子 CK18 的含量。

先前已有研究證實，抑制 integrin $\beta 1$ 會破壞或降低前列腺與乳腺上皮細胞形成腺泡 (Akhtar *et al.*, 2013; Bello-DeOcampo *et al.*, 2001)，然而過度活化 integrin $\beta 1$ 訊息路徑仍會破壞乳腺上皮細胞 MCF10A 腺泡構造的組成 (Deevi *et al.*, 2014)，顯示維持 integrin $\beta 1$ 下游訊息路徑的正常調節對於腺泡生成十分重要，已知 FAK 為 integrin $\beta 1$ 下游重要的訊息傳導因子之一，然而 FAK 缺失並無損乳腺組織腺體空腔的形成 (Akhtar *et al.*, 2013)，過度活化 FAK 則會破壞 MCF10A 形成的腺泡結構 (Deevi *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2016)，另外，在皮膚角質細胞中，CTEN



被證實有助於 FAK Y397 的磷酸化 (FAK pY397)，因此我們推測 CTEN 可能藉由提升 FAK 磷酸化破壞 RWPE-1 組成之腺泡結構，於是我們在腺泡生成試驗中添加工 0.2 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline，誘導 aON-EGFP 和 aON-CTEN 分別生合成 EGFP 和 CTEN，經過 6 天培養，我們以 western blotting 分析過程中 CTEN、FAK pY397 和 FAK 的變化 (圖 17A)，同時，將 FAK pY397 和 FAK 的色帶進行定量分析，以 FAK pY397 對 FAK 的比值作為 FAK pY397 相對含量的指標，我們發現控制組 (aON-EGFP) 的 FAK pY397 含量下降，而誘導 CTEN 表現則維持 FAK pY397 的磷酸化狀態 (圖 17B)，因此我們推論腺泡生成過程中，FAK Y397 磷酸化程度下降，而過度表達 CTEN 有助於維持 FAK Y397 磷酸化狀態，並破壞腺泡結構。

第五章 過度表現 *CTEN* 對前列腺癌細胞株的影響


由於 *CTEN* 基因表現在前列腺癌組織明顯受抑制 (Chen *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2010; Lo *et al.*, 2002)，在多數前列腺癌細胞株中也幾乎偵測不到 *CTEN*，且轉移性前列腺癌的 *CTEN* 表現程度比原位癌的 *CTEN* 表現程度低 (楊寬，2014)，我們推測 *CTEN* 可能作為癌症抑制因子，而 *CTEN* 缺失可能有助於前列腺癌發生或惡化，因此我們選擇以腦轉移前列腺癌細胞株 DU-145 作為研究材料，藉由外源表現 *CTEN* 觀察 *CTEN* 對前列腺癌細胞株的影響，考慮 *CTEN* 可能做為癌症抑制因子而不利於 DU-145 生長，如此一來也將進一步影響 *CTEN* 基因轉殖後穩定細胞株的篩選，因此我們將去氧羥四環素 (doxycycline) 可誘導之表現載體透過慢病毒 (lentivirus) 送入細胞當中，以嘌呤黴素 (puromycin) 篩選出穩定細胞群 (stable cell pool)，於進行相關細胞試驗時再以去氧羥四環素誘導 *CTEN* 表現 (aON-*CTEN*)，藉此評估 *CTEN* 對 DU-145 增生以及遷徙能力的影響，在此亦以 aON-EGFP 作為對照組。首先在增生能力試驗分析中，隨著去氧羥四環素的濃度提升，誘導表現出的 EGFP 和 *CTEN* 也隨之增加 (圖 18A)，在 aON-EGFP 組別中，誘導 EGFP 表現會些微抑制 DU-145 的增生狀況，然而此差異不具有統計上的顯著意義，在 aON-*CTEN* 組別中，誘導 *CTEN* 表現則不影響 DU-145 的增生 (圖 18B)；在遷徙能力分析方面，我們以 transwell 試驗方法進行，並添加 10% FBS 誘導細胞移動，在 aON-EGFP 組別中，誘導 EGFP 表現會些微增加 DU-145 的移動狀況，在 aON-*CTEN* 組別中，誘導 *CTEN* 表現則造成 DU-145 的移動能力下降至少 40% (圖 19)，表示 *CTEN* 雖然不影響前列腺癌細胞 DU-145 的增生能力，卻會抑制細胞的遷徙能力，推測 *CTEN* 缺失可能有助於前列腺癌細胞轉移，而關於此推測則有待相關試驗 (例如：細胞侵襲試驗或是注射腫瘤細胞於老鼠尾靜脈) 進一步證實。

第六章 討論




本研究發現 CTEN 有助於前列腺上皮細胞增生、貼附和移動 (圖 1、圖 6、圖 7、圖 9)，在細胞增生方面，CTEN 無論是在胃癌細胞、人類皮膚角質細胞或是前列腺上皮細胞，都可以藉由調控細胞週期相關因子來達到促進細胞增生的功能 (Aratani *et al.*, 2017; Seo *et al.*, 2016)，在前列腺上皮組織中增生情況旺盛的細胞大多位於基底細胞層 (Bonkhoff *et al.*, 1994; Bonkhoff *et al.*, 1991; Hudson *et al.*, 2001)，也因此通常得到的前列腺初代細胞大多為增生能力較旺盛的基底細胞 (transit amplifying cells) 或中間細胞 (intermediate cells) (Litvinov *et al.*, 2006)，我們發現基底細胞擁有較多 CTEN，而增生能力較低的管腔細胞 CTEN 含量較低 (圖 13)，此現象反映 CTEN 含量與前列腺上皮細胞增能力的正向關聯，推測 CTEN 有助於維持基底細胞增生，當細胞啟動凋亡反應時，活化的 caspase3 可以截切、產生 CTEN 571-715 片段，此片段可以抑制乳癌細胞生長，且將該片段表現於人類非惡性前列腺上皮細胞株則會造成細胞死亡，以至於無法篩選出穩定細胞株 (Lo *et al.*, 2005)，顯示 CTEN 除了維持前列腺組織的正常增生，對於啟動凋亡機制的細胞也能進一步促使細胞死亡，推測 CTEN 有助於前列腺上皮組織中不健康細胞的新陳代謝。

在前列腺上皮組織形成分支的過程中，上皮組織仍為實心線狀構造，此後才逐步形成具有空腔的管狀構造，儘管 Pearson *et al.* (2009) 在 RWPE-1 和 BPH-1 腺泡形成試驗中排除 caspase-dependent death 為管腔形成的重要機制，過去仍有研究指出，在大鼠出生後前列腺組織隨即開始逐步形成空腔，過程中一方面在空腔形成初期部分細胞發生凋亡，另一方面細胞發生分化、移動並重新組織，藉此得以形成空腔 (Bruni-Cardoso *et al.*, 2007)，有趣的是，隨著管腔的形成，增生旺盛的細胞比例逐步下降，推測此過程中基底細胞逐步分化為管腔細胞，而 CTEN 表現隨之降低並影響細胞增生情況，另外，過去曾有研究指出，於乳腺細胞 MCF10A 中抑制 CTEN 會抑制 RhoA 活化態、干擾 actin stress fiber 組成、阻礙 paxillin 聚集至集



中交集附著點 (focal adhesions) 並破壞 focal adhesions 形成 (Cao *et al.*, 2012), 在 RWPE-1 腺泡生成試驗中我們發現, 隨著細胞逐步分化為管腔細胞型態, FAK Y397 的磷酸化程度下降, 過度表現 CTEN 則有助於 FAK 磷酸化的維持 (圖 17), 在乳腺腺泡生成試驗中, FAK Y397 的磷酸化則有助於 RhoA 的活化態提升 (Deevi *et al.*, 2014), 所以在前列腺上皮組織動態變化的過程中, 可能藉由 CTEN 對 DLC1 以及 FAK 的影響來提升 RhoA-GTP 含量並幫助基底細胞移動至外圍的基底層, 同時 CTEN 連接整合蛋白質 (integrins), 推測有助於 focal adhesions 的形成並促使貼附於基底層, 而 CTEN 較少的管腔細胞其貼附於基底層的能力可能較差並留在靠近管腔的細胞層, 此外, 我們發現以 siRNA 造成 CTEN 缺失不會影響維持細胞彼此接合的相關蛋白質 E-cadherin 和 ZO-1 (又稱為 tight junction protein-1) 的含量, 推測 CTEN 於管腔細胞中減少的狀況不影響管腔細胞與基底細胞間的接合情形。整個前列腺腔體的形成與維持受到許多蛋白質分子的調控, 這當中有些蛋白質只出現在特定分化形態的上皮細胞, 例如在成體前列腺上皮組織中, p63 和 CTEN 主要存在基底細胞, 而 Nkx3.1 和 Dickkopf-3 則在管腔細胞中, 而這些分子的調節缺失會造成前列腺發展異常或阻礙腺泡形成 (Dutta *et al.*, 2016; Kawano *et al.*, 2006; Kruihof-de Julio *et al.*, 2013; Kurita *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2013), 這意謂著上皮細胞分化 (cell lineage specification) 很可能在前列腺腔體形成中扮演十分重要的角色。整體而言, 我們認為前列腺基底細胞分化為管腔細胞的過程中, 細胞負向調控 CTEN 是必須的, 推測 CTEN 將從增生、貼附和遷徙三項能力的調節影響前列腺上皮組織腔體的形成。

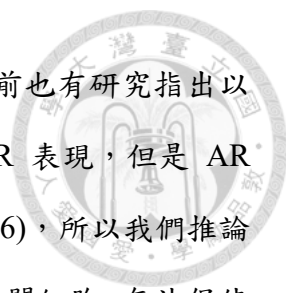
由本篇研究結果與先前研究推論, CTEN 在正常前列腺組織應該是透過 DLC-1 提升細胞遷徙能力, 然而, 於前列腺癌細胞株中外源表現 CTEN 則會使 CTEN 促進細胞移動的角色轉換為抑制, 在此顯然 CTEN 抑制 DU-145 的遷徙能力並非透過 DLC-1, 且 DLC-1 在前列腺癌中的表現是受到抑制, 因此在非惡性前列腺細胞株以及前列腺癌細胞株中, CTEN 對遷徙能力的影響將因細胞內分子環境的差異而執行截然不同的分子機制。有關 CTEN 於人類非惡性前列腺上皮細



胞 RWPE-1 的功能探討，我們發現 CTEN 缺失並未促使 RWPE-1 獲得更多癌細胞的特性，反而於腺泡生成過程中 CTEN 會受到負向調控 (圖 12)，FAK Y397 的磷酸化受到抑制 (圖 17)，過度表現 CTEN 於細胞中則會抑制 CK18 上升、破壞腺泡結構 ((圖 16)

圖 16) 以及維持 FAK Y397 磷酸化 (圖 17)，而組織結構的紊亂被視為癌症發生的早期現象之一，過度活化 FAK 也有助於前列腺癌的發展 (Figel *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2008; Lacoste *et al.*, 2005; Slack-Davis *et al.*, 2009; Stagno *et al.*, 2017)，這些研究結果顯示負向調控 CTEN 反而是維持正常前列腺組織發展過程中必須的分子調節，僅僅藉由抑制 CTEN 無法促使前列腺上皮細胞轉型與惡化，然而，誘導細胞分化為管腔細胞的過程中 CTEN 是受到抑制，雖然直接抑制 CTEN 無法促使細胞分化為管腔細胞，卻能夠促使 PSCA 表現量上升 (圖 14)，而 PSCA 在許多前列腺癌中是過度表現 (Reiter *et al.*, 1998)，事實上，細胞在轉型為前列腺癌細胞前大多會先分化為類似管腔細胞型態，因此在前列腺癌組織中，CTEN 缺失可能是癌化過程中被保留下來的基因背景，但也不排除 CTEN 缺失有助於前列腺癌組織進一步惡化的可能，先前研究指出 CTEN 可以增加前列腺癌細胞株 DU-145 和 PC-3 對化療藥物 paclitaxel 的感受性 (Li *et al.*, 2010)，過度表現 CTEN 於 DU-145 中雖然不影響細胞生長 (圖 18) 卻抑制了細胞遷徙能力 (圖 19)，表示 CTEN 缺失對於前列腺癌的發展具有更積極的生物意義存在。

關於前列腺器官發展的研究課題，老鼠動物模式的應用是目前最為容易取得且最廣為接受的活體試驗平台，然而在哺乳動物間，彼此的前列腺構造卻存在許多明顯的差異，老鼠的前列腺可以區分為三瓣，然而人類的前列腺為完整的單一構造、依位置可區分為三個區域 (Hayashi *et al.*, 1991; McNeal, 1988)，在不同物種間基底細胞對管腔細胞的比例，以及基底細胞層的結構也有明顯不同 (El-Alfy *et al.*, 2000)，因此，以人類前列腺細胞為基礎的實驗平台是不可或缺的。在本研究中，我們選擇以 RWPE-1 進行 3D 細胞培養，除了藉此模擬前列腺的腺泡生成，我們也首度證實該培養方法可以誘使細胞往管腔細胞型態進行分化 (圖 15B)，然而此培養方式



卻無法提升 prostate specific antigen (PSA) 和 AR 的表現，先前也有研究指出以 R1881 或 type I interferon 處理 RWPE-1 雖然可以些微提升 AR 表現，但是 AR 的含量卻遠遠不及前列腺間質細胞中的含量 (Litvinov *et al.*, 2006)，所以我們推論本次研究所用的 3D 培養方式僅能誘導 RWPE-1 分化為晚期中間細胞，無法促使其完全分化分泌型管腔細胞，未來實驗設計上或許可以考慮以初代細胞 (primary cells) 進行實驗，以彌補 RWPE-1 在永生 (immortalized) 的過程中觸發預期外的基因突變。另外，前列腺器官發展過程中，上皮細胞與間質細胞間的互動也是十分重要，將細胞培養於含有間質細胞外泌物質或是其他賀爾蒙及生長激素的培養基中 (例如: DHT 或是 keratinocyte growth factor)，將有助於前列腺初代細胞分化為分泌型管腔細胞 (Heer *et al.*, 2006; Karthaus *et al.*, 2014; Lamb *et al.*, 2010)，屆時將有助於觀察 CTEN 是否影響於管腔細胞分泌 PSA 和 prostatic acid phosphatase 的能力。

在本研究中，我們透過一系列的細胞試驗去論述 CTEN 於前列腺上皮組織的生物功能，並說明負向調控 CTEN 除了是前列腺上皮組織發展所必需，更可能助於前列腺癌惡化，然而相關分子機制還有待進一步的實驗設計來論證，我們初步發現 CTEN 有助於維持 FAK Y397 磷酸化，未來可以使用小分子藥物抑制 FAK pY397，檢視 CTEN 是否透過影響 FAK 磷酸化而破壞腺泡形成，另外，可以藉由表現不同 CTEN 結構域 (functional domain) 片段或以點突變的方式破壞 CTEN 的 SH2 或 PTB 結構域，進而找出 CTEN 結構上破壞腺泡形成或是抑制 DU-145 移動能力的重要區塊，並透過免疫共沉澱以及蛋白質身分鑑定找出可能的結合蛋白質，進而串聯出相關的訊息網絡。除了上述訊息網絡的探討，我們也關心 CTEN 除了抑制 DU-145 的遷徙能力，是否也影響細胞侵襲基底層的能力，關於這點未來可以透過細胞侵襲試驗 (cell invasion assay) 進行分析，甚至可以將具有高侵襲特性的癌細胞株 DU145 或 PC-3 於免疫缺乏鼠進行異種移植 (xenograft)，可以嘗試由尾靜脈 (lateral tail vein) 注入癌細胞，觀察癌細胞於多處器官移轉、增生情況，而前列腺癌細胞容易轉移至骨頭，將癌細胞植入脛骨 (intratibial injection)

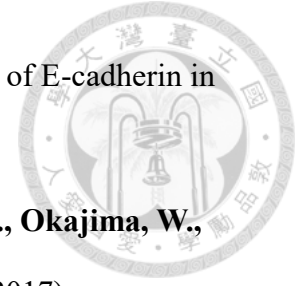
則有助於檢視 DU145 和 PC-3 的骨溶蝕 (osteolysis) 能力 (Dai *et al.*, 2016)，藉此觀察 CTEN 是否影響前列腺癌細胞轉移與侵襲。

本篇研究花了極大篇幅來闡述 CTEN 於前列腺上皮細胞的功能，關於 CTEN 的轉錄調控機制則較少著墨，雖然我們發現 $\Delta Np63$ 結合於 CTEN 啟動子上的重要位點，然而 $\Delta Np63$ 廣泛存在於許多器官的上皮組織，推測應該仍存有前列腺組織特有的轉錄控模組，以維持 CTEN 在前列腺基底細胞的高度表達，近來研究發現 Nkx3.1 在前列腺上皮細胞中可以負向調控 CTEN 基因表現 (Dutta *et al.*, 2016)，Nkx3.1 基因表現具有前列腺特異性，是影響前列腺發展的重要轉錄調控因子，在成人前列腺組織中主要存在於管腔型細胞 (Bhatia-Gaur *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005; Dutta *et al.*, 2016; Kruithof-de Julio *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2009)，且有助於細胞分化為管腔細胞並維持前列腺組織的腔體空間 (Bhatia-Gaur *et al.*, 1999; Dutta *et al.*, 2016; Kruithof-de Julio *et al.*, 2013)，CTEN 很可能在 Nkx3.1 主導的細胞分化中受到負向調控，未來若能證實這層調控關係將有助於我們更清楚闡述 CTEN 於前列腺上皮細胞中所扮演的角色。

參考文獻



- 王乙暄 (2017)。CTEN 於細胞核中累積對腫瘤形成特性的影響。碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系。
- 李昌恆 (2014)。探討 Cten 與 β -catenin 和 α -actinin4 之間的交互作用及 Cten 於細胞質和細胞核間穿梭的機制。碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系。
- 林芷萱 (2017) 表皮生長因子促進 *CTEN* 基因表達及磷酸化之調控機制。碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系。
- 邱品慈 (2016) 探討細胞核中 CTEN 參與調控 NF- κ B 及 ER α 訊號反易路徑之功能。碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系。
- 張佳鈞 (2013)。表皮生長因子促進 *Cten* 基因表現之機制探討。碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系。
- 莊惟 (2015)。CTEN 於細胞核中的功能探討。碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系。
- 楊寬 (2014)。前列腺細胞中 Δ Np63 α 調控 *CTEN* 基因進而參與細胞貼附與遷徙機制。碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系。
- 劉益洲 (2015)。p300 參與表皮生長因子促進 *CTEN* 基因表現之調控機制。碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系。
- Akhtar, N., and Streuli, C.H. (2013). An integrin-ILK-microtubule network orients cell polarity and lumen formation in glandular epithelium. *Nat Cell Biol* 15, 17-27.
- Albasri, A., Al-Ghamdi, S., Fadhil, W., Aleskandarany, M., Liao, Y.C., Jackson, D., Lobo, D.N., Lo, S.H., Kumari, R., Durrant, L., *et al.* (2011). Cten signals through integrin-linked kinase (ILK) and may promote metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 30, 2997-3002.
- Albasri, A., Seth, R., Jackson, D., Benhasouna, A., Crook, S., Nateri, A.S., Chapman, R., and Ilyas, M. (2009). C-terminal Tensin-like (CTEN) is an



oncogene which alters cell motility possibly through repression of E-cadherin in colorectal cancer. *J Pathol* 218, 57-65.

Aratani, K., Komatsu, S., Ichikawa, D., Ohashi, T., Miyamae, M., Okajima, W., Imamura, T., Kiuchi, J., Nishibeppu, K., Kosuga, T., et al. (2017).

Overexpression of CTEN relates to tumor malignant potential and poor outcomes of adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Oncotarget* 8, 84112-84122.

Barbieri, I., Pensa, S., Pannellini, T., Quaglino, E., Maritano, D., Demaria, M.,

Voster, A., Turkson, J., Cavallo, F., Watson, C.J., et al. (2010). Constitutively active Stat3 enhances neu-mediated migration and metastasis in mammary tumors via upregulation of Cten. *Cancer Res* 70, 2558-2567.

Bastide, C., Bagnis, C., Mannoni, P., Hassoun, J., and Bladou, F. (2002). A Nod Scid mouse model to study human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 5, 311-315.

Bello-DeOcampo, D., Kleinman, H.K., Deocampo, N.D., and Webber, M.M. (2001).

Laminin-1 and $\alpha 6\beta 1$ integrin regulate acinar morphogenesis of normal and malignant human prostate epithelial cells. *Prostate* 46, 142-153.

Bello, D., Webber, M.M., Kleinman, H.K., Wartinger, D.D., and Rhim, J.S. (1997).

Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis* 18, 1215-1223.

Benzinger, A., Muster, N., Koch, H.B., Yates, J.R., and Hermeking, H. (2005).

Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. *Mol Cell Proteomics* 4, 785-795.

Bhatia-Gaur, R., Donjacour, A.A., Sciavolino, P.J., Kim, M., Desai, N., Young, P.,

Norton, C.R., Gridley, T., Cardiff, R.D., Cunha, G.R., et al. (1999). Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev* 13, 966-977.

Blangy, A. (2017). Tensins are versatile regulators of Rho GTPase signalling and cell

adhesion. *Biol Cell* 109, 115-126.

Bonkhoff, H., Stein, U., and Remberger, K. (1994). The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. *Prostate* 24, 114-118.

Bonkhoff, H., Wernert, N., Dhom, G., and Remberger, K. (1991). Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Prostate* 19, 91-98.

Briknarova, K., Nasertorabi, F., Havert, M.L., Eggleston, E., Hoyt, D.W., Li, C.L., Olson, A.J., Vuori, K., and Ely, K.R. (2005). The serine-rich domain from Crk-associated substrate (p130cas) is a four-helix bundle. *J Biol Chem* 280, 21908-21914.

Bruni-Cardoso, A., and Carvalho, H.F. (2007). Dynamics of the epithelium during canalization of the rat ventral prostate. *Anat Rec* 290, 1223-1232.

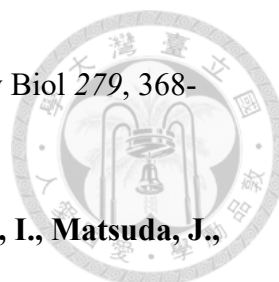
Cao, X., Voss, C., Zhao, B., Kaneko, T., and Li, S.S.-C. (2012). Differential regulation of the activity of deleted in liver cancer 1 (DLC1) by tensins controls cell migration and transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1455-1460.

Carroll, D.K., Carroll, J.S., Leong, C.O., Cheng, F., Brown, M., Mills, A.A., Brugge, J.S., and Ellisen, L.W. (2006). p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells. *Nat Cell Biol* 8, 551-561.

Chen, H., Mutton, L.N., Prins, G.S., and Bieberich, C.J. (2005). Distinct regulatory elements mediate the dynamic expression pattern of Nkx3.1. *Dev Dyn* 234, 961-973.

Chen, N.-T., Kuwabara, Y., Conley, C., Liao, Y.-C., Hong, S.-Y., Chen, M., Shih, Y.-P., Chen, H.-W., Hsieh, F., and Lo, S.H. (2013). Phylogenetic analysis, expression patterns, and transcriptional regulation of human CTEN gene. *Gene* 520, 90-97.

Chiang, M.K., Liao, Y.C., Kuwabara, Y., and Lo, S.H. (2005). Inactivation of tensin3



in mice results in growth retardation and postnatal lethality. *Dev Biol* 279, 368-377.

Cho, A.R., Uchio-Yamada, K., Torigai, T., Miyamoto, T., Miyoshi, I., Matsuda, J., Kurosawa, T., Kon, Y., Asano, A., Sasaki, N., et al. (2006). Deficiency of the *tenascin2* gene in the ICGN mouse: an animal model for congenital nephrotic syndrome. *Mamm Genome* 17, 407-416.

Clements, S.E., Techanukul, T., Lai-Cheong, J.E., Mee, J.B., South, A.P., Pourreyron, C., Burrows, N.P., Mellerio, J.E., and McGrath, J.A. (2012). Mutations in AEC syndrome skin reveal a role for p63 in basement membrane adhesion, skin barrier integrity and hair follicle biology. *Br J Dermatol* 167, 134-144.

Collins, A.T., Habib, F.K., Maitland, N.J., and Neal, D.E. (2001). Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci* 114, 3865-3872.

Dai, J., Hensel, J., Wang, N., Kruithof-de Julio, M., and Shiozawa, Y. (2016). Mouse models for studying prostate cancer bone metastasis. *BoneKEy Rep* 5, 777.

Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2003). Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 30, 256-268.

Deevi, R.K., Cox, O.T., and O'Connor, R. (2014). Essential function for PDLIM2 in cell polarization in three-dimensional cultures by feedback regulation of the β 1-integrin-RhoA signaling axis. *Neoplasia* 16, 422-431.

Dutta, A., Le Magnen, C., Mitrofanova, A., Ouyang, X.S., Califano, A., and Abate-Shen, C. (2016). Identification of an NKX3.1-G9a-UTY transcriptional regulatory network that controls prostate differentiation. *Science* 352, 1576-1580.

El-Alfy, M., Pelletier, G., Hermo, L.S., and Labrie, F. (2000). Unique features of the

basal cells of human prostate epithelium. *Microsc Res Tech* 51, 436-446.

Figel, S., and Gelman, I.H. (2011). Focal adhesion kinase controls prostate cancer progression via intrinsic kinase and scaffolding functions. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 11, 607-616.

Frank, S.B., and Miranti, C.K. (2013). Disruption of prostate epithelial differentiation pathways and prostate cancer development. *Front Oncol* 3, 273.

Gao, N., Ishii, K., Mirosevich, J., Kuwajima, S., Oppenheimer, S.R., Roberts, R.L., Jiang, M., Yu, X., Shappell, S.B., Caprioli, R.M., et al. (2005). Forkhead box A1 regulates prostate ductal morphogenesis and promotes epithelial cell maturation. *Development* 132, 3431-3443.

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K.M. (2001). Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 793-805.

Georgiadou, M., and Ivaska, J. (2017). Tensins: Bridging AMP-Activated Protein Kinase with Integrin Activation. *Trends in Cell Biol* 27, 703-711.

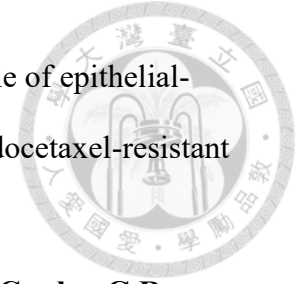
Goldstein, A.S., Huang, J.T., Guo, C.Y., Garraway, I.P., and Witte, O.N. (2010). Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science* 329, 568-571.

Grossmann, A., Benlasfer, N., Birth, P., Hegele, A., Wachsmuth, F., Apelt, L., and Stelzl, U. (2015). Phospho-tyrosine dependent protein-protein interaction network. *Mol Syst Biol* 11, 794.

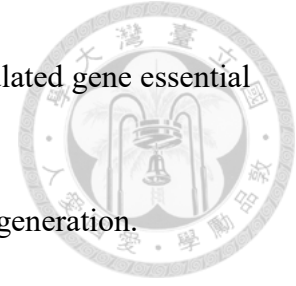
Guo, C., Liu, H., Zhang, B., Cadaneanu, R.M., Mayle, A.M., and Garraway, I.P. (2012). Epcam, cd44, and cd49f distinguish sphere-forming human prostate basal cells from a subpopulation with predominant tubule initiation capability. *PLoS One* 7.

Hajra, K.M., Chen, D.Y.S., and Fearon, E.R. (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 62, 1613-1618.

Hanrahan, K., O'Neill, A., Prencipe, M., Bugler, J., Murphy, L., Fabre, A., Puhr,



- M., Culig, Z., Murphy, K., and Watson, R.W.** (2017). The role of epithelial-mesenchymal transition drivers ZEB1 and ZEB2 in mediating docetaxel-resistant prostate cancer. *Mol Oncol* *11*, 251-265.
- Hayashi, N., Sugimura, Y., Kawamura, J., Donjacour, A.A., and Cunha, G.R.** (1991). Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod* *45*, 308-321.
- Haynie, D.T.** (2014). Molecular physiology of the tensin brotherhood of integrin adaptor proteins. *Proteins* *82*, 1113-1127.
- Heer, R., Collins, A.T., Robson, C.N., Shenton, B.K., and Leung, H.Y.** (2006). KGF suppresses alpha(2)beta(1) integrin function and promotes differentiation of the transient amplifying population in human prostatic epithelium. *J Cell Sci* *119*, 1416-1424.
- Hong, S.Y., Shih, Y.P., Li, T., Carraway, K.L., 3rd, and Lo, S.H.** (2013). CTEN prolongs signaling by EGFR through reducing its ligand-induced degradation. *Cancer Res* *73*, 5266-5276.
- Horton, E.R., Byron, A., Askari, J.A., Ng, D.H.J., Millon-Frémillon, A., Robertson, J., Koper, E.J., Paul, N.R., Warwood, S., Knight, D., et al.** (2015). Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol* *17*, 1577-1587.
- Hudson, D.L., Guy, A.T., Fry, P., O'Hare, M.J., Watt, F.M., and Masters, J.R.W.** (2001). Epithelial Cell Differentiation Pathways in the Human Prostate: Identification of Intermediate Phenotypes by Keratin Expression. *J Histochem Cytochem* *49*, 271-278.
- Hung, S.-Y., Shih, Y.-P., Chen, M., and Lo, S.H.** (2013). Up-regulated cten by FGF2 contributes to FGF2-mediated cell migration. *Mol Carcinog* *53*, 787-792.
- Ihrie, R.A., Marques, M.R., Nguyen, B.T., Horner, J.S., Papazoglu, C., Bronson,**



- R.T., Mills, A.A., and Attardi, L.D.** (2005). Perp is a p63-regulated gene essential for epithelial integrity. *Cell* 120, 843-856.
- Ishii, A., and Lo, S.H.** (2001). A role of tensin in skeletal-muscle regeneration. *Biochem J* 356, 737-745.
- Johnson, T.R., Khandrika, L., Kumar, B., Venezia, S., Koul, S., Chandhoke, R., Maroni, P., Donohue, R., Meacham, R.B., and Koul, H.K.** (2008). Focal adhesion kinase controls aggressive phenotype of androgen-independent prostate cancer. *Mol Cancer Res* 6, 1639-1648.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A.** (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428.
- Karthaus, W.R., Iaquinta, P.J., Drost, J., Gracanin, A., Van Boxtel, R., Wongvipat, J., Dowling, C.M., Gao, D., Begthel, H., Sachs, N., et al.** (2014). Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell* 159, 163-175.
- Kato, T., Kurosawa, T.M., and Taketo, M.M.** (2009). Proteinuria-induced chronic kidney disease in the ICGN/Oa mice with a mutation of tensin2 gene. *Ren Fail* 31, 229-238.
- Kato, T., Mizuno-Horikawa, Y., and Mizuno, S.** (2011). Decreases in podocin, CD2-associated protein (CD2AP) and tensin2 may be involved in albuminuria during septic acute renal failure. *J Vet Med Sci* 73, 1579-1584.
- Kato, T., Mizuno, S., and Ito, A.** (2014). A decrease in glomerular endothelial cells and endothelial-mesenchymal transition during glomerulosclerosis in the tensin2-deficient mice (ICGN strain). *Acta Histochem Cytochem* 47, 265-271.
- Kato, T., Mizuno, S., Taketo, M.M., and Kurosawa, T.M.** (2008). The possible involvement of tensin2 in the expression and extension of nephrin by glomerular podocytes in mice. *Biomed Res* 29, 279-287.

Katz, M., Amit, I., Citri, A., Shay, T., Carvalho, S., Lavi, S., Milanezi, F., Lyass, L.,

Amariglio, N., Jacob-Hirsch, J., et al. (2007). A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. *Nat Cell Biol* 9, 961-969.

Kawano, Y., Kitaoka, M., Hamada, Y., Walker, M.M., Waxman, J., and Kypta,

R.M. (2006). Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by Dickkopf-3. *Oncogene* 25, 6528-6537.

Kouwenhoven, E.N., Oti, M., Niehues, H., van Heeringen, S.J., Schalkwijk, J.,

Stunnenberg, H.G., van Bokhoven, H., and Zhou, H. (2015). Transcription factor p63 bookmarks and regulates dynamic enhancers during epidermal differentiation. *EMBO Rep* 16, 863-878.

Kruithof-de Julio, M., Shibata, M., Desai, N., Reynon, M., Halili, M.V., Hu, Y.P.,

Price, S.M., Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2013). Canonical Wnt signaling regulates Nkx3.1 expression and luminal epithelial differentiation during prostate organogenesis. *Dev Dyn* 242, 1160-1171.

Kurita, T., Medina, R.T., Mills, A.A., and Cunha, G.R. (2004). Role of p63 and basal cells in the prostate. *Development* 131, 4955-4964.

Kwon, S.-H., Nedvetsky, P.I., and Mostov, K.E. (2011). Transcriptional profiling identifies TNS4 function in epithelial tubulogenesis. *Curr Biol* 21, 161-166.

Lacoste, J., Aprikian, A.G., and Chevalier, S. (2005). Focal adhesion kinase is required for bombesin-induced prostate cancer cell motility. *Mol Cell Endocrinol* 235, 51-61.

Lamb, L.E., Knudsen, B.S., and Miranti, C.K. (2010). E-cadherin-mediated survival of androgen-receptor-expressing secretory prostate epithelial cells derived from a stratified in vitro differentiation model. *J Cell Sci* 123, 266-276.

Lawson, D.A., Xin, L., Lukacs, R.U., Cheng, D.H., and Witte, O.N. (2007). Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. *Proc Natl Acad Sci U*

S A *104*, 181-186.

Lawson, D.A., Zong, Y., Memarzadeh, S., Xin, L., Huang, J.T., and Witte, O.N.

(2010). Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation.

Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 2610-2615.

Li, Y., Mizokami, A., Izumi, K., Narimoto, K., Shima, T., Zhang, J., Dai, J., Keller,

E.T., and Namiki, M. (2010). CTEN/tensin 4 expression induces sensitivity to paclitaxel in prostate cancer. *Prostate* *70*, 48-60.

Liao, Y.-C., Chen, N.-T., Shih, Y.-P., Dong, Y., and Lo, S.H. (2009). Up-regulation of

C-terminal tensin-like molecule promotes the tumorigenicity of colon cancer through β -catenin. *Cancer Res* *69*, 4563-4566.

Liao, Y.-C., Si, L., White, R.W.D., and Lo, S.H. (2007). The phosphotyrosine-

independent interaction of DLC-1 and the SH2 domain of cten regulates focal adhesion localization and growth suppression activity of DLC-1. *J Cell Biol* *176*, 43-49.

Litvinov, I.V., Vander Griend, D.J., Xu, Y., Antony, L., Dalrymple, S.L., and Isaacs,

J.T. (2006). Low-calcium serum-free defined medium selects for growth of normal prostatic epithelial stem cells. *Cancer Res* *66*, 8598-8607.

Lo, S.-S., Lo, S.H., and Lo, S.H. (2005). Cleavage of cten by caspase-3 during

apoptosis. *Oncogene* *24*, 4311-4314.

Lo, S.H. (2014). C-terminal tensin-like (CTEN): A promising biomarker and target for

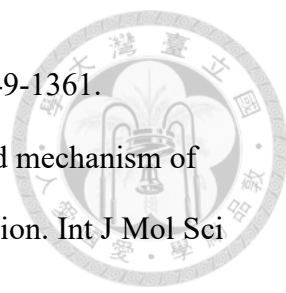
cancer. *Int J Biochem Cell Biol* *51*, 150-154.

Lo, S.H. (2017). Tensins. *Curr Biol* *27*, R331-R332.

Lo, S.H., and Lo, T.B. (2002). Cten, a COOH-terminal tensin-like protein with prostate

restricted expression, is down-regulated in prostate cancer. *Cancer Res* *62*, 4217-4221.

Lo, S.H., Yu, Q.C., Degenstein, L., Chen, L.B., and Fuchs, E. (1997). Progressive

- 
- kidney degeneration in mice lacking tensin. *J Cell Biol* 136, 1349-1361.
- Lo, U.G., Lee, C.F., Lee, M.S., and Hsieh, J.T.** (2017). The role and mechanism of epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer progression. *Int J Mol Sci* 18.
- Lu, X., Gao, J., Zhang, Y., Zhao, T., Cai, H., and Zhang, T.** (2018). CTEN induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis in non small cell lung cancer cells. *PLoS One* 13, e0198823.
- Machida, K., Thompson, C.M., Dierck, K., Jablonowski, K., Kärkkäinen, S., Liu, B., Zhang, H., Nash, P.D., Newman, D.K., Nollau, P., et al.** (2007). High-throughput phosphotyrosine profiling using SH2 domains. *Mol Cell* 26, 899-915.
- Martynova, E., Pozzi, S., Basile, V., Dolfini, D., Zambelli, F., Imbriano, C., Pavesi, G., and Mantovani, R.** (2012). Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63. *Oncotarget* 3, 132-143.
- McDade, S.S., Henry, A.E., Pivato, G.P., Kozarewa, I., Mitsopoulos, C., Fenwick, K., Assiotis, I., Hakas, J., Zvelebil, M., Orr, N., et al.** (2012). Genome-wide analysis of p63 binding sites identifies AP-2 factors as co-regulators of epidermal differentiation. *Nucleic Acids Res* 40, 7190-7206.
- McDade, S.S., Patel, D., Moran, M., Campbell, J., Fenwick, K., Kozarewa, I., Orr, N.J., Lord, C.J., Ashworth, A.A., and McCance, D.J.** (2014). Genome-wide characterization reveals complex interplay between TP53 and TP63 in response to genotoxic stress. *Nucleic Acids Res* 42, 6270-6285.
- McNeal, J.E.** (1988). Normal Histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 12, 619-633.
- McNeal, J.E., Redwine, E.A., Freiha, F.S., and Stamey, T.A.** (1988). Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol* 12, 897-906.
- Mirosevich, J., Gao, N., Gupta, A., Shappell, S.B., Jove, R., and Matusik, R.J.**

(2006). Expression and role of foxa proteins in prostate cancer. *Prostate* 66, 1013-1028.

Muharram, G., Sahgal, P., Korpela, T., De Franceschi, N., Kaukonen, R., Clark, K., Tulasne, D., Carpén, O., and Ivaska, J. (2014). Tensin-4-dependent MET stabilization is essential for survival and proliferation in carcinoma cells. *Dev Cell*.

Olsen, J.R., Oyan, A.M., Rostad, K., Hellem, M.R., Liu, J., Li, L., Micklem, D.R., Haugen, H., Lorens, J.B., Rotter, V., et al. (2013). p63 attenuates epithelial to mesenchymal potential in an experimental prostate cell model. *PLoS One* 8, e62547.

Packer, J.R., and Maitland, N.J. (2016). The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* 1863, 1238-1260.

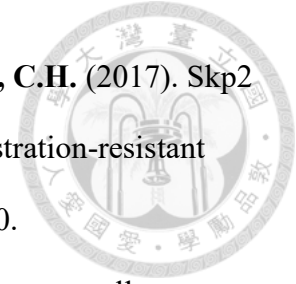
Pearson, J.F., Hughes, S., Chambers, K., and Lang, S.H. (2009). Polarized fluid movement and not cell death, creates luminal spaces in adult prostate epithelium. *Cell Death Differ* 16, 475-482.

Pritchard, C., Mecham, B., Dumpit, R., Coleman, I., Bhattacharjee, M., Chen, Q., Sikes, R.A., and Nelson, P.S. (2009). Conserved gene expression programs integrate mammalian prostate development and tumorigenesis. *Cancer Res* 69, 1739-1747.

Reiter, R.E., Gu, Z.N., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Le Beau, M.M., et al. (1998). Prostate stem cell antigen: A cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1735-1740.

Romero, D., Kawano, Y., Bengoa, N., Walker, M.M., Maltry, N., Niehrs, C., Waxman, J., and Kypta, R. (2013). Downregulation of Dickkopf-3 disrupts prostate acinar morphogenesis through TGF-beta/Smad signalling. *J Cell Sci* 126, 1858-1867.

Ruan, D., He, J., Li, C.F., Lee, H.J., Liu, J., Lin, H.K., and Chan, C.H. (2017). Skp2 deficiency restricts the progression and stem cell features of castration-resistant prostate cancer by destabilizing Twist. *Oncogene* 36, 4299-4310.



Rybak, A.P., Bristow, R.G., and Kapoor, A. (2015). Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget* 6, 1900-1919.

Schaeffer, E.M., Marchionni, L., Huang, Z., Simons, B., Blackman, A., Yu, W., Parmigiani, G., and Berman, D.M. (2008). Androgen-induced programs for prostate epithelial growth and invasion arise in embryogenesis and are reactivated in cancer. *Oncogene* 27, 7180-7191.

Seo, E.Y., Jin, S.-P., Kim, Y.K., Lee, H., Han, S., Lee, D.H., and Chung, J.H. (2016). Integrin- β 4-TNS4-focal adhesion kinase signaling mediates keratinocyte proliferation in human skin. *J Invest Dermatol*, doi: 10.1016/j.jid.2016.10.039.

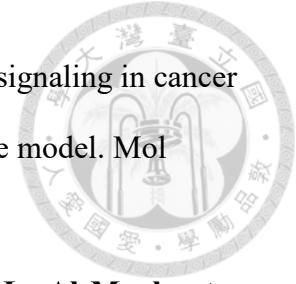
Seo, E.Y., Lee, D.H., Lee, Y., Cho, K.H., Eun, H.C., and Chung, J.H. (2012). Microarray analysis reveals increased expression of Delta Np63 alpha in seborrhoeic keratosis. *Br J Dermatol* 166, 337-342.

Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 24, 1967-2000.

Signoretti, S., Pires, M.M., Lindauer, M., Horner, J.W., Grisanzio, C., Dhar, S., Majumder, P., McKeon, F., Kantoff, P.W., Sellers, W.R., et al. (2005). p63 regulates commitment to the prostate cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11355-11360.

Signoretti, S., Waltregny, D., Dilks, J., Isaac, B., Lin, D., Garraway, L., Yang, A., Montironi, R., McKeon, F., and Loda, M. (2000). p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol* 157, 1769-1775.

Slack-Davis, J.K., Hershey, E.D., Theodorescu, D., Frierson, H.F., and Parsons,



J.T. (2009). Differential requirement for focal adhesion kinase signaling in cancer progression in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Mol Cancer Ther* 8, 2470-2477.

- Stagno, M.J., Zacharopoulou, N., Bochem, J., Tsapara, A., Pelzl, L., Al-Maghout, T., Kallergi, G., Alkahtani, S., Alevizopoulos, K., Dimas, K., et al.** (2017). Istaroxime inhibits motility and down-regulates Orai1 expression, SOCE and FAK phosphorylation in prostate cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 42, 1366-1376.
- Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H., and Paulson, D.F.** (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21, 274-281.
- Stoyanova, T., Cooper, A.R., Drake, J.M., Liu, X., Armstrong, A.J., Pienta, K.J., Zhang, H., Kohn, D.B., Huang, J., Witte, O.N., et al.** (2013). Prostate cancer originating in basal cells progresses to adenocarcinoma propagated by luminal-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 20111-20116.
- Strand, D.W., and Goldstein, A.S.** (2015). The many ways to make a luminal cell and a prostate cancer cell. *Endocr Relat Cancer* 22, T187-T197.
- Thorpe, H., Asiri, A., Akhlaq, M., and Ilyas, M.** (2017). Cten promotes epithelial-mesenchymal transition through the post-transcriptional stabilization of Snail. *Mol Carcinog* 56, 2601-2609.
- Toivanen, R., and Shen, M.M.** (2017). Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development* 144, 1382-1398.
- Tokar, E.J., Ancrile, B.B., Cunha, G.R., and Webber, M.M.** (2005). Stem/progenitor and intermediate cell types and the origin of human prostate cancer. *Differentiation; research in biological diversity* 73, 463-473.
- Touaitahuata, H., Morel, A., Urbach, S., Mateos-Langerak, J., de Rossi, S., and Blangy, A.** (2016). Tensin 3 is a new partner of Dock5 that controls osteoclast

podosome organization and activity. *J Cell Sci* 129, 3449-3461.

Tran, C.P., Lin, C., Yamashiro, J., and Reiter, R.E. (2002). Prostate stem cell antigen is a marker of late intermediate prostate epithelial cells. *Mol Cancer Res* 1, 113-121.

Tyson, D.R., Inokuchi, J., Tsunoda, T., Lau, A., and Ornstein, D.K. (2007). Culture requirements of prostatic epithelial cell lines for acinar morphogenesis and lumen formation in vitro: role of extracellular calcium. *Prostate* 67, 1601-1613.

van Leenders, G., Gage, W.R., Hicks, J.L., van Balken, B., Aalders, T.W., Schalken, J.A., and De Marzo, A. (2003). Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am J Pathol* 162, 1529-1537.

Walker, S., Foster, F., Wood, A., Owens, T., Brennan, K., Streuli, C.H., and Gilmore, A.P. (2016). Oncogenic activation of FAK drives apoptosis suppression in a 3D-culture model of breast cancer initiation. *Oncotarget* 7, 70336-70352.

Wang, W., Wang, L., Mizokami, A., Shi, J., Zou, C., Dai, J., Keller, E.T., Lu, Y., and Zhang, J. (2017). Down-regulation of E-cadherin enhances prostate cancer chemoresistance via Notch signaling. *Chin J Cancer* 36, 35.

Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K.D., Walker, D., Yu, H.L., Halili, M.V., Hu, Y.P., Price, S.M., Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2009). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature* 461, 495-500.

Wang, Y.Z., Hayward, S.W., Cao, M., Thayer, K.A., and Cunha, G.R. (2001). Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation* 68, 270-279.

Wang, Z.A., Toivanen, R., Bergren, S.K., Chambon, P., and Shen, M.M. (2014). Luminal cells are favored as the cell of origin for prostate cancer. *Cell Rep* 8, 1339-1346.

Webber, M.M., Bello, D., Kleinman, H.K., and Hoffman, M.P. (1997). Acinar differentiation by non-malignant immortalized human prostatic epithelial cells and

its loss by malignant cells. *Carcinogenesis* 18, 1225-1231.

Wehrle-Haller, B. (2012). Structure and function of focal adhesions. *Curr Opin Cell Biol* 24, 116-124.

Westfall, M.D., Mays, D.J., Sniezek, J.C., and Pietenpol, J.A. (2003). The $\Delta Np63\alpha$ phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 σ promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Mol Cell Biol* 23, 2264-2276.

Wozniak, M.A., Modzelewska, K., Kwong, L., and Keely, P.J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 1692, 103-119.

Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., and McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2, 305-316.

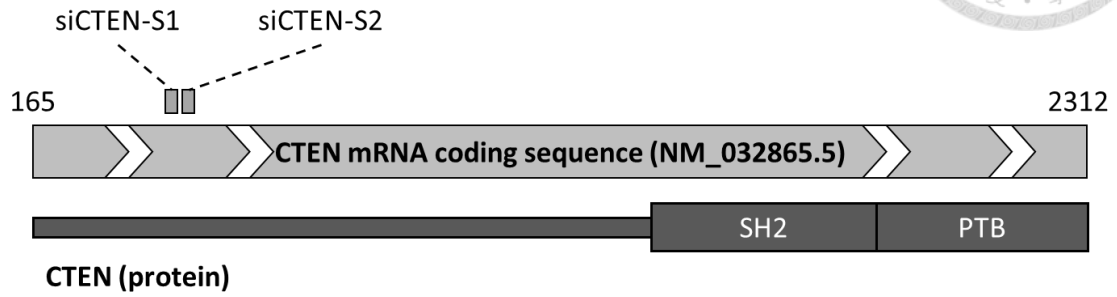
Yin, J., Pollock, C., Tracy, K., Chock, M., Martin, P., Oberst, M., and Kelly, K. (2007). Activation of the RalGEF/Ral pathway promotes prostate cancer metastasis to bone. *Mol Cell Biol* 27, 7538-7550.



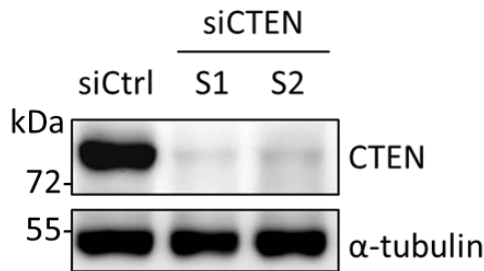


圖與表

(A)



(B)



(C)

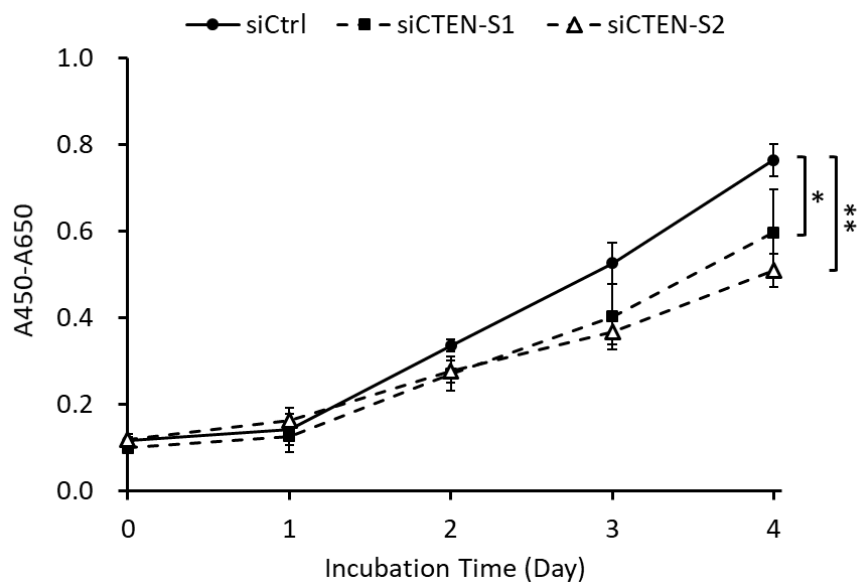
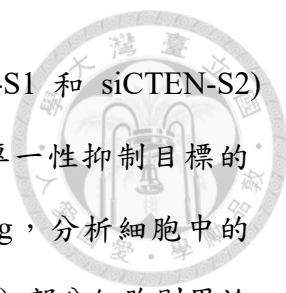


圖 1、觀察 CTEN 缺失對前列腺上皮細胞增生能力的影響

(A) 標示專一性抑制 CTEN 的 siRNA (siCTEN-S1, siCTEN-S2) 於 CTEN mRNA (NM_032865.5) 上的辨識位置，並同時標示 CTEN 之功能性區塊 SH2 和



PTB 的相對位置。(B) 將專一性抑制 CTEN 的 siRNA (siCTEN-S1 和 siCTEN-S2) 藉由 Lipofectamine 2000 轉染入 RWPE-1，siCtrl 設計為無專一性抑制目標的 siRNA，於轉染後 24 小時收取部分細胞進行 western blotting，分析細胞中的 CTEN 含量變化， α -tubulin 的含量高低作為 loading control。(C) 部分細胞則用於進行增生能力檢測，利用細胞對 WST-1 的代謝活性監測細胞生長狀況，以產物吸光值 $A_{450}-A_{650}$ 作為增生狀況指標。(結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示；使用 Student's t-test 分析，* : $p < 0.05$ ，** : $p < 0.01$)

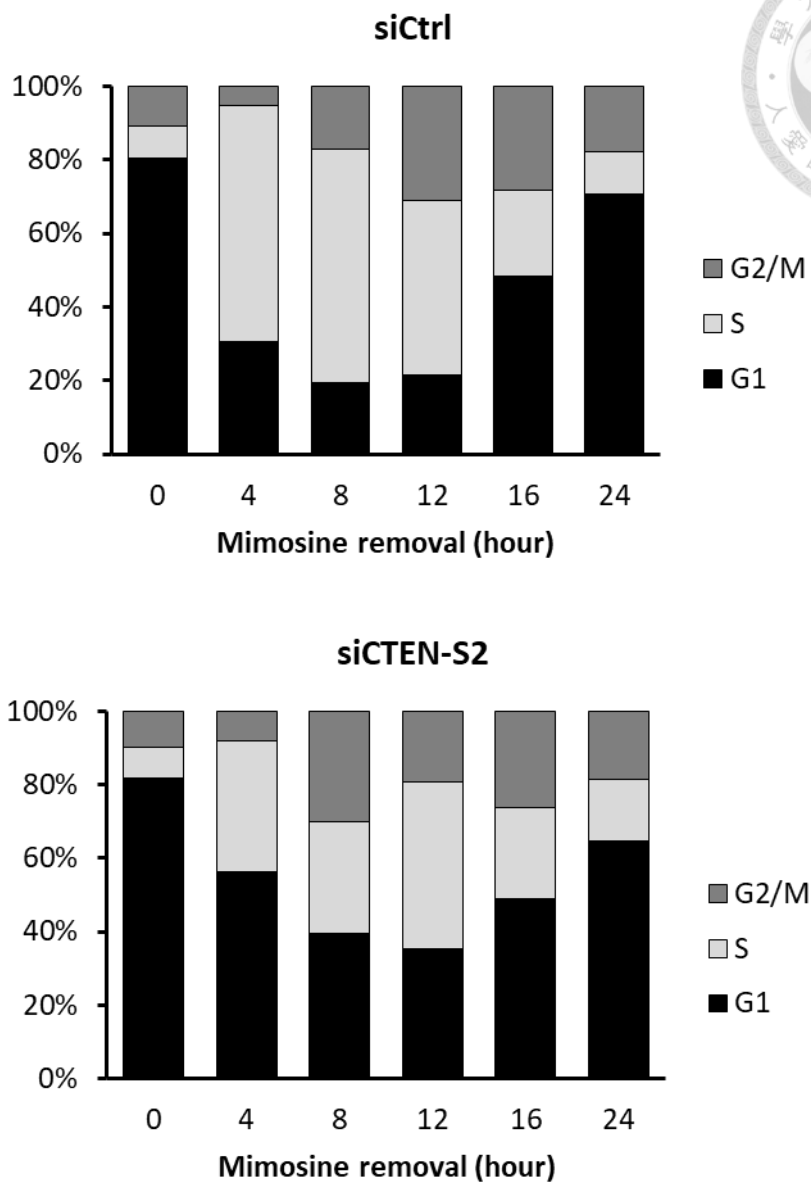


圖 2、CTEN 缺失對前列腺上皮細胞的細胞週期之影響

以 siCTEN-S2 抑制 CTEN，siCtrl 為負控制組，利用 thymidine 與 L-mimosine 處理 RWPE-1 使細胞停留在 G1 晚期，在移除 L-mimosine 後的 0、4、8、12、16、24 小時將細胞固定並以 PI 染 DNA，透過流式細胞儀分析細胞 PI 螢光訊號，將螢光訊號資料以 FlowJo 分析、推斷細胞週期分布。

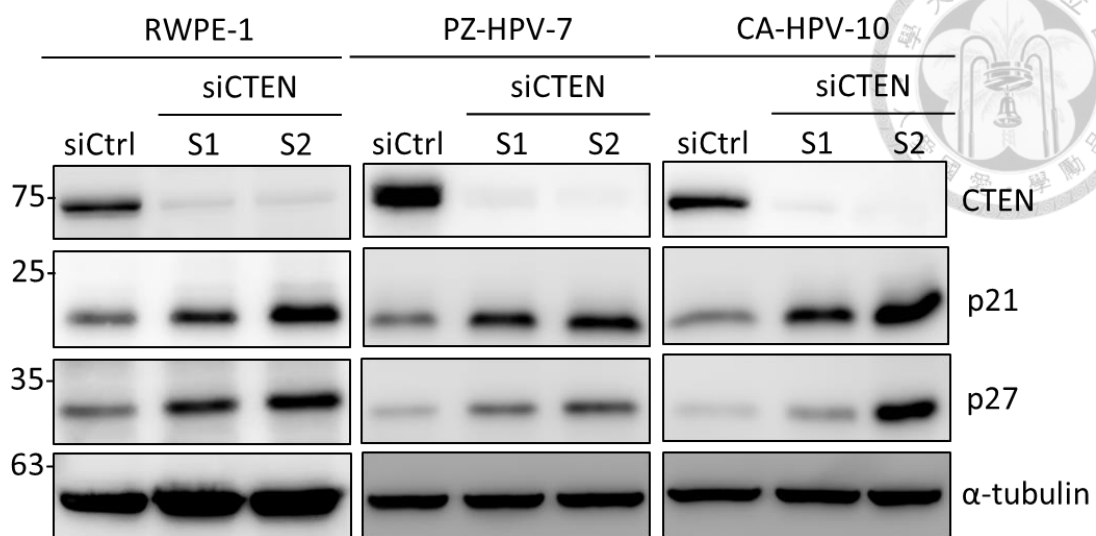


圖 3、CTEN 缺失對細胞週期相關調控因子的影響

將專一性抑制 CTEN 的 siRNA (siCTEN-S1 和 siCTEN-S2) 藉由 Lipofectamine 2000 轉染入 RWPE-1、PZ-HPV-7 和 CA-HPV-10，siCtrl 設計為無專一性抑制目標的 siRNA，於轉染後 48 小時收取細胞進行 western blotting，分析細胞中的 CTEN、p21 和 p27 的含量變化，α-tubulin 的含量高低作為 loading control。

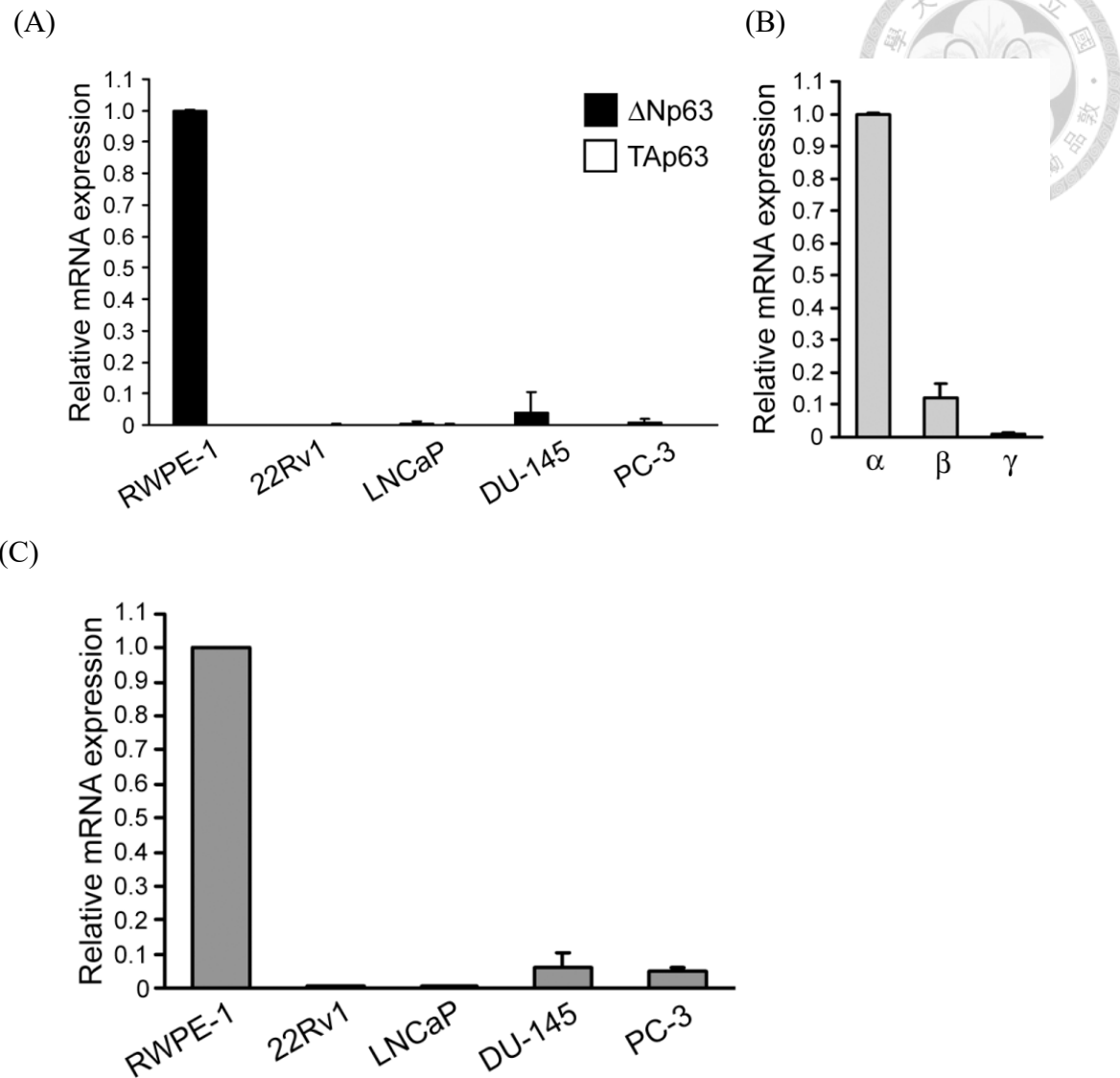


圖 4、比較前列腺上皮細胞中 p63 和 CTEN 的基因表現情形

(A) 以 real-time RT-PCR 分析前列腺細胞株中 Δ Np63 (■) 和 TAp63 (□) mRNA 的含量高低，RWPE-1 的 Δ Np63 mRNA 的含量為 1 進行相對表現量的計算。(B) 以 real-time RT-PCR 分析 RWPE-1 中 p63 α 、 β 、 γ mRNA 的含量高低，以 p63 α mRNA 的含量為 1 進行相對表現量的計算。(C) 以 real-time RT-PCR 分析前列腺細胞株中 CTEN mRNA 的含量高低，RWPE-1 的 CTEN mRNA 含量為 1 進行相對表現量的計算。(結果皆以 mean \pm SD 表示)

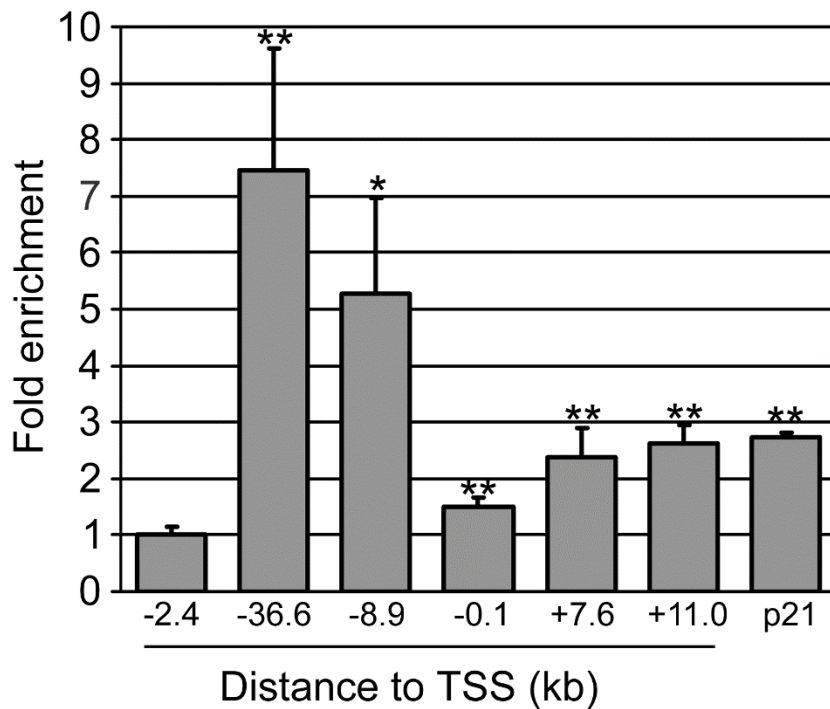
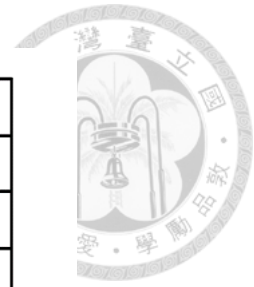


圖 5、以 ChIP-PCR 分析 Δ Np63 於 *CTEN* 基因座的結合情形

將 ChIP-PCR 的結果以個別 input 訊號進行歸一化，再以 Δ Np63 和 *CTEN* 啟動子上 -2420~-2300 的結合狀況為 1 計算其他區域結合狀況的增值倍率，-2.4 kb 為預期 Δ Np63 不結合區域，作為負控制組，*p21* 為 Δ Np63 目標基因，其啟動子作為正控制組。(結果以 mean \pm SD 表示；使用 Student's t-test 分析，*：p < 0.05，**：p < 0.01，相較於負控制組)

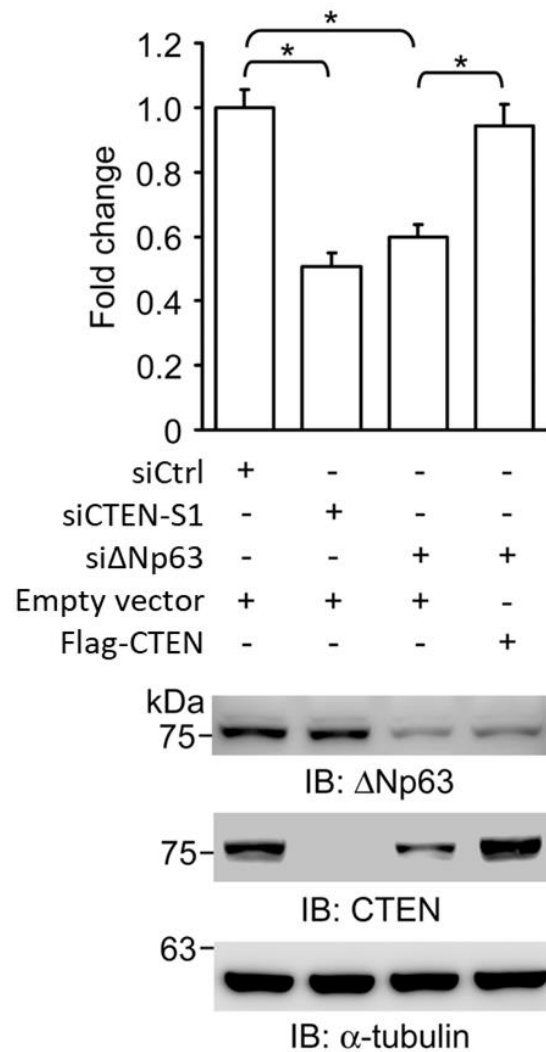


圖 6、缺乏 p63 和 CTEN 影響 RWPE-1 貼附於胞外基質 fibronectin 的能力

以 Lipofectamine 2000 將 siRNA 和 質體 DNA 同時轉染入 RWPE-1，於轉染後 48 小時將部分細胞改培養於有 fibronectin 塗層的細胞培養盤，1.5 小時之後以 PBS 洗去未貼附的細胞，留存下來的細胞以結晶紫染色並測定吸光值 A_{595} ，以對照組 (siCtrl 和 empty vector) 的吸光值為 1 計算其他實驗組的相對貼附情形。(結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示；使用 Student's t-test 分析，* : $p < 0.05$) 另外，於轉染後 48 小時收取部分細胞進行 western blotting，分析細胞中的 CTEN 和 ΔNp63 的含量變化， $\alpha\text{-tubulin}$ 的含量高低作為 loading control。

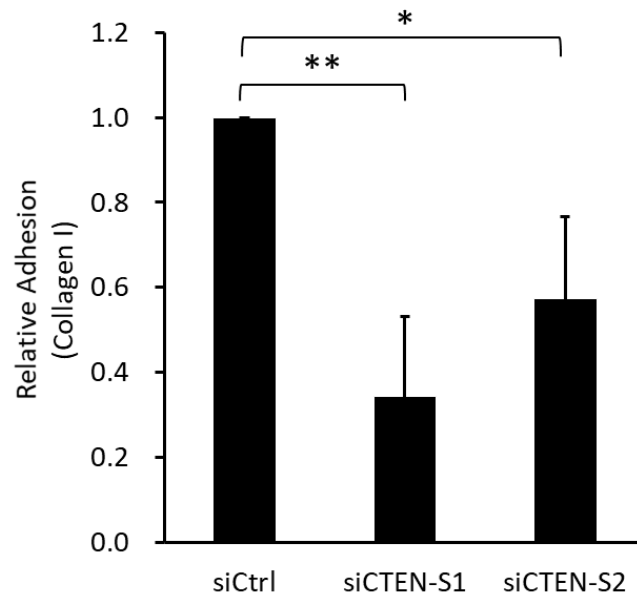
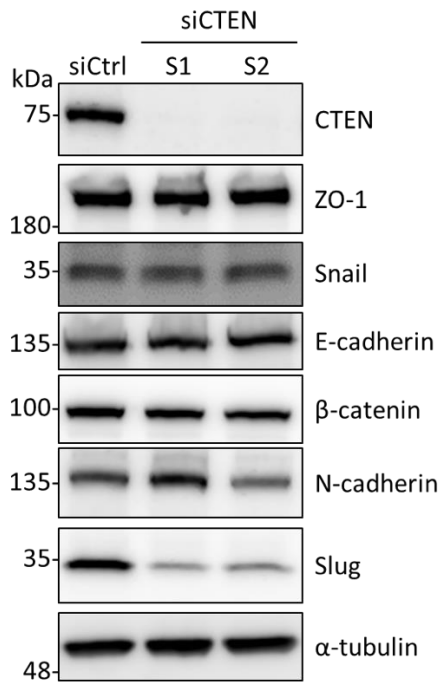


圖 7、CTEN 缺失影響細胞對胞外基質 collagen I 的貼附能力

以 Lipofectamine 2000 將 siRNA 轉染入 RWPE-1，於轉染後 48 小時將細胞改培養於有 collagen I 塗層的細胞培養盤，培養隔夜後以 0.025% trypsin 移除未緊密貼附的細胞，留存下來的細胞以結晶紫染色並測定吸光值 A_{595} ，以對照組 (siCtrl) 的吸光值為 1 計算其他實驗組的相對貼附情形。(結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示；使用 Student's t-test 分析，*： $p < 0.05$ ，**： $p < 0.01$)



(A)



(B)

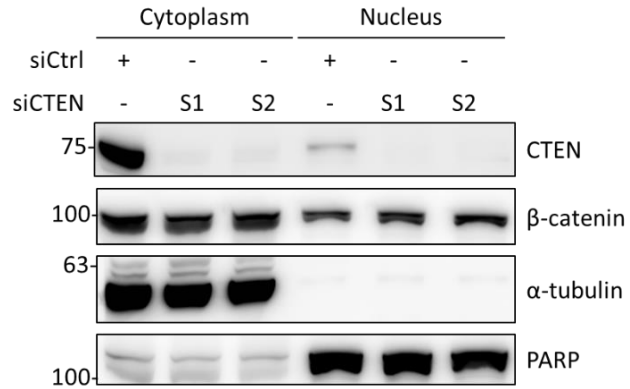
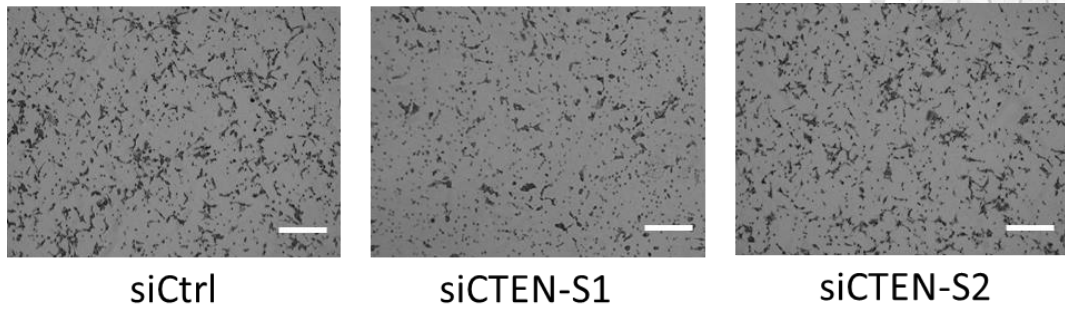


圖 8、CTEN 缺失對 EMT 相關生物指標的影響

(A) 使用 Lipofectamine 2000 將專一性抑制 CTEN 的 siRNA (siCTEN-S1 和 siCTEN-S2) 轉染入 RWPE-1，siCtrl 設計為無專一性抑制目標的 siRNA，於轉染後 48 小時收取細胞進行 western blotting，分析細胞中的 CTEN、ZO-1、Snail、E-cadherin、β-catenin、N-cadherin 和 Slug 含量變化，α-tubulin 的含量高低作為 loading control。(B) 於轉染 siRNA 進入 RWPE-1 後的 72 小時，收取細胞並將細胞質與細胞核分離，以 western blotting 分析細胞質與細胞核中 CTEN 和 β-catenin 含量變化，α-tubulin 作為細胞質的標記分子，poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 則作為細胞核標記分子。

(A)



(B)

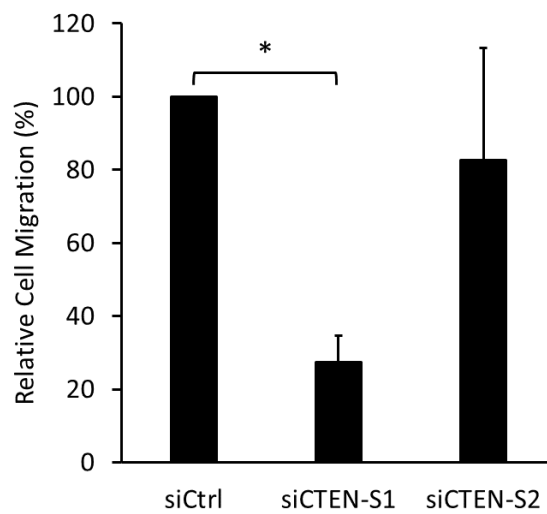


圖 9、CTEN 缺失對 RWPE-1 移動能力的影響

使用 Lipofectamine 2000 將專一性抑制 CTEN 的 siRNA (siCTEN-S1 和 siCTEN-S2) 轉染入 RWPE-1，siCtrl 設計為無專一性抑制目標的 siRNA，於轉染後 48 小時收取細胞進行細胞移動能力檢測 (transwell assay)，以 0.5% FBS 誘使細胞移動，24 小時後進行細胞染色、固定並移除未穿越薄膜的細胞，透過顯微鏡觀察細胞移動狀況 (A) (比例尺：250 μ m)，對照組 (siCtrl) 移動的細胞數作為 100%，評估細胞相對移動能力(B)(結果以 mean \pm SD 表示；使用 Student's t-test 分析，*：p < 0.05)

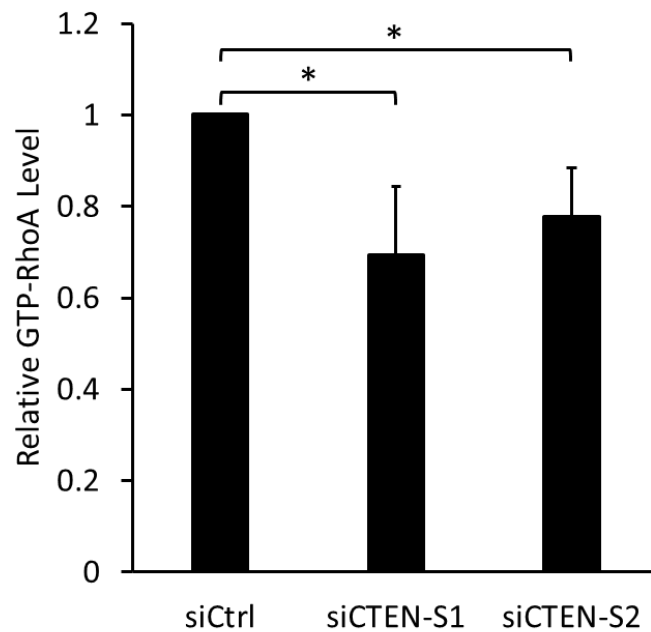


圖 10、CTEN 缺失對 RhoA 活化的影響

使用 Lipofectamine 2000 將專一性抑制 CTEN 的 siRNA (siCTEN-S1 和 siCTEN-S2) 轉染入 RWPE-1，siCtrl 設計為無專一性抑制目標的 siRNA，轉染後 24 小時進行 starvation 達 1 天，以 10% FBS 活化 RhoA 並收取細胞粗抽液，部分先進行 western blotting 分析細胞總 RhoA 含量，其餘大部分的粗抽液則進行 RhoA-GTP pull down assay，取得活化態 RhoA 再以 western blotting 分析含量，以總 RhoA 含量進行各實驗組結果歸一化，對照組歸一化數據 (siCtrl) 作為 1 計算其他實驗組的相對 RhoA 活化程度。(結果以 mean \pm SD 表示；使用 Student's t-test 分析，* : $p < 0.05$)

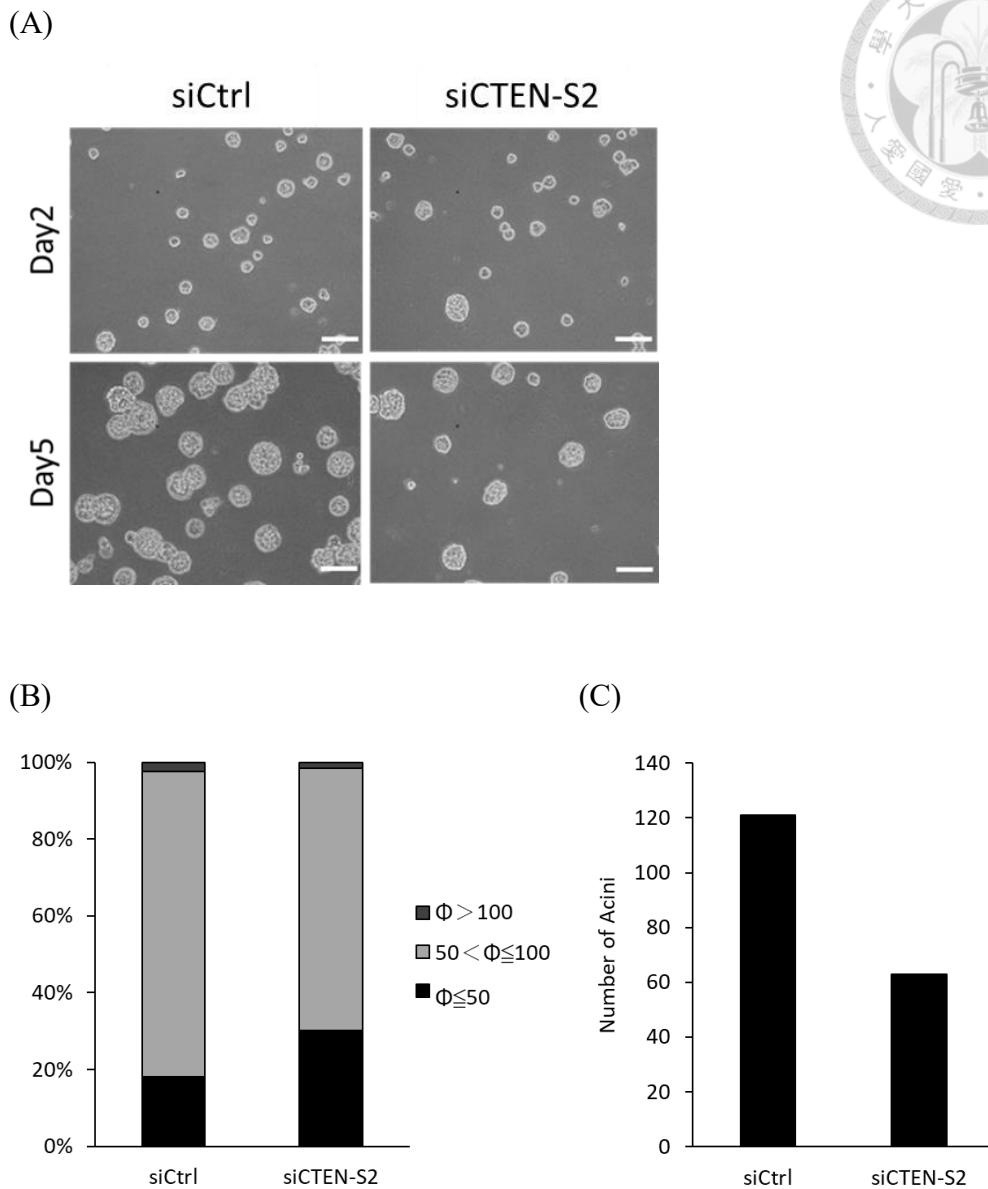


圖 11、以 siRNA 抑制 CTEN 基因表現，觀察對 RWPE-1 腺泡形成的影響

使用 Lipofectamine 2000 將專一性抑制 CTEN 的 siCTEN-S2 轉染入 RWPE-1，siCtrl 設計為無專一性抑制目標的 siRNA，於轉染後隔天將細胞培養在 matrigel 為基底的 3D 生長環境 (Day 0)，(A) 在第 2 和 5 天以光學顯微鏡觀察細胞生長情況 (比例尺：100 μm)，並分析第 5 天腺泡大小 (B) (以腺泡直徑分群，單位： μm) 以及數量 (C)。

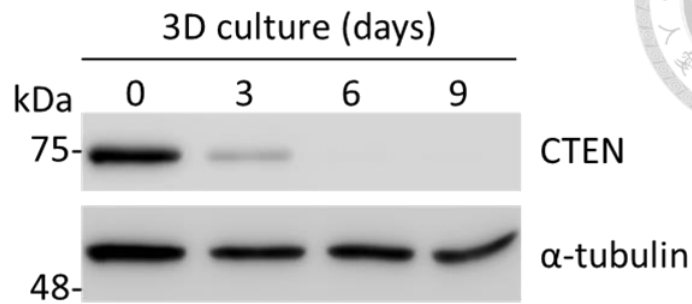


圖 12、於 3D 培養系統下 RWPE-1 的 CTEN 含量變化

將 RWPE-1 培養於底盤塗佈 matrigel 膠床的 24-well 培養盤，於培養 3、6、9 天後將細胞收取下來，並連同 3D 培養前的細胞（第 0 天）一起進行 western blotting，分析其中 CTEN 含量變化，以 α -tubulin 的含量高低作為 loading control。

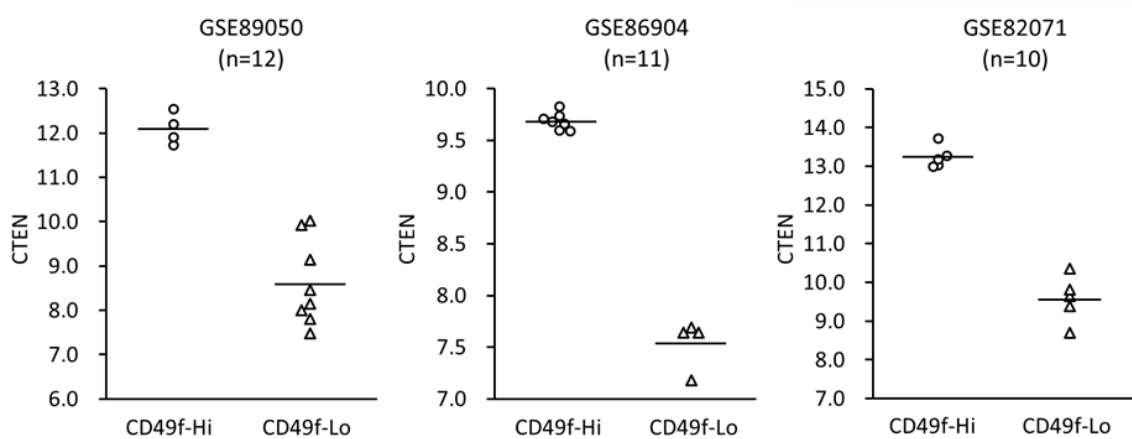


圖 13、比較基底型與管腔型前列腺上皮細胞間 CTEN 基因表現狀況

將各資料組 (GSE89050、GSE86904 和 GSE82071) 中的分析樣品依 CD49f 的表現量分為高表現量 CD49f-Hi (○) 和低表現量 CD49f-Lo (△) 兩組，將各別 CTEN 基因表現狀況以點狀圖表示，各分群 CTEN 表現狀況的平均值以橫桿 (—) 標示。

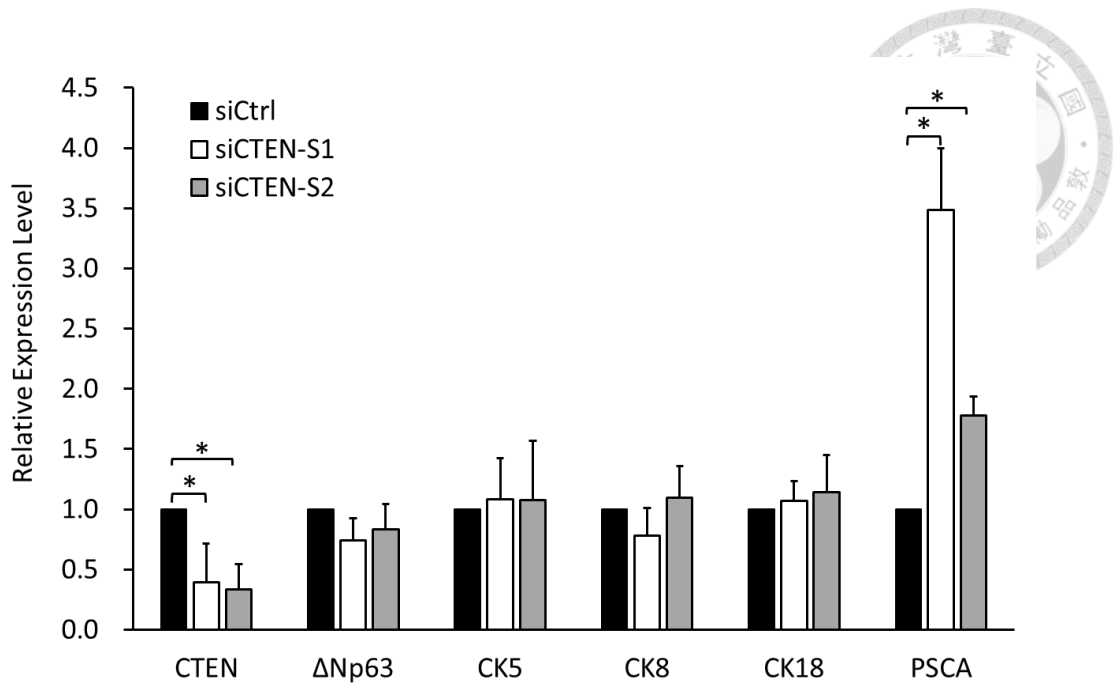


圖 14、CTEN 缺失對分化指標基因表現的影響

使用 Lipofectamine3000 將專一性抑制 CTEN 的 siRNA (siCTEN-S1 和 siCTEN-S2) 轉染入 RWPE-1，siCtrl 設計為無專一性抑制目標的 siRNA，於轉染後 6 天以 real-time RT-PCR 分析 CTEN、 Δ Np63、CK5、CK8、CK18 和 PSCA 的 mRNA 含量高低，對照組各個基因的 mRNA 含量為 1 計算相對基因表現狀況。(結果以 mean \pm SD 表示；使用 Student's t-test 分析，*：p < 0.05)

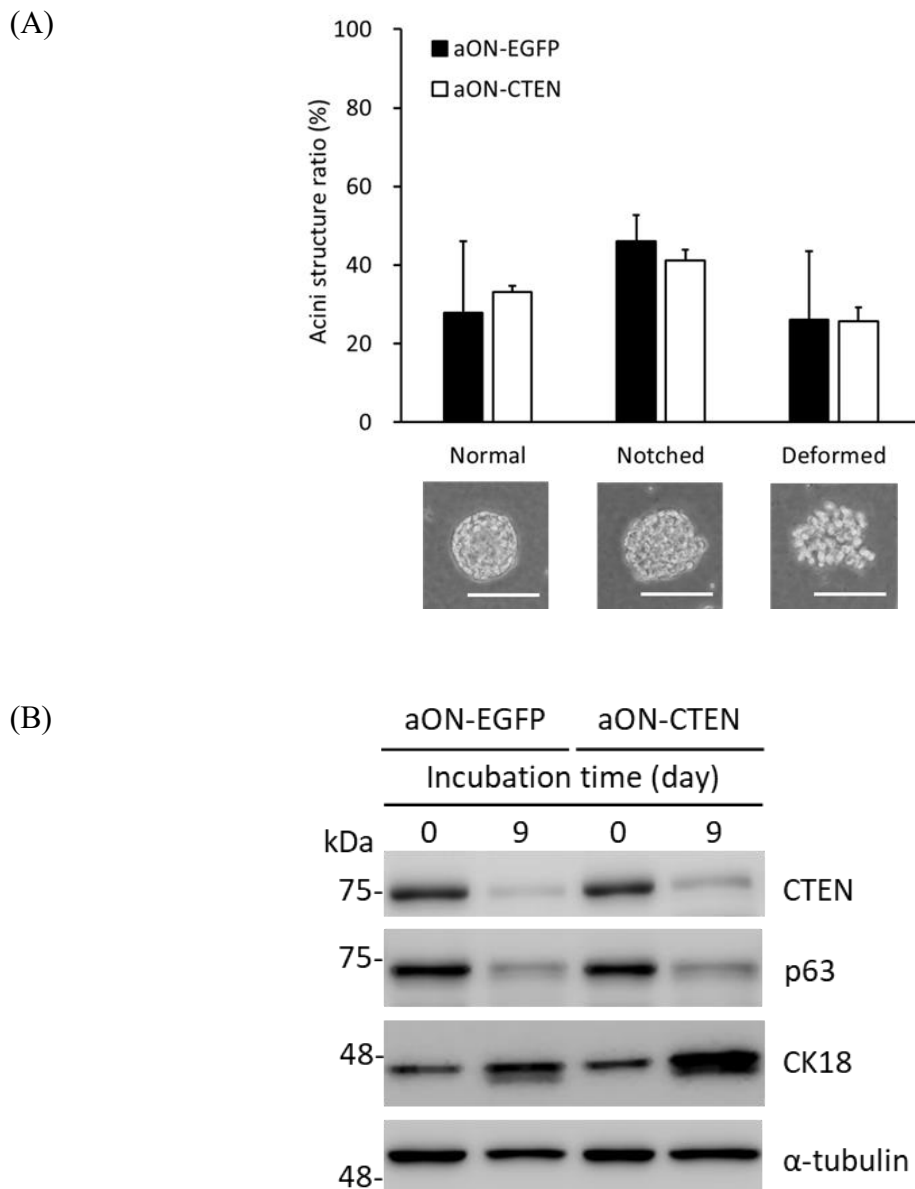
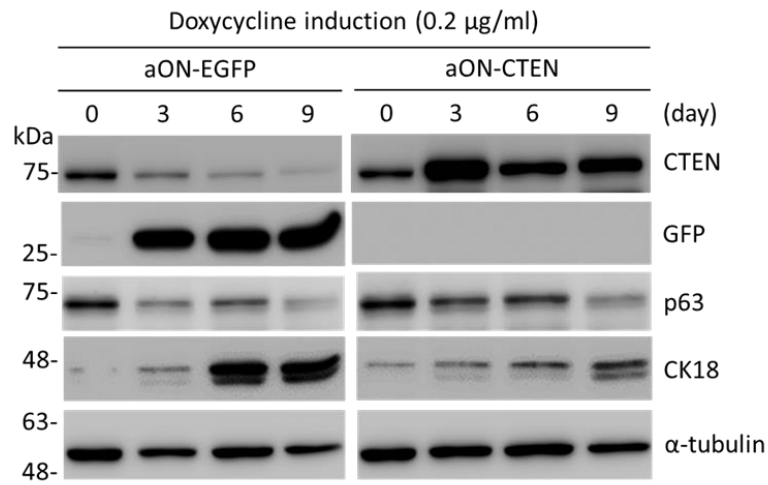


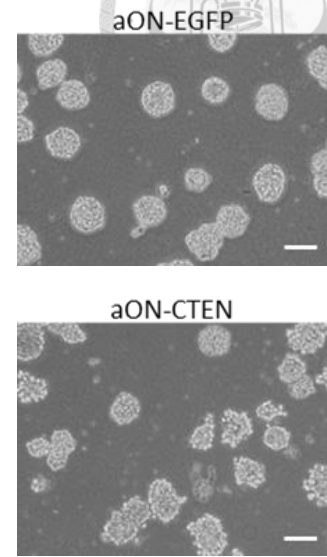
圖 15、比較 aON-EGFP 和 aON-CTEN 於 3D 培養環境下生長狀況與分化情形

將可誘導表現 EGFP (aON-EGFP) 和 CTEN (aON-CTEN) 的 RWPE-1 穩定細胞株於 matrigel 為基底的 3D 生長環境培養 9 天 (未添加 doxycycline)。(A) 以顯微鏡觀察腺泡結構，並依外觀分為三類 (Normal、Notched 和 Deformed)，代表性的圖片一併呈現於分類名稱下方 (比例尺: 100 μ m; 結果以 mean \pm SD 表示; 使用 Student's t-test 分析, $p > 0.05$, 無顯著差異)。(B) 另外收取細胞粗抽液，以 western blotting 分析 CTEN、p63 和 CK18 含量變化，以 α -tubulin 的含量高低作為 loading control。

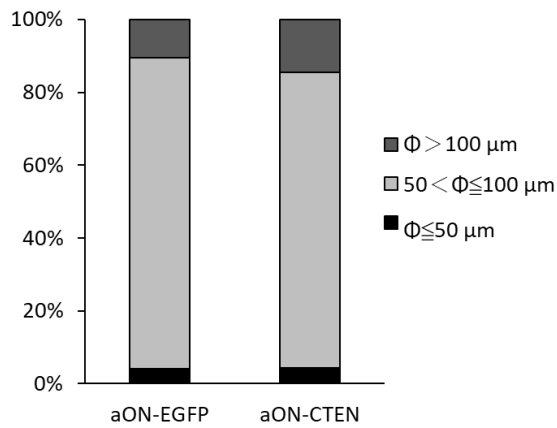
(A)



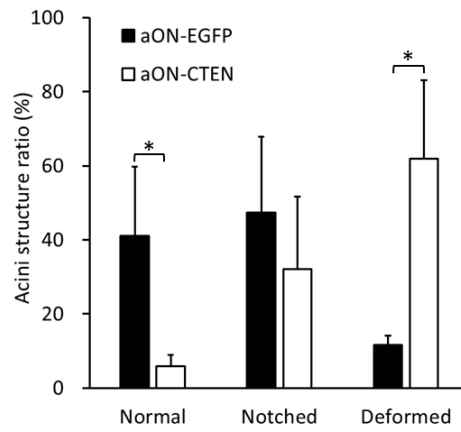
(B)



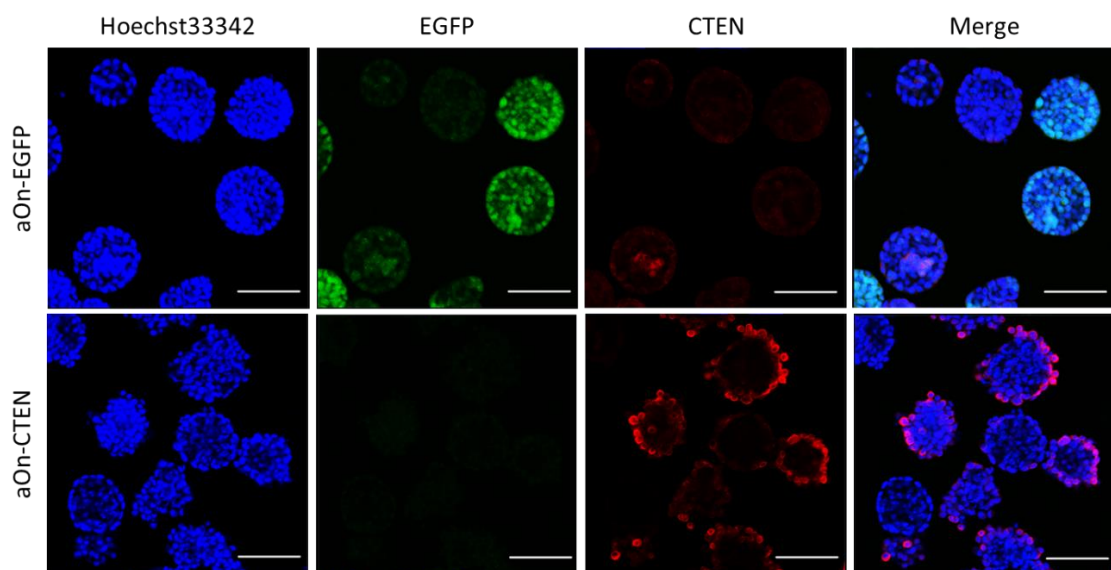
(C)



(D)



(E)

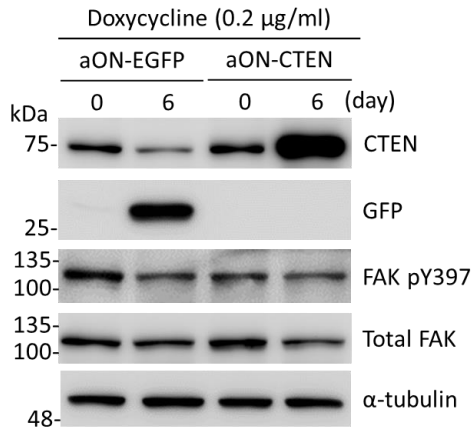


(圖 16)

圖 16、觀察 CTEN 對腺泡生成與細胞分化的影響

將可誘導表現 EGFP (aON-EGFP) 和 CTEN (aON-CTEN) 的 RWPE-1 穩定細胞株於 matrigel 為基底的 3D 生長環境培養 9 天 (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxycycline)。(A) 於第 3、6、9 天收取細胞並以 western blotting 分析 CTEN、GFP、p63 和 CK18 含量變化，以 α -tubulin 的含量高低作為 loading control。於第 9 天透過顯微鏡觀察腺泡型態 (B)，並分析腺泡大小 (C) (以腺泡直徑分群，單位： μm) 以及結構型態比例 (D) (結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示；使用 Student's t-test 分析，*： $p < 0.05$)。(E) 另外，使用共軛焦顯微鏡觀察第 9 天腺泡結構，以 488 nm 雷射激發 EGFP，透過 CTEN 抗體和 Alex flour 555 二級抗體對 CTEN 進行螢光標定，Hoechst33342 運用於細胞核螢光標定。(比例尺：100 μm)

(A)



(B)

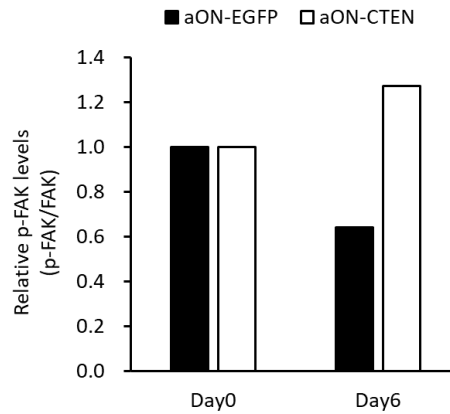
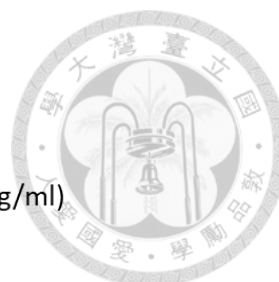


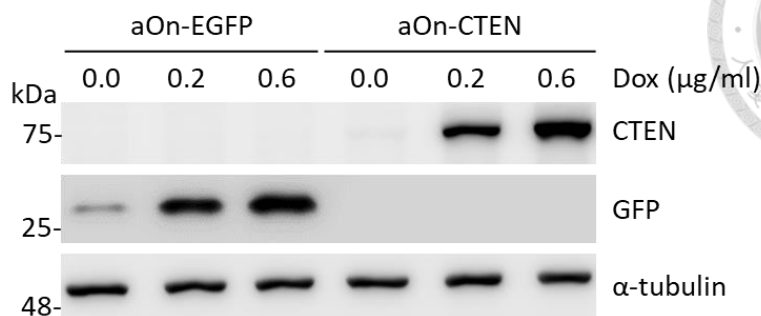
圖 17、於 3D 培養環境下，觀察 CTEN 對 FAK 磷酸化程度的影響

將可誘導表現 EGFP (aON-EGFP) 和 CTEN (aON-CTEN) 的 RWPE-1 穩定細胞株於 matrigel 為基底的 3D 生長環境培養 6 天 (0.2 µg/ml doxycycline)。

(A) 收取細胞並以 western blotting 分析 CTEN、GFP、FAK pY397 和 FAK 含量變化，以 α -tubulin 的含量高低作為 loading control。(B) 將 FAK pY397 和 FAK 色帶強度進行定量，以 FAK pY397 對 FAK 的比值作為磷酸化程度指標，並以第 0 天的磷酸程度作為 1 進行比較。



(A)



(B)

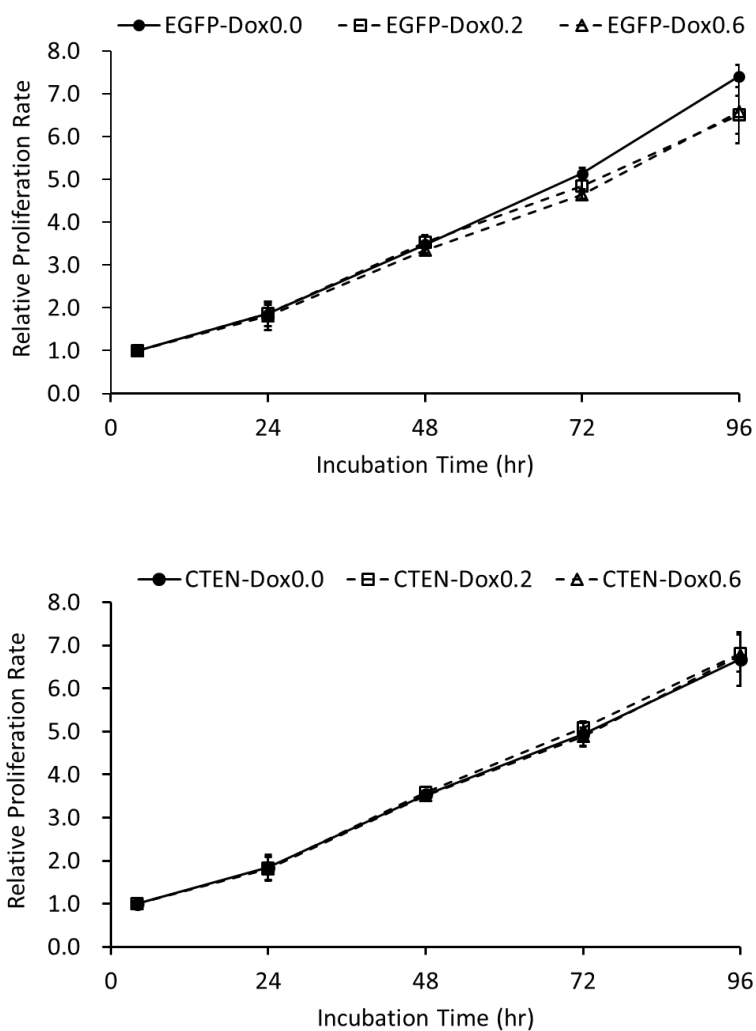



圖 18、CTEN 對前列腺癌細胞株 DU-145 增生能力的影響

將可誘導表現 EGFP (aON-EGFP) 和 CTEN (aON-CTEN) 的 DU-145 穩定細胞株以 0 (●)、0.2 (■)、0.6 (▲) μg/ml doxycycline 誘導培養 3 天。(A) 收



取部分細胞進行 western blotting，分析細胞中的 CTEN 和 EGFP 含量變化， α -tubulin 的含量高低作為 loading control。(B) 另一部分細胞則用於進行增生能力檢測，並繼續於指定濃度的 doxycycline 中進行，利用細胞對 WST-1 的代謝活性監測細胞生長狀況，以產物吸光值 $A_{450}-A_{650}$ 作為增生狀況指標，並以 4 小時的吸光值當作 1 計算每天相對增長情形。(結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示；使用 Student's t-test 分析， $p > 0.05$ ，無顯著差異)

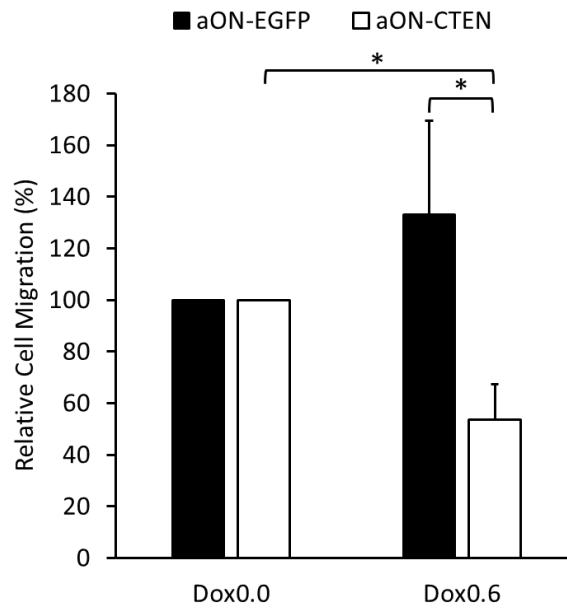


圖 19、CTEN 過表現對前列腺癌細胞株 DU-145 移動能力的影響

將可誘導表現 EGFP (aON-EGFP) 和 CTEN (aON-CTEN) 的 DU-145 穩定細胞株以 0 和 0.6 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline (Dox) 誘導培養 3 天，收取細胞進行細胞移動能力檢測，將 Dox0.0 移動細胞數當作 100% 計算相對移動細胞數，以檢視細胞的相對移動能力。(結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示；使用 Student's t-test 分析，*： $p < 0.05$)

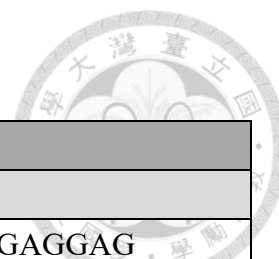
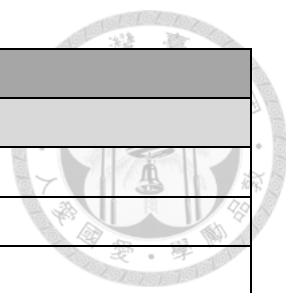


表 1、引子列表

Primer Name	Sequence (5' to 3')
For cloning	
NheI-EGFP-1F	TCAGCTAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
EGFP-NheI-238R	CCGCTAGCTTATCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
NheI-Flag-F	AAGCTAGCACCATGGACTACAAGGACGATGATGAC
CTEN715-NheI-R	CCGCTAGTTACTACATCCTTTCTGCGTCCTGCAGC
For ChIP-qPCR	
ChIP-CTEN-81-F	CGGAGGGGAGGAGAGAAG
ChIP-CTEN+25-R	CTGGGACCAAGACGACTCAG
ChIP-CTEN-2420-F	CTCCTGACCTCGTGATCCAC
ChIP-CTEN-2300-R	TCTCTACTAAGGGAGAGGG
ChIP-CTEN-36621k-F	TGCTGCTATTCCACGTCACGTTG
ChIP-CTEN-36479k-R	CACCTTTAAAGGGAAGTATCAGGCC
ChIP-CTEN-8857-F	AGCATGTCCTCTTACTCAGCTGC
ChIP-CTEN-8707-R	AAGCTGCTGGACCGTCTGTCCA
ChIP-CTEN+7604-F	CTGTTTCTTCAGGCCAGTCAGTC
ChIP-CTEN+7755-R	ACTGGTTTTGCCCCAGCTGGC
ChIP-CTEN+11036-F	AGGCTGGGGCTCCACAGTCATAA
ChIP-CTEN+11176-R	CTGAAGAGTGTGAGTCTTGCCTC
ChIP-p21-F	GCAGTGGGGCTTAGAGTGGGG
ChIP-p21-R	CAGGCTTGGAGCAGCTACAATTAC
For real-time RT-PCR	
18S rRNA-forward	CTTAGAGGGACAAGTGGCG
18S rRNA-reverse	ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA
CTEN-forward	GGACCCCAGAGGACCTTGACTCCTA
CTEN-reverse	GGGAAGCAGCTGGAAGGTGGGGT
TAp63-forward	AATTTTGAAACTTCACGGTGTGC
TAp63-reverse	TCTTTCCAAGAGAAATGAGCTGG
Δ Np63-forward	ATTCATATTGTAAGGGTCTCGGG
Δ Np63-reverse	GGGCATTGTTTTCCAGGTACAA
p63 α -forward	TGCAGCATTGTCAGTTTCTTAGC
p63 α -reverse	TGCTCAATCTGATAGATGGTGGT
p63 β -forward	TTGCAGCATTGTCAGGATCTGG
p63 β -reverse	AGAAGGGGAGGAGAATTCGT
p63 γ -forward	GGAACTCATGCAGTACCTTCCT
p63 γ -reverse	TTCCTGAAGCAGGCTGAAAGG



Primer Name	Sequence (5' to 3')
For real-time RT-PCR	
CK5-forward	GAGATCGCCACTTACCGCA
CK5-reverse	CCAGAGGAAACACTGCTTGTG
CK8-forward	GACGTCCTGCCCAAGTGAA
CK8-reverse	CCCAGTGCTACCCTGCATAG
CK18-forward	ACAATGCCCGCATCGTTCTG
CK18-reverse	TTCTCCACAGACTGGCGCAT
PSCA-forward	ACCAGTGACCACGAAGGCTG
PSCA-reverse	TTTGCAGGAGTAGCACAGCAG

表 2、抗體列表

Western blotting 一級抗體	Host species	反應條件
Anti-CTEN (sp83) (Spring Bioscience , M3832)	Rabbit	1:1000 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Anti- α -tubulin (B-5-1-2) (Sigma-Aldrich , T6074)	Mouse	1:5000 (gelatin-NET) , 室溫 , 1 小時
Anti-p21 (12D1) (Cell Signaling Technology , 2947)	Rabbit	1:2000 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Anti-p27 (Cell Signaling Technology , 2552)	Rabbit	1:2000 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Anti-ZO-1 (D7D12) (Cell Signaling Technology , 8163)	Rabbit	1:2000 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Anti-Snail (C15D3) (Cell Signaling Technology , 3879)	Rabbit	1:2000 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Anti-E-cadherin (24E10) (Cell Signaling Technology , 3195)	Rabbit	1:2000 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Anti- β -catenin (D10A8) (Cell Signaling Technology , 8480)	Rabbit	1:2000 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Anti-N-cadherin (D4R1H) (Cell Signaling Technology , 13116)	Rabbit	1:2000 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Anti-Slug (C19G7) (Cell Signaling Technology , 9585P)	Rabbit	1:2000 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Anti-PARP (46D1) (Cell Signaling Technology , 9532)	Rabbit	1:2000 (gelatin-NET) , 室溫 , 1 小時

Anti-RhoA (Cytoskeleton , ARH03)	Mouse	1:500 (TBST) , 4°C , 隔 夜
Anti-p63 (4A4) (Abcam , clone 4A4 , ab735)	Mouse	1:500 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Anti-GFP (B-2) (Santa Cruz Biotechnology , SC-9996)	Mouse	1:2000 (gelatin-NET) , 室溫 , 1 小時
Anti-CK18 (DC10) (Invitrogen , MA5-12104)	Mouse	1:2000 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Anti-FAK (4.47) (Merk Millipore , 05-537)	Mouse	1:2000 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Anti-phospho FAK Tyr397 (31H5L17) (Invitrogen , 700255)	Rabbit	1:2000 (gelatin-NET) , 4°C , 隔夜
Western blotting 二級抗體	Host species	反應條件
Peroxidase-labeled anti-rabbit IgG (KPL , 5220-0458)	Goat	1:10000 (gelatin-NET) , 室溫 , 1 小時
Peroxidase-labeled anti-mouse IgG (KPL , 474-1806)	Goat	1:10000 (gelatin-NET) , 室溫 , 1 小時
ChIP assay	Host species	反應條件
Anti-ΔNp63 (Calbichem , PC373)	Rabbit	2 μl , 4°C , 隔夜
Rabbit IgG (Pierce Magnetic ChIP Kit 提供)	Rabbit	1 μg , 4°C , 隔夜
免疫螢光染色	Host species	反應條件
Anti-CTEN (sp83) (Spring Bioscience , M3832)	Rabbit	1:100 , 室溫 , 隔夜

anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 555 (Invitrogen , A21428)	Goat	1:500 , 室溫 , 1 小時
--	------	-------------------

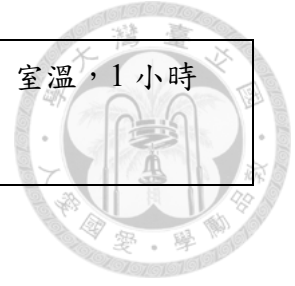




表 3、siRNA 序列

Symbol	Target Gene	Sequence (5'-3')
siCtrl (Sigma-Aldrich)	Negative Control	1: GAUCAUACGUGCGAUCAGA[dT][dT] 2: UCUGAUCGCACGUAUGAUC[dT][dT]
siCTEN-S1 (Invitrogen)	CTEN (TNS4)	Sense: CCCAGAGGACCUUGACUCCUACAUU Antisense: AAUGUAGGAGUCAAGGUCCUCUGGG
siCTEN-S2 (Invitrogen)	CTEN (TNS4)	Sense: UCUCACUGGAGAGCCUCAAUUCAGAU Antisense: AUCUGAUUGAGGCUCUCCAGUGAGA
siΔNp63 (Dharmacon)	ΔNp63	Sense: ACAAUGCCCAGACUCAAUU[dT][dT] Antisense: AAUUGAGUCUGGGCAUUGU[dT][dT]

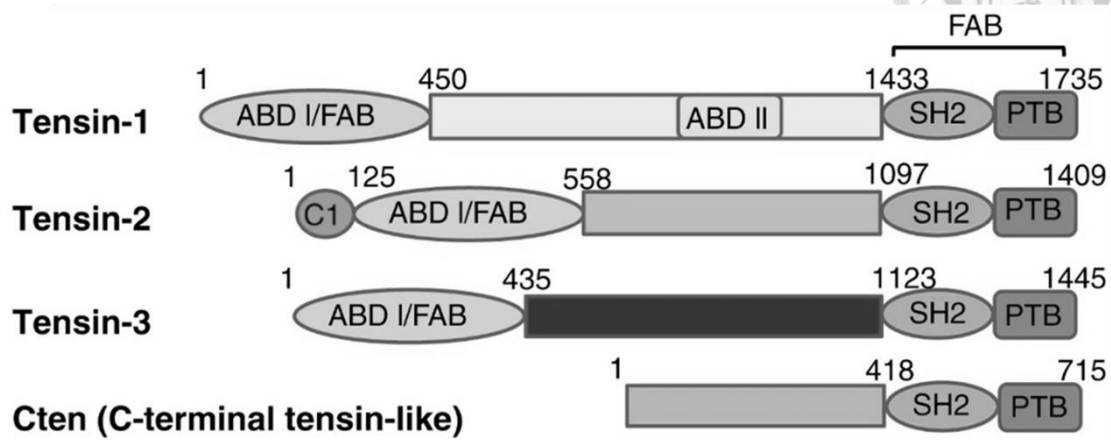


表 4、以 ChIP-Seq 分析 p63 於 CTEN 基因座的結合位置之相關研究資料

Cell Type	Location of peaks*			Distance to TSS		Site	Reference
	Start	End	Length	From	To		
EPI56T prostate cell line	38694054	38694746	693	-36813	-36121	Upstream	Olsen <i>et al.</i> , 2013
	38646661	38647031	371	10903	11273	Intron 2	
	38647881	38648193	313	9741	10053	Intron 2	Kouwenhoven <i>et al.</i> , 2015
Human primary keratinocyte	38650008	38650406	399	7528	7926	Intron 2	
	38666464	38666809	346	-8876	-8531	Upstream	
	38646261	38647346	1086	10588	11673	Intron 2	
Human primary foreskin keratinocyte	38647532	38648473	942	9461	10402	Intron 2	
	38647544	38648534	991	9400	10390	Intron 2	
	38649607	38650799	1193	7135	8327	Intron 2	McDade <i>et al.</i> , 2014
38649710	38650718	1009	7216	8224	Intron 2		
38666145	38667189	1045	-9256	-8212	Upstream		
38666183	38667175	993	-9242	-8250	Upstream		
Human primary foreskin keratinocyte	38646681	38647001	321	10933	11253	Intron 2	
	38650119	38650372	254	7562	7815	Intron 2	McDade <i>et al.</i> , 2012
	38666433	38666840	408	-8907	-8501	Upstream	
38694175	38694615	441	-36682	-36242	Upstream		
HaCaT keratinocyte cell line	38646380	38647132	753	10802	11554	Intron 2	
	38647720	38648253	534	9681	10214	Intron 2	Martynova <i>et al.</i> , 2012
	38649943	38650386	444	7548	7991	Intron 2	
38694327	38694584	258	-36651	-36394	Upstream		
38703661	38704192	532	-46259	-45728	Upstream		

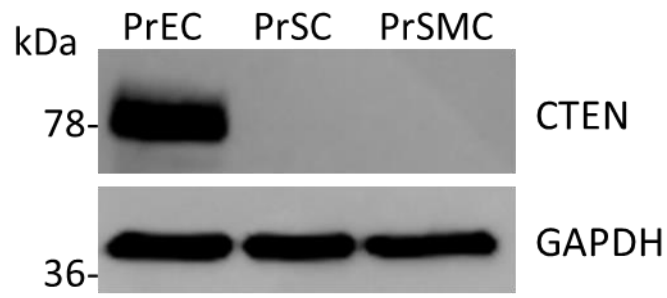
*CTEN gene is located in chromosome 17q21.2 region and the genomic sequence for CTEN gene (human genome NCBI build 37) starts from 38,632,080 bp to 38,657,933 bp (from the terminus of the p arm) on the minus strand.

附錄



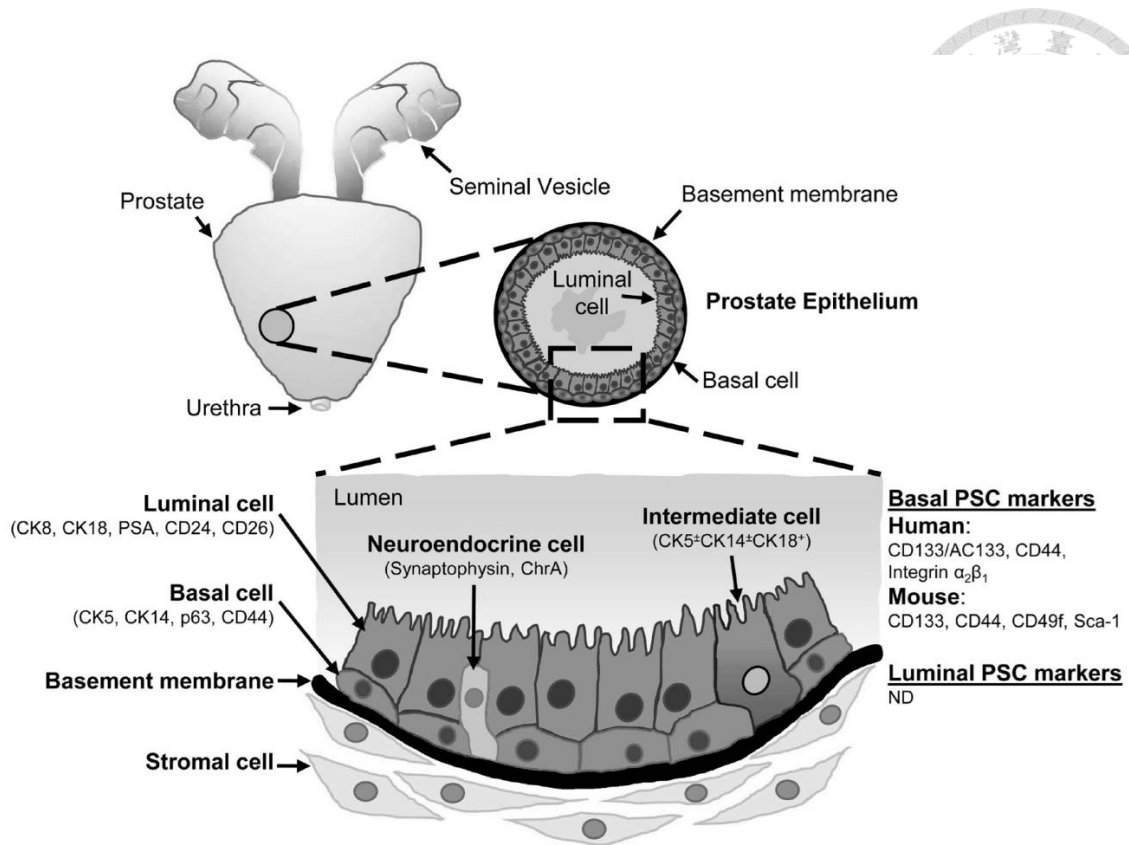
附圖 1、人類 Tensin 家族蛋白質結構示意圖

圖中標示出 Tensin 家族蛋白質結構中的功能性區塊，包含 actin-binding domain (ABD)、Src homology 2 (SH2) domain 和 phosphotyrosine-binding (PTB) domain，在 ABD、SH2 和 PTB 結構中包含了 focal adhesion binding (FAB) site，Tensin-2 的 N 端則具有 protein kinase C conserved region 1 (C1)，各功能性區塊的氨基酸位置也被標示於圖中。(Lo, 2017)



附圖 2、比較不同型態前列腺初代細胞的 CTEN 含量

以 western blotting 分析前列腺初代上皮細胞 (PrEC)、間質細胞 (PrSC) 和平滑肌細胞 (PrSMC)，比較 CTEN 蛋白質含量差異。



附圖 3、前列腺上皮組織細胞組成

該圖簡易呈現前列腺上皮組織結構，各型態細胞的名稱以及其生物標記分子標示於圖中。(PSC：prostate stem cell；ChrA：chromogranin A；ND：not determined) (Rybak *et al.*, 2015)