

A Tks4 állványfehérje szerepe normál és tumoros sejtek jelátvitelében

Doktori (PhD) értekezés

DOI-azonosító: 10.15476/ELTE.2024.215

László Loretta

Molekuláris biológus, MSc.

Témavezető:

Dr. Vas Virág, PhD., tudományos főmunkatárs

Kutatóhely:

HUN-REN, Természettudományi Kutatóközpont,
Molekuláris Élettudományi Intézet,
Jelátviteli és Funkcionális Genomika Kutatócsoport

ELTE, Biológia Doktori Iskola

A Doktori Iskola vezetője: Dr. Nyitrai László, DSc., PhD., egyetemi tanár

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Dr. Kovács Mihály, DSc., PhD., egyetemi tanár

**HUN
REN**



Budapest

2024

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	5
1.1. Az EMT folyamata.....	5
1.2. EMT, az embrionális fejlődésben.....	8
1.3. EMT, a tumorbiológiában	10
1.4. Állványfehérjék	11
1.5. A Tks4, mint multifunkcionális fehérje.....	13
1.6. A Tks4 szerepe a podoszóma és invadopódia kialakulásában.....	14
1.7. Tks4 orvosbiológiai vonatkozásai	17
1.8. Lehetőségek a Tks4 interakciós vizsgálatához	22
2. Célkitűzések	24
3. Anyagok és módszerek	25
3.1. Sejtkultúrák.....	25
3.2. Tks4-KO sejtvonalak létrehozása CRISPR-Cas9 módszerrel	26
3.3. HUES9 sejtek <i>in vitro</i> spontán differenciációja.....	28
3.4. HUES9 sejtek mezenchimális őssejt differenciációs folyamata	28
3.5. Sejtlizátum preparálás és fehérje koncentráció mérés	29
3.6. Western blot.....	29
3.7. Immuncitokémia és Konfokális mikroszkópia	30
3.8. Sejtalak kvantifikáció	30
3.9. Invadopódia vizsgálat és kolokalizációs koeficiens számítás	31
3.10. Proximity Ligációs Esszé (PLA)	31
3.11. Totál RNS izolálás, RT-qPCR	32
3.12. Wound healing esszé	33
3.13. TissueScan tüdőtumor cDNS Array	33
3.14. Proteome Profiler Humán Pluripotens őssejt Array.....	34
3.15. Sejtproliferációs mérések	34
3.16. Immunprecipitáció (IP).....	34
3.17. Tömegspektrometriai mérés (MS).....	35
3.18. A potenciális kötőhelyek azonosítása Tks4 és CAPZ között	35
3.19. Adatbázis analízisek.....	36
Tks4 génexpressziójának vizsgálata tüdőtumorban.....	36
Protein-protein interakciós analízis	36
3.20. Statisztikai analízis.....	37
3.21. Adatok elérhetősége	37

4.	Eredmények	38
	Tks4 szerepének vizsgálata embrionális őssejtek biológiájában	38
4.1.	Tks4 hiányos embrionális őssejtvonalak létrehozása	38
4.2.	A Tks4-KO HUES9 sejtek megtartják pluripotens tulajdonságaikat.....	42
4.3.	Tks4-KO sejtek spontán differenciálódási potenciáljának vizsgálata	44
4.4.	A Tks4-KO HUES9 sejtek differenciálódása mezenchimális őssejteké (MSC).....	46
4.5.	Tks4 hiányának funkcionális vizsgálata a differenciáltatott mezenchimális őssejtekben	48
	Tks4 szerepe a tumorbiológiában	51
4.6.	A Tks4 hiányos A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonallétrehozása és jellemzése.....	51
4.7.	A Tks4 kiütés hatása az invadopódiumok kialakulására és a sejt migrációra	53
4.8.	A Tks4 kiütés hatása az EMT-szerű folyamatra	56
4.9.	A Tks4 expressziójának downregulációja a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) progressziójában.....	58
4.10.	Tks4-CAPZA1 interakciójának azonosítása	60
4.11.	Tks4 kiütés CAPZA1-re gyakorolt hatásának és az EMT indukálásában betöltött szerepének vizsgálata	66
	A Tks4 interakció vizsgálata és szerepe az EMT folyamatában	67
5.	Eredmények megbeszélése	72
6.	Összefoglalás	82
7.	Summary	83
8.	Publikációk.....	84
9.	Köszönetnyilvánítás.....	86
10.	Irodalomjegyzék	87
11.	Függelék	99

Rövidítések jegyzéke

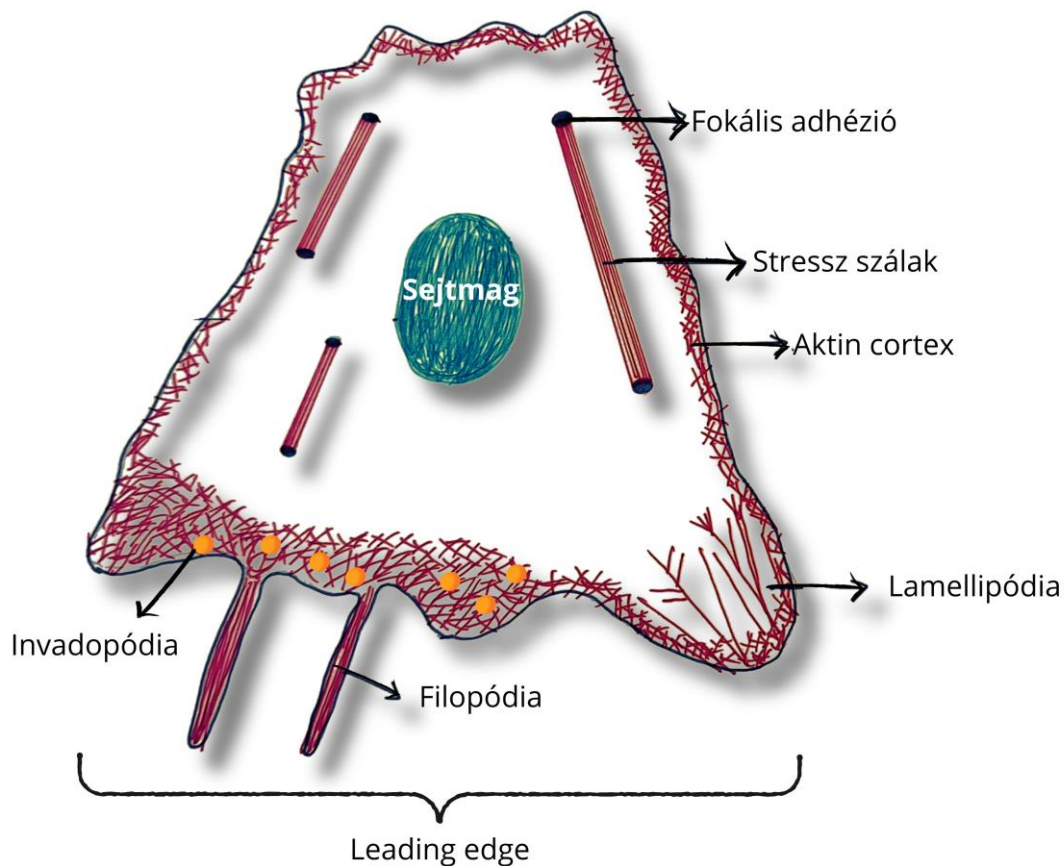
Epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT)	Epitheliás-mezechimális plaszticitás (EMP)
The Cancer Genome Atlas (TCGA)	Tüdő adenokarcinóma (LUAD)
Tüdő laphámsejtes karcinóma (LUSC)	Immunprecipitáció (IP)
Western blot (WB)	Immuncitokémia (ICC)
Proximity ligációs esszé (PLA)	Tömegspektrometria (MS)
Receiver operating characteristic curve (ROC)	Embrioid testecske (EB)
Mezenchimális-epiteliális átmenet (MET)	Extracelluláris mátrix (ECM)
Kissejtes tüdőrák (SCLC)	Nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC)
Nagysejtes karcinóma (LCC)	Mezenchimális őssejt (MSC)
folyadék-folyadék fázisszeparáció (LLPS)	Embrionális őssejtek (ESC)
prolin gazdag régió (PRM)	Phox homology domén (PX domén)
capping protein interakciós motívum (CPI)	rövid lineáris motívumok (SLIM)
Foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP2)	hosszú nem kódoló RNS (lncRNS)
Transzkripciós faktor (TF)	Görbe alatti terület (AUC)

1. Bevezetés

Az epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT) egészséges sejtek esetében egy szigorúan koordinált sejtszintű folyamat, ahol az epiteliális sejtek elvesztik epiteliális tulajdonságaikat és emellett mezenchimális jellegzetességeket nyernek. Egészséges szövetekben az EMT-nek kiemelt szerepe van az embrionális fejlődés során, és a felnőtt szervezetben sebgyógyuláskor. Nem egészséges szövetekben is végbemegy az EMT folyamata, de a kóros EMT koordinálása már koránt sem olyan szigorú lépéseken keresztül valósul meg, mint normál esetben. A kóros EMT-nek a tumor progresszió során a metasztázis képzés folyamatában van meghatározó szerepe. A tumorsejtekben megvalósuló EMT során úgynevezett köztes állapotok is fennállnak, amelyet hibrid EMT-nek vagy részleges EMT-nek nevezünk. Ilyen (EMT-like) fázisban a sejtek úgynevezett epitheliás mezenchimális plaszticitással (EMP) rendelkeznek, amely során különböző állapotokat vehetnek fel és ko-expresszálhatják az epiteliális és mezenchimális markereket egyaránt [1].

1.1. Az EMT folyamata

Az epiteliális-mezenchimális átmenetnek tehát (EMT) három fő típusa ismert: az első típus az embrionális fejlődésben (implantáció, gasztruláció, velőcső kialakulás) megjelenő, a második típus a sebgyógyulás, szövet regeneráció folyamatában előforduló, a harmadik típus a tumor progresszióval és metasztázissal összekapcsolható EMT. E folyamatok során a sejtek epiteliális fenotípusos jellegük csökken és mezenchimális tulajdonságokat nyernek. Az EMT iniciációjakor a sejtek elvesztik az apikális-bazális polaritásukat, mivel meggyengülnek az epiteliális sejtek közötti kapcsolatok (dezmoszómák, gap junkciók, adherens junkciók, tight junkció), a különböző adhézis fehérjék transzkripciós repressziója, degradációja vagy relokációja miatt. Továbbá citoszkeleton átrendeződés is történik, miáltal a sejtek motilitása és alakja megváltozik; lehetővé válik a dinamikus sejt elongáció, új aktin gazdag sejt projekciók alakulnak ki, amik elősegítik a sejtek mozgását [2]. Ilyen sejt projekciók a lamellipódia (lemezszerű membrán kitüremkedések a motilis sejt leading edge-n), filopódiák (tüskeszerű membrán kitüremkedések a lamellipódiákon), invadopódiák (dinamikus membránkitüremkedés), aktin stressz szálak (stressz hatására létrejövő kontraktilis képződmények) (1.ábra)[3].

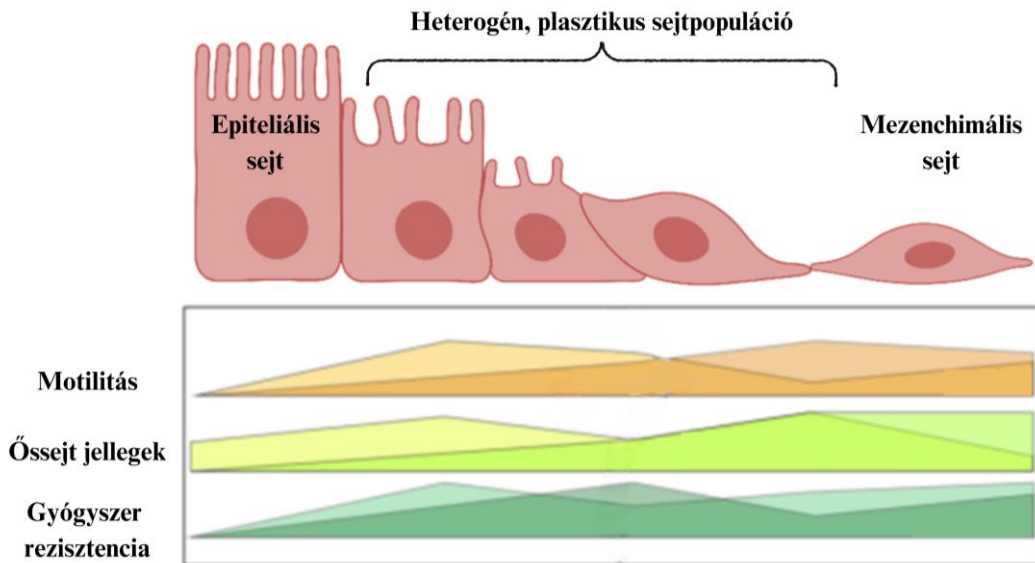


1.ábra: A sejt aktin gazdag struktúrái: Lamellipódia, filopódia, stressz szálak, fokális adhézió, invadopódia. (A kép saját rajz a következő forrás alapján: [4])

Továbbá, az EMT során változások történnek a jelátviteli folyamatokban, és átprogramozódik a sejtek génexpressziós profilja. Az EMT-ben szerepet játszó transzkripciós faktorok szintje megemelkedik, pl. Twist, Snai1, Snai2, Zeb1 szintje. Ezek koordinálják az epiteliális gének represszióját és a mezenchimális gének expresszióját, amelyeknek hatására EMT-ben fontos szerepet játszó fehérjék íródnak át. Ezek közé tartozik többek között a „cadherin switch”, ami azt jelenti, hogy az epiteliális sejtek által sejt felszínen expresszált glikoprotein, az E-cadherin szintje lecsökken, helyette az N-cadherin expressziója megemelkedik, ami megváltoztatja a sejt közötti adhéziós kapcsolatokat, mivel az N-cadherin egy sokkal gyengébb kapcsolatot létesít a sejtek között, ami elősegíti a sejtek mozgását és invázióját [5]. Az EMT-ben ugyan csak kiemelkedő szerepet játszó fehérjék a vimentin és a fibronectin. A vimentin egy intermedier filamentumot felépítő viskoelasztikus fehérje, amely támogatja a sejtek mozgását, egy jelátviteli platformot biztosít a fokális adhézióban (multiprotein struktúrák, amelyek

mechanikai kapcsolatot hoznak létre az extracelluláris mátrix és sejten belüli aktin kötegek között) [6]. A fibronectin (Fn1) is egy jól ismert EMT marker, egy glikoprotein, amelynek van citoplazmatikus és szekretált extracelluláris típusa is. Szabályozza a sejtek egymáshoz való kapcsolódását és a sejtmigrációt, valamint képes indukálni az EMT folyamatát [7].

A hibrid EMT vagy részleges EMT fogalmát 2020-ban pontosították [1], amelynek jelentése az, hogy a sejtek együttesen expresszálják az epiteliális és a mezenchimális markereket egyfajta plasztikus állapotban (EMP), így rugalmasan mozognak az epiteliális-mezenchimális differenciációs tengelyen, tehát képesek szabadon átalakulni az egyik állapotból a másikba (epiteliálisból mezenchimálisba, mezenchimálisból epiteliálisba, ezt az utóbbi folyamatot MET-nek nevezzük)[1,8]. Az EMP tulajdonságokat indukálhat számos faktor, mint a növekedési faktorok, a citokinek, illetve a hipoxia is, amely patológiás körülmények között, pl. tumor szövet belsejében gyakran előforduló jelenség. Mint látható, az EMT-ben a sejtek különböző képességekkel rendelkeznek, mint például a motilitás, az őssejt jellegek, ezen kívül a gyógyszer rezisztencia [1]. A mezenchimális állapot elérése előtt, az említett jellemzők a különböző tumorsejtekben folyamatosan ingadoznak az EMT folyamata során, így a tumorsejtpopuláció egy plasztikus heterogén állapotban van, és a tumor sejtek más-más fázisban vannak, különböző (motilitási, őssejt és gyógyszer rezisztencia) potenciállal rendelkeznek (2.ábra). Tanulmányok azt is leírták, hogy az EMT indukálhat a tumorsejtekben őssejt tulajdonságokat, pl. bizonyos EMT-ben szerepet játszó transzkripciós faktorok (pl. Twist, Snai1, Snai2) magasabb expressziója elősegíti az őssejtes jellegekkel rendelkező sejtek kialakulását [1]. Nemrég azt is kimutatták, hogy a hibrid EMT állapotban lévő sejtek nagyobb őssejtes potenciállal rendelkezhetnek, azoknál a sejteknél, amelyek, vagy teljesen epiteliális, vagy pedig teljesen mezenchimális állapotban vannak [1]. Ezzel a jelenséggel összefüggésbe hozható, hogy az őssejtek egy nem-elkötelezett állapotban vannak, amikor még sokféle sejt ki tud alakulni belőlük és ko-expresszálnak alacsony szinten számos transzkripciós faktort, hasonlóan, mint a részleges-EMT fázisban lévő tumorsejtek, melyek még epiteliális és mezenchimális sejté is alakulhatnak (plasztikusak). A differenciációs lépések mellett az EMT-ben, a terápiás rezisztencia kialakulása egy másik fontos folyamat [1]. Ugyanis kimutatták, hogy az EMT markerek magas szintű expressziója összefüggésbe hozható a gyógyszer rezisztens állapot kialakulásával, illetve, hogy bizonyos terápiák hatására a sejtek még inkább mezenchimális jellegeket vesznek fel. Ezért is kulcsfontosságú a különféle hibrid EMT állapotok vizsgálata, mivel ezen folyamatok alaposabb megismerése lehetőséget nyújt arra, hogy hatékonyabb és célzottabb terápiákat fejlesszünk ki ezen sejtek ellen [1,9].



2.ábra: Epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT), amely motilitás, őssejt jellegek és gyógyszer rezisztencia szempontjából dinamikusan változó tranzíciós spektrumnak nevezhető. Az EMT-markerek ingadozása lehetővé teszi, hogy a tumor sejtek különböző fázisokban legyenek, mindegyikük különböző potenciálokkal rendelkezik, például motilitás, őssejt jellegek és gyógyszerrezisztencia terén [1,9]. (Az ábra a következő forrásból származtatott átszerkesztett változat:[1])

1.2. EMT, az embrionális fejlődésben

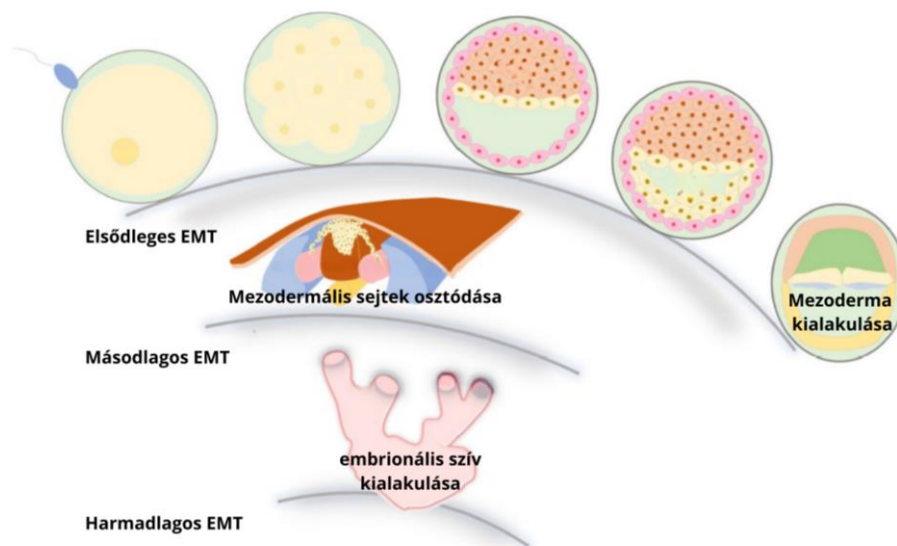
Az embrionális fejlődésben számos egymást követő EMT és MET lépés zajlik le, amely azért szükséges, hogy kialakuljanak a végső, speciálisan differenciált sejtek és így a szervek háromdimenziós szerkezete. Attól függően, hogy a fejlődés során mikor történik megkülönböztetünk elsődleges, másodlagos és harmadlagos EMT-t [3]. Az embrionális fejlődésben megjelenő EMT folyamatára jellemző, hogy epiteliális sejtek teljesen átalakulnak mezenchimális sejtekké, majd a MET folyamat során szekunder epiteliális sejtek jöhetnek létre, és általában nem jellemző a sejtek inváziója [10]. A humán embrionális őssejtek (ESC) differenciálódása során az E-cadherint represszáló transzkripciós faktorok expressziója megnő (Snai1, Snai2, Twist), megtörténik a cadherin switch: E-cadherin expressziója csökken, N-cadherin expressziója nő, illetve a vimentin EMT marker expressziója fokozódik [11].

Az **elsődleges EMT** a korai embrionális fejlődés folyamatában játszódik le, amikor a gasztrulációban a primitív ektodermából kialakul a mezoderma (3.ábra). A gasztruláció, az a folyamat, amikor az embrió három csíralemeze kialakul (az ektoderma, mezoderma és endoderma), amely az egyedfejlődés során egy fontos esemény a szervek kialakulása

szempontjából. A mezoderma és a velőcső sejtek kialakulása egy kulcs EMT folyamat, mivel ezek a sejtek számos sejttípussá képesek differenciálódni [3,12].

A **másodlagos EMT** során már olyan mezenchimális sejtek alakulnak ki, amelyek csak bizonyos sejtekké képesek differenciálódni (3.ábra). A korai mezodermális sejtek a gasztrulációt követően axiális, paraxiális, intermedier és laterális mezodermára osztódnak. Ezek a mezodermális osztódások ezután MET folyamat révén átmeneti hámszövetekké tudnak kondenzálódni, így kialakul a notokhord (gerinchúr), a szomiták (őscsigolyák), az urogenitális rendszer előfutárai, illetve a szomatopleura (ektodermához simuló oldallemez), és visceropleura (mellhártya lemeze) [3,12].

A **harmadlagos EMT**-re példa az, amelyet az EMT és a MET három egymást követő ciklusa jellemzi (3.ábra). Először az EMT folyamatában a gasztruláció során a szív mezodermális sejtjei jönnek létre, és a visceropleurában lévő szívprogenitor sejtek a MET révén gyorsan kétrétegű epitéliummá szerveződnek. Ezután a mezenchimasejtek EMT-n keresztül delaminálódnak a hámrétegből, így egy összefüggő szív mezoderm lap jön létre. Végül a mezodermális sejtek a mezodermális lapon belül MET révén a szív endotélbélését hozzák létre [3,12].



3.ábra: EMT az embrionális fejlődésben (Az ábra a következő forrásból származtatott átszerkesztett változat: [8]).

A természetesen megtörténő EMT folyamatokra reflektál az **in vitro körülmények** (mátrigélen való növesztés: ez egy olyan extracelluláris mátrixot biztosít a sejteknek, amely az *in vivo*

környezetre hasonlít) között epiteliális jellegekkel rendelkező humán pluripotens őssejtek esetében is megfigyelhető EMT. Ugyanis ezek a humán pluripotens őssejtek képesek sejtklaszttereket létrehozni, amelyből embrioid testecskék (EB) jöhetnek létre, amely az embrionális fejlődés egy fontos szakaszát mimikálja, amikor a gasztrulációban lezajló EMT-vel iniciációs és differenciációs folyamat következtében kialakulhat a három csíralemez: endoderma, ektoderma és mezoderma [3].

1.3. EMT, a tumorbiológiában

A tumoros sejtekben lezajló EMT, hasonlóan az embrionális fejlődés során megfigyelhető EMT-hez, egy dinamikus folyamat, amelyben reverzibilis állapotok (EMT és MET) váltakozhatnak átmenetileg [5]. Azonban a tumorsejtekben a folyamat populációs szinten nem szabályozott, így a heterogén tumorban egyszerre lehetnek jelen epiteliális és mezenchimális markereket különböző szinten expresszáló sejtek (úgynevezett hibrid vagy részleges EMT zajlik le), amely folyamat során a tumor sejtek megőrizhetik epiteliális tulajdonságaik egy részét, de bizonyos fokig mezenchimális fenotípust is mutatnak [9]. Ez lehetővé teszi számukra, hogy bizonyos sejtek migrációs képességekkel is rendelkezzenek, miközben a mezenchimális jellemzőik révén az extracelluláris mátrixhoz (ECM) erősebben kötődnek, mint egymáshoz. Sok tumortípusnál kimutatták, hogy a részleges EMT-t mutató sejtek fokozott metasztatikus potenciállal rendelkeznek, így nagyobb metasztatikus kockázatot jelentenek [10,13]. Más kutatócsoport viszont azt állapította meg, hogy az EMT folyamat során nem minden esetben növekszik meg a sejtek migrációs képessége, és így a migráció és az invázió egymástól elkülöníthető folyamat lehet [14].

Az EMT során számos folyamat indukálódhat pl.: létrejöhetnek tumor őssejtek, valamint az EMT stimulálhatja az angiogenesis folyamatát is, illetve gyógyszer rezisztencia kialakulását is elősegítheti. Ezek a folyamatok mind fontos szerepet játszanak a tumor kialakulásában, progressziójában és a metasztázis képzésében is. Az EMT folyamat során az egyik legnagyobb kihívás, hogy megállapítsuk, éppen melyik stádiumban vannak a sejtek, a hibrid/részleges EMT, vagy a reverz MET folyamata zajlik-e, amelyhez a megfelelő markerek azonosítása szükséges [5]. Ez elengedhetetlen annak érdekében, hogy a megfelelő terápiát alkalmazhassuk. Az biztos, hogy több tanulmány összefüggést mutatott az EMT és tumor progresszió között, pl.: prosztata-, tüdő-, máj-, hasnyálmirigy- és emlőrák esetében igazolták, hogy ha a tumorsejtek jelentős része EMT folyamaton megy keresztül, a tumor agresszivitása megnő [15–19].

A felsorolt daganattípusok közül a tüdőrák az egyik leggyakoribb rosszindulatú daganat, és világszerte vezető halálok. Ennek egyik oka, hogy a diagnózis sok esetben túl későn történik, amikor a betegség már előrehaladott, vagy akár metasztatikus stádiumban van. Egy másik fontos tényező, hogy kevés olyan korai diagnosztikai marker áll rendelkezésre, amely alkalmas lenne a betegség azonosítására. A tüdőtumort két nagy csoportra osztják: kissejtes tüdőrákra (SCLC) és nem kissejtes tüdőrákra (NSCLC). A tüdőrákos esetek több mint 80%-áért a nem kissejtes tüdőrák felel, amelyet szövettanilag további alcsoportokra osztják: adenokarcinómára (LUAD), nagysejtes karcinómára (LCC) és laphámsejtes karcinómára (LUSC) [20,21].

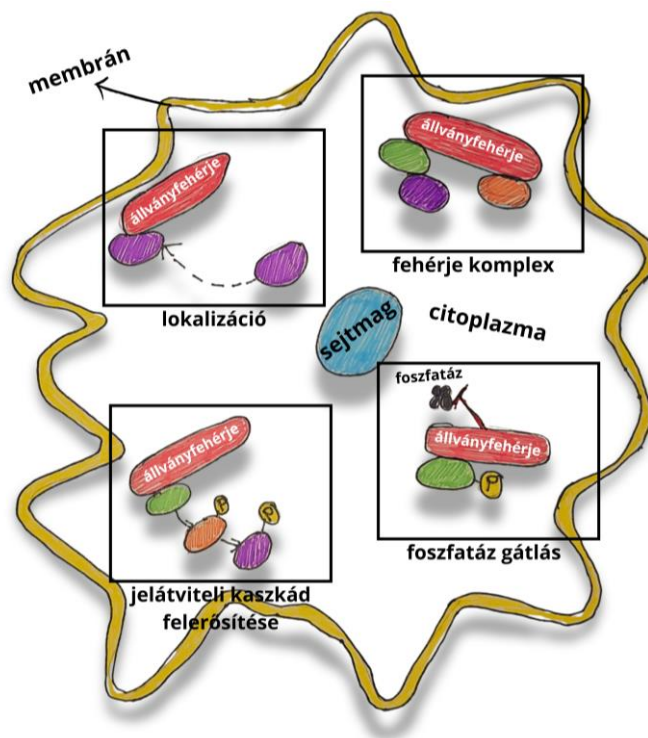
Több kutatás vizsgálta a tüdőrák és az EMT közötti kapcsolatot [22–27], például Bremnes és kutatócsoportja kimutatta, hogy az E-cadherin és a kateninek csökkent kifejeződése kedvezőtlen prognózissal jár a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) esetében [22]. Emellett a vimentin és a Snail fehérje jelenlétét szintén összefüggésbe hozták az NSCLC agresszívebb fenotípusával [23]. Továbbá az is bebizonyosodott, hogy az EMT markerek korai kifejeződése a tüdőrák fejlődésének kezdeti szakaszában (például az IA stádiumban) a kedvezőtlenebb túlélést jelezheti előre [24].

1.4. Állványfehérjék

Az állványfehérjék a fehérjék egy speciális osztályát képviselik, amelyek különleges szerepe abban rejlik, hogy képesek több partnerfehérjét közel hozni egymáshoz, létrehozva egy kapcsolódási platformot, ami elősegíti a makromolekuláris interakciók kialakulását [28,29]. Ezek a fehérjék általában nem rendelkeznek enzimatis aktivitással, de jelentős szerepet játszanak a fehérje-fehérje kölcsönhatások és hálózatok szabályozásában. Dinamikus módon képesek konformáció változásokon keresztül menni, amelyek szükségük is funkciójuk ellátáshoz így befolyásolva a jelátviteli folyamatokat [28,29]. Ezen kívül leírták szerepüket a folyadék-folyadék fázisszeparációban (LLPS) is. E folyamat során membrán nélküli kondenzátumok alakulnak ki cseppek formájában. Ezek a kondenzátumok a multivalens molekulák közötti kölcsönhatások révén jönnek létre. A fehérjék bizonyos doménjei, például az SH3 domén és a prolinban gazdag motívumok (PRM), amelyek gyakran előfordulnak állványfehérjékben, illetve a rendezetlen régiókkal rendelkező fehérjék képesek fázisszeparációra és cseppek kialakítására [30]. Kimutatták azt, hogy az LLPS folyamatának zavara tumorigenezishez is vezethet [30,31].

Az állványfehérjéknek számos funkciója van (4.ábra), például lokalizálhatják az effektor fehérjéket a megfelelő helyre (a citoplazmából a membránhoz), valamint képesek felerősíteni a

fehérje jelátviteli kaszkádokat, például a kináz jelátviteli útvonalat. Emellett ezek a fehérjék multifehérje komplexeket is képesek összeállítani és stabilizálni, mivel egyszerre több állványfehérje is kötődhet egymáshoz. Ezenkívül megakadályozhatják a foszforilált fehérjék degradációját, ezáltal biztosítva, hogy a szignalizációs kaszkád tovább működjön. Kimutatták, hogy egyes mutációk az állványfehérjékben különböző betegségekhez kapcsolhatók, mivel a mutáns állványfehérjék nem képesek a megfelelő konformációs állapotot felvenni, így megkötni a megfelelő partnereit [28,29]. Az állványfehérjék kiemelt szerepet játszanak a vezető halált okozó betegségekben: szív és érrendszeri (pl.: ANKRD1, IQGAP1), metabolikus és neurológiai betegségekben (pl.: β -Arrestin, IRS1, SHANK3), illetve rákban (pl.: Grb2, Paxilin, Tks4), ezért fontos lehet az állványfehérjék molekuláris mechanizmusainak karakterizálása, mivel így terápiás célpontokat is azonosíthatunk az általuk szabályozott jelátviteli útvonalakban [28,29].

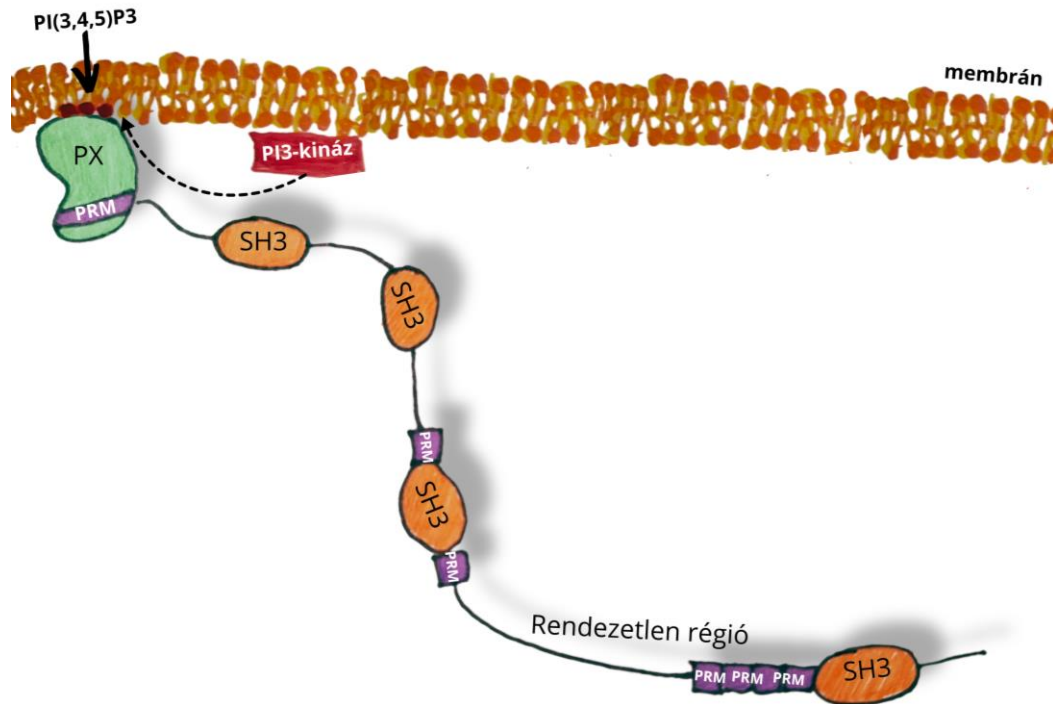


4.ábra: Állványfehérjék funkciói (A kép saját rajz a következő forrás alapján: [29]).

1.5. A Tks4, mint multifunkcionális fehérje

A doktori értekezésben szereplő állványfehérje a Tks4 (gén név: SH3PXD2B), amely hidat képez a növekedési faktor receptorok és az effektor jelátviteli fehérjék között [32]. A fehérje enzimatis hatással nem rendelkezik, azonban számos sejtszintű folyamat kiemelt szereplője. Szerkezetéből adódóan (prolin gazdag régiókkal (PRM) és négy SH3 doménnel rendelkezik, amelyek a leggyakoribb protein felismerő motívumok, illetve rendezetlen régióval és egy Phox homology (PX) membránkötő doménnel; 5.ábra) számos molekula kapcsolódását teszi lehetővé (függelék 1.táblázat). A Tks4 többek között az EGF-EGFR-Src jelátviteli út résztvevője [33]. Az EGFR aktivált Src kináz képes foszforilálni a Tks4-et több pozícióban (25, 373, és 508-as tirozin oldalláncán), amelynek hatására a jelátviteli molekulák Tks4-hez kötődhetnek, illetve maga az aktivált Src is képes a Tks4-hez kötődni és tovább foszforilálni a downstream targetjeit [33,34].

Kutatócsoportunk kimutatta, hogy a Tks4 fehérjének van egy nyitott és egy zárt konformációs állapota [34]. Zárt állapotban nem képes a membránhoz kötődni a Tks4 (ugyanis intramolekuláris kölcsönhatások révén az N-terminális régiója be van csomagolódva a tandem SH3 domének és a potenciális tandem SH3-asszociált motívum (PTAM) közötti, valamint a PX és a harmadik SH3 domének közötti kölcsönhatás eredményeképpen). Nyitott (aktív) állapotba bizonyos foszforilációs események hatására kerülhet, és így képes a membránhoz kötődni és effektor partnereket kötni [34]. Azonban nem tudjuk, hogy milyen meghatározott foszforilációs esemény szükséges a szerkezet kinyílásához, mert a Phosphositeplus adatbázis alapján nem csak tirozinon, de szerinen és theronin is képes foszforilálódni a Tks4. Ezen foszforilációs helyekből a kutatócsoportunk kizárta a PTAM melletti 353-as pozícióban lévő threonin foszforilációs helyet, tehát nem ezen a pozíción történő foszforiláció felelős a szerkezet kinyílásáért [34].



5.ábra: Tks4 állványfehérje doménjei. Phox homology domén (PX domén-zöld), SH3 domén (narancssárga), Prolin gazdag motívumok (PRM-lila) és rendezetlen régió (A kép saját rajz).

1.6. A Tks4 szerepe a podoszóma és invadopódia kialakulásában

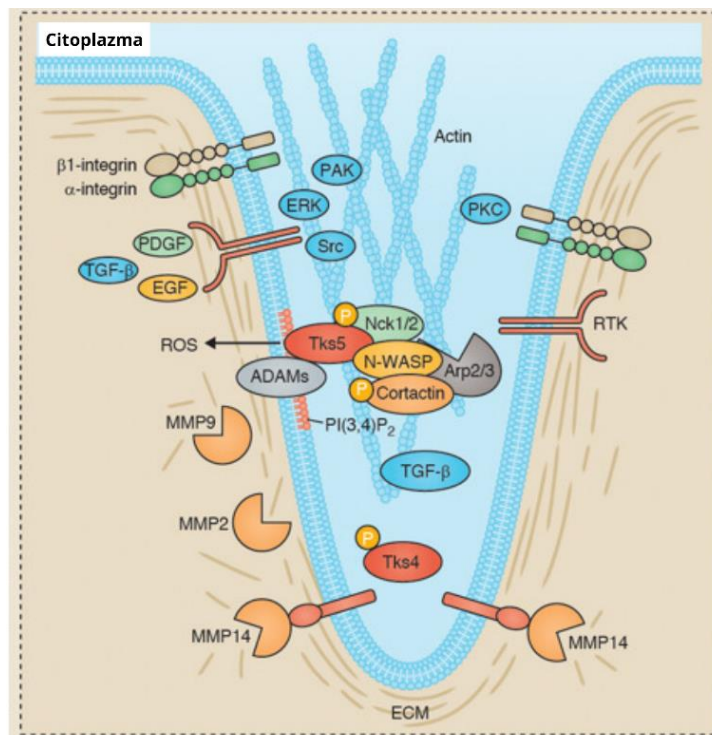
A podoszómák és az invadopódiák dinamikusan átrendeződő, aktinban gazdag membránstruktúrák, amelyeket együttesen invadoszómáknak nevezünk [35]. Ezek a képződmények képesek kapcsolódni az extracelluláris mátrixhoz (ECM), és a mátrix metalloproteinázok kihorgonyozása révén lebontani azt, ezáltal elősegítik a sejtek migrációját. A podoszómák elsősorban egészséges sejtekben találhatóak, például makrofágokban, osteoclastokban, endotélsejtekben, vaszkuláris simaizomsejtekben, valamint szerepet játszanak az embrionális fejlődésben is, ahol a dúcélc (neural crest) sejtekben fordulhatnak elő [36]. Ezzel szemben az invadopódiák főként tumoros sejtekben megjelenő struktúrák. Molekuláris felépítésében sok szempontból hasonló a két struktúra, de lényegi különbségük, hogy míg a podoszómák csak néhány percig maradnak fenn általában, addig az invadopódiák órákig is aktívak maradhatnak. Emellett az invadopódiák mérete nagyobb, mint a podoszómáké [35,37].

A podoszóma és invadopódia kialakulása során a sejtek fokális adhézions kapcsolatot létesítenek az extracelluláris mátrixszal (ECM), amelyben kulcsszerepet játszanak az olyan fehérjék, mint az Src, a fokális adhézions kináz (FAK) és az integrinek. Az Src fehérje foszforilálja az állványfehérjéket (Tks4[38] és Tks5 [39]), amelyek ezt követően a membránhoz lokalizálódnak, ahol a PX doménjük révén a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfáthoz (PIP2)

kötődik. Az állványfehérjéken keresztül megtörténik a cortactin helyszínre toborozása is (6.ábra). [37].

A sejtstruktúrában, az összeszerelődés fázisban az állványfehérjék számos aktin-szabályozó fehérjével, például az Nck1/2, a Grb2 és az N-WASP fehérjékkel képesek kölcsönhatásba lépni, míg a cortactin olyan fehérjét is vonz a komplexbe, mint az N-WASP, Arp2/3, WIP és dynamin, amelyek közül néhány akár összekötő hídként is szolgálhat a Tks5 és a cortactin kulcsfontosságú fehérjék között (6.ábra). A foszforilációs események, különösen a Tks5 és cortactin foszforilációja, kritikusak mind az invadopódia és a podoszóma struktúrák kialakulásában [37]. A cortactin esetében a foszforiláció (amit az Src, ERK, vagy PAK enzim végezhet) meghatározza, hogy mely partnerfehérjékkel lép kapcsolatba. Például, a tirozin-foszforiláció elősegíti az aktin polimerizációját, nem lezárt (barbed end) végeinek képződését és az invadopódia kialakulását azáltal, hogy leválik a cofilinről, amely gátolja az podoszóma/invadopódia képződését [37].

Az érési folyamat során a Tks4 is bekapcsolódik a komplexbe, és a cortactinnal kölcsönhatva koordinálják bizonyos mátrixmetalloproteázok, például az MMP-2 és MMP-9 lokalizációját, és elősegítik az MT1-MMP megfelelő lokalizációját és elhelyezkedését az invadopódiumok vagy podoszómák csúcsán (6.ábra). Így képesek az ECM degradációjára, ami elősegíti a sejtek invázióját vagy migrációját [37]. Emellett pedig M. D. Buschman et al. és kutatócsoportja kimutatta, hogy a Tks4 fontos a podoszóma kialakulásának folyamatában, ugyanis kísérleteik alapján a Tks4 hiányában a funkcionális podoszóma kialakulása nem megy végbe, hipotézisük szerint a Tks4 szükséges az aktin polimerizációjának stabilizálásához ebben a struktúrában [38]. Ugyancsak kimutatták, hogy mind a Tks4 vagy Tks5 hiányában a humán melanóma sejtekben csökken az invadopódia struktúrák száma [40]. A cortactin és F-actin mellett [37], a Tks4 és Tks5 is invadopódia markerként került be az irodalmi adatokba [41–44], gyakran használják az invadopódia jelenlétének kimutatására a legkülönbözőbb kísérleti rendszerekben.



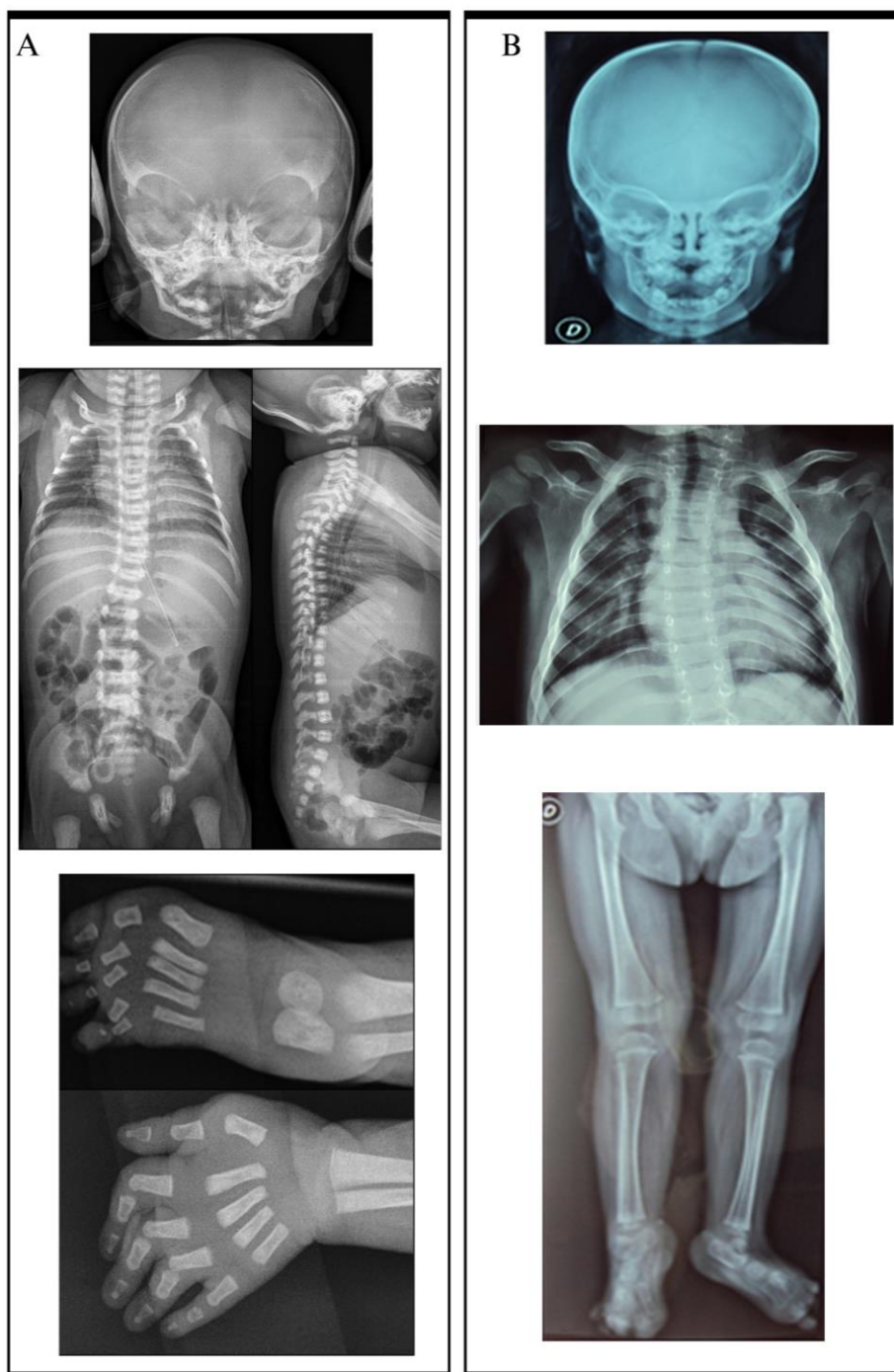
6.ábra: Az invadoszóma molekuláris struktúrája (Az ábra forrása: [45]).

Ahogy fentebb is leírtam az invadopódiának a tumor sejtek inváziójában és disszeminációjában van szerepe, így a kulcs invadopódia szabályozó fehérjék hiányának/mutációjának/expressziós zavarának következtében egyes tumorok progressziója is felgyorsul [40,46]. A tumorbiológiai vizsgálatok mellett, a Tks4 podoszóma szervező funkciójának működési zavarait a szakirodalomban összekapcsolták a korai fejlődés során fellépő zavarokkal, ami új utakat nyithat a fejlődési rendellenességek megértésében és kezelésében [35,47,48].

1.7. Tks4 orvosbiológiai vonatkozásai

Frank-Ter-Haar szindróma (FTHS)

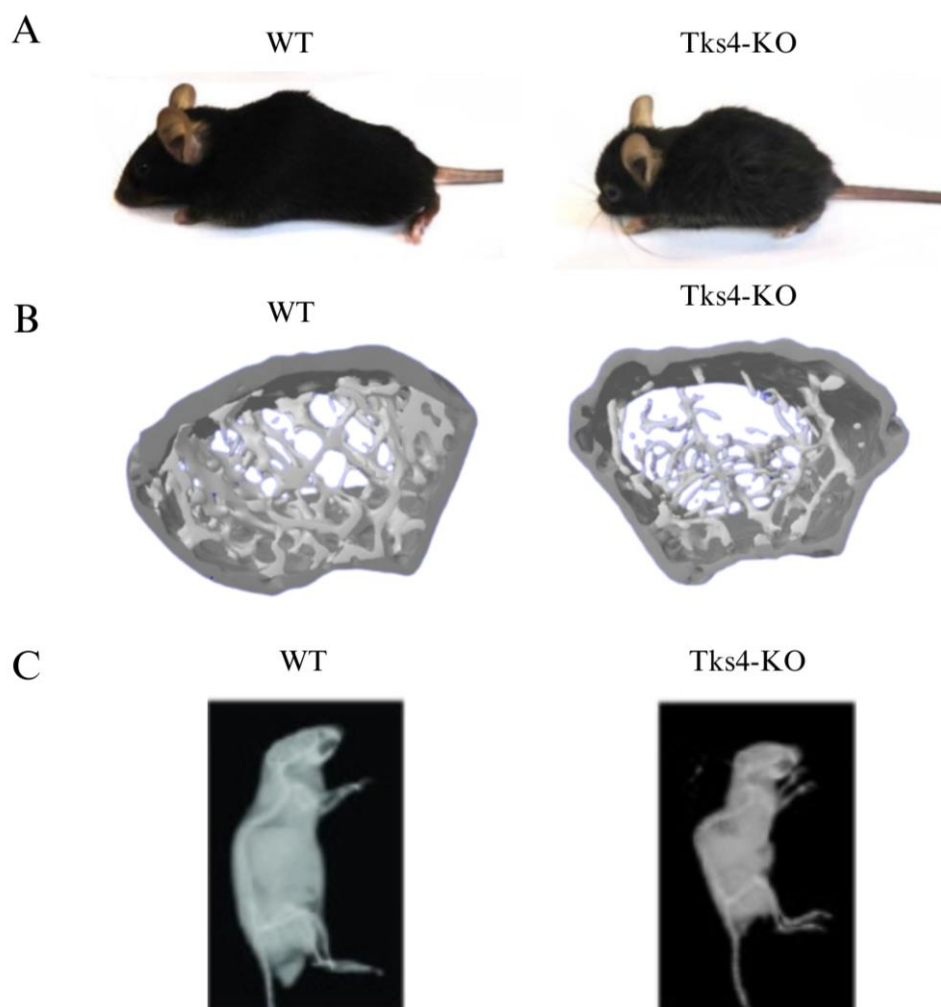
A Tks4 homozigóta mutációja egy ritka, veleszületett fejlődési rendellenességhez vezet, a Frank-Ter Haar szindrómához. Eddig 40 pácienszt azonosítottak Frank-Ter-Haar szindrómával, amelyből 20 beteg esetében mutattak ki Tks4 mutációt. Ebből a 20 páciensből 19 esetben homozigóta mutációt írtak le, és egy esetben pedig heterozigóta mutációt (ami azt jelenti, hogy a két allélon eltérő a mutáció) azonosítottak [47,49,58,59,50–57]. A mutációk több helyen is előfordulhatnak a Tks4 génben, például a PX doménben, vagy a második és harmadik SH3 domén között jelennek meg, illetve előfordulhat olyan deléciós esemény, amelynek hatására nem-teljes hosszúságú fehérje jön létre a 13.exon deléciója miatt, illetve olyan eseményt is leírtak, ahol az egész gén deléciója történt meg [59]. A mutációk okozhatnak stop kodonokat a szekvenciában, illetve kereteltolódást is, így funkcionális fehérje nem jön létre. A FTHS-ben érintett családokban dokumentált vérrokonság áll fenn, amit bizonyít az is, hogy a beteg gyerekekben mindkét allélon ugyanazt a mutációt azonosították. Két páciens esetében nem fedeztek fel vérrokonságot: egy marokkói családnál [58] és egy örmény családnál [59]. Az örmény családnál azonban (hasonlóan vérrokonságban lévő családoknál) homozigóta mutációt azonosítottak, valószínűleg azért, mivel ugyanazon kis etnikai csoportból származnak [59]. A marokkói családból született kisgyermeknél azonosították eddig az egyetlen heterozigóta mutációs mintázatot [58]. Az érintett gyermekek tünetei közé tartoznak a koponya- és csontdeformitások (7.ábrán látható): görbült és megrövidült csontok, kidülledő szemek, fogazati rendelleneségek, valamint szem-(glaukóma) és szívproblémák (billentyű és szeptum defektusok). Az FTHS-ben szenvedő gyermekek általában korai gyermekkorban elhaláloznak súlyos szívrendelleneségek miatt [32,47].



7.ábra: Két FTSH beteg esettanulmánya a csontfenotípus bemutatására (A) Röntgenfelvételek egy FTSH-ben szenvedő kisgyermekről (pár hónapos), ahol homozigóta Tks4 génmutáció (a két allélon ugyanaz a mutációs mintázat található) állt fenn. A felső kép koponya röntgen kép, ahol széles elülső homlokcsont látható. A középső képen a mellkas és a törzs látható, ahol gerincferdülés azonosítható. Alsó képen a lábujjak és ujjak deformitása, megrövidülése figyelhető meg (A képek forrása: [59]). (B) Másik FTSH beteg bemutatása (2 éves), akinek a Tks4 heterozigóta mutációja (a két allélon eltérő mutációs mintázat) volt jelen. A felső képen a

koponyafelvételen, hasonlóan, mint az A esettanulmány esetében, széles elülső homlokcsont látható. A középső képen, hasonlóan az A esettanulmányhoz gerincferdülés figyelhető meg. Az alsó képen, az alsó végtagok röntgenfelvételén a hosszú csontok görbülte és megrövidülése látható (A képek forrása: [58]).

Érdekes módon a kutatócsoportok által létrehozott Tks4 génhiányos egerek fenotípusa és a beteg gyermekeken észlelt elváltozások jelentős hasonlóságot mutatnak (8.ábra), ami alátámasztja, hogy mindkét fajban a Tks4 mutáció az egyedüli oka a szindróma kialakulásának [47,48,60]. Kutatócsoportunk a Tks4-KO egerünket felhasználva kimutatta, hogy a Tks4-nek fontos szerepe van a zsír és csontirányú sejtdifferenciációs folyamatokban [32]. A Tks4-KO egermodell vizsgálata arra is rámutatott, hogy Tks4 hiányában a csont szerkezet eltér az egészségestől, csonttritkuláshoz hasonló csont architektúra változások kísérik, amit egy Tks4-KO eger csont CT vizsgálatával meg is erősített csoportunk egy török csoporttal kooperációban (8B ábra) [61]. Azonban jelenleg a Tks4 mutáció hatásának pontos molekuláris mechanizmusa még nincs teljes mértékben felderítve, csak irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy az oszteoblasztok előalakjaiként is funkcionáló mezenchimális őssejtek (MSCk) csökkent differenciációs képessége okozhatja az FTHS csontfenotípust. A folyamat jobb megértését segíthetné, egy *in vitro* humán Tks4-KO embrionális őssejtvonal, amely modellezné a Tks4-mutáció által kiváltott megváltozott sejtdifferenciációs mechanizmusokat.



8.ábra: FTSH egér modell. (A) A vad (WT) és Tks4-KO egér összehasonlítása, ahol a Tks4-KO egér láthatóan kisebb, mint az ugyanannyi idős WT párja (A kép forrása: [60]). (B) 3D CT képek, a 8 hónapos WT és Tks4-KO egér combcsontjáról (femur), amely során a Tks4-KO egerekben egy csontitkuláshoz hasonló csont architektúrát figyelhetünk meg (A kép forrása: [61]). (C) 2 hónapos egerekről készült röntgenfelvételek, ahol a Tks4-KO egérnél gerincferdülés látható, hasonlóan mint az FTSH betegeknél (A kép forrása: [47]).

Tks4 szerepe a különböző ráktípusokban

A tudományos köztudatban tumorbiológiai szempontból a Tks4 fehérjének a ráksejtek invadopódia képzésben betöltött szervező, stabilizáló szerepe a legelfogadottabb. Én is erre tértem ki leginkább a bevezetésben. A Tks4 funkcióit régóta kutató Sara Courtneidge laborja is számos cikkében a Tks4 invadopódia-képző, sejtmotilitást szabályozó szerepét vizsgálta és emelte ki [37,45]. Legutóbb, még Iizuka és kutatócsoportja is kimutatta, hogy a Tks4-nek fontos szerepe lehet melanóma progresszióban, valószínűleg az invadopódia formáción keresztül, amit *in vivo* kísérletekkel is bizonyítottak [40]. Azonban kutatócsoportunk írta le először, hogy a

Tks4-nek az EMT-szerű folyamatok kialakításában is szerepe van. Szeder et al. egy Tks4 hiányos vastagbélráksejtvonalat (HCT116) állított elő, és a Tks4-KO sejtek fenotipizálása során kiderült, hogy a megváltozott sejtek motilitási tulajdonságain túl, epiteliális és mezenchimális marker expressziós különbségek is kialakultak Tks4 kiütés hatására. Ő vetette fel először, hogy a Tks4 több, mint invadopodia marker fehérje, mint ahogy az irodalomban ez széles körben elterjedt [62]. Tovább vizsgálva ezt a jelenséget Tantos Ágnes csoportja is igazolta, hogy a Tks4 kiütés megváltozott transzkriptómhoz vezetett nemcsak a fehérje kódoló mRNS-ek szintjén, de a hosszú nem-kódoló RNS-ek (lncRNS) csoportjában is, ugyanis bemutatták, hogy számos tumor progresszióban résztvevő mRNS és lncRNS szintje megváltozott a Tks4-KO vastagbélrák sejtekben a vad típusú sejtekhez képest [63]. Szekvenálási vizsgálat tehát bizonyította a Tks4 többrétű, az EMT folyamatát befolyásoló funkcióját az invadopodia képző funkcióján túl [63]. Kurilla Anitával dolgoztunk együtt annak megértése céljából, hogy a Tks4 milyen útvonalakon keresztül képes az EMT-szerű folyamatokat befolyásolni. 2023-ban közzeltük is azt a (géncsendesítéses és overexpressziós kísérleteken alapuló) munkánkat, melyben bemutatjuk, hogy a Tks4-CD2AP kapcsolatnak lehet irányító szerepe a vastagbélrákos sejtek EMT folyamataiban [64]. Ezen munkákkal párhuzamosan elindult a Tks4 biomarkerként való hasznosításának a kutatása más kutatócsoportok által is. Például Zhu és mtsai kimutatták, hogy a Tks4 magas expressziója biomarkerként szolgálhat gyomorrák esetén, és hogy a Tks4 kulcsszerepet játszhat a sejtek migrációjának, proliferációjának, az immunsejtek infiltrációjának és a gyógyszerérzékenység szabályozásában [65]. A Tks4 prognosztikai markerként való felhasználhatóságát hepatocelluláris karcinómában Kui és mtsai vetették fel, mivel a Tks4 gén kifejeződése ebben a daganattípusban megemelkedik és kimutatták, hogy a Tks4 magasabb expressziója a rosszabb túléléssel korrelál [66]. Felmerült tehát munkacsoportunkban, hogy ha a Tks4 több, mint egy invadopodia organizáló állványfehérje, és az EMT folyamatára is hatással van, vajon akkor az eddig nem vizsgált tumorok esetén is kimutatható-e az EMT-szerű megváltozott fenotípus Tks4 kiütés hatására. Továbbá, hogy magas vagy alacsony Tks4 expresszió jelenik-e meg a különböző tumorok progressziója során? Érdeemes lenne-e biomarker irányú felhasználhatóság szempontjából is megvizsgálni a Tks4-et más, epidemiológiailag jelentős tumortípus esetén is?

Ezen a gondolatmeneten elindulva, érdeklődésünk a tüdőtumorerre fordult. Zhang és mtsai kimutatta, hogy a tüdőrák egyik megelőző állapotában a krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD) a Tks4 egyike a központi szignalizációs (hub) géneknek, melynek szintje megváltozik a betegség során [67]. Továbbá a tüdőrák esetében már kimutatott szerepe van az EMT

folyamatának [22–27], a megnövekedett EMT marker expresszió rosszabb prognózissal korrelált tüdőrákos esetekben [68]. Összefoglalva tehát hipotézisünk szerint a Tks4-nek lehet szerepe a tüdőrákos EMT folyamatok szabályozásában és érdemes megvizsgálni, hogy biomarkerként is felhasználható-e tüdőtumorok azonosítására.

1.8. Lehetőségek a Tks4 interakciós vizsgálatához

Az állványfehérjék általánosságban molekuláris kapcsolókként működnek a sejten belüli jeltovábbító rendszerekben. Azáltal, hogy képesek megkötni további fehérjéket melyek különböző szignalizációs kaszkádokhoz tartozhatnak, jel erősítő vagy jel gyengítő lépések történnek a fizikai összekapcsolódás/molekuláris közelség hatására. A Tks4 állványfehérje doménszerkezete (SH3 domének és prolin gazdag régiók) lehetővé teszi, hogy más állványfehérjékkel is összekapcsolódjon, ezáltal még több fehérje-fehérje interakció jöjjön létre lokálisan a membrán alatti régióban. Ugyanakkor partnerfehérjéi lehetnek a jeltovábbítás végső kimenetelét is befolyásoló effektor faktorok/fehérjék, melyek a Tks4-hez asszociálva aktiválódhatnak, kinázokkal/foszfatázokkal létesíthetnek kapcsolatot vagy az aktin szálakhoz kötődhetnek. Ennek a szövevényes jeltovábbítást közvetítő hálózatnak a feltérképezéshez az interaktomikai módszertanát lehet segítségül hívni. A hagyományos interaktomika legtöbbször kvalitatív betekintést nyújt a szignalizációs hálózatok egy-egy pontjába, felfedve a csomópontokat és a fehérje-fehérje kapcsolatokban résztvevő kritikus komponenseket. A Tks4 köré szerveződő biológiai hálónak a szerkezete még nincs felderítve, pedig állványfehérje szerepe már régóta ismert. Az interaktomika új eszközei lehetővé teszik, hogy a Tks4 középpontú -akár betegségekhez is köthető - hálózati elemeknek, vagyis a Tks4 partnerfehérjéknek a vizsgálatát elvégezzük.

A szignalizációs lépések nem-kovalens, sokszor tranzienst kapcsolatokon keresztül valósulnak meg, melyekről “pillanat képeket” kaphatunk, ha az aktuális fehérje-fehérje kölcsönhatásokat kimutatjuk. Ilyen módszer például az immunprecipitáció [69]. IP-vel a célfehérjét, jelen esetben a Tks4-et ellenanyaggal fedett Sepharose gyöngyökkel elkülöníthetjük a sejtek lizátumából. Ha a nem-túltermeltetett, endogén Tks4-et ilyenkor megvizsgáljuk, akkor az IP mintában a Tks4 még együtt van a vele komplexet képező természetes partnerfehérjéivel. Ezt az állapotot kihasználva, elküldhetjük a Tks4-IP mintát tömegspektrometriás mérésre, hogy a Tks4-el interakcióban lévő fehérjék listáját kimutassuk [70]. A Tks4-IP minta összetétele megmutatja, hogy milyen fehérjék állnak közvetlen vagy közvetett kapcsolatban a Tks4-gyel. Ahhoz, hogy az MS módszerrel mért Tks4-gyel való interakciót bizonyítsuk is, a Tks4-IP mintát Western blot

technikával is megvizsgáljuk. Az MS mintákban azonosított partnerek jelenlétét validálhatjuk partnerfehérje-specifikus ellenanyagok használatával. Másik megközelítés az interakció jelenlétének kimutatására az in situ sejten való két fehérje közelségének kimutatása. Lehet egy példa ilyen típusú módszerre a Duolink Proximity Ligation Assay (PLA)[71], mely során két elsődleges ellenanyagot használunk a fixált sejteken: az egyik ellenanyag általában nyúlban termeltetett és specifikus a Tks4-re, a másik ellenanyag általában egérben termeltetett és specifikus az MS mérésben azonosított új partner fehérjére. A másodlagos ellenanyagok (anti-nyúl és anti-egér) fluoreszcens DNS szállal jelöltek, melyek csak akkor kapcsolódnak össze és adnak jelet, ha a két másodlagos ellenanyag <40 nm távolságra van. Ennek a módszernek az előnye, hogy a fixált és egy komplexben lévő fehérjék nem mosódnak le, szemben a IP-WB módszerrel, ahol a mosási lépések mind eltávolíthatják a kötőpartnereket.

Molekuláris szinten is vizsgálhatjuk a két fehérje kapcsolatát és predikciókat tehetünk az interakciós felszínre, mivel az AlfaFold fejlődésével egyre pontosabban tudjuk a fehérjék szerkezetét modellezni. Rendelkezésünkre állnak adatbázisok is, ahol a már ismert kötő motívumok, rövid konzervált lineáris szekvenciák vizsgálhatók az egész proteomban [72,73]. Ezekben az adatbázisokban kereshetünk azzal a céllal, hogy a partnermolekulákban a kötési felszínt beazonosítsuk és a kapcsolatot felderítsük az interakciós motívumok megkeresésével.

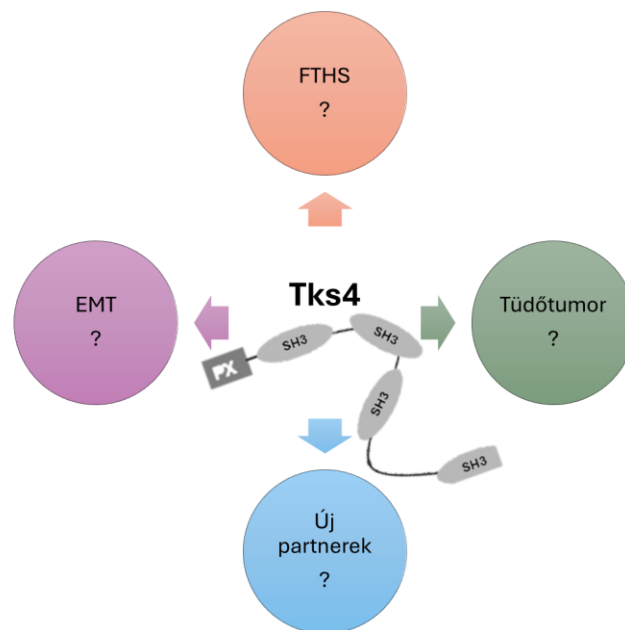
Mivel ilyen irányú kísérleteket még nem végeztek Tks4 fehérjén ezért munkám során a rendelkezésre álló proteomikai módszereket felhasználtam a Tks4 köré formálódó interakciós hálózat feltérképezéséhez.

2. Célkitűzések

A doktori munkám célja az volt, hogy feltárjam, hogyan határozza meg a Tks4 állványfehérje a jelátviteli folyamatokat normál és daganatos sejtekben, valamint annak vizsgálata, hogy milyen szerepet játszik a Tks4 az EMT folyamatában, mely alapvető jelentőséggel bír mind az embrionális fejlődésben, mind a tumorbiológiában.

Célok (9.ábra):

- Egy Tks4-hiányos embrionális őssejt modell létrehozása, a Tks4 fehérje humán embrionális fejlődésben betöltött szerepének és a Frank-Ter Haar szindróma molekuláris mechanizmusainak feltárásához
- Tks4 állványfehérje szerepének vizsgálata tumoros sejtekben egy Tks4-hiányos *in vitro* tüdő tumor modell segítségével
- EMT folyamat tanulmányozása az előállított Tks4-KO sejt vonalakban, normál és tüdő tumoros sejtekben
- Az EMT mechanizmusának pontosabb megértése érdekében a Tks4-középpontú molekuláris hálózat feltérképezése és eddig még nem ismert Tks4 partnerfehérjék azonosítása
- A Tks4 expressziós szintjének vizsgálata tüdő tumoros esetekben, hogy felderítsük a Tks4 biomarkerként való alkalmazásának lehetőségeit



9. ábra: Célkitűzéseim: a Tks4 szerepének átfogó vizsgálata.

3. Anyagok és módszerek

Ebben fejezetben a doktori kutatásom által alkalmazott módszereket mutatom be. Azokat a kísérleteket, amelyeket egyedül végeztem egyesszám első személyben írtam, ahol a kutatócsoport tagjainak segítségével végeztük a kísérletet azt többszámmal jelöltem. Amennyiben a kutatócsoporton kívüli személy segített az adott személy neve feltüntetésre került.

3.1. Sejtkultúrák

A vad és Tks4-KO HUES9 sejtvonalakat a HUN-REN, TTK Humán Pluripotens Össejt Laboratóriumában tenyésztette Dr. Apáti Ágota csoportja. A vad típusú **HUES9** embrionális össejtvonalat (Douglas Melton (HHMI) bocsátotta rendelkezésünkre) az etikai jóváhagyásoknak megfelelően kezelték (*HUES9 NIH jóváhagyás NIHhESC-09-0022 és Egészségügyi Kutatási Tanács, Humán Reprodukciós Bizottság Magyarországon (Egészségügyi Tudományos Tanács, Humán Reprodukciós Bizottság, ETT HRB) jóváhagyási szám: 6681/2012-EHR. HUES9*). A vad HUES9 sejtvonalat és az ebből előállított Tks4-KO HUES9 sejtvonalakat Mátrigél (Corning, Corning, NY, USA) bevonatú flaskákban tenyésztették mTeSR1 médiummal (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada), és Accutase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével passzálták. A sejteket kariotipizálásra küldték UD-GenoMed Medical-hoz.

A vad típusú **A549** humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalat (Szüts Dávid csoportjától /HUN-REN, TTK Genomstabilitás Kutatócsoport/ kaptuk) és az ebből létrehozott Tks4-KO sejteket F12K médiummal tartottam fent, amely 10% FBS-t és 0.5% Penicillint (10 000 units) /Streptomycint (10 mg) (Merck, Sigma-Aldrich, Cat.: P0781) tartalmazott és TrypLE oldattal (ThermoFisher Scientific, Gibco, Cat.: 12605028) passzáltam. A vad típusú és Tks4-KO A549 sejtvonalak DNS profilját short tandem repeat (STR) marker analízissel ellenőriztem a Microsynth AG labor segítségével. Az alacsony (3%) oxigén koncentrációs kísérlethez a sejteket hipoxiás kamrába helyeztem, ahol 3 napon át inkubáltam őket és ezek után RNS-t és fehérjét izoláltam későbbi RT-qPCR és Western blot kísérletekhez.

A tömegspektrometriai interakciós analízishez az A549 sejtek mellett, HCT116, MCF7, HPAC és N87 sejteket használtunk, amelyeket csak az analízis idején tenyésztettünk. A **HCT116** vastagbélrák sejtvonalat MCoys'5A médiumba (Thermofisher Scientific, Gibco, Cat.: 26600023), az **MCF7** emlőrák sejtvonalat DMEM médiumba (Thermofisher Scientific, Gibco,

Cat.: 11960085), a **HPAC** hasnyálmirigy-rák sejt vonalat DMEM/F12 médiumba (ThermoFisher Scientific, Gibco, Cat.: 31330095), az **N87** gyomorrák sejt vonalat RPMI 1640 médiumba (ThermoFisher Scientific, Gibco, Cat.: 72400054) tartottuk fent 100 mm petri csészén. Minden médiumot 10% FBS-sel (ThermoFisher Scientific, Gibco, Cat.: 16000044) és 0,5% Penicillin (10 000 egység) /Streptomocinnel (10 mg) (Merck, Sigma-Aldrich, Cat.: P0781) egészítettük ki és a sejteket 37°C-on és 5% CO₂ mellett tenyésztettük sejtenyészítő inkubátorban.

Az IP-WB, ICC és PLA mérésekhez az A549 mellett, két másik tüdőrákos sejt vonalat használtam: **HOP-92** (humán tüdő nem kissejtes karcinóma) és **NCI-H460** (humán tüdő nagysejtes karcinóma). A sejt vonalakat Füredi András (HUN-REN, TTK Gyógyszerrezisztencia Kutatócsoport) bocsátotta rendelkezésünkre. A kísérletek rövid idejére a HOP-92, NCI-460 sejt vonalakat 37°C-on, 5% CO₂ mellett sejtenyészítő inkubátorban tenyésztettem, és RPMI 1640 médiumot (ThermoFisher Scientific, Gibco, Cat.: 72400054) használtam, amelyet 10% FBS-sel (ThermoFisher Scientific, Gibco, Cat.: 16000044) és 0,5% Penicillin (10 000 egység) /Streptomocinnel (10 mg) (Merck, Sigma-Aldrich, Cat.: P0781) egészítettem ki.

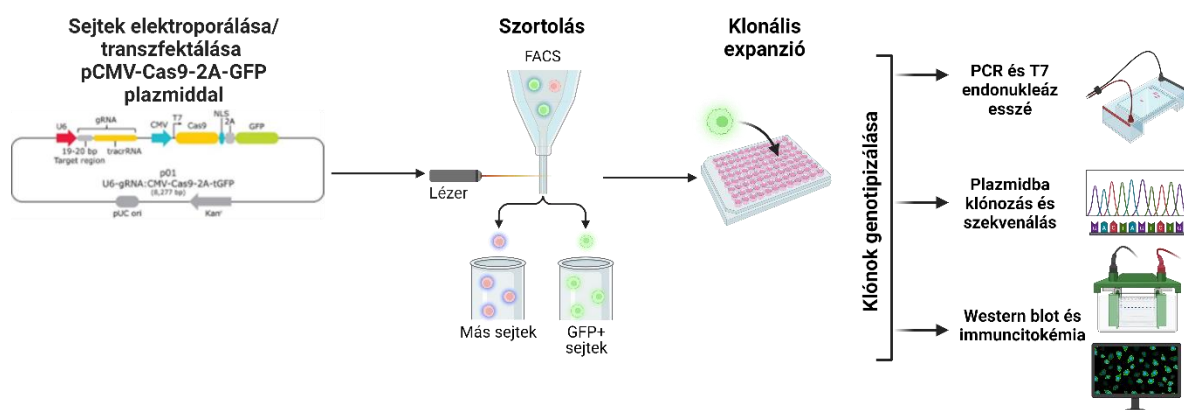
3.2. Tks4-KO sejt vonalak létrehozása CRISPR-Cas9 módszerrel

A vad típusú **HUES9** sejteket pCMV-Cas9-GFP_SH3PXD2B (Sigma-Aldrich) Amara Nucleofector A-23 programjával és a Human Stem Cell Nucleofector™ Kit (Lonza, Basel, Svájc) segítségével transzfektálta Dr. Apáti Ágota kutatócsoportja. A sejteket ezután Mátrigél bevonatú plateken mTeSR1 médiában tartották fent. Két nappal a nukleofekció után a GFP-pozitív sejteket fluoreszcencia-aktivált sejt szortolással (Attune FACSARIA III sorter) válogatták egy 96 well plate-re; 1 GFP+ sejt /well egysejt klónozás céljából.

A vad típusú **A549** sejteket pCMV-Cas9-GFP_SH3PXD2B (Sigma-Aldrich) transzfektáltam FUGENE transzfekciós reagenssel (Promega, Cat.: E2311). 24 órát követően a GFP-pozitív sejteket szortoltuk fluoreszcencia-aktivált sejt szortolással majd wellenként egy sejtet válogattunk ki egy 96 well plate egy wellébe. A fluoreszcencia-aktivált sejt szortolást (FACS) Dr. Váradi György segítségével végeztük a HUN-REN, TTK Áramlási Citometria Laboratóriumában.

Ezekután mind az A549 és HUES9 sejteket a 96-well platen tenyésztettük, amikor megfelelő konfluenciát értek (legalább 40-50%), akkor a sejtekből genomiális DNS-t izoláltam genotipizálás céljából Phire Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) kittel. Mindkét sejt vonal esetében több mint, 20 klónt sikerült felszaporítanom. A guide RNS területét

lefedő szakaszt Tks4-specifikus primerekkel felamplifikáltam PCR-rel, majd 1%-os agaróz gélen ellenőriztem a potenciálisan módosított DNS szakaszt, amely 1400 bp körüli sávot adott a gélen. Ahhoz, hogy a Tks4-KO klónokat kiválogassam a következő lépésben a felamplifikált PCR terméket T7 endonukleáz esszével ellenőriztem. A T7 endonukleáz abban az esetben hasít, ha mismatch történt a nukleotid sorrendben, tehát ha a Cas9 enzim hasított és tévesen random nukleotid(ok) épült(ek) be vagy ha deléció történt a szekvenciában, ilyenkor a T7 endonukleáz különböző méretű fragmenteket eredményez a vad típusú szekvenciához hasonlítva. Az esetünkben az ampfilikált régió (1400 bp) közepén található a Cas9 hasítóhely így, ha módosulás történt a nukleotid sorrendben 700 bp körül látunk az agaróz gélen sávot. Azokat a klónokat, amelyek 700 bp körüli sávot adtak lehetséges Tks4-KO klónoknak azonosítottam. Ezeket tovább ellenőriztem Sanger szekvenálással is. Ehhez a klónokból genomi DNS-t izoláltam, majd PCR-rel felamplifikáltam azt a szakaszt, amely a Cas9 hasítóhelyet tartalmazta, ezt pBluescript II SK (+) plazmidba klónoztam. A plazmidokat Escherichia coli DH5alpha baktériumba transzformáltam, és a baktérium kolóniákat kék fehér szelekcióval azonosítottam, ahol a fehér színű kolóniák tartalmazták a plazmidunkat. A plazmid DNS-t a GenElute™ Plasmid Miniprep Kittel (Sigma-Aldrich) izoláltam, és elküldtem szekvenálásra, majd a kapott szekvenciákat SnapGene szoftverrel analizáltam. A referencia Tks4 szekvenciát az NCBI GenBankból töltöttem le: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (Homo sapiens SH3 and PX domains 2B (SH3PXD2B), transcript variant 1, mRNA: NCBI Reference Sequence: NM_001017995.3). A Tks4 fehérje hiányát Western blottal (WB) és immuncitokémiával (ICC) is megerősítettem. A Tks4-KO sejtek létrehozásának és validálásának lépései a 10.ábrán látható.



10.ábra: Tks4-KO sejtek létrehozásának folyamata CRISPR-Cas9 módszerrel. Az ábra a Biorender.com által készült.

3.3. HUES9 sejtek *in vitro* spontán differenciációja

A sejtek spontán differenciációja a TTK Humán Pluripotens Óssejt Laboratóriumában történt Dr. Apáti Ágota csoportja segítségével. A pluripotens őssejteket egér embrionális fibroblaszt sejteken tenyésztették (ezek úgynevezett feeder sejtek, támogatják a pluripotens őssejtek növekedését, osztódását) mTeSR1 médiumban. Sejtpasszálás során, kollagenáz segítségével szedték fel a sejteket a plate-ről, mert a kollagenáz elősegíti, hogy a kialakult sejtcsomók együtt maradjanak, amely fontos lépés az embrioid testecske (EB) képződéséhez. Ezeket a sejtcsomókat áthelyezték egy alacsony kötődési tulajdonságú (ultra-low attachment) plate-re borjú szérumot tartalmazó médiumban, hogy a sejtcsomók szuszpenzióban embrioid testecskévé (EB) alakuljanak és elinduljon a spontán differenciáció. Ebben a stádiumban különböző méretű sejtcsomók jönnek létre. Ahhoz, hogy teszteljük, hogy a sejtek képesek-e mindhárom csíralemez irányába differenciálódó sejteket létrehozni, 6 nap után kiválasztották a legnagyobb átmérőjű EB-eket. A kísérlet során 30-30 darab EB-t választottak ki a vad típusú és a Tks4 kiütött sejtvonalakból is, majd zselatin bevonatú plate-re helyezték őket, ahol 6 nap alatt tovább differenciálódtak. A Tks4 fehérje szintjét ezalatt a folyamat alatt monitoroztam (3.napon, 6.napon). A csíralemez markerek expressziós szintjét pedig a differenciáció után vizsgáltam (a kikapasztást követő 6.nap után). Az ilyen típusú mérési módszerek igen vagy nem választ adnak, arra a kérdésre, hogy egy-egy marker megjelenik vagy nem a differenciáció során. Statisztikai módszereket nem érdemes alkalmazni, mivel a spontán differenciáció során megjelenő különböző sejttípusok érettsége és aránya EB-ről EB-re változhat, így a biológiai szórás nagyon nagy. A módszer annak megválaszolására szolgál, hogy a sejtek pluripotensek maradtak-e a genetikai módosítás után és képesek-e egyáltalán a differenciációra. Ahhoz, hogy a differenciációs képesség mértékét és így statisztikailag szignifikáns eltéréseket tudjunk mérni, egy-egy specifikus sejttípusba kell eltolni a differenciációt megfelelő növekedési faktorok, extracelluláris mátrixok és kismolekulák használatával. Akkor a sejtvonal specifikus elköteleződést indukáló médium hatására adott sejtdifferenciáció mértéke már kvantifikálható lenne.

3.4. HUES9 sejtek mezenchimális őssejt differenciációs folyamata

A sejtek mezenchimális irányba történő differenciációja a TTK Humán Pluripotens Óssejt Laboratóriumában történt Dr. Apáti Ágota csoportja segítségével. A differenciációs folyamat során az EB-eket a 6.napon zselatinnal bevont plate-re kerültek és 10% FBS-t tartalmazó DMEM médiumra váltottak. Majd 19 nap után a sejteket passzálták tripszinnel és 15% FBS-t tartalmazó

DMEM médiumban tenyésztették tovább. 12 nap múlva ismét tripszinnel passzálták a sejteket. Végül, amikor morfológiailag homogén és kiterülő sejteket láttak, akkor a mezenchimális sejtekre jellemző markereket (CD73, CD44, CD90) megmérték áramlási citométerrel (FACS) Dr. Váradi György segítségével a HUN-REN, TTK Áramlási Citometria Laboratóriumában (az alkalmazott ellenanyagok típusa és hígítása a függelék 2.táblázatában található).

3.5. Sejtlizátum preparálás és fehérje koncentráció mérés

A sejteket 100 mm átmérőjű Petri csészén tenyésztetem, amikor elérték a megfelelő konfluenciát akkor a sejteket lízis pufferben (*50 mM Hepes puffer (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 20 mM NaF, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM p-nitrofenil-foszfát, 10 mM benzamidin, 1 mM fenilmetil-szulfonil-fluorid, valamint egyenként 25 µg/ml leupeptin, szója tripszin inhibitor és aprotinin*) felkapartam hideg DPBS mosás után. A következő lépésben a centrifugálással (20 800 rpm, 10 perc, 4°C) a sejtörmelégeket eltávolítottam a fehérje lizátumból. A fehérje koncentrációt Lowry reagenssel (750 nm-en) és microplate olvasóval mértem BSA hígítási sor segítségével. A gélelektroforézishez a fehérje lizátumokhoz 4x mintapuffert (*4x, 0,2 M Tris, 0,277 M SDS, 40% (V/V) glicerin, 0,588 M β-merkaptotanol, 0,05 M EDTA, 1,19 mM brómfenol-kék desztillált vízben*) adtam és 100°C-on 5 percig inkubáltam, majd jégre tettem. A további fel nem használt fehérje lizátumot -80°C-on, a 4x mintapufferrel bekevert mintákat pedig -20°C-on tároltam.

3.6. Western blot

A Western blot során a 10%-os stain-free gélekre (Biorad, TGX Stain Free FastCast Acrylamid Kit, Cat.: 1610183) egyenlő mennyiségű fehérje mintákat vittem fel (20 µg). Az SDS poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) 160 V-on 45 percig futtattam szobahőmérsékleten. A gélelektroforézis után a stain-free géleket Chemidoc segítségével ellenőriztem, hogy a fehérjéket egyenlő mennyiségben vittem-e fel, és a futás minőségét is ellenőriztem. A fehérje mintákat ezután a gélekről nitrocellulóz membránra transzferáltam vagy 300 mA-on 1 óra alatt 4°C-on. A membránokat 1 óráig blokkoltam 5% sovány tejporthalmazó PBS oldatban szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán át 4°C -on inkubáltam a megfelelő elsődleges ellenanyaggal, amelyet 0,4% Tween20-at tartalmazó 1%-os tejpor tartalmú PBS-ben hígítottam. A legtöbb membránt szétvágtam mólsúly marker segítségével az elsődleges ellenanyag hibridizációja előtt, hogy egyszerre több fehérjét is tudjak tesztelni. A következő lépésben a membránokat háromszor mostam 0,4% Tween20-at tartalmazó 1%-os

tejpor tartalmú PBS oldattal 5 percig szobahőmérsékleten. Ezekután (egér vagy nyúl) HRP konjugált másodlagos ellenanyagot adtam a membránokhoz, és 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltam. A következő lépésben a végső mosások következtek (3 mosás, 10 perc szobahőmérsékleten, 0,4% Tween20-at tartalmazó 1%-os tejpor tartalmú PBS oldattal). Az előhívás előtt 5 percig PBS-ben mostam a membránokat szobahőmérsékleten. Az előhívás ECL reagenssel történt és Chemidoc és/vagy röntgen detekciós készülékkel fényérzékeny filmekkel vizualizáltam a sávokat. A loading kontroll minden esetben alfa-tubulin volt. Az alkalmazott ellenanyagok listája és hígítása a függelék 2.táblázatában található.

3.7. Immuncitokémia és Konfokális mikroszkópia

A sejteket 12-well ibidi kamrákra (eltávolítható szilikon falakkal) növesztettem 5000 sejt/lyuk koncentrációban. Amikor a sejtek elérték a kívánt konfluenciát (kb. 24-48 óra után), akkor DBPS mosás után 4% paraformaldehiddel fixáltam a sejteket 15 percig szobahőmérsékleten. A következő lépésben permeabilizálás következett: 0,1% Triton X tartalmú PBS oldattal 10 percig szobahőmérsékleten. A blokkolás során 1 órán át inkubáltam a sejteket szobahőmérsékleten 2% BSA-t tartalmazó PBS oldatban. A megfelelő elsődleges ellenanyagot egy éjszakán át inkubáltam a sejtekkel 4°C-on, majd háromszori 5 perces mosás után, hozzáadtam a megfelelő másodlagos ellenanyagot, amellyel 1 órán át történt szobahőmérsékleten az inkubálás. Ezekután háromszori 5 perces mosás következett, majd a sejtmagokat DAPI festékkel festettem 10 percig szobahőmérsékleten. A következőkben egy végső PBS mosás után a szilikon falakat egy csipesz segítségével eltávolítottam és fedőlemezzel, valamint FluorSave mounting médiummal fedtem le a tárgylemezt. A detektálás Zeiss LSM-710 konfokális mikroszkóppal végeztem 20x,40x, vagy 63x objektívval. A képeket Image J vagy Zen Blue 3.2 szoftverrel analizáltam. Az alkalmazott ellenanyagok/festékek listája, és hígítása a függelék 2.táblázatában található.

3.8. Sejtalak kvantifikáció

A sejtek alakjának mennyiségi meghatározásához és statisztikai méréséhez az A549 WT és a két A549 Tks4-KO sejtvonalon a formafaktor-analízist alkalmaztam. A következő egyenlet határozza meg a formafaktort (FF): $FF = 4\pi[\text{terület}]/[\text{kerület}]^2$ segítségével 0 és 1 közötti értéket kaphatunk, ahol a minél inkább kör alakú sejtfarmát az 1-hez közelebbi értékek jelzik [74]. Az alak és a sejtarhitektúra változásainak megfigyeléséhez falloidinnal, F-aktint jelölő festékkel festettem meg a sejteket. Ezután megmértem a sejtek területét és kerületét, majd a két érték

arányát meghatároztam. Ehhez sejttípusonként 55 képet (110 sejtet) elemeztem Image J segítségével, amelyeket 8 megismételt kísérletből generáltam.

3.9. Invadopódia vizsgálat és kolokalizációs koefficiens számítás

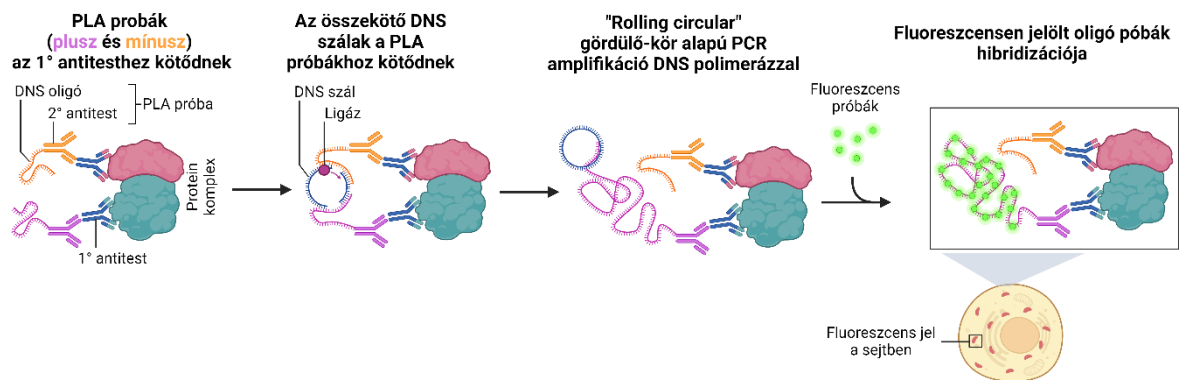
Az invadopódia mennyiségi meghatározása manuálisan történt az A549 sejteken. Az F-aktin és cortactin kolokalizációja által megjelenő narancssárgás pontszerű képződmények az invadopódiák, amelyek a sejtek szélein, citoplazmájában helyezkednek el. Az F-aktin és cortactin dupla festést gyakran használják invadopódia meghatározásra, mivel ezek az invadopódia kulcs építőelemei [37]. A kísérletben 60 sejtet vizsgáltam meg sejttípusonként, amelyek során egyenként leszámoltam az invadopódiák számát.

Ezenkívül a cortactin és az F-aktin fehérjék kolokalizációs együtthatóját az Image J EzColocalization plugin segítségével számoltam ki.

3.10. Proximity Ligációs Esszé (PLA)

Ahhoz, hogy megerősítem a Tks4-CAPZA1 kapcsolatát Duolink® Proximity Ligációs esszét (Merck, Sigma-Aldrich, Cat.: DUO92008, DUO92004, DUO92002, DUO82049) használtam. Az esszét a gyártó instrukciói alapján végeztem el (11. ábra). Először a sejteket levehető szilikon falú 12-well ibidi kamrába tenyésztettem 5000 sejt/lyuk koncentrációban. A sejteket 4% paraformaldehiddel fixáltam 15 percig szobahőmérsékleten. DPBS mosási lépés után a sejteket permeabilizáltam 0,1% Triton-X tartalmú DPBS-ben 10 percig szobahőmérsékleten. A permeabilizációt követően a sejteket blokkoltam blokkoló oldattal 1 órán át szobahőmérsékleten. Mivel egy protein-protein interakciót mutatunk ki, így ebben az esszében két elsődleges ellenanyagot használtam a két target proteinre egyszerre, amelynél fontos, hogy az egyik nyúlban, a másik pedig egy egérben termeltetett ellenanyag legyen Tks4 nyúl ellenanyag (Lányi és kutatócsoportja által létrehozott ellenanyag [75]), a CAPZA1 pedig egér ellenanyag (Santa Cruz: sc-374302) volt a kísérletben. Ezekkel az ellenanyagokkal egy éjszakán át inkubáltam a sejteket 4°C-on, illetve a negatív kontrollok esetében elsődleges ellenanyag nélkül inkubáltam a sejteket. A következő nap a PLA próbákat adtam hozzá a sejtekhez: anti-nyúl (PLA *plusz* próba) a nyúlban termeltetett elsődleges ellenanyaghoz, míg az anti-egér ellenanyag (PLA *minusz* próba) pedig az egérben termeltetett ellenanyaghoz kötődik, amelyeket 1 óráig 37°C-on inkubáltam. A kétféle másodlagos ellenanyagra egy szálú DNS volt kötve, ha az ellenanyagok kikötődve közel helyezkednek el egymáshoz, akkor az egyszálú DNS-ek összekapcsolódnak a komplementer próbákkal. Ezekután a komplementer DNS szálak

ligációja következett 37°C-on 30 percig. Majd ezt követte az amplifikációs lépés 37°C-on 100 percig, amely során a fluoreszcens próbák a kész szálakhoz hibridizálnak. A végső mosások után a sejtek magját DAPI sejtmag festékkel (ThermoFisher Scientific, Cat.: 62248) festettem és FluorSave mounting médiummal (Merck, Millipore, Cat.: 345789) fedtem le a tárgylemezt. Képeket Zeiss LSM 710 segítségével készítettem 63x nagyítással (random 10 mezőt fotóztam minden esetben). A Duolink® PLA esszé lehetővé teszi két protein interakciójának kimutatását sejten belül mivel, ha megfelelő közelségben vannak (kevesebb mint, ~40 nm), akkor pirosan világító pöttyök jelzik a fizikális interakciót.



11.ábra: A proximity ligációs esszé (PLA) folyamata. Az ábra a Biorender.com segítségével készült.

3.11. Totál RNS izolálás, RT-qPCR

TRIzol reagenssel (Life Technologies, ambion, Cat.:15596026) és Direct-zol™ RNA Miniprep Kit-tel (Zymo Research, Cat.: R2052) a gyártó instrukciói alapján total RNS-t izoláltam a sejtekből. Az RNS koncentrációt Nanodrop spektrofotométerrel határoztam meg. A cDNS szintézishez 300 ng total RNS-t és „First strand cDNA synthesis kit for RT-PCR” mixet (Merck, Roche, Cat.: 11483188001) használtam. A qPCR mérésekhez Taqman hidrolízis próbákat vagy gén specifikus primer párokat használtam. A próbák esetén a TaqMan™ Fast Advanced Master Mix-et (ThermoFisher Scientific, Cat.: 4444557), a gén specifikus primerek esetében a SyberGreen master mix-et (ThermoFisher Scientific, Cat.: 4368577) használtam. Az A549 sejtek esetében a GAPDH volt a housekeeping gén, míg HUES9 sejtek esetében RPLP0-t használtam housekeeping génként és $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszert alkalmaztam a relatív expressziós szintek számításához. A PCR méréseket Applied Biosystem Quantstudio (5 vagy 6 pro) vagy StepOne

PCR készülékeken végeztem. A függelék 3.táblázata tartalmazza a PhD dolgozatban alkalmazott primerek és próbák, reagensek listáját, szekvenciáját.

3.12. Wound healing esszé

Ehhez a kísérlethez wound healing inzertet tartalmazó 24-well platet (ibidi, Cat.: 80242) használtam. Minden lyuk szilikon fallal elválasztott 2 db 70 ul végtérfogatú kompartmentet tartalmazott, amikbe belenövesztettem a sejteket. A szilikon fal hozta létre a „sebet” a sejtrétegben, miután ezt eltávolítottam. Minden kompartmentbe 66 000 sejtet tettem ki 70 ul tápfolyadékba. Egy éjszakán át tartó inkubáció után a médiumot lecseréltem szérum mentes médiumra és még egy éjszakán át inkubáltam így a sejteket. A következő nap a sejtek elérték a konfluenciát, így a szilikon falat egy steril csipesszel eltávolítottam. A wellket DPBS-sel mostam, majd a lyukak egy részéhez 2% FBS F12K médiumot adtam, a másik részéhez a 2% FBS F12K médiumhoz 50 ng/ml EGF kezelést adtam. A sejt migrációt 24 órán át monitoroztam 15 percenkénti felvételekkel JuLI stage real-time live cell imaging rendszerrel 4x objektívvel lyukanként 2 mező fotózásával. A kinyert képeket Image J-vel analizáltam a Wound Healing Size Tool pluginnal.

3.13. TissueScan tüdő tumor cDNS Array

A Tks4 génexpresszióját megvizsgáltam tüdő tumorokban, amelyhez egy kereskedelmi forgalomban kapható cDNS array-t vásároltunk (TissueScan Lung Cancer cDNA Array III (Origene, Cat.: HLRT103)). A méréseket hasonlóan végeztem el, mint az idézett cikkekben [76,77]. Az array tartalmazott 48 különböző cDNS mintát: amelyből 8 normál és 40 különböző stádiumú tüdő tumoros minta (Stádiumok: IA n=6, IB n=6, IIA n=3, IIB=8, IIIA=5, IIIB=5, IV=7). A gyártó minden lyukba elötöltötte egy-egy beteg vagy egészséges szövetből származó cDNS mintát, én pedig Tks4 és a GAPDH Taqman próbákkal lemértem az adott mintában az expressziós szinteket. Az Origene, mint gyártó szerezte be az etikai engedélyeket a humán minták feldolgozásához, és rendelkezésünkre bocsátotta anonim módon a mintákhoz tartozó beteg információkat (függelék 4.táblázat). A relatív expressziós szintek kiszámításához a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszert alkalmaztam, amit a RT-qPCR részben említettem és GAPDH-t használtam háztartási (housekeeping) génként.

3.14. Proteome Profiler Humán Pluripotens őssejt Array

15 differenciálódási markerfehérje expressziós szintjének egyidejű mérésére egy membránalapú antitest array-t (R&D system, ARY010) használtam és a gyártó instrukcióit követtem. Ebben az esetben a 15 különböző antitest a membránhoz volt kötve, majd a sejtlyázátumokat adtam hozzá a membránhoz. Az array minden szükséges puffert és a másodlagos ellenanyagot is tartalmazta (Streptavidin-HRP ellenanyag). A kemilumineszcens jelet Chemidoc rendszerrel (BioRad) detektáltam. A pixel denzitás meghatározására az ImageJ szoftvert használtam az array kézikönyvének megfelelően.

3.15. Sejtproliferációs mérések

A HUES9 sejteknél Bürker kamrát és a Vi-Cell XR automatizált sejtszámláló készüléket használtunk a sejtek számolására Dr. Apáti Ágota csoportjával. 4 napon át követtük a sejtek proliferációját és az így kapott adatokat az 1. napra normalizáltuk és ábrázoltuk.

Az A549 sejtek proliferációjának méréséhez MTT esszét használtam (Cell Proliferation Kit I (MTT: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Merck, Roche, Cat.: 11465007001)). 2500 sejtet tettem ki 96 well plate-re, majd a kit protokollját követtem: először MTT-labelling reagenst adtam a well-ekhez, ezt követően a platet 4 órán át 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó sejtinkubátorban tartottam. Az inkubációs idő letelte után szolubilizációs puffert adtam a sejtekhez, és a platet egy éjszakán át inkubáltam. Másnap abszorbanciát mértem 600 nm-en, illetve 700 nm-en, ami a referencia hullámhosszúságot jelentette mikroplate leolvasóval. A sejtek számát 24 órán, 48 órán és 72 órán át határoztam meg az abszorbancia mérések alapján.

3.16. Immunprecipitáció (IP)

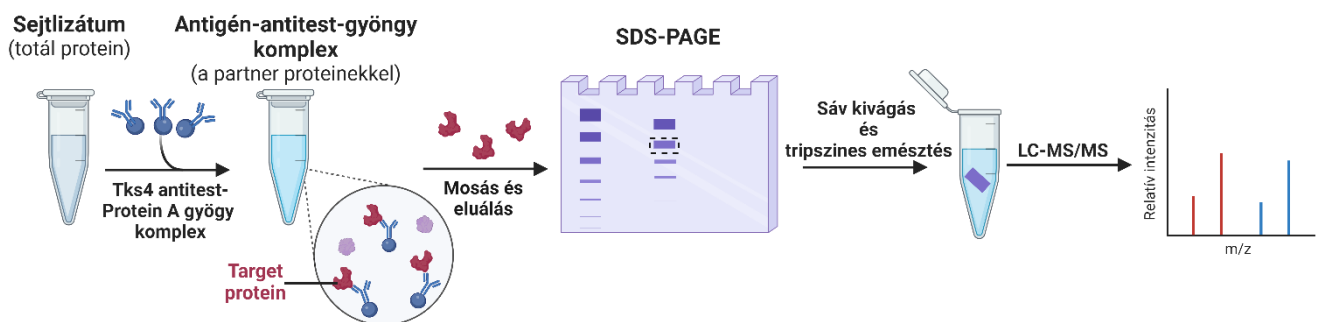
Elsőként sejtlyízist végeztem az össz-fehérjepreparációhoz különböző sejtekből (HCT116, MCF7, A549, HPAC, N87, HOP-92, NCI-H460, HUES9). Ezután Protein Sepharose A gyöngyöket (Sigma-Aldrich, Cat.: P9424) pipettáztam 1,5 ml-es csövekbe, majd a gyöngyöket centrifugáltam és háromszor mostam hideg DPBS-sel (4°C, 20 800 x g, 10 perc). A mosásokat követően a Tks4 antitestet és a sejtlyázátumokat külön-külön adtam a gyöngyökhöz. Az oldatokat ezután 1 órán át vagy egy éjszakán át forgattuk 4°C-on, hogy az antitest-fehérje kötődés létrejöhessen. A forgatási lépés után a gyöngyöket négyszer mostam 0,1%-os TritonX PBS oldattal (mosások között 1 perc, 7600 x g centrifugálást alkalmaztunk). Az utolsó mosási lépést

követően a gyöngyöket újra szuszpendáltam 2x mintapufferben, majd a csöveket 5 percig 100°C-on forraltam a fehérjék denaturálása érdekében (12.ábra). Ezt követően vagy Western blotot végeztem vagy a gélből kivágott sávokat tömegspektrometriai analízisre küldtem.

3.17. Tömegspektrometriai mérés (MS)

A sejtlízis, IP és az SDS-PAGE után a gélt Coomassie-kékkel festettem meg a fehérjék láthatóvá tételéhez. Ezután a megfelelő sávokat kivágtam a gélből a molekulatömeg-tartományuk alapján (10-25 kDa, 25-50 kDa, 50-100 kDa, 100-300 kDa). Ezeket a gélseleteket elküldtem az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft-nek (Debrecen, Magyarország) tömegspektrometriás elemzésre (12.ábra). Negatív kontrollként az IP gyöngyöket (ellenanyag nélkül) a sejtlizátumokkal inkubáltam.

Az öt sejtvonal MS-méréseiből kapott eredményeket a Scaffold viewer szoftver segítségével elemeztük. A fehérje küszöbértéket 99%-ra, a minimális peptidszámot kettőre, a false discovery rate-t (FDR) pedig 0,1%-ra állítottuk be az IP-mintákban jelen lévő fehérjék szűrése és azonosítása érdekében.



12.ábra: A Tks4-IP-MS folyamata. Az ábra a Biorender.com segítségével készült.

3.18. A potenciális kötőhelyek azonosítása Tks4 és CAPZ között

A potenciális kötőhelyek azonosítása Tks4 és CAPZA1 között Dr. Pancsa Rita segítségével történt. A Tks4 és a CAPZ heterodimer között egy lehetséges rövid lineáris motívum (SLiM) által közvetített kölcsönhatást kerestünk. Bár a Tks4 négy SH3 doménnel rendelkezik, specifikus felismerési motívumaikat még nem írták le. Az SH3 domének azonban általában prolinban gazdag motívumokat kötnek meg rendezetlen régiókban, a CAPZ pedig nem rendelkezik rendezetlen régiókkal, és eddig nem írták le, hogy kölcsönhatásba lépne SH3

doménekkel. Másrészt viszont ismert, hogy a CAPZ regulátorok kölcsönhatásba lépnek a CAPZ szár régiójával a CPI (capping protein interacting motívum) révén, amelyet az ELM adatbázis annotált (http://elm.eu.org/elms/LIG_ActinCP_CPI_1) [72]. Az adott motívumot meglehetősen hosszú és összetett, az ismert CAPZ kölcsönhatási partnerek kötődései (alignment) alapján készült, és mind univerzálisan konzervált, mind fehérjecsald-specifikus aminosavakat tartalmaz pozícióspecifikus módon [78]. A kereséshez a CPI motívumot analizáltuk és az univerzálisan konzervált aminosavakat megtartottuk, de a fehérjecsaldspecifikus pozíciókat kihagytuk a reguláris kifejezésből, így a következő CPI motívummintát kaptuk: (L.....R[PAVT][KRH][^DEN].{1,5}((R.)|. [RK]))..[PAS] ; ahol . bármelyik aminosavat jelenti, a szögletes zárójelben lévő aminosavak mind elfogadhatóak egy adott pozícióban, a szögletes zárójelben lévő ^-vel jelölt aminosavak nem elfogadhatóak az adott pozícióban, a szögletes zárójelben lévő számok pedig azt a tartományt jelzik, hogy az előző pozícióban lévő rész hányszor fordulhat elő.

Ezt a motívumot a SLiMSearch4 webszerverben kerestük az egész proteomban és megtaláltuk a humán Tks4-ben is. A SLiMSearch4 alapértelmezett beállításokkal keres, pontoz és rangsorol egy adott (reguláris kifejezésként megadott) motívummintát egy-egy kiválasztott fehérjében [73]. A Tks4 ugyanolyan magas pontszámot ért el, mint az ismert CAPZ-partnerek; a Tks4 L636-os pozíciójától kezdődő CPI-szerű motívum a 11. helyen szerepelt a humán proteomból vett interakciós partner listában, ami azt jelenti, hogy a Tks4 nagy eséllyel egy CAPZ-t kötő fehérje.

3.19. Adatbázis analízisek

Tks4 génexpressziójának vizsgálata tüdődomban

Ahhoz, hogy megvizsgáljam a Tks4 génexpresszióját nem kissejtes tüdődomban (NSCLC): tüdő adenokarcinómában (LUAD) és tüdő laphámsejtes karcinóma (LUSC) a GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) adatbázist alkalmaztam. A cut-off értéket a mediánok alapján határoztam meg, a p-érték: 0,001 és a LOG2FC cut-off értéke: 0,6 volt. A túlélési analízist is a GEPIA2 segítségével végeztem el.

Protein-protein interakciós analízis

A fehérje-fehérje interakciók elemzését a STRING adatbázis segítségével végeztem el (<https://string-db.org/>). A 0,40 feletti interakciós pontszámmal rendelkező interakciókat vettem

figyelembe a „text mining” eredmények kizárásával. Ezt az elemzést kísérletes és már publikált adatokkal, valamint saját Tks4-partner azonosítási eredményeink adataival egészítettük ki a Tks4-hez kapcsolódó releváns fehérje kölcsönhatások hálózatba illesztésének érdekében.

3.20. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 10 szoftverrel végeztük. A statisztikai szignifikancia meghatározásához nem párosított Student t-tesztet vagy ANOVA-t használtunk Tukey post hoc teszttel. A Tks4 expressziós szint biomarker szerepére ROC-görbe elemzést végeztem. A statisztikai szignifikanciát $p < 0,05$ vagy $p < 0,001$ értéken határoztam meg, és a p-értékeket az ábrákon csillaggal jelöltem.

3.21. Adatok elérhetősége

A doktorihoz kapcsolódó kutatásomban nyílt hozzáférésű adatokat használtam. A referencia (WT) Tks4 szekvenciát az NCBI GenBankból töltöttem le: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (Homo sapiens SH3 and PX domains 2B (SH3PXD2B), transcript variant 1, mRNS: NCBI referencia szekvencia: NM_001017995.3). A Tks4 partner molekulák fehérje-fehérje kölcsönhatás elemzésének adatait a String adatbázisból (<https://string-db.org/>) nyertem ki. A Tks4 expressziós szintjét az embrionális szövetekben az EMBL-EBI-Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) adatbázisából töltöttem le.

A Tks4-IP-MS elemzés adatkészlete a függelék 5. táblázatban található (ezen adatok nyers változata a bioRxiv preprint repositoryban található, accession number:10.1101/2023.01.13.523903). A Tks4 (SH3PXD2B) mRNS expressziós elemzése tüdő adenokarcinóma (LUAD) és tüdő laphámsejtes karcinóma (LUSC) betegeknél a GEPIA 2 adatbázisból (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) származnak. A Tks4 génexpresszió prognosztikai elemzését a tüdőrákos betegek teljes túlélésére vonatkozóan a GEPIA 2 adatbázis (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) segítségével vizsgáltam.

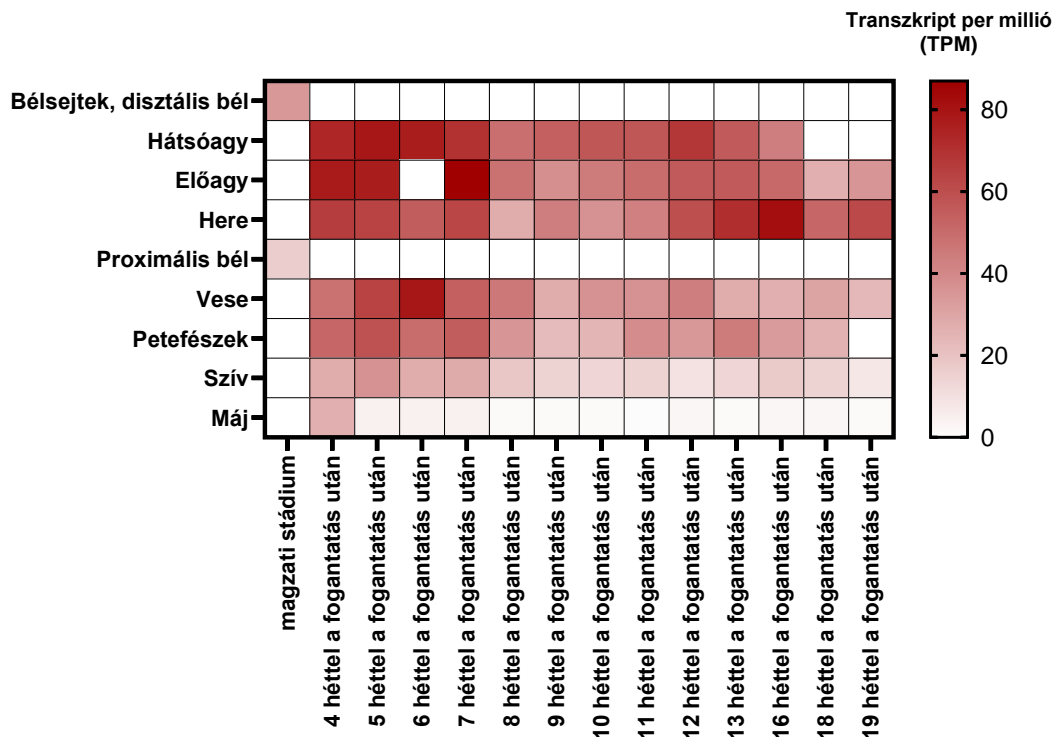
A CD2AP és a CAPZ heterodimer (PDB ID: 3AA6, <https://www.rcsb.org/structure/3AA6>), valamint a CKIP és a CAPZ heterodimer (PDB ID: 3AA1, <https://www.rcsb.org/structure/3AA1>) kristályszerkezetét a Protein Data Bank (PDB) RCSB.org adatbázisából (<https://www.rcsb.org/>) nyertem ki. A Tks4 és a CAPZ közötti potenciális kötőhelyek azonosítását a SLiMSearch 4 (<http://slim.icr.ac.uk/slimsearch/index.php>) segítségével elemeztük Dr. Pancsa Ritával.

4. Eredmények

Tks4 szerepének vizsgálata embrionális őssejtek biológiájában

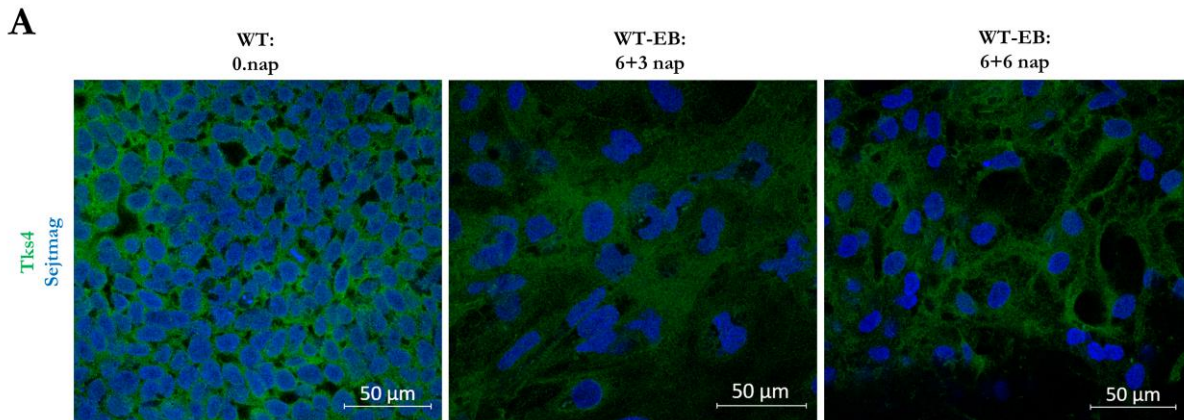
4.1. Tks4 hiányos embrionális őssejtvonalak létrehozása

Hogy fényt derítsünk a Tks4 embrionális őssejtbiológiában betöltött szerepére, először lekértem az EMBL-EBI-Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) adatbázisában elérhető adatokat, hogy megtudjam a Tks4 expressziós szintjét egyes embrionális szövetekben, ezek alapján megállapítottuk a Tks4 kifejeződik embrionális korban (13.ábra)[79–81]. Kiválasztottuk az Intézetünkben is elérhető HUES9 hESC sejtvonalat a további vizsgálatokhoz, és laborunkban is validáltam, hogy a vad típusú HUES9 sejtek kifejezik a Tks4-et. Az immuncitokémiai elemzés kimutatta, hogy a HUES9 sejtek expresszálják a Tks4 fehérjét, és hogy a Tks4 jelen volt a sejtek spontán differenciálódása során (14A ábra). Továbbiakban a HUES9 sejtekben a Tks4 humán embrionális őssejtekben betöltött szerepét vizsgáljuk a Tks4 gén (SH3PXD2B) CRISPR/Cas9 rendszerrel történő kiütésével.



13.ábra: A Tks4 expressziójának szintje az embrionális fejlődés során a különböző szervekben. Minél sötétebb a szín annál magasabb a Tks4 expressziója az adott szervben (szövettípusban). Az ábra az EMBL-EBI-Expression Atlas adatbázisában elérhető adatok alapján [79–81] a GraphPad Prism10 szoftverben készült.

Az SH3PXD2B 2. exonjában mutációkat hoztam létre, és a genetikai változásokat szekvenálással igazoltam (14B ábra). Két Tks4-KO HUES9 klónt állítottam elő, ahol inzerciós-deléciós eseményeken keresztül történt meg az SH3PXD2B gén kiütése, amelyek mindkét allélban stop kodonokat eredményeztek. A homozigóta Tks4-KO klónok mellett két SH3PXD2B heterozigóta HUES9 klónt is létrehoztam. A heterozigóta HUES9 klónokban a szekvenciaelemzések a Cas9 vágási hely melletti inzerciós-deléciós mutációt mutattak ki az egyik allélban, míg a másik allél érintetlen maradt. A Tks4 hiányát a HUES9 homozigóta Tks4-KO klónokban, illetve a Tks4 alacsonyabb expresszióját a HUES9 heterozigóta Tks4-KO klónokban western blottal (WB) (14C ábra) és immuncitokémiával (ICC) validáltam (14D ábra).



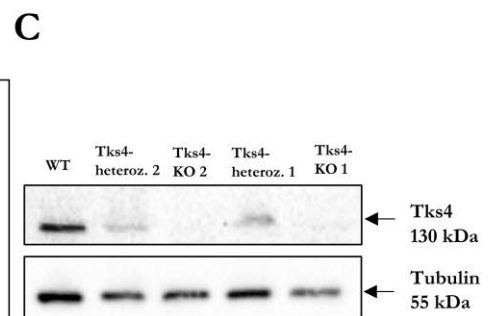
B

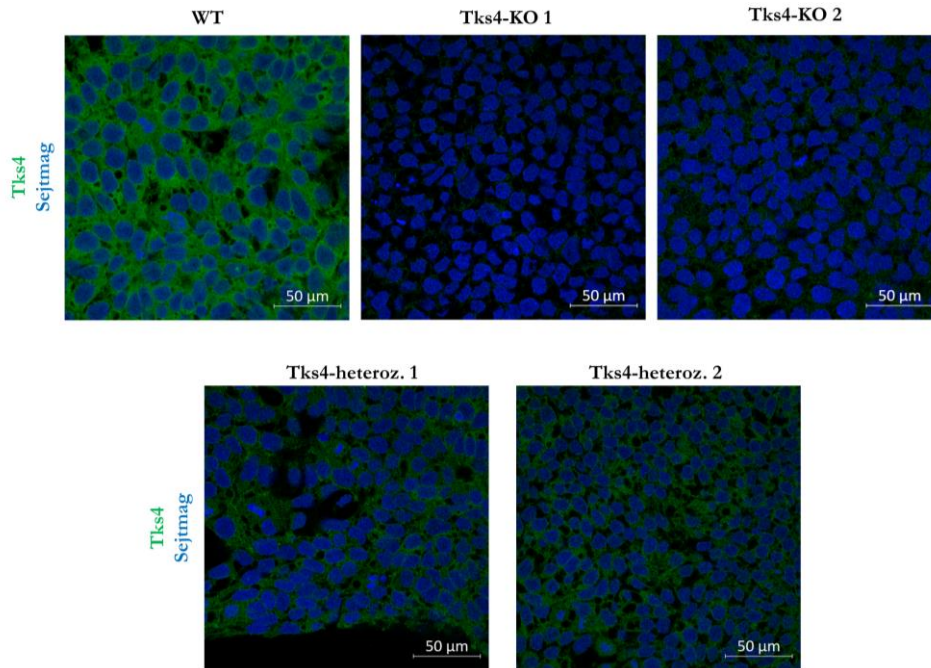
Tks4-KO 1 (KO/KO)
 allél 1: 9 bp deléció & GT inzerció
 GTCTACATCATCCGGGTCA-----GTGGTCCACCGAGGCCAATTTACCGGCGCTACAGCAAGTT
 allél 2: 8 bp deléció
 GTCTACATCATCCGGGTC-----CAGCGGCTCCACCGAGGCCAATTTACCGGCGCTACAGCAAGTT

Tks4-KO 2 (KO/KO)
 allél 1: 7 bp deléció
 GTCTACATCATCC-----JGGTCCAGCGGCTCCACCGAGGCCAATTTACCGGCGCTACAGCAAGTT
 allél 2: 8 bp deléció & missense mutáció
 GTCTACATCATCCGGCTC-----CAGTGGCTCCACCGAGGCCAATTTACCGGCGCTACAGCAAGTT

Tks4-heteroz. 1 (vad típus/KO)
 módosult allél: 14 bp inzerció & missense mutáció
 GTCTACATCATACATCATCCGGGTCTACATCAACGTGGTCCAGTGGCTCCACCGAGGCCAATTTACCGGCGCTACAGCAAGTT

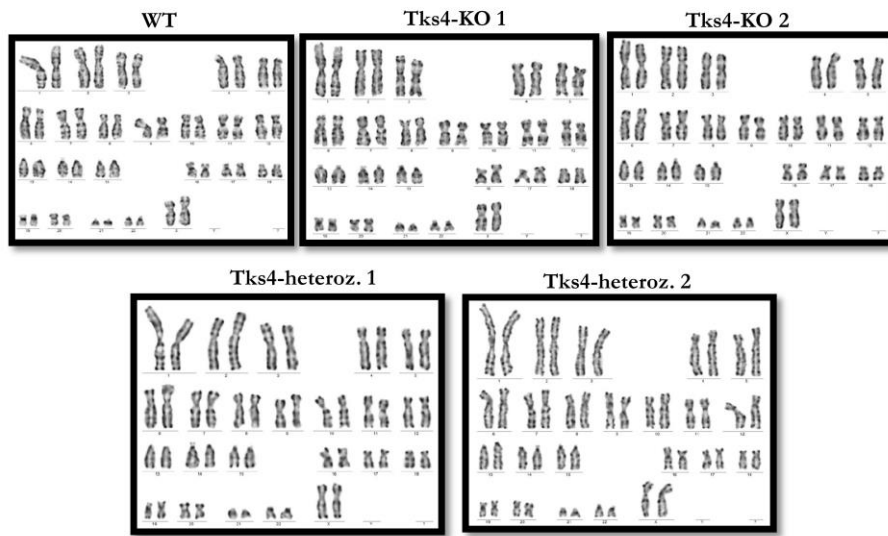
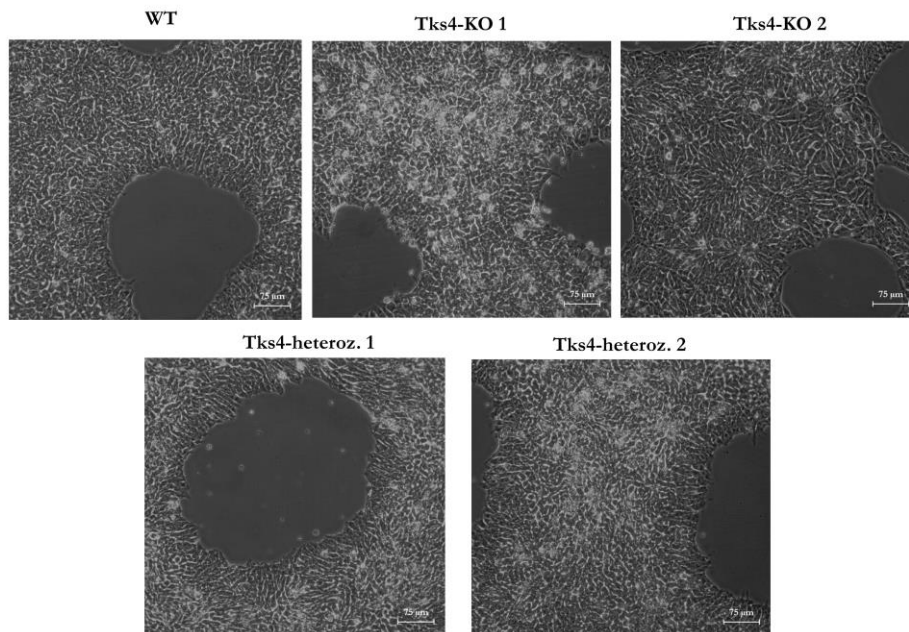
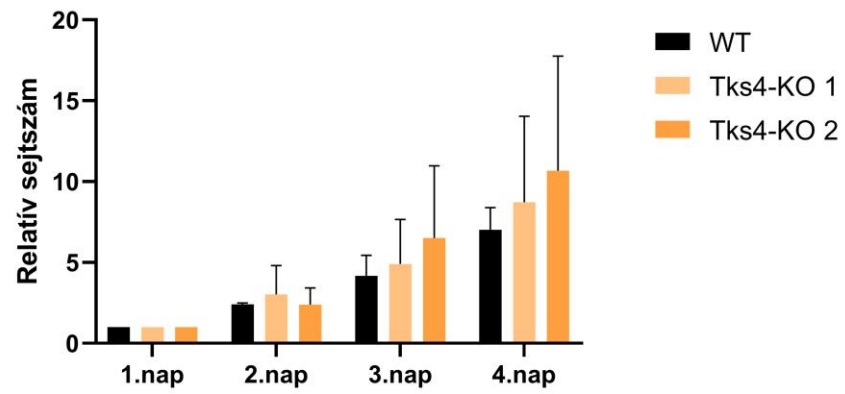
Tks4-heteroz. 2 (vad típus/KO)
 módosult allél: deléció, inzerció, missense mutáció
 GTCTACATCATCCGGGTCCAGTGGCTCCA-----CCGAGGCCAATTTACCGGCGCTACAGCAAGTT



D

14.ábra: Tks4-hiányos HUES9 sejtek előállítás. (A) Reprezentatív konfokális képek, amelyek a Tks4 immunfestését mutatják a vad típusú HUES9 sejtek spontán differenciálódása során (3 időpontban) az embrioid testecske (EB) képződés révén. (B) Az SH3PXD2B gén 2. exonjának szekvenciája a két újonnan létrehozott homozigóta mutált (KO/KO) és a két heterozigóta (WT/KO) HUES9 klónban. A mutáns nukleotidok sárgán vannak jelölve a szekvenált allél megfelelő régiójában. (C) WB és (D) ICC vizsgálat a Tks4 fehérje szintjének kimutatására a két Tks4-KO klónban és a két heterozigóta klónban, a WT sejtekkel összehasonlítva (jelölés: Tks4 - zöld, sejtmag - kék (DAPI)).

Ezekután Dr. Apáti Ágota csoportja segítségével ellenőriztük a HUES9 WT és homo/heterozigóta Tks4-KO sejtvonalak kromoszóma állományát, és a kariogram eredményei azt mutatták, hogy a sejtek kromoszóma állománya nem változott meg a Tks4 kiütést követően a vad típusú sejtvonalhoz hasonlítva (15A ábra). Valamint, a Tks4 hiánya nem okoz jelentős morfológiai változásokat a HUES9 sejtekben (15B ábra), és nem változtatja meg a Tks4-KO mutáns klónok proliferációs képességét (15C ábra).

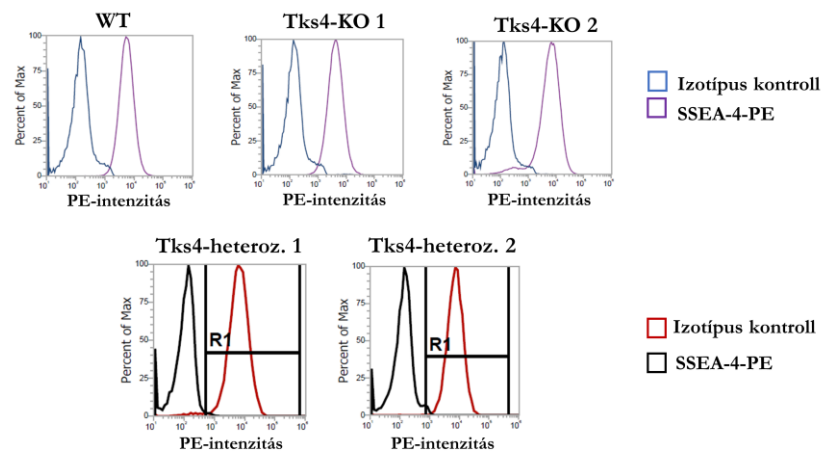
A**B****C**

15.ábra: A Tks4 génkiütés után a HUES9 klónok karakterizálása. (A) A HUES9 sejtvonalak G-sávós citogenetikai elemzése, amely megerősíti a normál kariotípust. (B) Reprezentatív fénymikroszkópos képek, amelyek azt mutatják, hogy a sejtvonalak megtartják a humán embrionális őssejtre (ESC) jellemző morfológiát. (C) Proliferációs mérések WT és Tks4-KO klónokban.

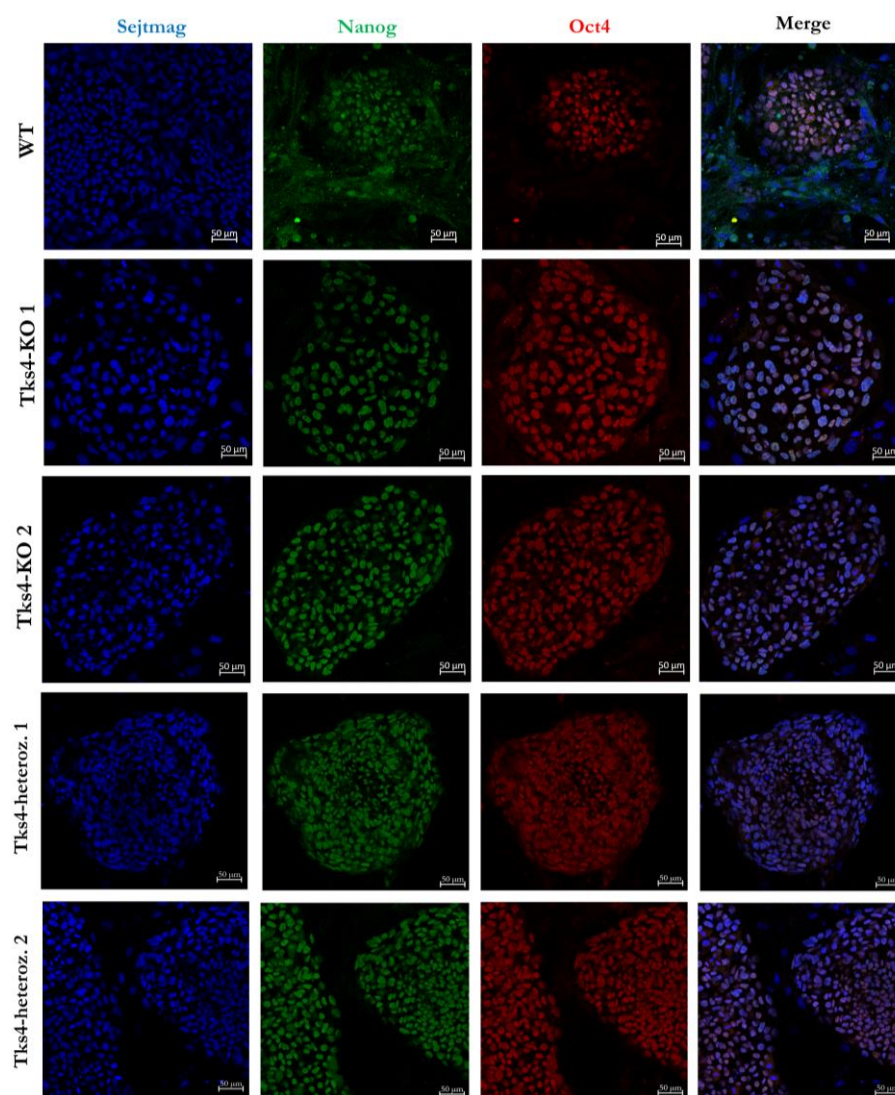
4.2. A Tks4-KO HUES9 sejtek megtartják pluripotens tulajdonságaikat

Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy a Tks4 mutációja vezet-e megváltozott pluripotenciához. Így áramlási citometriával az SSEA-4 pluripotencia markert vizsgáltuk meg Dr. Apáti Ágota csoportjával, és az eredmények azt mutatták, hogy az összes mutáns klón több mint 95%-os pozitivitást mutatott az SSEA-4 pluripotencia markerre (16A ábra). Valamint immuncitokémiával is vizsgáltuk egyéb pluripotencia markereket is: Nanog és Oct4, amelyekre a klónok pozitívak voltak (16B ábra). Ezek alapján elmondható, hogy a homo/heterozigóta Tks4-KO HUES9 klónok hasonló pluripotens fenotípust mutattak, mint a WT sejtek.

A



B



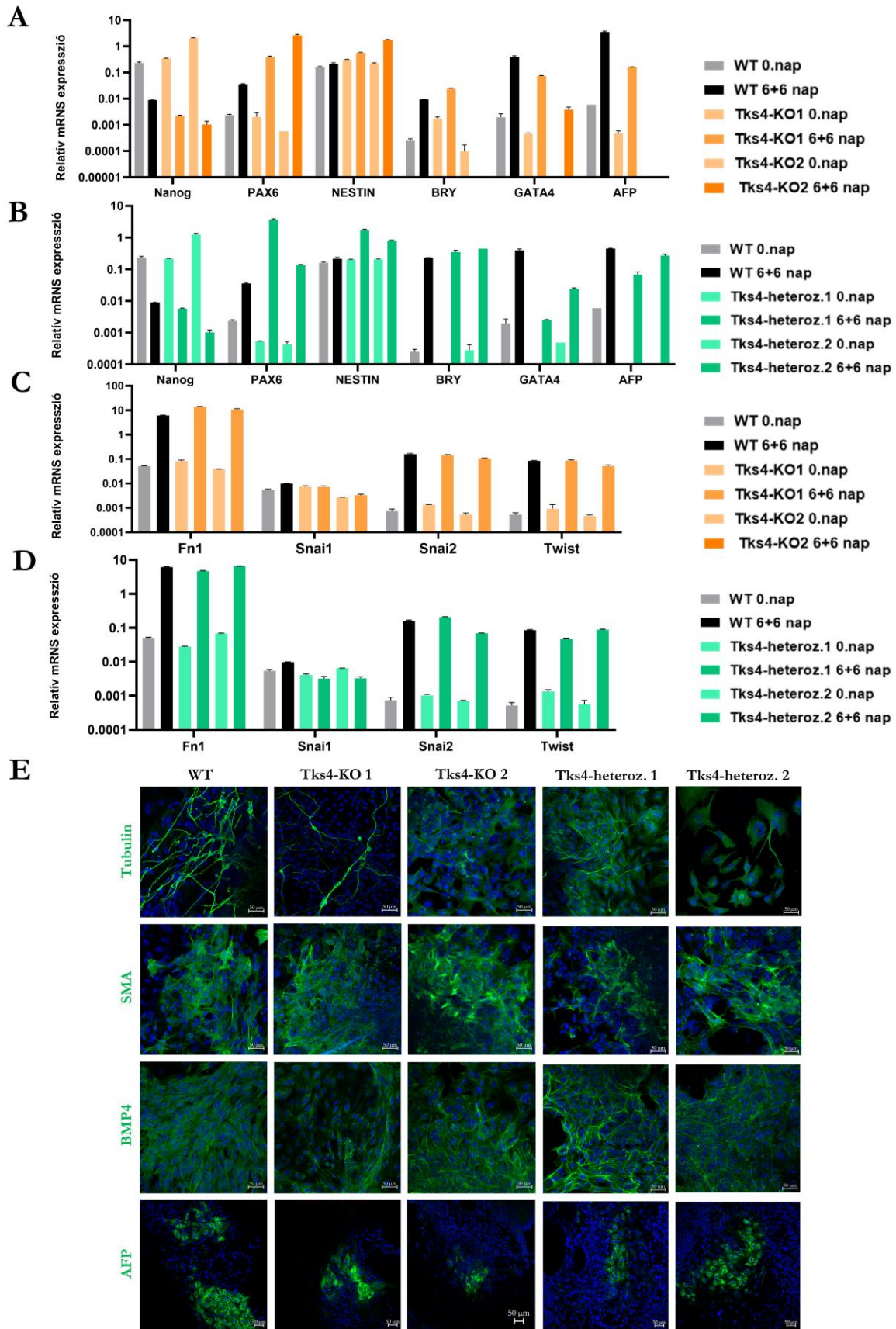
16.ábra: A létrehozott homozigóta és heterozigóta Tks4-KO HUES9 sejtek pluripotenciájának jellemzése. (A) A homo/heterozigóta Tks4-KO sejtek SSEA4-expresszióját áramlási citometriával elemeztük. Negatív kontrollként izotípus kontrollokat használtunk. (PE Phycoeritrin jelzés szintjét jelöli az ábrákon). (B) ICC festés, amely Oct4 (piros) és Nanog (zöld) expresszióját mutatja a sejtekben. A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük meg (20x nagyítás).

4.3. Tks4-KO sejtek spontán differenciálódási potenciáljának vizsgálata

A kísérletek a TTK Humán Pluripotens Össejt Laboratóriumában történtek Dr. Apáti Ágota csoportja segítségével. A létrehozott Tks4-KO sejtek spontán differenciálódási potenciálját is megvizsgáltuk az embrioid testecske (EB) képzési tulajdonságaikat tesztelve. A pluripotens össejteket egér fibroblaszt sejteken tartották fent kolóniák képzése céljából 2 passzázsig, majd 6 napig ultra-alacsony kötődésű plateken tartották őket, hogy EB-ket képezzenek. Az összes vizsgált sejt vonal EB-ket képezett. A 7. napon az EB-ket zselatinnal bevont felületre passzázták további 6 napra. A sejt kultúrákban a spontán differenciálódási folyamat nyomon követésére RT-qPCR segítségével használták. Így kimutattuk, hogy a Nanog pluripotencia marker lecsökkent a 6+6 napos differenciáltatás után. Megállapítottuk, hogy több csíralemez marker, mint az ektoderm marker PAX6 jelentősen megnövekedett és NESTIN expresszió kis mértékben emelkedett. A mezodermális markerek közül a Brachyury és GATA4 szintje megemelkedett a WT és az egyik Tks4-KO sejt kultúrában, de nem volt detektálható a második Tks4-KO kultúra differenciációja során (17A ábra). Az endoderm AFP marker szintje ugyan csak megemelkedett az EB formáció során kivéve a második Tks4-KO klónt (17A ábra). A heterozigóta differenciált klónok szintén csökkent Nanog expressziót mutattak, és az összes vizsgált csíralemez markert is kifejezték (17B ábra). A differenciált sejt populációban a három csíralemez rétegből származó sejtek jelenlétének kimutatására a 12. napon a fixált mintákat megfestették β -III-tubulinra (az ektoderm marker), SMA-ra (mezoderm marker), AFP-re (endoderm marker) és BMP4-re (mez/endoderm marker) (17E ábra). Az immuncitokémiai elemzések eredményei azt mutatták, hogy a homo/heterozigóta Tks4-KO HUES9 klónokban a WT sejtekhez hasonlóan minden egyes csíralemez marker jelen volt, kivéve a Tks4-KO 2 klónt, ahol az AFP fehérje alacsonyabb szinten volt jelen. Eredményeink arra utalnak, hogy a Tks4 csökkent expressziója a heterozigóta sejtekben és a Tks4 hiánya jelentősen nem befolyásolja az alapvető csíralemezek kialakulását, eltérést csak az egyik Tks4-KO sejt kultúra egy endodermális (AFP) marker és egy mezodermális marker (Brachyury) expressziójában figyeltünk csak meg.

Korábbi kutatásunkban felfedeztük, hogy a Tks4 hiánya egy vastagbélrákos sejt vonalban (HCT116) megváltozott fenotípust eredményez, és a Tks4-KO HCT116 sejtekben epiteliális-mezenchimális átmenethez (EMT) hasonló folyamatot indukál [62]. Ennek vizsgálatára, hogy a Tks4 hiánya nemcsak a rákos sejtekben, hanem az embrionális össejteken is befolyásolja-e az EMT-t, ami az embrionális fejlődés egyik kulcs folyamata, megmértem a Fibronectin (Fn1), Snai1 és Twist EMT markerek expressziós szintjét (17CD ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy a spontán differenciálódási folyamat során ezeknek a markereknek az expressziós szintje

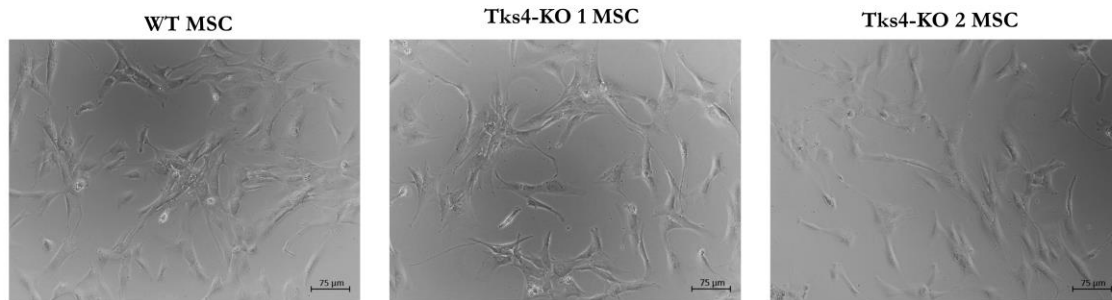
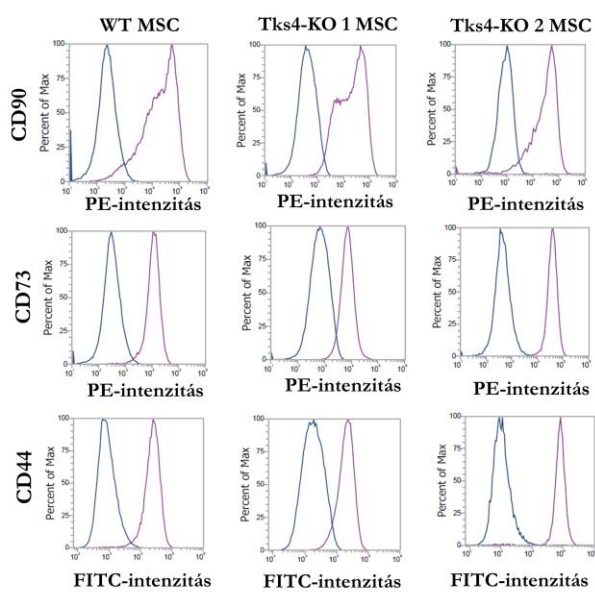
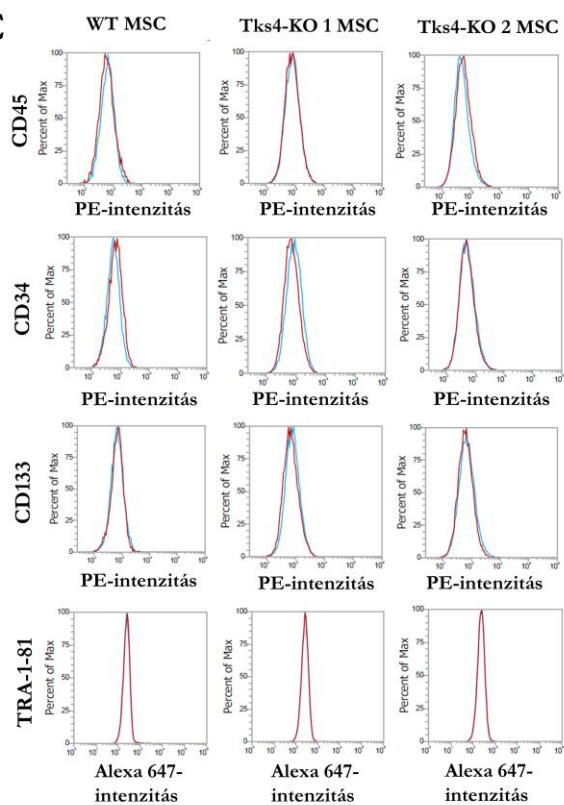
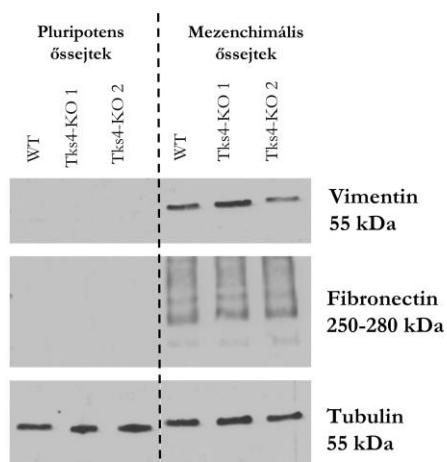
drámaian megnőtt; ugyanakkor nem észleltem expressziós szintkülönbséget a WT sejtek és a homo/heterozigóta Tks4-KO embrionális őssejtklónok között.



17. ábra: Spontán differenciációs kísérletek eredményei. A pluripotenciával kapcsolatos Nanog és a differenciációval kapcsolatos PAX6, alfa-fetoprotein (AFP), Brachyury (BRY), GATA4 és NESTIN gének expressziós szintjét RT-qPCR segítségével vizsgáltuk a spontán differenciálódás hatékonyságának felmérésére Tks4-KO (A) és Tks4 heterozigóta klónokban (B). Azokban az esetekben, ahol nincs eredmény az oszlopdiaagrammon, az azt jelenti, hogy a mérés abban a sejttípusban nem mutatott expressziót az adott mRNS-re. A génexpressziót az RPLP0 háztartási génre normalizáltuk. (C-D) Az EMT-vel kapcsolatos markerek (Fibronectin (Fn1), Snail1, Snai2, Twist) expressziós szintje az eredeti őssejtvonalban (0. nap), illetve a spontán differenciált sejtekben (a differenciálódás 6+6. napja). (E) A WT sejtek és a Tks4-KO sejtek mindhárom csíralemezzrétegbe történő differenciálódási potenciáljának vizsgálata ICC segítségével a spontán differenciálódás után: β -III-tubulin (az ektoderm marker), SMA (mezoderm marker), AFP (endoderm marker) és BMP4 (mez/endoderm marker). A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük.

4.4. A Tks4-KO HUES9 sejtek differenciálódása mezenchimális őssejteké (MSC)

Már korábbi kutatásokban vizsgálták, hogy a Tks4 szerepet játszik az egér csontvelő mezenchimális őssejtek (MSCk) differenciálódásában, és a Tks4 mutációja csökkent osteoblaszt és adipocita irányú differenciációt eredményez [60]. Annak vizsgálatára, hogy a Tks4-nek van-e hatása a humán embrionális őssejtekből differenciált MSC jellegű sejtekben is, WT sejteket és Tks4-KO HUES9 klónokat MSC sejtekké differenciáltatott Dr. Apáti Ágota kutatócsoportja (a korábban ebben a publikációban [82] leírtak szerint). A differenciálódás 6 hete alatt mind a WT, mind a Tks4-KO HUES9 sejtek MSC-szerű sejt morfológiát mutattak (18A ábra). Áramlási citometriával ellenőrizték a mezenchimális őssejtekre jellemző markereket (CD90, CD73, CD44), valamint pluripotencia marker (TRA-1-81) és hematopoetikus őssejt/sejt markereket hiányát is (CD34, CD133, CD45). Az eredmények alapján mindegyik sejttípus expresszálta az MSC markereket (18B ábra), továbbá a pluripotencia marker és hematopoetikus őssejt/sejt markerekre a sejtek MSC fenotípusnak megfelelő negatív eredményt mutattak (18C ábra). Ezekután Western blot segítségével vizsgáltam az EMT markerek (Vimentin és Fibronectin) expresszióját a pluripotens és a mezenchimális őssejtekben és azt tapasztaltam, hogy a Vimentin és Fibronectin expressziója hasonló mértékű az MSC sejtekben, függetlenül a Tks4 jelenlététől vagy hiányától (18D ábra), illetve ezzel is igazoltuk, hogy a pluripotens őssejtekből sikeresen differenciálódott MSC sejtek jöttek létre, mivel megjelentek az EMT markerek.

A**B****C****D**

18.ábra: A HUES9 sejtéből differenciáltatott Tks4-KO MSC jellegű sejtek jellemzése. (A) Reprezentatív fénymikroszkópos képek a generált MSC sejtekről, amelyek megnyúlt MSC-szerű morfológiát mutatnak (méretarányos sáv 75 μm). (B) A WT MSC és a két Tks4-KO MSC klón mezenchimális őssejtekre jellemző markereket (CD90, CD73, CD44) bemutató áramlási citometriás hisztogramok. (C) A pluripotencia markert (TRA-1-81) és hematopoetikus őssejt/sejt markereket (CD34, CD133, CD45) bemutató hisztogramok. (D) A Vimentin és a Fibronectin EMT (és differenciálódási) markerek WB analízise pluripotens őssejtekben (WT és Tks4-KO) és a létrehozott MSC (WT és Tks4-KO) sejtvonalakban.

4.5. Tks4 hiányának funkcionális vizsgálata a differenciáltatott mezenchimális őssejtekben

Miután meggyőződtem arról, hogy a Tks4 jelen van a létrehozott WT MSC-szerű sejtekben is (19A ábra), Proteome Profiler Humán Pluripotens őssejt array-t (R&D Systems, ARY010) használtam, hogy megvizsgáljam a Tks4 mutáció hatását a differenciálódott MSC sejtekben. Hőtérképen (19B ábra) ábrázoltam az eredményeket, hogy egységesen lássuk az összes marker változását a differenciáltatott MSCk-ben az eredeti pluripotens embrionális őssejtekhez képest. Az ábráról leolvasható, hogy a HUES9 pluripotens (WT és Tks4-KO) sejtek magas szinten expresszálták az Oct4, Sox2 és Nanog őssejtmarkereket, de a sejt differenciációs fehérjéket nem expresszálják a pluripotens természetüknek megfelelően. A differenciáltatott MSC vonalakban viszont a pluripotencia markerek expressziója csökkent, és a differenciációt szabályozó fehérjék expressziója megemelkedett.

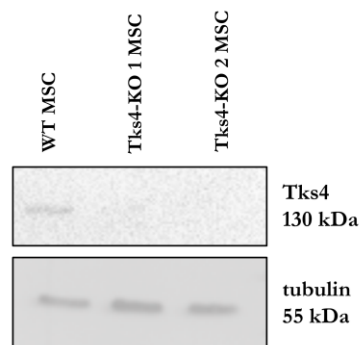
Továbbiakban csak a differenciáltatott vad és Tks4 hiányos sejtek mezenchimális tulajdonságait hasonlítottuk össze: általánosságban elmondható, hogy mindkét Tks4-KO MSC-klónban a sejtek differenciációjával kapcsolatos markerek alacsonyabb szinten voltak, mint a vad MSC klónokban (19BC ábra). A mezodermális markerek (Snai1 és FoxA2) expressziós szintjének csökkenése a Tks4-KO MSC klónokban arra utal, hogy a Tks4 hiánya esetén az MSC differenciálódás megváltozhat és kevésbé erőteljes lehet, mint a WT sejtekben. Hasonlóképpen, a csontszövet kialakulásában szerepet játszó GATA4 (GATA Binding Protein 4) és GSC (Homeobox protein gooseoid) transzkripciós faktorok szintje alacsonyabb volt a Tks4-KO MSC-kben, mint a WT sejtekben, ami tovább erősíti azt az hipotézist, hogy a Tks4 hiánya lassítja a mezenchimális irányú differenciálódást [83,84]. Ezek az adatok összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, hogy a Tks4-nek szerepe van a csontszövet-képződésben, ami összefügghet az FTHS betegek csontfenotípusával.

Érdekes módon az E-cadherin és a Snail szintje alacsonyabb volt a Tks4-KO MSC-kben (19C ábra), ami arra utal, hogy a Tks4 hiánya megváltoztathatja az EMT folyamatát az MSC-vé történő differenciálódás során.

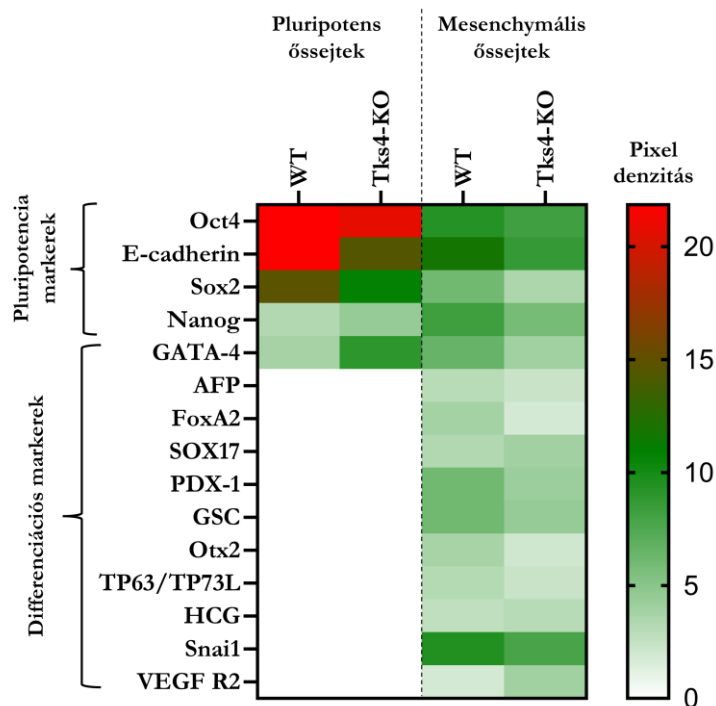
A két Tks4-KO klón nagyon hasonló fenotípust mutatott az említett differenciációs markerek tekintetében, kivéve az endoderm marker AFP expressziós szintjét. A Tks4-KO 2 klón a Tks4-KO 1 klónhoz és a WT sejtekhez képest csökkent AFP-szintet mutatott, ami összhangban van a spontán differenciálódási kísérletek során kapott ICC eredményekkel.

Összefoglalva, azt feltételezzük, hogy a Tks4-KO MSC sejtek részleges hibrid EMT fenotípussal rendelkeznek lecsökkent E-cadherin és transzkripciós faktor expressziós szintekkel. Tehát a Tks4 hiánya nem blokkolta a mezenchimális differenciációt az embrionális őssejtekben hiszen például a Vimentin és Fibronectin expressziós szintek, valamint maga a sejtek morfológiája lényegesen nem tért el a Tks4-KO klónokban, de a Tks4-génkiütés lassította a folyamatot, ahogy számos marker expressziója nem érte el a vadtypusban mért szinteket.

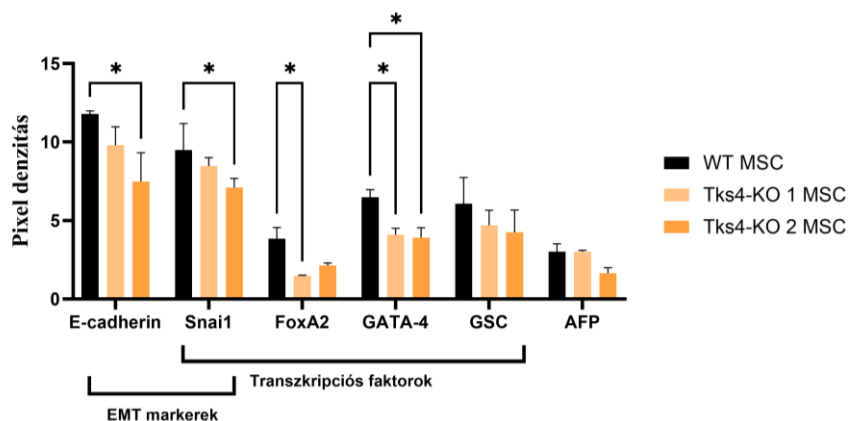
A



B



C



19.ábra: Tks4 hiányának funkcionális vizsgálata a mezenchimális őssejt irányú differenciáció során (A) WB, amely a Tks4 jelenlétét mutatja a WT MSC sejtekben és a Tks4-KO MSC klónokban a Tks4 fehérje hiányát. (B) Hőtérkép, amely összehasonlítja a pluripotens őssejt (WT és Tks4-KO) és a generált MSC (WT és Tks4-KO) sejtek Proteome Profiler Humán Pluripotens őssejt array eredményeit. A két Tks4-KO klónt külön-külön mértük, de a kapott adatsorokat összevontuk, és két független biológiai minta átlagát ábrázoltuk. (C) A korai differenciálódási markerek (E-cadherin, Snai1, FoxA2, GATA4, GSC, AFP) protein szintjeinek változásait külön is ábrázoltam oszlopdiagrammon és a két Tks4-KO MSC klón eredményeit szeparáltan is bemutatom.

A heterozigóta klónokat későbbi felhasználásra lefagyasztottam, a jelen kísérletsorozatban nem vizsgáltam tovább, mert a heterozigóta Tks4 mutációk egérben és emberben nem okoztak fenotípusos elváltozásokat, így nem modelleztük tovább *in vitro* ezt a genotípust. Ugyanakkor a heterozigóta Tks4 HUES9 sejtvonalak érdekes kiindulási pontjai lehetnek további vizsgálatoknak, ahol a Tks4 redukált expressziójának hatását lehetne vizsgálni hESCk használatával.

Tks4 szerepe a tumorbiológiában

4.6. A Tks4 hiányos A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonal létrehozása és jellemzése

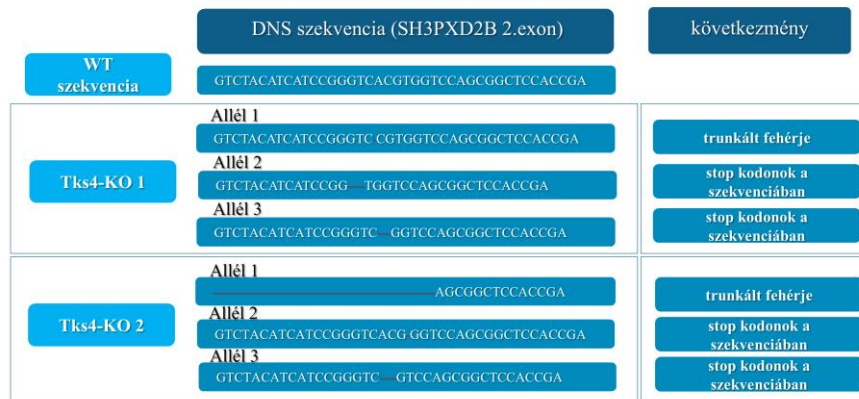
A Tks4 állványfehérje felfedezése óta számos munka fókuszált a Tks4 invadopodia és podoszóma képző hatására, de arról kevés kutatás jelent meg az elmúlt években (az én munkámmal párhuzamosan), ami a Tks4 tumorbiológiai EMT szabályozó szerepét is vizsgálta. Ezek a kutatások vastagbélrák esetében vizsgálták, hogy a Tks4 gén kiütése EMT-szerű fenotípust idéz elő, azonban a Tks4 alacsony expressziójának szerepét más ráktípusok EMT-folyamatában még nem vizsgálták. Ezért az én PhD munkám második részében egy eddig még ilyen szempontból nem kutatott ráktípust, a tüdőrákban előforduló EMT folyamatát vizsgáltam Tks4 jelenlétében és hiányában.

Az A549 tüdőrákos sejtvonalat választottuk modellnek a Tks4 fehérje EMT-re gyakorolt hatásának vizsgálatához tüdőrákban. Az A549 sejtek mérhető mértékben expresszálják a Tks4-et és epiteliális fenotípust mutatnak, így széles körben alkalmazzák őket a tüdőrákkutatásban, és ideálisak az EMT vizsgálatára [85,86].

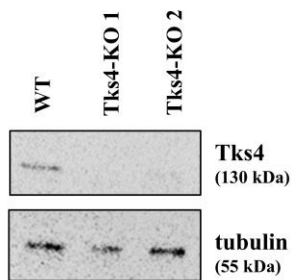
Jellemeztem az A549 sejteket, és a kariogram kimutatta, hogy három példányban tartalmazzák az 5. kromozómát, következésképpen három különböző SH3PXD2B allélt hordoznak (függelék 1.ábra). Ennek érdekében a CRISPR/Cas9 rendszert használtam a Tks4 fehérjét kódoló SH3PXD2B gén kiütésére. Kétféle Tks4-knockout (KO) A549-sejtvonalat hoztam létre, amelyek mindegyike csak az SH3PXD2B 2. exonjában tartalmazott különböző mutációkat (20A ábra). A Sanger-szekvenálás kimutatta, hogy mindkét Tks4-KO A549 klón mindhárom allélban deléciós mutációkat tartalmaz, amelyek leolvasási keret eltolódást (frameshift mutáció) és így számos stop kodon megjelenését okozták a Tks4 fehérje szekvenciájában. A sejtvonal SNP autentifikációs analízise kimutatta, hogy a létrehozott klónok genomjában az SNP mintázat megegyezik a vad típusú A549 sejtek DNS-ével (függelék 2.ábra), tehát maga a CRISPR technika nem okozott off-target elváltozásokat. A Tks4 fehérje hiányát Western blot (20B ábra) és immunocitokémia segítségével igazoltam (20C ábra). Megfigyelhető, hogy a SH3PXD2B mutációi nem befolyásolták a sejtek proliferációs kapacitását, amit MTT assay bizonyított (20D ábra); azonban a Tks4-KO A549 klónok morfológiája megváltozott, mivel a sejtek orsószzerű alakot mutáltak (20F ábra). Ezenkívül az F-aktinnal festett sejteket formafaktor kvantifikációnak is alávettem, ahol az 1-hez közeli érték kerekesebb alakot jelent [74]. A statisztikai analízis kimutatta, hogy a Tks4-KO klónok jelentősen alacsonyabb formafaktor

értékeket mutattak (20E ábra), jelezve, hogy a vad típusú sejtek jelentősen kerekesebb alakúak, mint a Tks4-KO sejtek.

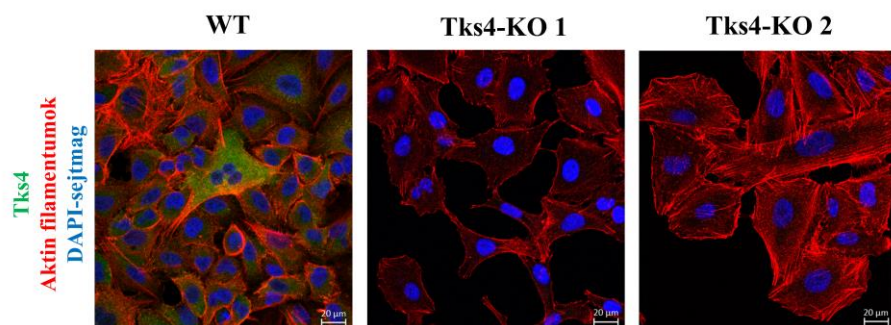
A



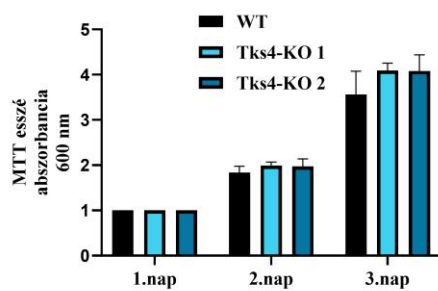
B



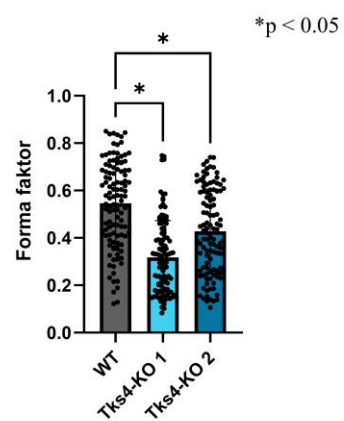
C



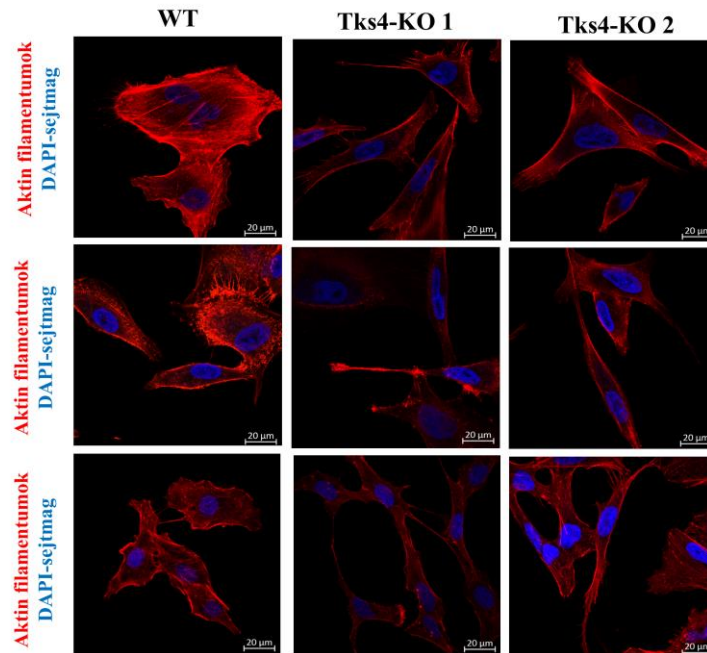
D



E



F



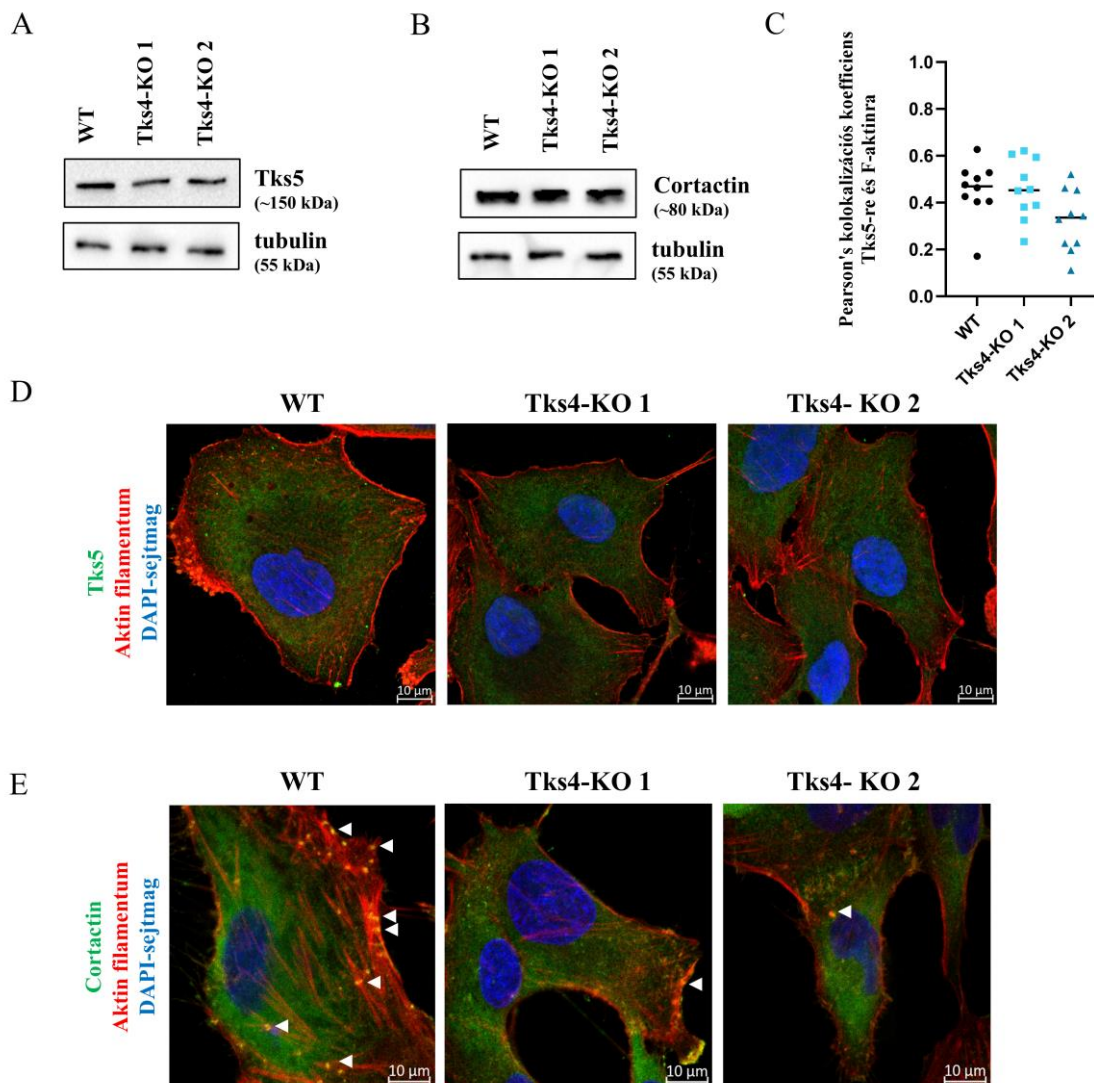
20.ábra: Tks4-hiányos A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtek jellemzése.

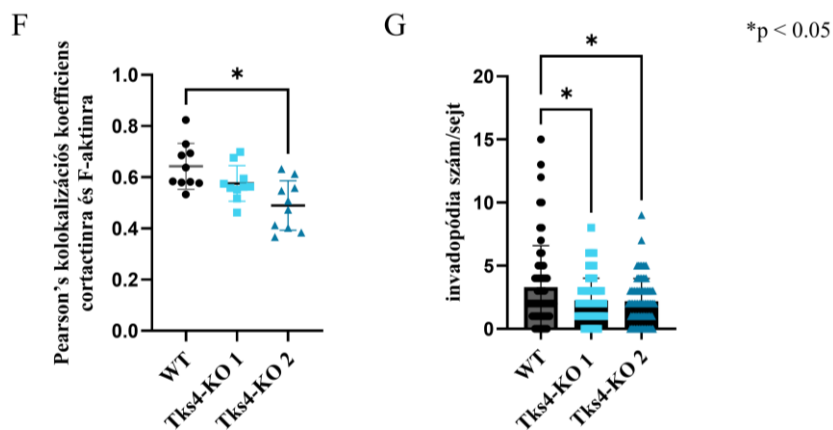
(A) A Tks4-KO klónok DNS-szekvencia-változásai (pirossal jelölt deléciós események) a CRISPR-Cas9 genomszerkesztés után, valamint ezek fehérjeszintű következményei. A referencia (WT) Tks4 szekvenciát (NM_001017995.3) az NCBI GenBankból töltöttem le. (B) A Tks4 hiányának validálása a Tks4-KO sejtekben WB segítségével. (C) A Tks4 hiányának validálása a Tks4-KO sejtekben ICC-vel (nagyítás: 40x). (D) A Tks4-KO és a vad típusú sejtek MTT-teszttel mért proliferatív kapacitásának összehasonlítása. (E) A formafaktort 0 és 1 közötti értéként adjuk meg, ahol a kör alakú sejtformát az 1-hez közelebbi értékek jelzik (n=110 minden sejtípusonként). (F) A Tks4-KO sejtek megnyúlt morfológiáját bemutató reprezentatív konfokális képek (nagyítás: 63x). A sejtmagok DAPI-val (kék), az aktin filamentumok pedig falloidinnal (piros) vannak festve. A kísérletet háromszor ismételt meg, és kísérletenként öt véletlenszerű mezőt rögzítettem.

4.7. A Tks4 kiütés hatása az invadopódiumok kialakulására és a sejt migrációra

A Tks4 podoszóma/invadopódia-képző szerepét már számos sejtípusban megerősítették, de tüdőráksejtekben még nem. E funkció vizsgálatára vad típusú és Tks4-KO A549 tüdőadenokarcinóma sejtekben vizsgáltuk az invadopódia markereket: Tks5 és a cortactin szintjét és lokalizációját.

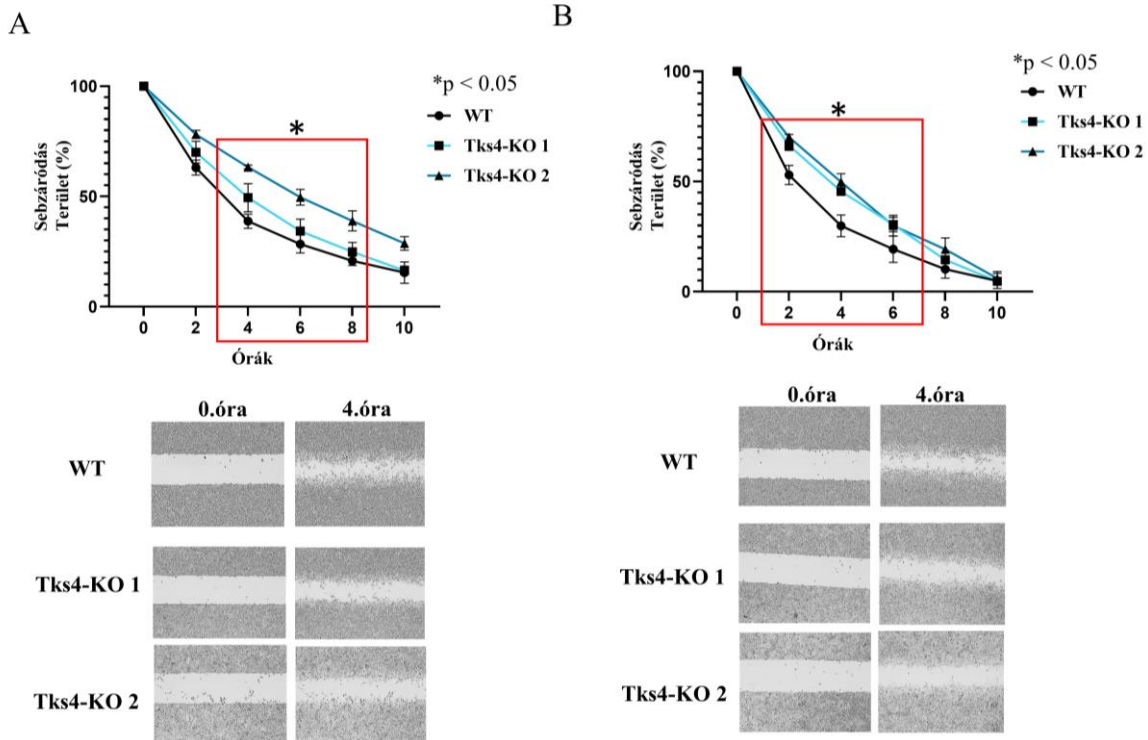
A WB eredmények azt mutatják, hogy a Tks4 kiütés nem befolyásolta a Tks5 és a cortactin fehérje expressziós szintjét (21 AB ábra). Ezt követően a sejteket F-aktinnal együtt festettem meg a Tks5 (21D ábra), illetve a cortactin esetében (21E ábra), és kiszámítottam a Pearson's kolokalizációs koefficiens (21 CF ábra). A Tks5/F-aktin festés esetében a kolokalizáció eleve alacsony volt a vad típusú A549 sejtekben, és nem volt kimutatható jelentős csökkenés a Tks4-KO klónokban (21C ábra). Ezzel szemben a cortactin/F-aktin festődés Pearson-koefficiense magas volt a vad típusú sejtekben, és jelentősen csökkent a Tks4-KO1 sejtekben (21F ábra). Ezen eredmények alapján mivel a cortactin és az F-aktin együttesen széles körben használt markere az invadopodia struktúráknak, ezeket használtam fel az invadopodiák specifikus azonosítására és kvantifikációjára a sejtekben [37,87–89]. A membrán körüli és citoplazmában lévő, cortactin és F-aktin kettős festődésű, kör/gyűrű alakú, pontszerű struktúrákat számszerűsítettem sejtenként és így az invadopodiák számát ábrázoltam. A koraktin/F-aktin pozitív fókuszok/pontok elemzése azt mutatja, hogy az invadopodia struktúrák száma mindkét Tks4-KO sejtben csökkent (21G ábra).





21.ábra: A Tks4 deléció hatása a tüdőráksejtek invadopódia képződésére. WB analízis a Tks5 (A) és a cortactin (B) esetében. A C panel az F-aktin és a Tks5 Pearson's-féle kolokalizációs együtthatóját ábrázolja. (D) A Tks5 és az F-aktin ICC festése (konfokális képek, nagyítás: 63x) (E) A kulcsfontosságú invadopódia-markerek, az F-aktin (piros) és a cortactin (zöld) immuncitokémiai festése, melyen az invadopódia-szerű struktúrákat jelölő narancssárga pontok láthatóak (fehér nyilakkal jelölve; konfokális képek, nagyítás: 63x). (F) Az F-aktin és a cortactin kolokalizációja a Pearson's-koeficiens meghatározása alapján. (G) Az invadopódiumok számának kvantitatív elemzése a cortactin és az F-aktin kolokalizációja alapján. Az ábra az invadopódiák átlagos számát mutatja sejtenként (minden pont egy sejtnek felel meg).

Tekintettel arra, hogy az invadopódiumok olyan membránstruktúrák, amelyeket a rákos sejtek mozgásra használnak, és általában a migráció szabályozásához kapcsolódnak, az A549 sejtek migrációs képességét vizsgáltam *in vitro* wound healing teszt segítségével. Az eredmények a Tks4-KO sejtek migrációs képességének enyhe csökkenését mutatták a vad típusú sejtekhez képest (22A ábra). Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az EGF fokozhatja a tüdőráksejtek migrációját, ezért megvizsgáltuk az EGF-kezelés hatását a Tks4-KO sejtek migrációs képességeire is [85]. Az eredmények azt mutatták, hogy a vad típusú sejtek migrációs sebessége jobban megnőtt EGF-stimuláció hatására a Tks4-KO sejtekhez képest (21B ábra). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a Tks4 kiütés csökkentette a sejtek migrációs képességét, még EGF-kezelés jelenlétében is.

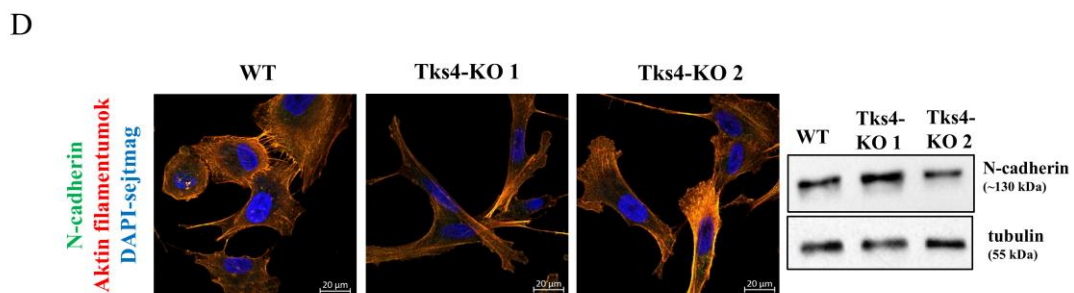
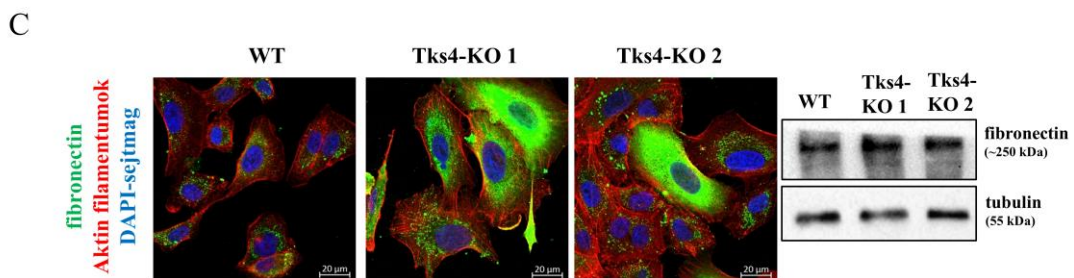
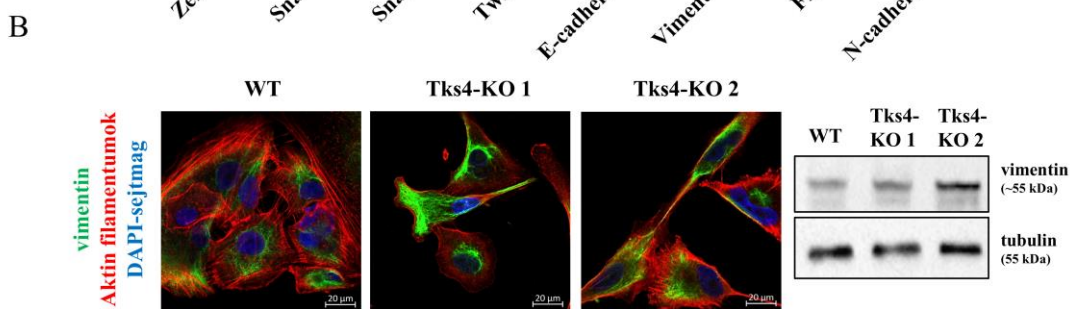
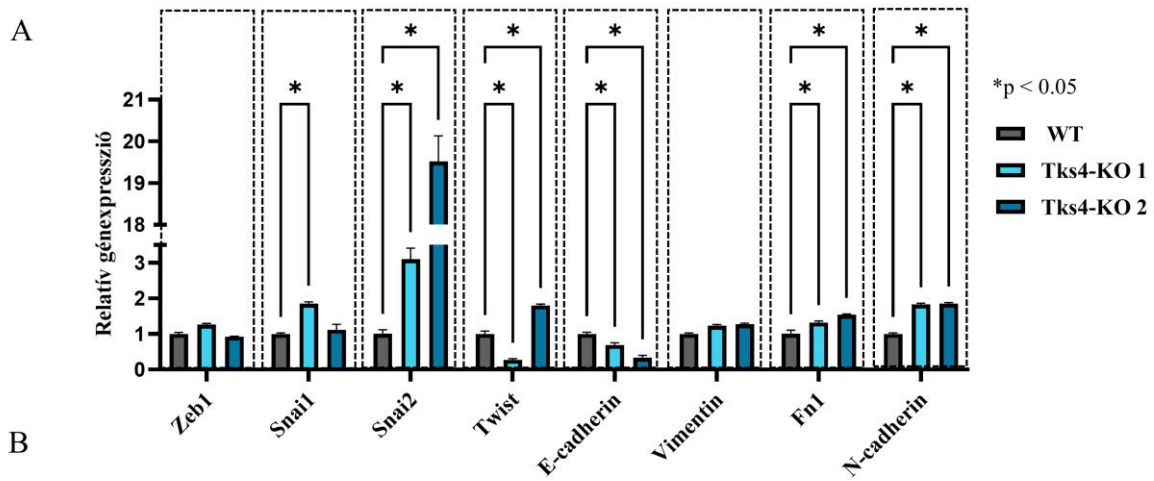


22.ábra: A Tks4-KO tüdőráksejtek migrációs képességének vizsgálata wound healing teszttel. A bal oldali panel a Tks4-KO sejtek migrációját mutatja (A), a jobb oldali panel pedig az EGF-kezelés (50 ng/ml) hatását a sejt migrációra (B). A piros jelölés a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a WT sejtekhez képest Tks4-KO sejtek esetében.

4.8. A Tks4 kiütés hatása az EMT-szerű folyamatra

Ezután RT-qPCR, WB és ICC módszerekkel megmértem az EMT markerek változását a Tks4 kiütését követően, hogy megvizsgáljam a Tks4 nemrég felfedezett, de kevésbé ismert hatását a tüdőráksejtek EMT folyamatára (23. ábra). A qPCR eredmények azt mutatták, hogy a mezenchimális markerek (fibronectin, Snai1, Snai2 és Twist) a vad típusú A549 sejtekben alapszinten expresszáálódtak; azonban mindkét Tks4-KO klónban a fibronectin és a Snai2 expressziós szintje emelkedett, míg az E-cadherin expressziója csökkent. Ezenkívül az egyik Tks4-KO klón a Snai1 és a Twist transzkripciós faktorok megnövekedett mRNS-szintjét mutatta (23A ábra). A vimentin és a fibronectin a Tks4-KO sejtekben a vad típusú sejtekhez képest megnövekedett expressziót mutat ICC és WB mérések alapján (23 BC ábra). A Tks4-KO sejtekben más EMT markerek, például az N-cadherin expressziós szintjében nem észleltünk szignifikáns különbségeket (23D ábra). Ezen markerek, különösen a fibronectin, vimentin, Snai2 és E-cadherin megváltozott expressziós szintje, valamint a Tks4-KO sejtek megváltozott,

megnyúlt morfológiája (20EF ábra) arra utal, hogy a Tks4-KO sejtek EMT-szerű fenotípust mutatnak.



23.ábra: Az EMT-vel kapcsolatos markerek expressziós szintjének változása a Tks4-KO sejtekben RT-qPCR, ICC és WB módszerekkel.

(A) Az EMT-vel kapcsolatos legfontosabb transzkripciós faktorok (Zeb1, Snail1, Snail2, Twist) és az epitheliális-mezenchimális markerek (N-cadherin, E-cadherin, Vimentin, Fibronectin (Fn1)) RT-qPCR analízise. A génexpressziós szinteket a GAPDH-ra normalizáltam. A vimentin (B), fibronectin (C), N-cadherin (D) (Alexa Fluor 488-zöld) lokalizációját F-aktinnal (Phalloidin-piros) festve ICC segítségével vizualizáltam (konfokális képek, nagyítás: 63x képek). A vizsgált fehérjék szintjét WB-al mértem (jobb oldali panelek).

4.9. A Tks4 expressziójának downregulációja a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) progressziójában

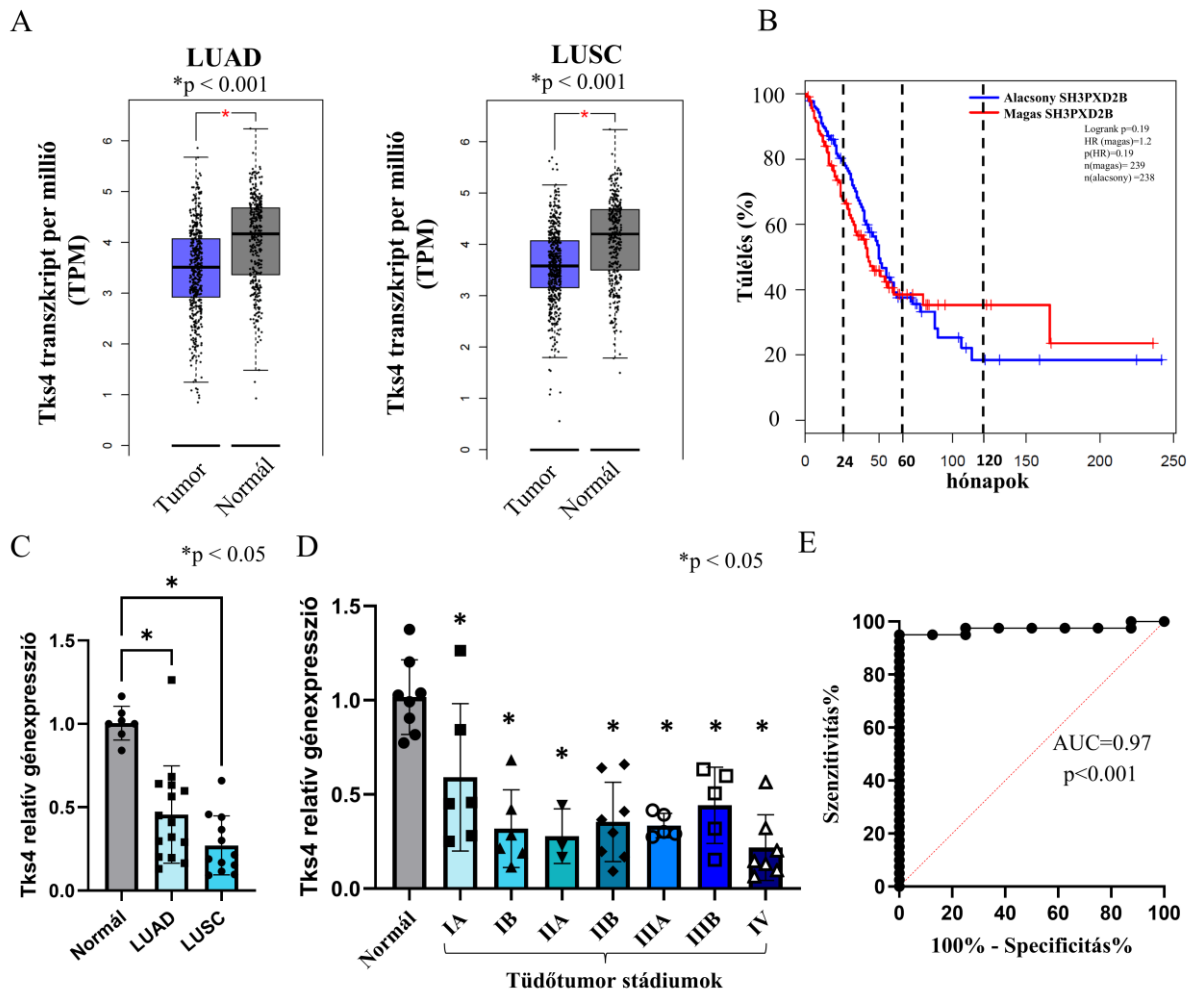
A Tks4 fehérje humán tüdőrákra gyakorolt hatásának további vizsgálatához a GEPIA2 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) adatbázis segítségével elemeztem a Tks4 mRNS szintjét tüdőrákos betegekből származó mintákban.

Az adatbázis a Tks4 mRNS expressziójának szignifikáns csökkenését mutatta ki a tumoros tüdőszövetekben a normál tüdőszövetekhez képest mind a tüdő adenokarcinóma, mind a tüdő laphámsejtes karcinóma esetében (24A ábra). Továbbá azt is megfigyeltem, hogy a Tks4 mRNS csökkent szintje a tüdőrákos betegek rosszabb túlélésével korrelál (24B ábra).

Az *in silico* eredmények validálása érdekében humán cDNS array-t végeztem a Tks4 mRNS-szintjének mérésére 48 humán tüdőszövetmintában, amely egészséges és különböző stádiumú nem kissejtes tüdőtumor mintákat is tartalmazott. A humán tüdőtumor cDNS array eredményei alátámasztották az adatbázis-elemzés eredményeit, és a Tks4 expressziójának csökkenését mutatták a tüdőrákos mintákban a normál mintákhoz képest (24C ábra). Emellett a tüdőrák stádiumainak elemzése olyan tendenciát mutatott, hogy a Tks4 szintje a normál szövetekben volt a legmagasabb, és minden stádiumban szignifikánsan alacsonyabb volt a Tks4 szintje, legfőképpen a legalacsonyabb szint az agresszívebb, IV. stádiumú tüdőrákban volt (24D ábra). A Tks4 alacsony expressziós szintje metasztatikus rákos betegeknél tovább validálta a Tks4-hiányos tüdőrák sejtmodellünket a Tks4 EMT szabályozásban betöltött szerepének tanulmányozására.

A csökkent Tks4 mRNS-szint, mint biomarker potenciáljának felmérése érdekében ROC (receiver operating characteristic) elemzéseket végeztem, amelyek megmutatják a Tks4 expressziós szintjének érzékenységét és specificitását a normál és tüdőrákos szövetek megkülönböztetésében (24E ábra). A TissueScan cDNS-array adatainak elemzése azt mutatta,

hogy a Tks4 expressziós szintje rendkívül specifikus és érzékeny markerként szolgál, amit a görbe alatti terület (AUC) 0,97-es értéke is jelez (24E ábra).



24.ábra: A Tks4 mRNS szintjének vizsgálata humán tüdő tumor mintákban bioinformatikai adatbázis és TissueScan cDNS array segítségével.

(A) Tks4 mRNS expressziós szintek a tüdő adenokarcinómában (LUAD) és laphámsejtes tüdőrákban (LUSC) a GEPIA2 adatbázisból (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>). Az expressziós szinteket normál tüdőszövetek (normál minták elemszáma LUAD adatsor esetében n=346, normál minták elemszáma LUSC adatsor esetében n=337) és tumoros tüdőszövetek (tumoros minták elemszáma LUAD adatsor esetében n=483, tumoros minták elemszáma LUSC adatsor esetében n=486) esetében vizsgáltam. (B) A Tks4 génextpresszió prognosztikai elemzése a tüdőrákos betegek túlélésére vonatkozóan a GEPIA2 adatbázis felhasználásával. A piros vonal a "magas Tks4-szintű csoportot" (n=239), míg a kék vonal az "alacsony Tks4-szintű

csoportot" (n=238) jelöli. A szaggatott vonalak az elemzés 2, 5 és 10 éves túlélési rátáját jelzik, tükrözve a Tks4-szint különbségeit a túlélési görbéken. (C) Humán TissueScan cDNS-array segítségével mért Tks4 génexpressziós adatok. Az expressziós szinteket normál tüdőszöveti minták (n=8), LUAD betegek (n=15) és LUSC betegek (n=12) esetében mutatjuk be. (D) A Tks4 génexpresszió elemzése különböző stádiumú tüdőrákszövetekben. Az array az I-től IV-ig terjedő stádiumokat tartalmazta. Ezeknek a stádiumoknak az osztályozása az adott daganat méretén, valamint a nyirokcsomók és/vagy távoli szervek egyidejű érintettségén alapul. A tüdőrák legagresszívabb stádiuma a IV. stádium, amely az áttétes tüdőrák. Az arrayben szereplő betegségstádiumok és a mintaszámok a következők voltak: IA (n=6), IB (n=6), IIA (n=3), IIB (n=8), IIIA (n=5), IIIB (n=5) és IV (n=7). Az expressziós szinteket a GAPDH-ra normalizáltam. A p-értékeket Student's unpaired/nem párosított t-próbával vagy ANOVA-teszttel és Tukey posthoc teszttel számoltam ki a normál szövetek Tks4 expressziójához hasonlítva. (E) A TissueScan cDNS array eredményeinek ROC-elemzése. AUC=Görbe alatti terület: 0.97.

4.10. Tks4-CAPZA1 interakciójának azonosítása

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a Tks4 szerepét a tumorbiológiában és így az EMT folyamatában, nem elég a leíró expresszós szint elemzések elvégzése, hanem a folyamat szignáltranszdukciós aspektusának vizsgálatára is szükség van. Ezért a Tks4 állványfehérjével kapcsolatba lépő jeltovábbító molekulák feltérképezését is elvégeztem, hogy a Tks4-általi EMT folyamat szabályozás lehetséges molekuláris közreműködőit azonosítsam. E célból Tks4 immunprecipitációt (IP) végeztünk különböző rákos sejtekből izolált fehérje mintákból, majd tömegspektrometriai analízisre (MS) küldtük a mintákat. Ötféle rákos sejtvonalat vizsgáltunk: MCF7- emlőrák sejtvonalat, HPAC- hasnyálmirigyrák sejtvonalat, N87- gyomorrák, HCT116- vastagbélrák, és A549- tüdőrák sejtvonalat. A potenciális Tks4-partner fehérjéket tartalmazó listát a függelék 5.táblázatában összesítettem.

Az MS-analízis során azonosított új potenciális partnerfehérjék közül a CAPZA1 felkeltette a figyelmünket a korábban még nem vizsgált Tks4-CAPZ interakció miatt, valamint, hogy a CAPZA1 mind az öt elemzett sejtvonalban jelen volt, mint potenciális Tks4 partnermolekula (1. táblázat).

1. táblázat: Részlet a Tks4-IP-MS adatokból (a teljes adatsor a függelék 5.táblázatában található).

vizsgált sejtvonala	MS-azonosított fehérje:	Azonosító	Alternatív ID	Molekula tömeg	peptidszám	
					Anti-Tks4-IP minta	kontroll minta
A549	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	P52907	CAPZA1	33 kDa	4	0
HCT116	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	P52907	CAPZA1	33 kDa	9	1
N87	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	P52907	CAPZA1	33 kDa	9	1
MCF7	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	P52907	CAPZA1	33 kDa	4	0
HPAC	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	P52907	CAPZA1	33 kDa	4	0

A CAPZA1 a CAPZB-vel egy CAPZ néven ismert heterodimert alkot, amely az aktin filamentumok tüskés “barbed” végének szabályozott lezárásáért felelős. A legújabb eredmények azt mutatták, hogy a CAPZ szabályozó szerepet játszik az EMT-vel kapcsolatos eseményekben. Huang és munkatársai kimutatták, hogy a CAPZA1 gátolja az EMT-t az aktin citoszkeleton átrendeződésének szabályozásával, és a CAPZA1 alacsony szintje elősegíti az EMT folyamatot, amit alacsony oxigénszintű körülmények között hepatocelluláris karcinóma sejtekben mértek ki [90,91]. Ezen ismeretekre alapozva, úgy döntöttünk, hogy megvizsgálom a Tks4-CAPZA1 kapcsolatot.

Elsőként adatbázis elemzéses lépéseket tettünk Dr. Pancsa Rita segítségével a Tks4 és CAPZA1 fehérjék közötti lehetséges kölcsönható szekvencia motívumok azonosítására. Elsősorban rövid lineáris motívumok (SLiM) által közvetített interakciók jöhettek számításba a két fehérje közötti interakciós felszín kialakításában. Ennek az oka az volt, hogy bár a Tks4 négy SH3 doménnel rendelkezik, és ezeken keresztül kapcsolatba tud lépni más jeltovábbító molekulák prolinban gazdag régióival, a CAPZ heterodimer nem rendelkezik prolinban gazdag rendezetlen régiókkal, amelyek ideális kötőhelyként szolgálhatnának az SH3 domének számára, ezért az SH3-mediált kölcsönhatási mechanizmust nagyon valószínűtlennek ítéltük. Azonban felfedeztük, hogy a Tks4 harmadik és negyedik SH3-doménje közötti hosszú rendezetlen régió tartalmaz egy erősen konzervált motívumot, amely nagymértékű hasonlóságot mutat CAPZ-t kötő fehérjékben leírt „Actin Capping fehérjékkel kölcsönható rövid lineáris motívumhoz” (ennek a motívumnak a neve: capping protein interacting motif: CPI; lásd http://elm.eu.org/elms/LIG_ActinCP_CPI_1). Ez a motívum viszonylag hosszú, és

rendelkezik néhány általánosan konzervált aminosavval, valamint néhány fehérjecsald-specifikus aminosav pozícióval, amelyek még a CAPZ validált kötőpartnerei között is jelentős variabilitást mutatnak. A SlimSearch4 szerver segítségével rákerestünk az egyszerűsített (általánosan konzervált aminosavak által alkotott) CPI motívumra, hogy megtaláljuk a humán proteomban az olyan fehérjéket, melyek tartalmazzák ezt a motívumot [73]. Az eredményül kapott lista a Tks4 636-654. szekvenciáját is tartalmazta, mégpedig az 5. legmagasabb pontszámmal. Ez a pontszám egy kombinált mutató, mely figyelembe veszi a motívum konzerváltsági mintázatát, hosszát, és rendezetlenségi fokát (hozzáférhetőségét). A SlimSerch4 számításai szerint tehát a Tks4-ben azonosított CPI motívum nagyon hasonló a CAPZ ismert interakciós partnereiben fellelhető már validált CPI motívumokhoz (25. ábra). A SlimSearch4 szervertől kapott magas pontszám abból adódik, hogy a Tks4-ben megtalálható CPI motívum optimális, rendezetlen környezetben van, tehát hozzáférhető, és hogy a valódi, funkcionális motívumokra jellemző szigetes evolúciós konzerváltsági mintázatot mutat [92]. A Tks4-CAPZA kölcsönhatást feltáró kísérletes eredményeink és az azonosított motívum kedvező tulajdonságai nagyon ígéretes, új CPI motívum útján kölcsönható CAPZ partnerré teszik a Tks4-et.

SLIMSearch4

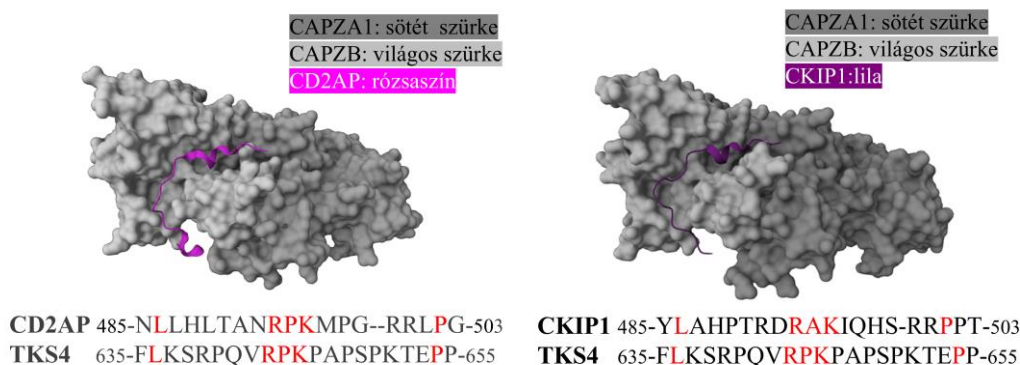
Instances Conservation Function Filters PSSM														
Query: L.....R[PAVT][KRHM][^DEN].{1,5}((R.)(. [RK])). [PAS] Species: Homo sapiens														
Download: idit json 168 hits in 162 proteins Page 1 of 2 First														
Protein Name	Gene Name	Peptide	Length	Start	End	mammalia	metazoa	qfo	vertebrates	conservation			accessibility	
										Disorder score	AlphaFold2 accessibility	AF2 structural classification		
Zinc finger protein 469	ZNF469	ndGLGERPPPRPRRTQAPgsr	17	986	1002	1.000	1.000	1.000	1.000	0.982	0.869	IDR		
Fibronectin type III domain-containing protein 1	FNDC1	qprLSLTQAGRPRPTSQGRSHSSsdp	20	1033	1052	0.814	0.549	0.829	0.933	0.979	0.813	IDR		
Capping protein, Arp2/3 and myosin-I linker protein 2	CARMIL2	gqpLRHPTRARPRRQHHRRPPpgp	21	1016	1036	0.232	1.2e-4	0.002	0.023	0.965	0.74	loop		
Capping protein, Arp2/3 and myosin-I linker protein 3	CARMIL3	gykLRHQQTGRPRPRTTPPg	17	971	987	0.215	2.8e-5	0.002	0.004	0.959	0.848	IDR-SS		
SH3 and PX domain-containing protein 2B	SH3PXD2B	npFLKSRPQVRPKPAPSFKTEPpg	19	636	654	0.297	0.209	0.120	0.163	0.951	0.89	IDR		
Tonsoku-like protein	TONSL	dmpLTRSRRPRRGTGQNRPPSSsg	20	842	861	0.892	0.957	0.713	0.963	0.945	0.917	IDR		
CRACD-like protein	CRACDL	papLPPPGGARARRARLQHSsa1	17	299	315	0.335	0.646	0.842	0.830	0.929	0.87	IDR		
SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	SH3KBP1	tekLSHPTTSRPKATGRPPSqs1	18	476	493	0.541	4.9e-6	0.003	0.009	0.926	0.88	IDR-SS		

25.ábra: A SlimSearch4 szerver segítségével kerestük az általánosan konzervált aminosavak által alkotott egyszerűsített CPI motívumot a humán proteomban. Zölddel kiemelve a CAPZ már ismert interakciós partnerei, pirossal a Tks4 (mint újonnan azonosított) CAPZA1 partnert.

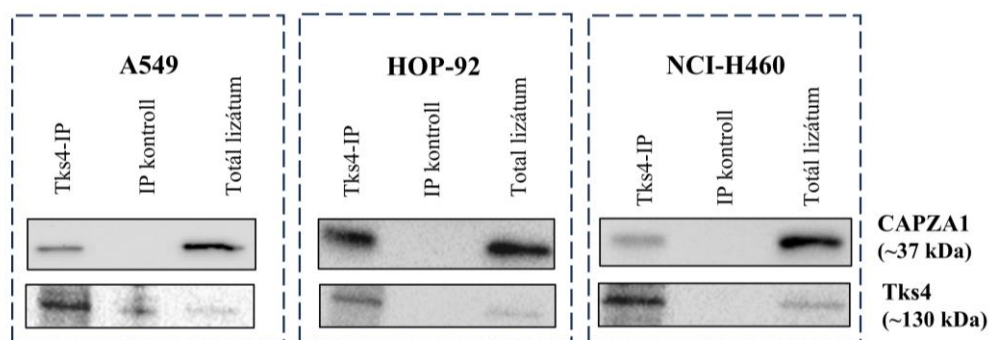
Régóta ismert, hogy a CAPZ heterodimer úgynevezett “stalk” szár régiójához ezen a motívumon keresztül kötődnek a capping protein regulátorok, mint például a kazein kináz 2-interacting protein-1 (CKIP1), CD2 Associated Protein (CD2AP), capping protein Arp2/3 myosin I linker (CARMIL) fehérjék, SH3 Domain Containing Kinase Binding Protein 1 (SH3KBP1 vagy másnéven Cin85) [93]. A CPI motívumok által közvetített, már ismert kölcsönhatásokat a 26A ábrán mutatom be. Az ábrán a CAP heterodimer kristályszerkezete látható komplexben két különböző partner, a CD2AP és a CKIP1, CPI motívumával. A Tks4-ből származó CPI-szerű motívum szekvenciáját összehasonlítottuk a CD2AP és a CKIP1 CPI motívumaival. Az illesztések (26A ábra alsó része) azt mutatják, hogy a Tks4 a CPI motívum legfontosabb pozícióiban (a 26A ábrán pirossal jelölt pozíciók) ugyanazokat vagy hasonló aminosavakat tartalmaz, mint az ismert interaktorok. Ezen elemzés alapján azt a konklúziót vontuk le, hogy a Tks4-ben található CPI-szerű motívum valószínűsíthetően az elsődleges CAPZ kölcsönhatási hely, és potenciálisan a CAPZ heterodimer szár régiójához kötődhet, hasonlóan más Capping fehérje regulátorokhoz (26A ábra).

Következő lépésben az MS analízis mellett, két másik módszerrel is megpróbáltam kimutatni a Tks4 és CAPZA1 interakcióját tüdőrák sejtekben. A mérésbe további két másik tüdőtumorból származó sejtvonalat is bevontam (HOP-92: tüdő nem kissejtes karcinóma, NCI-H460: tüdő nagysejtes karcinóma). Először az endogén Tks4 fehérjét a sejtlizátumokból immunprecipitáltam, majd a megfelelő partner fehérje (CAPZA1) elleni Western blottal hívtam elő. A CAPZA1 mindhárom sejtvonalban jelen volt a Tks4-által szervezett fehérje komplexben (26B ábra).

A



B

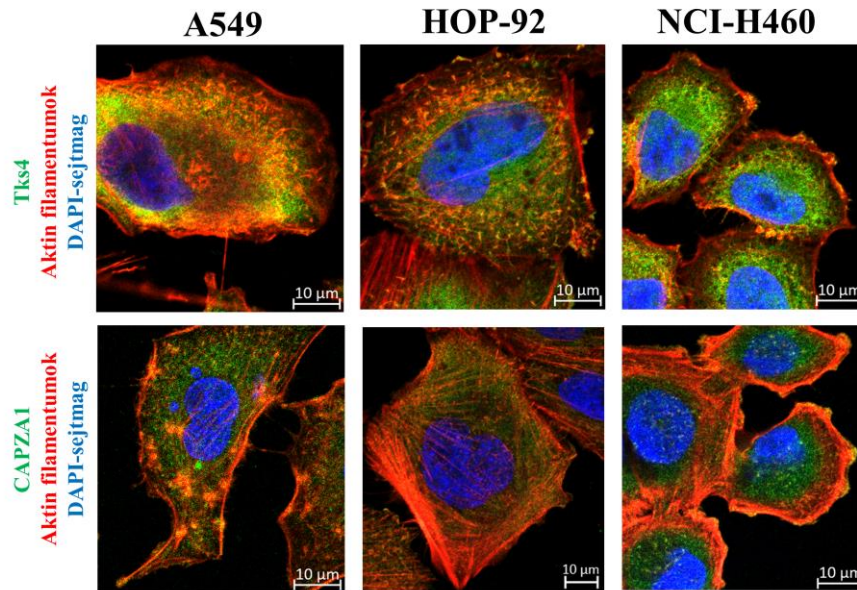


26.ábra: Tks4-CAPZA1 kölcsönhatás validálása. (A) A Tks4-ben a CAPZ fehérje kötéséhez szükséges interakciós motívum azonosítása, amelyhez két már ismert CAPZ-vel interakcióba lépő fehérje: a CD2AP és a CKIP CAPZ-vel alkotott komplexének kristályszerkezetét töltöttük le a Protein Data Bank (PDB) adatbázisból (<https://www.rcsb.org/>). A CAPZ heterodimerrel együtt kristályosított CD2AP-ban lévő CAP interakciós motívum (PDB ID:3AA6; bal oldal), valamint CKIP-ben lévő CAP interakciós motívum (PDB ID:3AA1; jobb oldal) vizualizációja. Alsó részen: a CD2AP és a CKIP fehérjékben lévő CAP interakciós motívumok és illesztésük a Tks4-ben prediktált CAP motívumhoz. A kölcsönható motívum konzervált aminosavai pirossal vannak kiemelve. (B) A Tks4-CAPZA1 kölcsönhatás validálása Tks4-IP-WB segítségével. A vad típusú A549, HOP-92, NCI-H460 tüdőrák sejtekből Tks4-IP történt, majd CAPZA1 antitesttel WB-t végeztem.

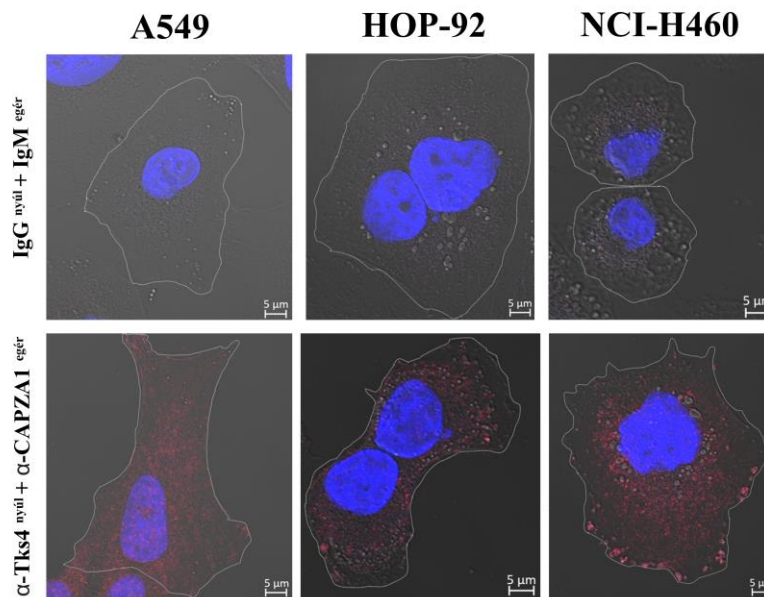
Ezután ICC technikával is validáltam a Tks4-CAPZA1 kölcsönhatás jelenlétét A549, HOP-92 és NCI-H460 tüdőrákos sejtekben, hogy a fehérje-fehérje kölcsönhatás helyét is meghatározzam a sejtekben (27 ábra). A két fehérje lokalizációjának bemutatására a Tks4-et vagy a CAPZA1-t F-aktinnal festettem, ami általánosságban azt mutatta, hogy mind a Tks4, mind a CAPZA1 jelen van a membrán közeli struktúrákban és a sejtek citoplazmájában (27A ábra). Különösen a Tks4 kimutatásánál találtunk erőteljesebb feldúsulást és kolokalizációt az aktinban gazdag invadopódiákra jellemző membránstruktúrákban. A CAPZA1 lokalizációjának vizsgálatakor a CAPZA1 festődési mintázata tipikusan kis pontszerű eloszlást mutatott a sejtek citoplazmájában. Ez arra utal, hogy a CAPZA1 az aktin nem lezárt (barbed end) végeihez kötődik, amelyek a citoplazmában szétszóródva helyezkednek el. Az ICC után, Proximity ligációs esszét (PLA) is végeztünk annak megerősítésére, hogy a két fehérje a sejtekben is kölcsönhatásban van egymással, nem csak a sejtlizátumokban. A Tks4 és CAPZA1 kettős

festésének eredményét fixált sejtekben a 27B ábrán mutattam be, amely a két fehérje szoros közelségét és kötődését bizonyítja mindhárom tüdőrákos sejtvonal sejtjeinek citoplazmájában.

A



B



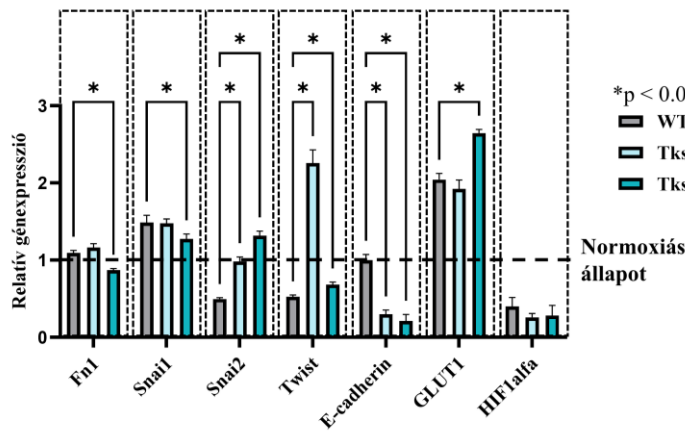
27.ábra: A Tks4 és a CAPZA1 lokalizációjának vizualizációja három tüdőrákos sejtvonalban (A549, HOP-92 és NCI-H460). (A) A Tks4-t vagy a CAPZA1-t (Alexa Fluor 488-zöld) F-aktin (falloidin-piros) kettős festése (konfokális képalkotás; nagyítás: 63x). (B) A Tks4-CAPZA1 kötődés megerősítése a három tüdőráksejtben Duolink PLA festéssel. A felső sorokban a kontroll minták láthatók, melyek csak másodlagos antitestekkel lettek kezelve (anti-nyúl IgG és anti-egér IgM). Az alsó sorban, anti-Tks4 (nyúl) és anti-CAPZA1 (egér) antitesteket egyszerre használtam a két fehérje közötti kötődés vizualizálására. A piros pontok a két fehérje

közötti kölcsönhatáskor jelennek meg, amikor a két másodlagos ellenanyag közel kerül egymáshoz. A sejthatárokat fehér vonalak jelzik a fáziskontrasztos képek alapján (63x).

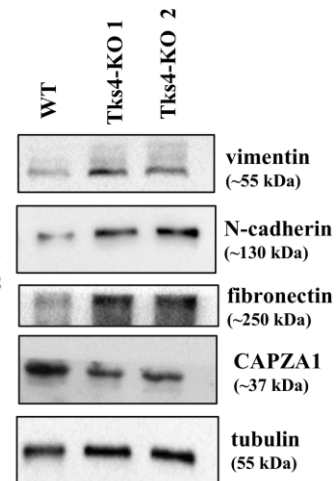
4.11. Tks4 kiütés CAPZA1-re gyakorolt hatásának és az EMT indukálásában betöltött szerepének vizsgálata

A Tks4 kiütés CAPZA1-re gyakorolt hatásának és az EMT indukációban betöltött szerepének további vizsgálatához hasonló kísérleti elrendezést alkalmaztam, mint amelyet a CAPZA1 hepatocelluláris karcinóma sejtekben betöltött szerepének vizsgálatához alkalmazott Huang és mtsai. [91]. Ennek megfelelően a tüdőráksejteket 3 napig alacsony oxigénszintnek (3%) tettem ki, hogy EMT indukáló környezetet hozzak létre. Az alacsony oxigénszintű állapot általános hatását a GLUT1 (glükóztranszporter 1) fokozott expressziójának és a HIF1alfa csökkent mRNS expressziójának mérésével igazoltam az alacsony oxigénszintnek kitett mintákban (28A ábra) [94,95]. Megfigyeltük, hogy az alacsony oxigénszint a Snai2 mRNS (fő EMT TF) szintjét megemelte minden mintában (vad és Tks4-KO) összehasonlítva a normál oxigénszint melletti körülményekkel. Valamint azt az eredményt kaptuk, hogy a Tks4-KO klónokban alacsony oxigénszint esetében, a Snai2 és a Twist mRNS szintjének emelkedése, és az E-cadherin szintjének csökkenése kifejezettebb volt a vad típusú sejtekhez képest. Fehérjeszinten is vizsgáltuk a vimentin, az N-cadherin és a fibronectin expressziójának változásait. Jelentős vimentin, N-cadherin és fibronectin szint növekedést figyeltünk meg a Tks4-KO sejtvonalakban a vad típusú sejtekhez képest (28B ábra). Ezek az eredmények azt jelezték, hogy a Tks4-KO sejtvonalak állapota jobban eltolódott az EMT-folyamatok irányába, mint a vad típusú sejteké, és gyorsabb választ mutattak az EMT-indukáló alacsony oxigénszintű környezetre [96]. Továbbá a CAPZA1 szintje is lecsökkent a Tks4 hiányos sejtekben alacsony oxigénkoncentrációs körülmények között az EMT folyamat során (28B ábra), ami a CAPZA1 és a Tks4 potenciális koregulációjára utalhat.

A



B



28.ábra: Az alacsony oxigénkoncentrációjú állapot hatása az EMT-szerű fenotípusra A549 tüdőráksejtekben. (A) Az EMT-markerek (Fn1= fibronectin, Snai1, Snai2, Twist) és az alacsony oxigénállapotot jelző GLUT1 és HIF1alfa markerek expressziójának mérése RT-qPCR segítségével 3 napos alacsony oxigénkoncentrációt (3% oxigén) követően. Az adatokat a normoxiás állapotú kontrollmintákhoz normalizáltuk, szaggatott vonallal jelezve „1” szinten. (B) Az EMT markerek (vimentin, N-cadherin, fibronectin) és a CAPZA1 expressziós szintjének mérése WB-vel. A tubulint loading kontrollként használtuk.

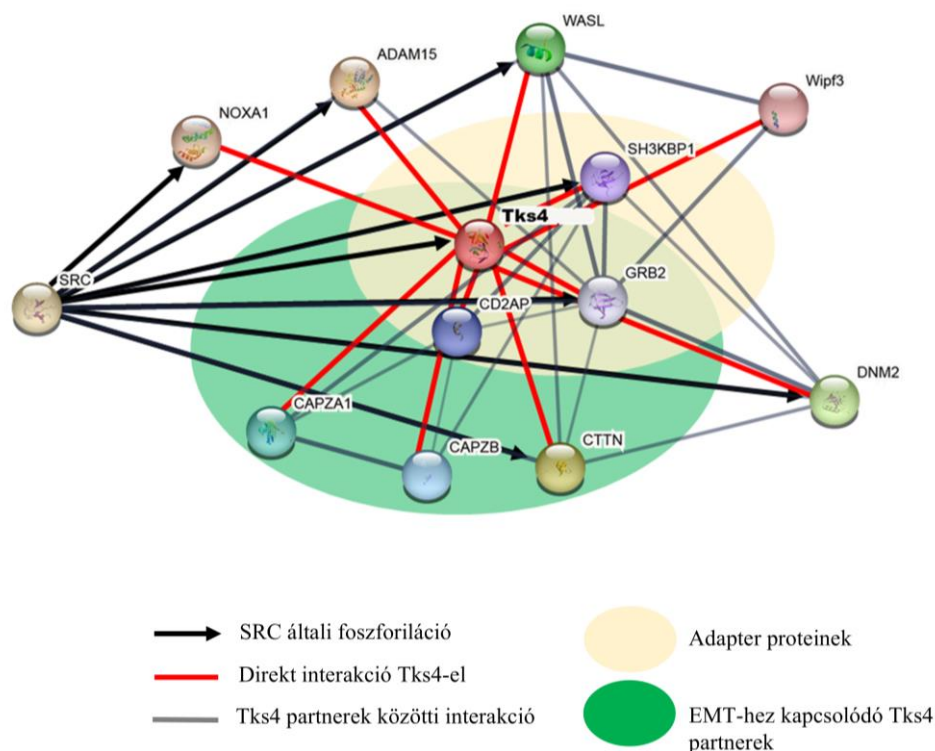
A Tks4 interakom vizsgálata és szerepe az EMT folyamatában

Végül célunk az volt, hogy feltárjuk a Tks4 által közvetített molekuláris eseményeket, amelyek részt vesznek az EMT szabályozásában. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a Tks4 a PX doménjén keresztül a plazmamembránhoz képes kötődni, és hogy SH3 doménjén keresztül kölcsönhatásba lép a jelátvitelben résztvevő fehérjékkel, koordinált kapcsolatokat létesítve azok prolinban gazdag régióival. Feltételeztük, hogy a Tks4 doménszerkezetének multivalens tulajdonságai és a különböző típusú szignálfehérjék megkötésére való képessége lehetővé teszi nemcsak az invadopodia-szabályozó fehérjék, hanem a potenciális EMT-szabályozó fehérjék toborzását is.

A Tks4-függő jelátviteli útvonalak mélyebb megismerése érdekében áttekintettem a Tks4 kevés, az irodalomban leírt kötőpartnerét és az általunk azonosított Tks4 partnerfehérjéket (a CAPZ fehérjét is beleértve), majd a STRING adatbázis (<https://string-db.org/>) segítségével tovább elemeztem a Tks4 interakciós hálózatát (29. ábra). Ezután azokra a szignálfehérjékre összpontosítottam, amelyekről ismert, hogy hatással vannak az EMT-re (2. táblázat). A fehérje-

fehérje interakciós elemzés (29. ábra) kimutatta, hogy a Tks4 három adaptorfehérjével képes fehérjekomplexet alkotni: SH3 Domain Containing Kinase Binding Protein 1 (SH3KBP1/Cin85), CD2AP (CD2-associated protein) és Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2). Ez az állványfehérjékből álló csomópont számos EMT-hez kapcsolódó jelátviteli fehérje számára szolgálhat dokkoló platformként (2. táblázat).

Az állványfehérjék mellett az Src-kináz is jelen van ebben a fehérje interakciós hálózatban. Az Src-kináz számos Tks4-hez kapcsolódó/asszociálódó fehérjét foszforilál, köztük a cortactint, a dynamin2-t, a WASL-t, a Grb2-t, az SH3KBP1-et, a NOXA1-t és az ADAM15-öt (2. táblázat).



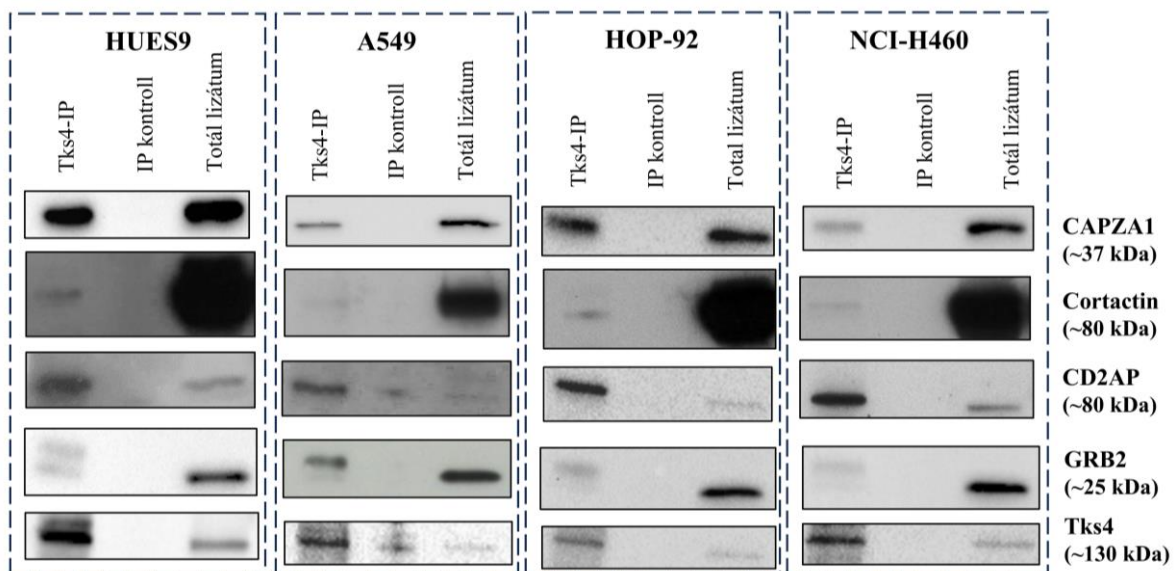
29.ábra: A Tks4 partner molekulák fehérje-fehérje kölcsönhatásainak elemzése: A Tks4 teljes interakciós hálózata. A piros vonalak a Tks4 közvetlen interakcióit jelzik. A fekete nyilak az Src általi foszforilációt mutatják. A szürke vonalak a hálózatban lévő egyéb fehérjék közötti kölcsönhatásokat ábrázolják. A sárga ellipszis az adaptorfehérjék csomópontját, míg a zöld ellipszis az EMT-vel kapcsolatos Tks4-partnereket jelöli. Az interakciós elemzést a STRING (<https://string-db.org/>) segítségével vizualizáltam, beépítve kísérleti és az irodalmi adatokat.

2. táblázat: Az EMT szabályozásában résztvevő Tks4-partner fehérjék listája.

<u>Tks4 partner fehérje</u>	<u>Fehérje típus és funkció</u>	<u>EMT-vel kapcsolatos funkció</u>
CD2AP (CD2-associated protein)	Adaptorfehérje, lokalizálja a cortactint és a capping fehérjéket a sejtmembránhoz [97].	A CD2AP-Tks4 arány befolyásolja az EMT folyamatot a vastagbélrák sejtekben [64].
Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)	Adaptorfehérje, szerepe van a RAS útvonalban és az aktin-citoszkeleton átrendeződésében az N-WASP - Arp 2/3 útvonalon keresztül [98].	A Grb2 upregulációja EMT-t indukál az A549 sejtekben az E-cadherin expressziójának csökkentése és a Snail expressziójának növelése révén [99].
CAPZA1 (F-actin-capping protein subunit alpha-1)	F-aktin capping fehérje, a CAPZB-vel heterodimert alkot, ez a dimer az F-aktin filamentumok "barbed" tüskés végeihez tud kötődni, hogy gátolja a polimerizációt [97].	A CAPZA1 fehérje csökkent expressziója elősegíti az EMT-t és blokkolja az aktin citoszkeleton átrendeződését hepatocelluláris karcinómában. A CAPZA1 kötődési affinitása csökken az F-aktinhoz EMT-indukáló hipoxiás környezetben [91].
Cortactin/CTTN (Src substrate cortactin)	F-aktin kötő fehérje, invadopodia/podoszóma szervező és az Arp2/3 interakción keresztül szabályozza az aktin filamentumokat [100].	A Cortactin elősegíti az EMT-t melanómában, gyomorrákban és szájüregi laphámsejtes karcinómában [101].
Src (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src)	Tirozin-kináz, amely számos jelátviteli fehérjét képes foszforilálni, például: cortactin [102–104], Tks4 [33,38,105], Grb2 [106–108], SH3KBP1 [103,109,110], NOXA1 [111], ADAM15 [112–114], dynamin2 [115,116].	Az aktív Src indukálhatja az EMT-t foszforilációs eseményeken keresztül, amely ezáltal az E-cadherin expressziójának csökkenéséhez, a sejt-sejt kapcsolatok gyengüléséhez és a mezenchimális markerek expressziójának növekedéséhez vezet, például prosztatákban, emlőrákban, hasnyálmirigy karcinómában [117–121].

Ezután igazoltam az EMT-ben résztvevő fehérjék jelenlétét a Tks4-interaktomban az endogén Tks4 fehérje immunprecipitálásával és WB kísérletekkel a három különböző NSCLC tüdőrák sejtípus lizátumaiból (A549: humán tüdő adenokarcinóma, HOP-92: humán tüdő nem kissejtes karcinóma, NCI-H460: humán tüdő nagysejtes karcinóma). Munkám ezen pontján a HUES9 embrionális őssejtvonal vizsgálatát is bevontam az interaktom kutatásba, és vad típusú HUES9 sejteken is elvégeztem a Tks4-IP-t. A 30. ábrán mutatom be az eredményeket.

Az eredmények alapján arra következtettünk, hogy a Tks4 interaktómban a normál embrionális HUES9 őssejtvonalban és a három tüdőrákos sejtvonalon is Tks4-hez kapcsolódnak a vizsgált EMT-ben szerepet játszó partnerfehérjék (Grb2, CAPZA1, Cortactin, CD2AP).

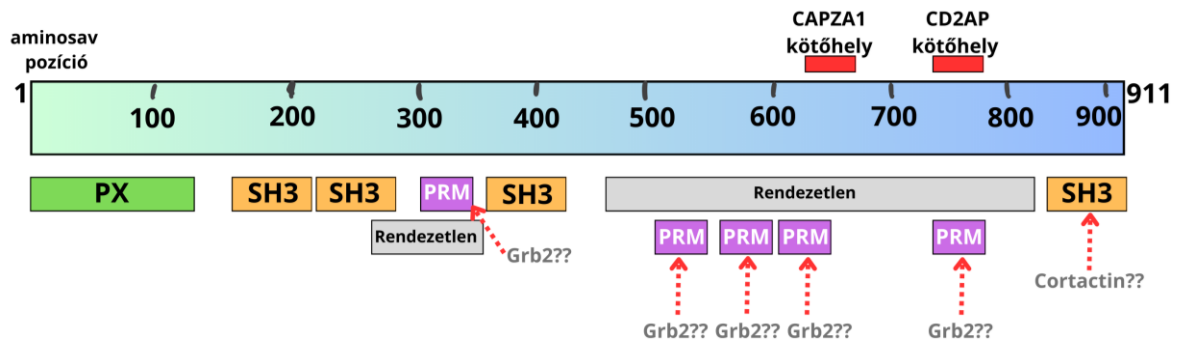


30.ábra: A Tks4 interaktom validálása Tks4-IP-vel, majd Western blottal három tüdőrákos sejtvonalon (A549, HOP-92, NCI-H460) és a HUES9 embrionális őssejtvonalon.

Érdekelt, hogy az ismert EMT-vel kapcsolatba hozható Tks4-partner fehérjék kötőhelyei átfednek-e egymással a Tks4-en belül, ezért egy összefoglaló ábrát készítettem (31. ábra). Korábbi kutatásunkban kimutattuk hogy, a Tks4 egyik partnerének, a CD2AP-nak kötődési helye a Tks4-en belül a 755PVVPPR760 prolin gazdag motívum [64]. A CAPZA1, pedig predikciónk alapján a Tks4-en belül a 636-654. szekvencia közötti szakaszban képes bekötődni, amelynek szekvenciája a Tks4-ben megtalálható capping protein interacting (CPI) motívumnak felel meg. A Grb2-Tks4 kötődésre vonatkozóan azt mutatták ki, hogy a Grb2 N-terminális SH3 doménje képes lehet a Tks4-en belül a prolin gazdag motívumokhoz kötődni [122,123], de mivel a Tks4-en belül több ilyen motívum is van, így nincs még tudományos adat arról, hogy pontosan hova kötődhet be a Tks4-en belül. A cortactin esetében Crimaldi és kutatócsoportja

arra mutatott rá, hogy a Tks5 utolsó SH3 doménjéhez kötődik a cortactin. A Tks5 fehérje a Tks4 közeli homológja, hasonlóan a Tks4-hez rendelkezik PX és SH3 doménnel, de 4 helyett 5 darab SH3 doménből áll [45,105]. Mivel a Tks5 ötödik SH3 doménje nagyfokú (57%-os) szekvencia homológiát mutat a Tks4 utolsó SH3 doménjével ezért valószínűsíthető, hogy a cortactin itt lép kapcsolatba a Tks4-el is [45,124]. A vázolt kötőhelyek eddigi tudásunk alapján nem fednek át a Tks4-en belül, a partnermolekulák valószínűsíthetően nem kompetálnak egymással.

Tks4



31.ábra: Az EMT-vel kapcsolatba hozott ismert és az és újonnan azonosított Tks4 partnermolekulák kötőhelyeinek bemutatása a Tks4-en belül (1-911 aminosav sorrend, alatta a Tks4 domén szerkezete: PX és SH3 domének, PRM (prolin gazdag motívum), rendezetlen régiók) (Az ábra a uniprot.org alapján rajzolva).

5. Eredmények megbeszélése

A dolgozatban *in vitro* mérések és *in silico* elemzések felhasználásával két sejttípust, embrionális őssejt eredetű és tüdő tumor eredetű sejteket vizsgáltam, az EMT folyamatok megértése szempontjából. Az EMT folyamata kulcsszerepet játszik az embrionális fejlődésben, valamint a metasztatikus és agresszív tumorok kialakulásában [1,3]. Ez a folyamat magában foglalja a fenotípus váltáshoz szükséges transzkripciós faktorok aktiválódását, valamint a citoszkeleton átrendeződésében részt vevő fehérjék újraelosztását és felhalmozódását a plazmamembrán alatti fehérje-komplexekben. Az egészséges sejtek esetén végbemenő EMT jól szabályozott, összehangolt szignalizációs lépések sorozata. Ezzel ellentétben a tumorsejtek mezenchimális fenotípus váltása része a tumor progressziónak, mely sok faktoriális, sokszor véletlenszerű folyamat, amit befolyásol az adott tumor mutációs háttere, mikrokönyezete és maga a tumor heterogén sejtösszetétele populációs szinten [1,5]. A doktori kutatásom fő fókusza az EMT folyamat vizsgálata volt normál (embrionális) és tumoros (tüdőrák eredetű) sejtekben, különös tekintettel egy nemrégiben kutatócsoportunk által leírt EMT-t befolyásoló fehérje vizsgálatára a Tks4 szignál molekulára.

A Tks4 állványfehérjének (SH3PXD2B gén) orvosbiológiai jelentőségét először a Frank-Ter Haar szindróma (FTHS) patológiájának kapcsán fedezték fel, mikor bebizonyosodott, hogy a betegség hátterében a SH3PXD2B gén mutációja áll. Az FTHS egy ritka, veleszületett fejlődési rendellenesség, amelynek felfedezése óta tudományos erőfeszítések irányultak annak vizsgálatára, hogyan fejti ki a hatását a Tks4 fehérje az FTHS által érintett szövetekben (zsír, csont) [32,47]. Három különböző egérmodellt hoztak létre a Tks4 hiányának vizsgálatára *in vivo*, és ezek a kutatások információkat szolgáltatottak arról, hogy a Tks4 hogyan szabályozza a csont- és zsírszövetek homeosztázisát [47,48,60]. Viszont a Tks4-KO egerek segítségével végzett kísérletek nem adnak információt arról a mechanizmusról, amelyen keresztül a Tks4 fehérje molekuláris szinten kifejti hatását, illetve hogyan befolyásolja a jeltovábbító utakat a sejtek differenciálódása során és milyen szignál molekulákkal lép kölcsönhatásba. Ráadásul a kísérleti egérsejtek használata kevésbé hatékony, mint a humán sejteké, ugyanis az állati rendszerekben kapott eredményeket validálni szükséges humán sejtekben. Ezért úgy döntöttünk, hogy egy megfelelő *in vitro* modellt hozunk létre a Tks4 fehérje hiányának humán sejtekben történő további elemzésére, olyan sejttípusokban melyek széleskörű differenciálódási képességgel rendelkeznek. A pluripotens őssejt-alapú kísérletek és a CRISPR/Cas9 módszer alkalmazása a Tks4 gén kiütésére lehetővé teszi számunkra, hogy közvetlenül humán sejtekben

fedezzük fel a Tks4 hatásait, vizsgáljuk a Tks4 állványfehérje molekuláris interaktómját/jelátvitelét, és validáljuk az egérkísérletek eredményeit.

Sikeresen létrehoztunk két homozigóta Tks4-KO klónt és két heterozigóta Tks4-KO klónt a normál kariotípusú HUES9 embrionális őssejtvonalból. Szekvenálási eredményeink azt mutatták, hogy rövid inzerciós-deléció (indel) események (kevesebb, mint 15 bázispár) alakultak ki a létrehozott sejtvonalak mutált alléljaiban. A Tks4-KO HUES9 sejtek mind a három csíralemez irányba képesek voltak differenciálódni, hasonlóan az eredeti WT HUES9 sejtekhez, amelyet egy spontán differenciálódási kísérlet során mutattunk ki. A Tks4-KO őssejtek pluripotenciáját immunfestéssel (Oct4, Nanog) és áramlási citometriával erősítettünk meg (SSEA-4). Eltéréseket figyeltünk meg az endoderm AFP marker expressziójában a két Tks4-KO sejtvonal között, mivel a második Tks4-KO klónban extrém alacsony AFP expressziót észleltünk fehérje és mRNS szinten a spontán differenciálódás és az MSC kultúrák esetében is (17AE és 19C ábra). Az eltérésnek az alapját nem vizsgáltuk, bár érdekes lenne tanulmányozni az AFP expressziós szinteket FTHS betegeknél és Tks4-KO egerekben, hogy esetlegesen azonosítsunk egy korrelációt az alacsony AFP expresszió és az FTHS-hez kapcsolódó fenotípusok között. Hipotézisünk szerint, mivel az AFP kritikus a nemi szövetek megfelelő fejlődéséhez; ezért az AFP hiánya részben okozhatja a meddőséget, amelyet az SH3PXD2B-mutáns egerekben és FTHS-ben szenvedő egyéneknél figyeltünk meg [125].

Összefoglalva, eredményeink azt mutatják, hogy a Tks4 hiánya nem zavarja fundamentálisan a csíralemez-képződés első lépéseit. Tekintettel arra, hogy az FTHS betegeknél is mindhárom csíralemez kifejlődik az embrionális fejlődés során és a Tks4-KO egerekben is, életképes utódokat eredményezve, nem meglepő, hogy a Tks4-KO HUES9 sejtek is megőrizték széleskörű differenciálódási képességüket. Feltételezzük, hogy a Tks4 hiánya megzavarhatja a sejtek/szövetek specializációját, valamint megváltozott sejtmaturációt eredményezhet *in vivo* az embrionális korban és *in vitro* HUES9 sejtekben. Ezt a hipotézist úgy teszteltük, hogy MSC sejtekké differenciáltattuk a HUES9 sejteket. Mivel két FTHS által is érintett szövettípus, az érett csont- és zsírsejtek egy közös őssejt-típusból, az MSC-ből származnak, így a Tks4 kiütés hatását vizsgáltuk a MSC differenciálódás irányára. Az embrionális őssejtek speciális körülmények között képesek MSC-t képezni, és az MSC-képződési folyamat követhető *in vitro*, így megvizsgáltuk a Tks4-KO HUES9 sejtek MSC fejlődési potenciálját.

Eredményeink kimutatták, hogy a HUES9 sejtek (a létrehozott Tks4-KO sejtvonalak is) képesek tovább differenciálódni MSC sejtekké. A Tks4 hiány hatásának vizsgálatára végzett kísérleteink során azt vettük észre, hogy a Tks4-KO MSC sejtekben többféle mezodermális és

osteogén marker expressziós szintje alacsonyabb volt (19BC ábra). Tehát az MSC irányú differenciáció megtörténik Tks4 hiányában is, de a további differenciációhoz és csont irányú elköteleződéshez szükséges faktorok csökkent mértékben vannak jelen a Tks4-KO MSC vonalakban.

Korábban már munkacsoportunk leírta, hogy a Tks4-nek van szabályozó szerepe az EMT-szerű folyamatokban igaz csak vastagbélrák esetén [62]. Ezért megmértük az EMT-hez kapcsolódó markerek (fibronectin, Snail, Twist) expressziós szintjét a HUES9 sejtek spontán differenciálódási folyamatában. Nem rákos sejtekben, mint például a humán embrionális őssejtekben, nem észleltünk jelentős különbségeket az EMT markerek expressziós szintjében a WT és a Tks4-KO sejtek között, és arra a következtetésre jutottunk, hogy a Tks4 hiánya nem zavarja az EMT folyamatát az embrionális őssejtekben. Ezzel szemben a mezenchimális irányban differenciáltatott Tks4-KO MSC-k EMT-vel kapcsolatos tulajdonságai változásokat mutattak: a főbb EMT markerek (E-cadherin és Snail) expressziós szintje megváltozott. Ezek alapján feltételezzük, hogy a Tks4 nem kulcsszabályozója az EMT-nek, de szerepet játszik a folyamat finomhangolásában. A megfigyelt EMT-szerű eseményeket kísérő expressziós változások a Tks4-KO MSCk-ben (pl. csökkent E-cadherin és Snail fehérje szintek) és a csontszövet kialakulásában szerepet játszó (GATA4, GSC) transzkripciós faktorok alacsonyabb szintje arra utalnak, hogy a differenciálódási folyamat kinetikáját befolyásolja a Tks4. A megváltozott EMT markerek szintje Tks4 hiány esetén eredményezhet megváltozott differenciálódott szövetösszetételt, amely az FTHS esetén megfigyelhető megváltozott csontszövet háttérében állhat. Ezek az adatok összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, hogy a Tks4 hiányának szerepe van a csökkent és a normálistól eltérő csontszövet-képződésben a Tks4-KO egerekben is, hasonlóképpen a Tks4-mutációt hordozó FTHS betegek oszteoporotikus szerkezetű és megrövidült csontfelépítéséhez [61].

Összefoglalva, kulcsfontosságú eredmények között szerepel egy *in vitro* humán őssejt modell létrehozása annak vizsgálatára, hogyan hat a Tks4 fehérje hiánya az őssejtekre: a Tks4-KO HUES9 sejtek ugyan képesek három csiralemez létrehozására, de az FTHS által érintett sejttípusok irányába történő differenciálódás hatékonyságában eltérnek a vad típusú HUES9 sejtektől.

A disszertáció második felében a patológiás EMT folyamatok és a Tks4 kapcsolatát vizsgáltam tüdő tumor esetén. Kutatócsoportunk érdeklődését felkeltette, hogy az elmúlt években egyre nagyobb figyelmet kapott az a feltételezés, hogy a Tks4 egyes ráktípusokban potenciális biomarkerként is szolgálhat, ami összefüggésbe hozható a Tks4 EMT befolyásoló funkciójával.

Például Kui és munkatársai (2021) egy kombinált multi-omikai és kísérleti tanulmány során kimutatták, hogy a Tks4 expressziós szintje prognosztikai jelentőséggel bír hepatocelluláris karcinómában [66]. Egy másik kutatócsoport megállapította, hogy a Tks4 magas expressziója biomarkerként szolgálhat a gyomorrák esetén [65]. Egy indiai csoport átfogó adatbázis elemzése rámutatott arra, hogy az SH3PXD2B génről átíródó mRNS expressziója kulcsfontosságú markere a mellrák sejtek tüdőmetasztázis képzésének [126]. Emellett egy egereken végzett kutatásban a Tks4 lehetséges szerepét vizsgálták tüdőmetasztázist képző melanóma sejtekben [127]. Továbbá csoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy a Tks4 hiánya EMT-szerű fenotípust indukál vastagbélrák sejtekben, amelyet más kutatócsoport is megerősített [62,128]. Ezeket az eredményeket figyelembe véve célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a Tks4 hatását egy olyan ráktípusban, amelyet eddig ebben az összefüggésben nem tanulmányoztak.

Ezért adatbázis-elemzést és humán tüdőrák szöveti minták qPCR méréseit végeztem el (24. ábra). Az eredmények bemutatták a Tks4 expressziós szintjének változásait az NSCLC előrehaladása során. Általánosságban azt tapasztaltuk, hogy a Tks4 mRNS szintje alacsonyabb a tüdőrák szövetekben, mint az egészséges szövetekben (24CD ábra). Ez arra utal, hogy a Tks4 potenciális biomarkerként szolgálhat az egészséges és a rákos tüdőszövetek megkülönböztetésére (24E ábra). Emellett a legalacsonyabb Tks4 expressziós szintet az NSCLC legelőrehaladottabb stádiumában mértük (24D ábra). A tüdőrákos betegek túlélési adatainak elemzése alapján pedig kiderült, hogy a Tks4 szint csökkenése rosszabb túlélési esélyeket jelez hosszútávon (24B ábra). Ennek megfelelően a Tks4 mRNS expressziós szintjének qPCR-rel történő mérése a sebészileg eltávolított tüdőszövet mintákban potenciálisan segíthet a betegség lehetséges prognózisának meghatározásában. Eredményeinket összevetettük az irodalmi adatokkal, és azt találtuk, hogy a magas vagy alacsony Tks4 expressziós szintek prognosztikus hatása a rák szöveti típusától függ. Hepatocelluláris karcinóma esetén például a magasabb Tks4 mRNS expressziós szint rövidebb túlélési idővel jár [66], ellentétben az általam vizsgált tüdőrákkal. Feltételezzük, hogy a Tks4 szerepe eltérhet a rákos sejtípus vagy a rák stádiumának függvényében a daganat előrehaladása során, mivel több jelátviteli útvonalban is részt vesz, beleértve az aktin átrendeződését és az EMT-szerű folyamatok szabályozását. Figyelembe véve, hogy az EMT a tüdőrák előrehaladásának egyik jellemzője [18], arra a következtetésre jutottunk, hogy az alacsonyabb Tks4 szint az NSCLC mintákban valószínűleg fokozhatja az EMT-t elősegítő jelátvitelt.

A csökkent Tks4 szint hatását az EMT folyamatokra *in vitro* modelleztük, hogy megértsük az NSCLC-ben betöltött prognosztikai jelentőségét. Ehhez az A549 tüdő adenokarcinóma

sejtvonalat választottam, amely egy gyakran alkalmazott *in vitro* tüdőrák modell, és CRISPR/Cas9 technológia segítségével a Tks4-et kódoló gén mutációját hoztam létre. Két Tks4-KO klónt sikeresen előállítottam, és vizsgáltam a Tks4 kiütés hatásait az EMT-hez kapcsolódó folyamatokra.

A Tks4 hiánya tüdőrák sejtekben egy elongált, mezenchimális-szerű fenotípust eredményezett, amely hasonló ahhoz, amit korábban Tks4-KO vastagbélrák sejtekben is megfigyelt munkacsoportunk, ahol megnyúlt és kevésbé kör alakú sejtalakot fedeztünk fel [62]. További méréseim arra mutattak rá, hogy a Tks4-KO tüdőrák sejtek epiteliális-mezenchimális hibrid fenotípust mutatnak. Egyes mezenchimális markerek, mint például a fibronectin, az N-cadherin és a Snai2 transzkripció faktor fokozott génexpressziója jellemezte a Tks4-KO sejteket, és ezzel párhuzamosan, az epiteliális marker, az E-cadherin csökkent expressziója (23. ábra), ami az EMT folyamat egyik jellegzetessége. De nem minden EMT-hez kapcsolódó marker fehérje és mRNS szintje mutatott egységes változást, mivel az N-cadherin szintje a vad típusú sejtekhez hasonló maradt a Tks4-KO sejtekben, amit ICC és WB kísérletekkel is megerősítettünk, valamint a sejtek migrációs képessége se nőtt meg. Ezt a jelenséget alaposabban is megvizsgáltam: Általánosságban elmondható, hogy a migrációs képesség és az invadopodia kialakulása az invazív rákos sejtek jellegzetességei. Méréseim azt mutatták, hogy a Tks4-KO rákos sejtek migrációs képessége kissé csökkent is mind a kezeletlen, mind az EGF-fel kezelt Tks4-KO sejtek esetében. Ez a megállapítás azzal magyarázható, hogy a Tks4 jól definiált szerepet játszik az EGFR/Src útvonalban [33], így ennek a fehérjének a hiánya az EGFR jelátvitel károsodásához és következésképpen csökkent sejtmobilitáshoz vezethet. Mivel a Tks4 kulcsfontosságú tényező az invadopodia képződésében, így nem meglepő, hogy Tks4 hiányában a sejtek invadopodia képződése csökkent mértéket mutatott. Feltételeztük, hogy az eltérő hatások (csökkent invadopodia képzés, de megemelkedett EMT marker expresszió) mechanizmusa mögött az állhat, hogy a Tks4 partnerei is többféleképpen befolyásolhatják az EMT-t. **Tehát a Tks4 partnermolekulák aktuális szintje, aránya, kötődése, és így a Tks4 utáni (down stream) szignalizáció különböző hatással bírhat.** A partnermolekulák eltérő hatásaira ismert példa, hogy az EMT-t elősegítő Snai1 transzkripció faktor egyrészt iniciálja a mezenchimális fenotípus kialakulását E-cadherin represszió keresztül, de Lee és munkatársai azt is kimutatták, hogy a Snai1 transzkripció faktor elnyomhatja az invadopodia kialakulásáért felelős cortactin expresszióját is, gátolva annak aktin átrendező funkcióját [129]. Mivel a cortactin a Tks4 ismert partnermolekulája [75], mi is megvizsgáltuk a cortactin és az aktin kolokalizációját a Tks4-KO sejtekben (21E ábra). Megállapítottuk, hogy a Tks4 kiütés a cortactin és az aktin kolokalizációjának csökkenését eredményezte (21F ábra), ami így érthető

módon az invadopódiumok képződésének csökkenéséhez vezetett (21G ábra). Az EMT marker vizsgálatok esetén pedig megnövekedett Snai1 TF expressziót mértünk ki egyik Tks4-KO sejtvonalunkban. Ezzel összhangban tehát, a Tks4-KO sejtek csökkent migrációja, invadopódia képződése, valamint megnövekedett EMT marker expressziója (Snai1, Snai2, N-cadherin, vimentin, fibronectin) közötti összefüggés alapján arra következtethetünk, hogy a Tks4 befolyásolhatja az EMT folyamatot, mégpedig abban az intermedier (EMT-szerű) fázisban, amikor még a mezenchimális és epiteliális jellemzők egyaránt jelen vannak a ráksejteken, létrehozva egy heterogén, fenotípusosan plasztikus tumor sejtpopulációt.

A Tks4 azon képességét, hogy olyan fehérjéket toboroz, amelyek kettős szerepet játszanak a citoszkeleton átrendezésében és az EMT-szerű folyamatban, tovább erősíti az a tény, hogy partnerfehérjéinek is van EMT-t fokozó, de migrációt csökkentő hatása is.

Munkám következő fázisában, eddig még nem ismert Tks4-partner fehérjéket kerestem, melyeknek lehet szerepe az EMT-szerű folyamatok kialakításában. Tks4-IP-MS elemzés során, azonosítottam a CAPZ fehérjéket, mint új Tks4 interakciós partnereket (1. táblázat). A CAPZA1-Tks4 fehérjéknek a kooperációját az A549 tüdőrák sejtvonalon is, és két másik tüdőrák sejtvonalon is kimutattam, Tks4-IP-WB (26B ábra) és PLA módszer alkalmazásával (27B ábra), ami megerősíti a Tks4-CAPZA1 kötődés jelenlétét a sejtekben. A két fehérje közötti interakció EMT regulációs hatását is elemeztem, de először feltártuk az újonnan leírt fehérje-fehérje kapcsolat molekuláris részleteit. Azonosítottuk a prediktív kötőhelyeket a két fehérjében. Rámutattunk arra, hogy az interakció a Tks4 rendezetlen régiójában előforduló „capping fehérje-interakciós motívumon” keresztül valósulhat meg, amely a CAPZ heterodimer fehérje szár régiójához kapcsolódik (26A ábra). A későbbiekben további szerkezeti elemzésekre van szükség, melyekhez Tks4 mutánsokat szükséges alkalmaznunk, hogy vizsgáljuk ennek az interakciónak a specifikus szerkezeti követelményeit és funkcionális hatásait. Az eddig közölt eredményeink alapján annyi biztosan elmondható, hogy ezek a fehérjék interakcióba lépnek egymással A549 sejtekben (és még három sejt vonalban, 26B és 27B ábra). A CAPZB és CAPZA1 fehérjékből álló CAP heterodimer az aktin filamentumok megnyúlásában játszik szerepet azáltal, hogy a növekvő aktin filamentumok barbed end végeit lefedik [130]. A CAPZA1 tumorbiológiai hatásai is (hasonlóan a Tks4-hez) ellentmondásosak. Például az alacsony CAPZA1 expressziós szintet fokozott invazív fenotípussal hozták összefüggésbe gyomorrákban [131] és tüdőrákban is [132], míg hepatocelluláris karcinómában a CAPZA1 overexpressziója gátolta az EMT folyamatot [90]. Sőt, hepatocelluláris karcinóma sejtekben kimutatták, hogy a CAPZA1 csökkent expressziója kifejezetten hajtja az alacsony oxigénszint által indukált EMT folyamatot [91]. Ezeket a megfigyeléseket alapul véve mi is

alacsony oxigén koncentráció mellett indukált EMT folyamatokat vizsgáltunk Tks4-KO sejtekben. Eredményeink megerősítették a hepatocelluláris karcinóma sejteken végzett említett kísérleteket, mert tüdőrák sejtek esetén is EMT-szerű fenotípust figyeltünk meg ilyen körülmények között a sejtekben (28. ábra). Továbbá az alacsony oxigénszintet alacsony CAPZA1 expresszió kísérte a Tks4-KO sejtekben (28B ábra). E jelenség egyik lehetséges magyarázata, hogy a Tks4-KO sejtekben a Tks4 és a CAPZ fehérjék közötti kölcsönhatás hiánya modulálja az EMT-indukáló jelátviteli útvonalakat. A feltételezés alaposabb megértéséhez és megerősítéséhez azonban további kísérletek szükségesek.

Emellett K. H. Liu és kutatócsoportja kimutatta, hogy hipoxiás körülmények között az EMT folyamata felgyorsulhat a vad típusú A549 sejtekben [96]. Kísérleteink során azt is megfigyeltük, hogy az alacsony oxigénkoncentrációs állapot, erősebb EMT-t indukáló hatást gyakorolt a Tks4-KO sejtekre, mint a vad típusú sejtekre, amit a mezenchimális markerek, köztük a vimentin, N-cadherin, fibronectin és Snai2 fokozott expressziója jelzett a vad típusú sejtekhez képest (28A ábra). Mivel a Tks4-KO sejtek az alacsony oxigén által kiváltott stresszre erőteljesebb EMT-szerű fenotípusos változással reagáltak, mint a vad típusú A549 sejtek, ezek az eredmények azt is sugallják, hogy alapvetően a Tks4 kiütése egy plasztikusabb, EMT indukációra gyorsabban reagáló sejtípust eredményezett.

Összességében a Tks4 hiánya elősegíti az EMT folyamatának előrehaladását tüdőrákban, de nem okoz megnövekedett migrációs fenotípust, valamint megállapítottuk, hogy a Tks4 mRNS szintjének csökkenése potenciálisan kedvezőtlen prognosztikai tényezőnek bizonyult az NSCLC-ben. Továbbá, azonosítottunk egy eddig még nem leírt fehérje-fehérje kapcsolatot, melynek hatása lehet a Tks4 általi EMT szabályozásra.

Hipotézisünk szerint a Tks4 állványfehérjéhez kapcsolódó jeltovábbító molekulák aktuális jelenléte, arányai, közöttük lévő kötődési viszonyok különböző módon befolyásolhatják a Tks4 utáni jelátviteli utakat, ezért további Tks4-interaktóm vizsgálatokat végeztem, hogy azonosítsam a Tks4 partnermolekulákat és ezek már ismert hatásait az EMT folyamatokra. Ezekbe a kísérletsorozatokba bevontam mindhárom tüdőrák sejtvonalat (A549, NCI-H460, HOP-92) és a HUES9 embrionális sejtvonalat, és Tks4-IP-WB kísérleteket végeztem. Ahhoz, hogy a target fehérjéket kiválasszam a WB méréshez, a kísérlethez elsőként STRING adatbázis, irodalmi adatok és saját kutatási adataink alapján egy fehérje-fehérje interakciós hálózatot hoztam létre, amelyből további irodalmi adatok alapján azokat vettük számításba, amelyek az EMT folyamatában részt vesznek. A továbbiakban ezeket a Tks4-partnermolekulákat (Grb2, CAPZA1, CD2AP, cortactin) vizsgáltam meg, és gyűjtöttem össze a lehetséges kapcsolataikat az EMT folyamatával (2.táblázat).

A fehérje-fehérje interakciós elemzésünk feltárta, hogy a **Grb2 adaptor** fehérje is kapcsolódik a Tks4 fehérjekomplexhez ezekben a sejtekben (29. ábra). Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a Grb2 képes szabályozni az EMT-t a Snai1 transzkripciós faktoron keresztül [99] és az SHP2/Grb2/PI3K/AKT jelátviteli kaszkádon keresztül tüdőrákban [133]. A Grb2 szerepe az EMT szabályozásában újabb résztvevőt jelent a Tks4 hálózatában. A hálózat elemzés arra is rámutatott, hogy az **Src** tirozin-kináz is része a Tks4 szignálhálózatának. Az Src is az EGFR jelátviteli útvonalhoz tartozik, és foszforiláció révén szabályozza az EMT eseményeit [117]. A Tks4 és az Src közötti interakcióval kapcsolatos tanulmányok kimutatták, hogy a Tks4 az Src-t a plazmamembránhoz rögzíti, és dokkolóhelyként szolgál az EGFR és az Src számára [33,105]. Ráadásul több olyan molekula is kötődik a Tks4-hez, amelyek az Src kináz szubsztrátjai, ami tovább növeli ennek a fehérjehálózatnak a komplexitását (a fekete nyilak mutatják a 29. ábrán), például ilyen a Grb2 is. A Grb2 további fehérjéket toboroz az EGFR és az AKT útvonalakhoz, és egyidejűleg modulálja a sejtek motilitását és az EMT-vel kapcsolatos eseményeket is a Tks4-gyel együtt. **Ezért azt feltételezzük, hogy a tüdőráksejtekben a Tks4 csökkent expressziója megzavarhatja a specifikus partnermolekulák kölcsönhatásait vagy sejtszintű lokalizációját, ami potenciálisan az EMT fokozott iniciációjához vezethet.**

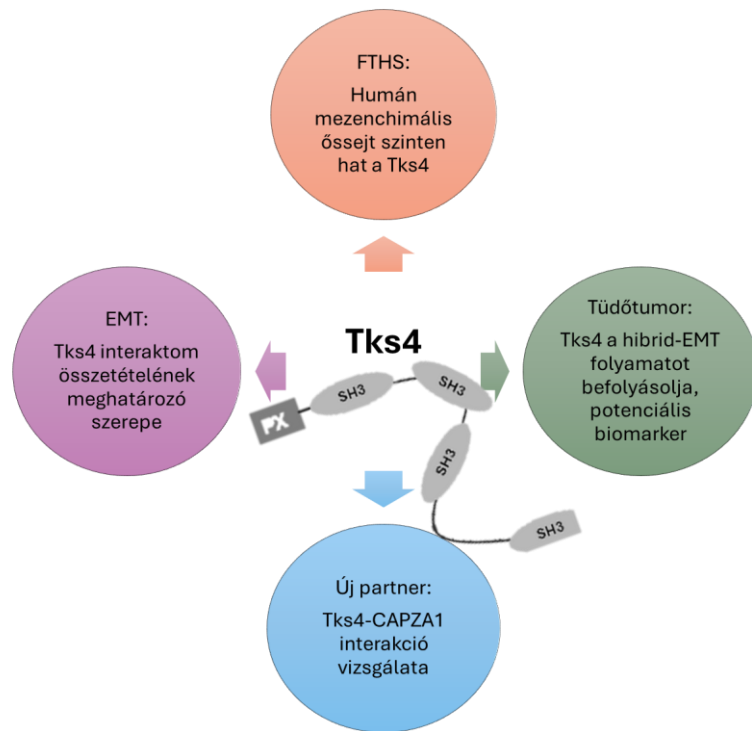
A Tks4-központú interaktomnak további adaptorfehérjék (például SH3KBP1, **CD2AP**) is részei. A Tks4-IP-MS és a Tks4-IP-WB kísérletek is megerősítették, hogy a CD2AP is a Tks4-hez kapcsolódik a vizsgált sejttípusokban is [64]. A CD2AP egy olyan adaptorfehérje, amely elsősorban a dinamikus aktin-citoszkeleton átrendeződési folyamatokban vesz részt [134]. Csoportunk írta le elsőként, hogy a Tks4 és a CD2AP expressziós aránya a humán vastagbélrák sejtekben befolyásolhatja az EMT sejt eseményeit, és diagnosztikai szerepe is van a vastagbélrákban [64,135].

A Tks4-hez kapcsolódó EMT-t szabályozó molekulák analízisének túl nyilvánvaló, hogy a Tks4 **partnerei közvetlenül kölcsönhatásba léphetnek egymással** is, és hálózatot alkothatnak (29. ábra). Ezen összetett kapcsolatok közül a cortactin és a CD2AP közötti kapcsolat kulcsfontosságú közvetítő szerepet játszik az aktin citoszkeleton átrendeződésében a sejtek mozgása során azáltal, hogy jeleket továbbít a WASP és dynamin2 fehérjék felé [136]. Továbbá, az ebben a komplexben részt vevő adaptorfehérjék hasonló kötőpartnerekkel rendelkeznek, amit az is alátámaszt, hogy mind a CAPZA1, mind a cortactin közvetlenül kötődik a Tks4 és a CD2AP molekulákhoz is [137,138].

Mivel irodalmi adatokból ismerjük, hogy a Tks4 interaktom jelátviteli molekulái eltérő hatásokat gyakorolhatnak az EMT szabályozására és az aktin átrendeződésre a fentebb már

említett esetekben, ezért megállapíthatjuk, hogy az egész jelátviteli útvonal végkimenetele nagymértékben kontextusfüggő és sejttípusfüggő. A Tks4-interaktom összetétele és a komponensek aránya fontos szerepet játszik a jelátviteli utak finomszabályozásában, ezáltal meghatározza az EMT folyamatának végkimenetelét. Hipotézisünk szerint, egyes sejtekben az EMT-t előmozdító, máskor pedig az azt gátló effektorok dominálnak a fehérje komplexben, és ezek összessége határozza meg, hogy a sejt differenciáció mezenchimális irányba terelődik-e el vagy sem. Ez a jelenség is közre játszhat a tumorsejtpopulációban jelen lévő mezenchimális plaszticitás kialakulásához. A bemutatott *in vitro* sejtes kísérleteim összességében arra mutattak rá, hogy a Tks4 hiánya a tumoros sejtekben hibrid EMT folyamatot indukál, míg a HUES9 MSC sejtekben ezt a folyamatot enyhén lassítja, a további differenciáció/elköteleződés lépéseit akadályozhatja. Ez arra utal, hogy a normál és tumoros sejtek eltérően reagálnak a Tks4 hiányára. **A tárgyalt eredmények azt mutatják, hogy a Tks4 és az általa szervezett hálózatban (29. ábra) részt vevő molekulák jelenléte együttesen járulnak hozzá az EMT-szerű folyamatok, az invadopodia képződés és a differenciáció szabályozásához.**

Összefoglalva, ez a doktori kutatás jelentősen bővíti ismereteinket a Tks4 interaktomról és annak szerepéről az embrionális őssejtekben és tüdőráksejtekben zajló EMT-szerű folyamatok szabályozásában (32. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy a Tks4 expressziós szintje és fehérje-interakciói eddig nem feltárt paraméterek az EMT irányításában. PhD disszertációmban bemutattam, hogy a Tks4 hiánya többféle sejtfunkció zavarához vezethet, mivel a Tks4 képes befolyásolni az EMT folyamatokat, a sejt migrációt és az invadopodiumok képződését, valószínűsíthető, hogy az effektor kötőpartnereinek aktuális kombinációjától függően. Bemutattam, hogy a Tks4 szintje, mint központi állványfehérje, jelentős hatással van a tüdő tumor progressziójára. Továbbá, a Tks4 hiánya az embrionális fejlődés során megzavarhatja a mezenchimális őssejtek differenciációját csont irányba, ami összhangban áll a Frank-ter Haar-szindróma (FTHS) fenotípusos tüneteivel.



32.ábra: PhD disszertációmban bemutatott eredmények összefoglalása.

6. Összefoglalás

A közelmúltban jelent meg a hibrid epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT) fogalma a tudományos irodalomban, amelynek jelentése az, hogy a sejtek egyidőben epiteliális és mezenchimális markereket is expresszálnak, amely során rugalmasan mozognak az epiteliális-mezenchimális tengelyen. Munkám során az embrionális fejlődésben végbemenő EMT megjelenését és a tumorszövetben megfigyelhető EMT-szerű folyamatokat vizsgáltam különös tekintettel a Tks4 fehérjére, mint újonnan felfedezett EMT-t befolyásoló faktorra. A Tks4 egy állványfehérje, melynek mutációja (génnev: SH3PXD2B) egy ritka, veleszületett betegséget a Frank-Ter Haar szindrómát (FTHS) okozza. Továbbá a Tks4 szintjének vizsgálatát egyre fokozottabban kutatják, mint potenciális biomarkert bizonyos ráktípusokban.

Hipotézisünk szerint, a Tks4 hiányával összefüggő, rendellenes EMT szabályozás jelentős szerepet játszhat mind a FTHS fenotípusának kialakulásában, mind a tumor fejlődésében.

Az embrionális őssejtekben a szabályozott mezenchimális irányú differenciációnak jelentős szerepe van a mezodermális sejtek kialakulásakor, így ennek vizsgálatára egy *in vitro* Tks4-KO embrionális őssejt (HUES9) modellrendszert hoztam létre, ahol az eredményeim azt mutatták, hogy a Tks4-KO pluripotens őssejtekből differenciáltatott, mezenchimális (MSC) őssejtekben a mezodermális markerek (Snai1 és FoxA2) expressziós szintje csökkent, illetve a csontszövet kialakulásában szerepet játszó (GATA4, GSC) transzkripció faktorok szintje alacsonyabb volt a Tks4-KO MSCk-ben, mint a WT sejtekben. Ezek az eredmények megerősítik azt a hipotézist, hogy a Tks4 hiánya lassítja a normál sejtekben a mezenchimális irányú differenciálódást, illetve, hogy a Tks4-nek szerepe van a csontszövet-képződésben, ami összefügghet az FTHS betegek csontfenotípusával.

PhD munkám másik részében vizsgáltam tüdő adenokarcinóma sejtekben (A549) CRISPR/Cas9 technológiát alkalmazva a Tks4 kiütés hatásait. A Tks4 hiánya egy EMT-szerű hibrid fenotípus kialakulását okozta. Tüdőrákos szövetekből származó mintákból RT-qPCR mérésekkel kimutattam, hogy a Tks4 potenciális biomarkerként szolgálhat az egészséges és a rákos tüdőszövetek megkülönböztetésére. Ahhoz, hogy bővítsük az ismereteinket a Tks4 szerepéről az EMT-szerű folyamatok szabályozásában embrionális őssejtekben és tüdőráksejtekben, megvizsgáltam a Tks4 interaktomját is, és új partnereket azonosítottam (pl. CAPZA1 fehérjét) Tks4-IP-tömegspektrometriás és Tks4-IP-Western blot módszerekkel. Eredményeim azt mutatták, hogy a Tks4, mint központi állványfehérje, az általa szabályozott interaktom összetételétől függően hatással lehet a tüdőtumor progressziójára, valamint az embrionális fejlődés során megzavarhatja a csontdifferenciációt.

7. Summary

Recently, the term hybrid epithelial-mesenchymal transition (EMT) has emerged in the scientific literature, which refers to the simultaneous expression of epithelial and mesenchymal markers in cells, with flexible oscillation along the epithelial-mesenchymal axis. In my work, I have studied the emergence of EMT during embryonic development and the EMT-like processes observed in tumor tissues with a particular focus on the Tks4 protein as a newly discovered factor regulating EMT. Tks4 is a scaffold protein (gene name: SH3PXD2B) and its mutation causes a rare congenital disease called Frank-Ter Haar syndrome (FTHS). In addition, there is increasing research on Tks4 expression levels in certain types of cancers, for the potential application as a prognostic biomarker.

Our hypothesis is that the abnormal EMT regulation associated with Tks4 deficiency may play a significant role in both the development of FTHS phenotype and tumor development.

In embryonic stem cells, regulated mesenchymal differentiation plays a major role in the generation of mesodermal cells. Therefore, Tks4-KO HUES9 mesenchymal stem cells (MSCs) were generated, where my results have shown that the expression levels of mesodermal markers (Snai1 and FoxA2) were reduced, and the levels of transcription factors involved in bone tissue formation (GATA4, GSC) were lower in Tks4-KO MSCs than in WT cells. These results support the hypothesis that the lack of Tks4 slows down mesenchymal differentiation in normal cells and that Tks4 has a role in bone tissue formation, which may be related to the bone phenotype of FTHS patients.

In another part of my PhD work I investigated the effects of Tks4 knockout in lung adenocarcinoma cells (A549) using CRISPR/Cas9 technology. The absence of Tks4 led to the development of an EMT-like hybrid phenotype. Using RT-qPCR measurements from lung cancer tissue samples, I demonstrated that Tks4 could serve as a potential biomarker to distinguish healthy from cancerous lung tissues. To expand our knowledge on the role of Tks4 in the regulation of EMT-like processes in embryonic stem cells and lung cancer cells, I also investigated the interactome of Tks4 and identified novel partners (e.g. CAPZA1 protein) by Tks4-IP mass spectrometry and Tks4-IP Western blot methods. My results showed that Tks4, as a central scaffold protein, may affect tumor progression depending on the composition of the interactome it regulates, and may disrupt bone tissue differentiation during embryonic development.

8. Publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

László, L.; Maczelka, H.; Takács, T.; Kurilla, A.; Tilajka, Á.; Buday, L.; Vas, V.; Apáti, Á. A Novel Cell-Based Model for a Rare Disease: The Tks4-KO Human Embryonic Stem Cell Line as a Frank-Ter Haar Syndrome Model System. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, doi:10.3390/ijms23158803.

IF: 4,9

László, L.; Kurilla, A.; Tilajka, Á.; Pancsa, R.; Takács, T.; Novák, J.; Buday, L.; Vas, V. Unveiling Epithelial Plasticity Regulation in Lung Cancer: Exploring the Crosstalk Among Tks4 Scaffold Protein Partners. *Mol. Biol. Cell* 2024, 1–19, doi:10.1091/mbc.e24-03-0103.

IF: 3,1

Egyéb publikációk a PhD időszak alatt:

László, L.; Kurilla, A.; Takács, T.; Kudlik, G.; Koprivanacz, K.; Buday, L.; Vas, V. Recent Updates on the Significance of KRAS Mutations in Colorectal Cancer Biology. *Cells* 2021, 10, 1–19, doi:10.3390/CELLS10030667.

IF: 5,1

Sipeki, S.; Koprivanacz, K.; Takács, T.; Kurilla, A.; **László, L.**; Vas, V.; Buday, L. Novel Roles of SH2 and SH3 Domains in Lipid Binding. *Cells* 2021, 10, doi:10.3390/CELLS10051191.

IF: 5,1

Kurilla, A.; **László, L.**; Takács, T.; Tilajka, Á.; Lukács, L.; Novák, J.; Pancsa, R.; Buday, L.; Vas, V. Studying the Association of TKS4 and CD2AP Scaffold Proteins and Their Implications in the Partial Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Process. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, doi:10.3390/IJMS242015136.

IF: 4,9

Tilajka, Á.; Kurilla, A.; **László, L.**; Lovrics, A.; Novák, J.; Takács, T.; Buday, L.; Vas, V. Predictive value analysis of the interaction network of Tks4 scaffold protein in colon cancer. *Front. Mol. Biosci.* 2024, 11, 1–15, doi:10.3389/fmolb.2024.1414805.

IF: 3,9

Takács, T.; **László, L.**; Tilajka, Á.; Novák, J.; Buday, L.; Vas, V. Insulin receptor substrate 1 is a novel member of EGFR signaling in pancreatic cells. *Eur. J. Cell Biol.* 2024, 103, doi:10.1016/j.ejcb.2024.151457.

IF: 4,5

Nem a PhD időszak alatt keletkezett könyvfejezet:

Iván P. Uray and **Loretta László** Translation of Effects of Retinoids and Rexinoids: Extraction and Quality Assessment of RNA from Formalin-Fixed Tissues. *Retin. Rexinoid Signal. Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* 2019, 2019, 225–236, doi:10.1007/978-1-4939-9585-1.

(IF meghatározás a 2023-as IF lista alapján)

Konferencia kivonatok

Significance of Tks4 scaffold protein in embryonic stem cell differentiation: First steps in establishment of a new Tks4-KO HUES9 cells: **Loretta László**, Beáta Haraszti, László Buday, Bálint Szeder, Hédi Maczelka, Tamás I. Orbán, Virág Vas, Ágota Apáti, Hungarian Molecular Life Sciences – **Eger, 2021** – **poszter** (<https://2021.hunlifesci.hu/>)

The role of Tks4 scaffold protein in tumor biology: **Loretta László**, Tamás Takács, Álmos Tilajka, Anita Kurilla, László Buday, Virág Vas, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society- **Pécs, 2022**- **előadás** (<https://network.febs.org/posts/annual-meeting-of-the-hungarian-biochemical-society-2022>)

Multiverse of scaffold proteins- what role has the absence of Tks4 scaffold protein in tumor biology and embryonic development?: **Loretta László**, Tamás Takács, Álmos Tilajka, Anita Kurilla, László Buday, Virág Vas, 8th meeting of the invadosome consortium, **Séte, France, 2022** - **poszter & flash poszter prezentáció** (<https://www.atoutcom.com/invadosome/>)

Crosstalk between the partner molecules of Tks4 adaptor protein represents an the EMT program regulating mechanism: **Loretta László**, Anita Kurilla, Tamás Takács, Álmos Tilajka, Julianna Novák, László Buday, Virág Vas, Hungarian Molecular Life Sciences – **Eger, 2023** – **poszter** (<https://2023.hunlifesci.hu/>)

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet nyilvánítani Dr. Buday Lászlónak, aki lehetővé tette számomra, hogy kutatócsoportjában végezhessem el a PhD kutatásomat. Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Vas Virágnak, azt, hogy egyengette utamat a PhD felé vezető úton, köszönöm, hogy szakmai támogatására, értékes tanácsaira mindig számíthattam. Szeretnék köszönetet nyilvánítani kutatócsoportunk további tagjainak (Haidarné Solti Zitának, Kurilla Anitának, Takács Tamásnak, Tilajka Álmosnak, Novák Juliannának) akik segítettek munkámat.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Apáti Ágotának és kutatócsoportjának (Maczelka Hédiének és Haraszi Beának), valamint Dr. Pancsa Ritának, akikkel kooperációban dolgozhattam együtt és így elősegítették kutatásom előremenetelét.

Köszönöm Dr. Nyitray Lászlónak és Dr. Kovács Mihálynak, hogy doktoranduszként tanulmányaimat az ELTE, TTK, Biológia Doktori Iskola Szerkezeti Biokémia Doktori Programjában végezhettem el.

Szeretném megköszönni a családomnak, hogy hittek bennem és nem engedték, hogy feladjam az álmaimat és mellettem voltak végig ezen a kalandos úton.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani a férjemnek, aki türelmével és támogatásával végigkísért minden nehézségen, mindig mellettem állt, és aki, bár nem biológus, már fejből tudja, mi az a Tks4...

10. Irodalomjegyzék

1. Bornes, L.; Belthier, G.; van Rheenen, J. Epithelial-to-mesenchymal transition in the light of plasticity and hybrid e/m states. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, doi:10.3390/jcm10112403.
2. Datta, A.; Deng, S.; Gopal, V.; Yap, K.C.H.; Halim, C.E.; Lye, M.L.; Ong, M.S.; Tan, T.Z.; Sethi, G.; Hooi, S.C.; et al. Cytoskeletal Dynamics in Epithelial-Mesenchymal Transition: Insights into Therapeutic Targets for Cancer Metastasis. *Cancers 2021, Vol. 13, Page 1882* **2021**, *13*, 1882, doi:10.3390/CANCERS13081882.
3. Kim, D.H.; Xing, T.; Yang, Z.; Dudek, R.; Lu, Q.; Chen, Y.H. Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview. *J. Clin. Med.* **2018**, *7*, 1, doi:10.3390/JCM7010001.
4. Chen, M.; Zhu, W.; Liang, Z.; Yao, S.; Zhang, X.; Zheng, Y. Effect of F-Actin Organization in Lamellipodium on Viscoelasticity and Migration of Huh-7 Cells Under pH Microenvironments Using AM-FM Atomic Force Microscopy. *Front. Phys.* **2021**, *9*, 1–12, doi:10.3389/fphy.2021.674958.
5. Ribatti, D.; Tamma, R.; Annese, T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl. Oncol.* **2020**, *13*, 100773, doi:10.1016/j.tranon.2020.100773.
6. Sivagurunathan, S.; Vahabikashi, A.; Yang, H.; Zhang, J.; Vazquez, K.; Rajasundaram, D.; Politanska, Y.; Abdala-Valencia, H.; Notbohm, J.; Guo, M.; et al. Expression of vimentin alters cell mechanics, cell-cell adhesion, and gene expression profiles suggesting the induction of a hybrid EMT in human mammary epithelial cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 1–16, doi:10.3389/fcell.2022.929495.
7. Debnath, P.; Huirem, R.S.; Bhowmick, A.; Ghosh, A.; Ghosh, D.; Dutta, P.; Maity, D.; Palchaudhuri, S. Epithelial mesenchymal transition induced nuclear localization of the extracellular matrix protein Fibronectin. *Biochimie* **2024**, *219*, 142–145, doi:10.1016/J.BIOCHI.2023.11.011.
8. Li, C.H.; Hsu, T.I.; Chang, Y.C.; Chan, M.H.; Lu, P.J.; Hsiao, M. Stationed or relocating: The seesawing emt/met determinants from embryonic development to cancer metastasis. *Biomedicines* **2021**, *9*, doi:10.3390/biomedicines9091265.
9. Celià-Terrassa, T.; Kang, Y. How important is EMT for cancer metastasis? *PLoS Biol.* **2024**, *22*, 1–18, doi:10.1371/journal.pbio.3002487.
10. Brabletz, T.; Kalluri, R.; Nieto, M.A.; Weinberg, R.A. EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 128–134, doi:10.1038/nrc.2017.118.
11. Kim, Y.S.; Yi, B.R.; Kim, N.H.; Choi, K.C. Role of the epithelial-mesenchymal transition and its effects on embryonic stem cells. *Exp. Mol. Med.* **2014**, *46*, 1–6, doi:10.1038/emm.2014.44.
12. Thiery, J.P.; Acloque, H.; Huang, R.Y.J.; Nieto, M.A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **2009**, *139*, 871–890, doi:10.1016/j.cell.2009.11.007.
13. Saitoh, M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J. Biochem.* **2018**, *164*, 257–264, doi:10.1093/JB/MVY047.

14. Schaeffer, D.; Somarelli, J.A.; Hanna, G.; Palmer, G.M.; Garcia-Blanco, M.A. Cellular Migration and Invasion Uncoupled: Increased Migration Is Not an Inexorable Consequence of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 3486–3499, doi:10.1128/MCB.00694-14.
15. Odero-Marah, V.; Hawsawi, O.; Henderson, V.; Sweeney, J. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and prostate cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1095*, 101–110, doi:10.1007/978-3-319-95693-0_6.
16. Wang, Y.; Zhou, B.P. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chin. J. Cancer* **2011**, *30*, 603–611, doi:10.5732/CJC.011.10226.
17. Yang, J.; Liu, Y.; Liu, S. The role of epithelial-mesenchymal transition and autophagy in pancreatic ductal adenocarcinoma invasion. *Cell Death Dis.* **2023**, *14*, doi:10.1038/s41419-023-06032-3.
18. Legras, A.; Pécuchet, N.; Imbeaud, S.; Pallier, K.; Didelot, A.; Roussel, H.; Gibault, L.; Fabre, E.; Le Pimpec-Barthes, F.; Laurent-Puig, P.; et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition and MicroRNAs in Lung Cancer. *Cancers* **2017**, *Vol. 9*, Page 101 **2017**, *9*, 101, doi:10.3390/CANCERS9080101.
19. Van Zijl, F.; Zulehner, G.; Petz, M.; Schneller, D.; Kornauth, C.; Hau, M.; Machat, G.; Grubinger, M.; Huber, H.; Mikulits, W. Epithelial–Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma. *Futur. Oncol.* **2009**, *5*, 1169–1179, doi:10.2217/FON.09.91.
20. Xu, K.; Zhang, C.; Du, T.; Gabriel, A.N.A.; Wang, X.; Li, X.; Sun, L.; Wang, N.; Jiang, X.; Zhang, Y. Progress of exosomes in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *134*, 111111, doi:10.1016/j.biopha.2020.111111.
21. Nooreldeen, R.; Bach, H. Current and future development in lung cancer diagnosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22168661.
22. Bremnes, R.M.; Veve, R.; Hirsch, F.R.; Franklin, W.A. The E-cadherin cell–cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer* **2002**, *36*, 115–124, doi:10.1016/S0169-5002(01)00471-8.
23. You, J.; Li, M.; Cao, L.M.; Gu, Q.H.; Deng, P.B.; Tan, Y.; Hu, C.P. Snail1-dependent cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells via exosomes. *QJM An Int. J. Med.* **2019**, *112*, 581–590, doi:10.1093/QJMED/HCZ093.
24. Matsubara, T.; Tagawa, T.; Takada, K.; Toyokawa, G.; Shimokawa, M.; Kozuma, Y.; Akamine, T.; Haro, A.; Osoegawa, A.; Mori, M. Clinical and Prognostic Significance of the Epithelial–Mesenchymal Transition in Stage IA Lung Adenocarcinoma: A Propensity Score–Matched Analysis. *Clin. Lung Cancer* **2019**, *20*, e504–e513, doi:10.1016/J.CLCC.2019.04.006.
25. Zhou, L.; Yu, L.; Wu, S.; Feng, Z.; Song, W.; Gong, X. Clinicopathological significance of KAI1 expression and epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *World J. Surg. Oncol.* **2015**, *13*, 1–8, doi:10.1186/S12957-015-0657-8/TABLES/3.
26. Xiao, D.; He, J. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *J. Thorac. Dis.* **2010**, *2*, 154, doi:10.3978/J.ISSN.2072-1439.2010.02.03.7.
27. Li, F.; Song, Q.Z.; Zhang, Y.F.; Wang, X.R.; Cao, L.M.; Li, N.; Zhao, L.X.; Zhang,

- S.X.; Zhuang, X.F. Identifying the EMT-related signature to stratify prognosis and evaluate the tumor microenvironment in lung adenocarcinoma. *Front. Genet.* **2022**, *13*, 1008416, doi:10.3389/FGENE.2022.1008416/BIBTEX.
28. DiRusso, C.J.; Dashtiahangar, M.; Gilmore, T.D. Scaffold proteins as dynamic integrators of biological processes. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 102628, doi:10.1016/j.jbc.2022.102628.
 29. Mukherjee, S.; Low, B.C. Scaffold Proteins and their Roles in Human Diseases. *Proc. Singapore Natl. Acad. Sci.* **2020**, *14*, 15–29, doi:10.1142/s2591722620400025.
 30. Peng, P.-H.; Hsu, K.-W.; Wu, K.-J. Liquid-liquid phase separation (LLPS) in cellular physiology and tumor biology. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, *11*, 3766.
 31. Wang, B.; Zhang, L.; Dai, T.; Qin, Z.; Lu, H.; Zhang, L.; Zhou, F. Liquid–liquid phase separation in human health and diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *61*, 2021, *6*, 1–16, doi:10.1038/s41392-021-00678-1.
 32. Kudlik, G.; Takács, T.; Radnai, L.; Kurilla, A.; Szeder, B.; Koprivanacz, K.; Merő, B.L.; Buday, L.; Vas, V. Advances in Understanding TKS4 and TKS5: Molecular Scaffolds Regulating Cellular Processes from Podosome and Invadopodium Formation to Differentiation and Tissue Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–28, doi:10.3390/IJMS21218117.
 33. Dülk, M.; Szeder, B.; Glatz, G.; Merő, B.L.; Koprivanacz, K.; Kudlik, G.; Vas, V.; Sipeki, S.; Cserkaszkzy, A.; Radnai, L.; et al. EGF Regulates the Interaction of Tks4 with Src through Its SH2 and SH3 Domains. *Biochemistry* **2018**, *57*, 4186–4196, doi:10.1021/acs.biochem.8b00084.
 34. Merő, B.; Koprivanacz, K.; Cserkaszkzy, A.; Radnai, L.; Vas, V.; Kudlik, G.; Gógl, G.; Sok, P.; Póti, Á.L.; Szeder, B.; et al. Characterization of the intramolecular interactions and regulatory mechanisms of the scaffold protein tks4. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8103, doi:10.3390/IJMS22158103/S1.
 35. Linder, S.; Cervero, P.; Eddy, R.; Condeelis, J. Mechanisms and roles of podosomes and invadopodia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, *24*, 86–106, doi:10.1038/s41580-022-00530-6.
 36. Alonso, F.; Spuul, P.; Daubon, T.; Kramer, Ij.; Génot, E. Variations on the theme of podosomes: A matter of context. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2019**, *1866*, 545–553, doi:10.1016/J.BBAMCR.2018.12.009.
 37. Murphy, D.A.; Courtneidge, S.A. The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: Characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 413–426, doi:10.1038/nrm3141.
 38. Buschman, M.D.; Bromann, P.A.; Cejudo-Martin, P.; Wen, F.; Pass, I.; Courtneidge, S.A. The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 1302–11, doi:10.1091/mbc.E08.
 39. Abram, C.L.; Seals, D.F.; Pass, I.; Salinsky, D.; Maurer, L.; Roth, T.M.; Courtneidge, S.A. The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 16844–16851, doi:10.1074/JBC.M300267200/ASSET/58004359-8525-4BBC-85AB-5908F71D4045/MAIN.ASSETS/GR8.JPG.

40. Iizuka, S.; Abdullah, C.; Buschman, M.D.; Diaz, B.; Courtneidge, S.A. The role of Tks adaptor proteins in invadopodia formation, growth and metastasis of melanoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 78473, doi:10.18632/ONCOTARGET.12954.
41. Abdellatef, S.; Fakhoury, I.; Haddad, M. Al; Jaafar, L.; Maalouf, H.; Hanna, S.; Khalil, B.; El Masri, Z.; Hodgson, L.; El-Sibai, M. StarD13 negatively regulates invadopodia formation and invasion in high-grade serous (HGS) ovarian adenocarcinoma cells by inhibiting Cdc42. *Eur. J. Cell Biol.* **2022**, *101*, 1–37, doi:10.1016/j.ejcb.2021.151197.
42. Al Haddad, M.; El-Rif, R.; Hanna, S.; Jaafar, L.; Dennaoui, R.; Abdellatef, S.; Miskolci, V.; Cox, D.; Hodgson, L.; El-Sibai, M. Differential regulation of rho GTPases during lung adenocarcinoma migration and invasion reveals a novel role of the tumor suppressor StarD13 in invadopodia regulation. *Cell Commun. Signal.* **2020**, *18*, 1–20, doi:10.1186/s12964-020-00635-5.
43. Whitehead, C.A.; Nguyen, H.P.T.; Morokoff, A.P.; Luwor, R.B.; Paradiso, L.; Kaye, A.H.; Mantamadiotis, T.; Stylli, S.S. Inhibition of Radiation and Temozolomide-Induced Invadopodia Activity in Glioma Cells Using FDA-Approved Drugs. *Transl. Oncol.* **2018**, *11*, 1406–1418, doi:10.1016/j.tranon.2018.08.012.
44. Saykali, B.A.; El-Sibai, M. Invadopodia, Regulation, and Assembly in Cancer Cell Invasion. *Cell Commun. Adhes.* **2014**, *21*, 207–212, doi:10.3109/15419061.2014.923845.
45. Saini, P.; Courtneidge, S.A. Tks adaptor proteins at a glance. *J. Cell Sci.* **2018**, *131*, doi:10.1242/JCS.203661/56744.
46. Leong, H.S.; Robertson, A.E.; Stoletov, K.; Leith, S.J.; Chin, C.A.; Chien, A.E.; Hague, M.N.; Ablack, A.; Carmine-Simmen, K.; McPherson, V.A.; et al. Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis. *Cell Rep.* **2014**, *8*, 1558–1570, doi:10.1016/j.celrep.2014.07.050.
47. Iqbal, Z.; Cejudo-Martin, P.; de Brouwer, A.; van der Zwaag, B.; Ruiz-Lozano, P.; Scimia, M.C.; Lindsey, J.D.; Weinreb, R.; Albrecht, B.; Megarbane, A.; et al. Disruption of the Podosome Adaptor Protein TKS4 (SH3PXD2B) Causes the Skeletal Dysplasia, Eye, and Cardiac Abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2010**, *86*, 254–261, doi:10.1016/J.AJHG.2010.01.009.
48. Mao, M.; Thedens, D.R.; Chang, B.; Harris, B.S.; Zheng, Q.Y.; Johnson, K.R.; Donahue, L.R.; Anderson, M.G. The podosomal-adaptor protein SH3PXD2B is essential for normal postnatal development. *Mamm. Genome* **2009**, *20*, 462–475, doi:10.1007/s00335-009-9210-9.
49. Bendon, C.L.; Fenwick, A.L.; Hurst, J.A.; Nürnberg, G.; Nürnberg, P.; Wall, S.A.; Wilkie, A.O.M.; Johnson, D. Frank-ter Haar syndrome associated with sagittal craniosynostosis and raised intracranial pressure. *BMC Med. Genet.* **2012**, *13*, doi:10.1186/1471-2350-13-104.
50. Borrone, C.; Di Rocco, M.; Crovato, F.; Camera, G.; Gambini, C. New multisystemic disorder involving heart valves, skin, bones, and joints in two brothers. *Am. J. Med. Genet.* **1993**, *46*, 228–234, doi:10.1002/ajmg.1320460225.
51. Chang, T.C.; Bauer, M.; Puerta, H.S.; Greenberg, M.B.; Cavuoto, K.M. Ophthalmic findings in Frank-ter Haar syndrome: report of a sibling pair. *J. AAPOS* **2017**, *21*, 514–516, doi:10.1016/j.jaapos.2017.07.216.

52. Hamel, B.C.J.; Draaisma, J.M.T.; Pinckers, A.J.L.G.; Boetes, C.; Hoppe, R.L.E.; Ropers, H.H.; Brunner, H.G. Autosomal recessive Melnick-Needles syndrome or ter Haar syndrome? Report of a patient and reappraisal of an earlier report. *Am. J. Med. Genet.* **1995**, *56*, 312–316, doi:10.1002/AJMG.1320560320.
53. Maas, S.M.; Kayserili, H.; Lam, J.; Apak, M.Y.; Hennekam, R.C.M. Further delineation of Frank–ter Haar syndrome. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2004**, *131A*, 127–133, doi:10.1002/AJMG.A.30244.
54. Mégarbané, K. Tomey, and G.W. Congenital Glaucoma, Limb Deformities, Skeletal Dysplasia, and Facial Anomalies: Report of Another Family. *J. Med. Genet* **1997**, *73*, 67–71, doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19971128)73:1.
55. Ter Haar, B.; Hamel, B.; Hendriks, J.; De Jager, J. Melnick-Needles syndrome: Indication for an autosomal recessive form. *Am. J. Med. Genet.* **1982**, *13*, 469–477, doi:10.1002/AJMG.1320130418.
56. Wilson, G.R.; Sunley, J.; Smith, K.R.; Pope, K.; Bromhead, C.J.; Fitzpatrick, E.; Di Rocco, M.; Van Steensel, M.; Coman, D.J.; Leventer, R.J.; et al. Mutations in SH3PXD2B cause Borrone dermato-cardio-skeletal syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* *2014 226* **2013**, *22*, 741–747, doi:10.1038/ejhg.2013.229.
57. Zemojtel, T.; Köhler, S.; Mackenroth, L.; Jäger, M.; Hecht, J.; Krawitz, P.; Graul-Neumann, L.; Doelken, S.; Ehmke, N.; Spielmann, M.; et al. Effective diagnosis of genetic disease by computational phenotype analysis of the disease-associated genome. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, doi:10.1126/SCITRANSLMED.3009262/SUPPL_FILE/6-252RA123_TABLE_S6.ZIP.
58. Zrhidri, A.; Jaouad, I.C.; Lyahyai, J.; Raymond, L.; Egéa, G.; Taoudi, M.; El Mouatassim, S.; Sefiani, A. Identification of two novel SH3PXD2B gene mutations in Frank-Ter Haar syndrome by exome sequencing: Case report and review of the literature. *Gene* **2017**, *628*, 190–193, doi:10.1016/J.GENE.2017.07.011.
59. Durand, B.; Stoetzel, C.; Schaefer, E.; Calmels, N.; Scheidecker, S.; Kempf, N.; De Melo, C.; Guilbert, A.S.; Timbolschi, D.; Donato, L.; et al. A severe case of Frank-ter Haar syndrome and literature review: Further delineation of the phenotypical spectrum. *Eur. J. Med. Genet.* **2020**, *63*, 103857, doi:10.1016/J.EJMG.2020.103857.
60. Dülk, M.; Kudlik, G.; Fekete, A.; Ernsts, D.; Kvell, K.; Pongrácz, J.E.; Mero, B.L.; Szeder, B.; Radnai, L.; Geiszt, M.; et al. The scaffold protein Tks4 is required for the differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs) into adipogenic and osteogenic lineages. *Sci. Reports 2016 61* **2016**, *6*, 1–9, doi:10.1038/srep34280.
61. Vas, V.; Kovács, T.; Körmendi, S.; Bródy, A.; Kudlik, G.; Szeder, B.; Mező, D.; Kállai, D.; Koprivanacz, K.; Merő, B.L.; et al. Significance of the Tks4 scaffold protein in bone tissue homeostasis. *Sci. Reports 2019 91* **2019**, *9*, 1–10, doi:10.1038/s41598-019-42250-6.
62. Szeder, B.; Tárnoki-Zách, J.; Lakatos, D.; Vas, V.; Kudlik, G.; Merő, B.; Koprivanacz, K.; Bányai, L.; Hámori, L.; Róna, G.; et al. Absence of the Tks4 Scaffold Protein Induces Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Changes in Human Colon Cancer Cells. *Cells 2019, Vol. 8, Page 1343* **2019**, *8*, 1343, doi:10.3390/CELLS8111343.
63. Jacksi, M.; Schad, E.; Buday, L.; Tantos, A. Absence of Scaffold Protein Tks4 Disrupts Several Signaling Pathways in Colon Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1310,

doi:10.3390/IJMS24021310/S1.

64. Kurilla, A.; László, L.; Takács, T.; Tilajka, Á.; Lukács, L.; Novák, J.; Pancsa, R.; Buday, L.; Vas, V. Studying the Association of TKS4 and CD2AP Scaffold Proteins and Their Implications in the Partial Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Process. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, doi:10.3390/IJMS242015136.
65. Zhu, Y.; Hu, Y.; Wang, P.; Dai, X.; Fu, Y.; Xia, Y.; Sun, L.; Ruan, S. Comprehensive bioinformatics and experimental analysis of SH3PXD2B reveals its carcinogenic effect in gastric carcinoma. *Life Sci.* **2023**, *326*, 121792, doi:10.1016/J.LFS.2023.121792.
66. Kui, X.; Wang, Y.; Zhang, C.; Li, H.; Li, Q.; Ke, Y.; Wang, L. Prognostic value of SH3PXD2B (Tks4) in human hepatocellular carcinoma: a combined multi-omics and experimental study. *BMC Med. Genomics* **2021**, *14*, 1–10, doi:10.1186/S12920-021-00963-6/FIGURES/3.
67. Zhang, S.; Pang, K.; Feng, X.; Zeng, Y. Transcriptomic data exploration of consensus genes and molecular mechanisms between chronic obstructive pulmonary disease and lung adenocarcinoma. *Sci. Reports 2022 121* **2022**, *12*, 1–14, doi:10.1038/s41598-022-17552-x.
68. Cui, Y.; Wang, X.; Zhang, L.; Liu, W.; Ning, J.; Gu, R.; Cui, Y.; Cai, L.; Xing, Y. A novel epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related gene signature of predictive value for the survival outcomes in lung adenocarcinoma. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 974614, doi:10.3389/FONC.2022.974614/BIBTEX.
69. Lin, J.-S.; Ali, J.; Lai, E.-M. Protein–Protein Interactions: Co-immunoprecipitation. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; 2024; Vol. 2715, pp. 273–283 ISBN 9781493970339.
70. Budayeva, H.G.; Cristea, I.M. A mass spectrometry view of stable and transient protein interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *806*, 263, doi:10.1007/978-3-319-06068-2_11.
71. Alam, M.S. Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr. Protoc. Immunol.* **2018**, *123*, e58, doi:10.1002/cpim.58.
72. Kumar, M.; Michael, S.; Alvarado-Valverde, J.; McRossed D Sign©száros, B.; Sámano-Sánchez, H.; Zeke, A.; Dobson, L.; Lazar, T.; Örd, M.; Nagpal, A.; et al. The Eukaryotic Linear Motif resource: 2022 release. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D497–D508, doi:10.1093/nar/gkab975.
73. Krystkowiak, I.; Davey, N.E. SLiMSearch: a framework for proteome-wide discovery and annotation of functional modules in intrinsically disordered regions. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W464–W469, doi:10.1093/NAR/GKX238.
74. Szebényi, K.; Barrio-Hernandez, I.; Gibbons, G.M.; Biasetti, L.; Troakes, C.; Beltrao, P.; Lakatos, A. A human proteogenomic-cellular framework identifies KIF5A as a modulator of astrocyte process integrity with relevance to ALS. *Commun. Biol.* **2023**, *6*, doi:10.1038/s42003-023-05041-4.
75. Lányi, Á.; Baráth, M.; Péterfi, Z.; Bögel, G.; Orient, A.; Simon, T.; Petrovszki, E.; Kis-Tóth, K.; Sirokmány, G.; Rajnavölgyi, É.; et al. The Homolog of the Five SH3-Domain Protein (HOFI/SH3PXD2B) Regulates Lamellipodia Formation and Cell Spreading. *PLoS One* **2011**, *6*, e23653, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0023653.
76. Wu, J.I.; Lin, Y.P.; Tseng, C.W.; Chen, H.J.; Wang, L.H. Crabp2 Promotes Metastasis

- of Lung Cancer Cells via HuR and Integrin β 1/FAK/ERK Signaling. *Sci. Reports* 2019 9/1 **2019**, 9, 1–14, doi:10.1038/s41598-018-37443-4.
77. Jiang, L.; Zhu, W.; Streicher, K.; Morehouse, C.; Brohawn, P.; Ge, X.; Dong, Z.; Yin, X.; Zhu, G.; Gu, Y.; et al. Increased IR-A/IR-B ratio in non-small cell lung cancers associates with lower epithelial-mesenchymal transition signature and longer survival in squamous cell lung carcinoma. *BMC Cancer* **2014**, 14, 1–10, doi:10.1186/1471-2407-14-131/TABLES/1.
78. McConnell, P.; Mekel, M.; Kozlov, A.G.; Mooren, O.L.; Lohman, T.M.; Cooper, J.A. Comparative Analysis of CPI-Motif Regulation of Biochemical Functions of Actin Capping Protein. *Biochemistry* **2020**, 59, 1202–1215, doi:10.1021/ACS.BIOCHEM.0C00092/ASSET/IMAGES/LARGE/BI0C00092_0011.JPEG.
79. Kraiczy, J.; Nayak, K.M.; Howell, K.J.; Ross, A.; Forbester, J.; Salvestrini, C.; Mustata, R.; Perkins, S.; Andersson-Rolf, A.; Leenen, E.; et al. DNA methylation defines regional identity of human intestinal epithelial organoids and undergoes dynamic changes during development. *Gut* **2019**, 68, 49–61, doi:10.1136/gutjnl-2017-314817.
80. Cardoso-Moreira, M.; Halbert, J.; Valloton, D.; Velten, B.; Chen, C.; Shao, Y.; Liechti, A.; Ascensão, K.; Rummel, C.; Ovchinnikova, S.; et al. Gene expression across mammalian organ development. *Nature* **2019**, 571, 505–509, doi:10.1038/s41586-019-1338-5.
81. George, N.; Fexova, S.; Fuentes, A.M.; Madrigal, P.; Bi, Y.; Iqbal, H.; Kumbham, U.; Nolte, N.F.; Zhao, L.; Thanki, A.S.; et al. Expression Atlas update: insights from sequencing data at both bulk and single cell level. *Nucleic Acids Res.* **2024**, 52, D107–D114, doi:10.1093/nar/gkad1021.
82. Varga, N.; Veréb, Z.; Rajnavölgyi, É.; Németh, K.; Uher, F.; Sarkadi, B.; Apáti, Á. Mesenchymal stem cell like (MSCI) cells generated from human embryonic stem cells support pluripotent cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, 414, 474–480, doi:10.1016/J.BBRC.2011.09.089.
83. Khalid, A.B.; Pence, J.; Suthon, S.; Lin, J.; Miranda-Carboni, G.A.; Krum, S.A. GATA4 Regulates Mesenchymal Stem Cells via Direct Transcriptional Regulation of the WNT Signalosome. *Bone* **2021**, 144, 115819, doi:10.1016/J.BONE.2020.115819.
84. Rivera-Pérez, J.A.; Wakamiya, M.; Behringer, R.R. Goosecoid acts cell autonomously in mesenchyme-derived tissues during craniofacial development. *Development* **1999**, 126, 3811–3821, doi:10.1242/DEV.126.17.3811.
85. Schelch, K.; Vogel, L.; Schneller, A.; Brankovic, J.; Mohr, T.; Mayer, R.L.; Slany, A.; Gerner, C.; Grusch, M. EGF Induces Migration Independent of EMT or Invasion in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, 9, 634371, doi:10.3389/FCELL.2021.634371/BIBTEX.
86. Dong, H.; Wei, Y.; Wan, X.; Cai, S. Hypoxia Promotes Human NSCLC Cell Line A549 Motility and EMT Through Extracellular HSP90 α . *Eur. Respir. J.* **2017**, 50, PA3307, doi:10.1183/1393003.CONGRESS-2017.PA3307.
87. Juin, A.; Di Martino, J.; Leitinger, B.; Henriët, E.; Gary, A.S.; Paysan, L.; Bomo, J.; Baffet, G.; Gauthier-Rouvière, C.; Rosenbaum, J.; et al. Discoidin domain receptor 1

- controls linear invadosome formation via a Cdc42-Tuba pathway. *J. Cell Biol.* **2014**, *207*, 517–533, doi:10.1083/JCB.201404079/VIDEO-1.
88. Wang, S.; Li, E.; Gao, Y.; Wang, Y.; Guo, Z.; He, J.; Zhang, J.; Gao, Z.; Wang, Q. Study on Invadopodia Formation for Lung Carcinoma Invasion with a Microfluidic 3D Culture Device. *PLoS One* **2013**, *8*, e56448, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0056448.
89. Li, Y.; Zhang, H.; Gong, H.; Yuan, Y.; Li, Y.; Wang, C.; Li, W.; Zhang, Z.; Liu, M.; Liu, H.; et al. MiR-182 suppresses invadopodia formation and metastasis in non-small cell lung cancer by targeting cortactin gene. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 1–15, doi:10.1186/S13046-018-0824-1/FIGURES/8.
90. Huang, D.; Cao, L.; Zheng, S. CAPZA1 modulates EMT by regulating actin cytoskeleton remodelling in hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, *36*, 1–9, doi:10.1186/S13046-016-0474-0/FIGURES/4.
91. Huang, D.; Cao, L.; Xiao, L.; Song, J. xian; Zhang, Y. jun; Zheng, P.; Zheng, S. guo Hypoxia induces actin cytoskeleton remodeling by regulating the binding of CAPZA1 to F-actin via PIP2 to drive EMT in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **2019**, *448*, 117–127, doi:10.1016/J.CANLET.2019.01.042.
92. Davey, N.E.; Cyert, M.S.; Moses, A.M. Short linear motifs - ex nihilo evolution of protein regulation. *Cell Commun. Signal.* **2015**, *13*, doi:10.1186/S12964-015-0120-Z.
93. Edwards, M.; Zwolak, A.; Schafer, D.A.; Sept, D.; Dominguez, R.; Cooper, J.A. Capping Protein Regulators Fine-Tune Actin Assembly Dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 677, doi:10.1038/NRM3869.
94. Zhang, J.Z.; Behrooz, A.; Ismail-Beigi, F. Regulation of glucose transport by hypoxia. *Am. J. Kidney Dis.* **1999**, *34*, 189–202, doi:10.1016/S0272-6386(99)70131-9/ASSET/07299A26-6394-43B1-BE97-EFD2A0004BE1/MAIN.ASSETS/GR4.SML.
95. Cavadas, M.A.S.; Mesnieres, M.; Crifo, B.; Manresa, M.C.; Selfridge, A.C.; Scholz, C.C.; Cummins, E.P.; Cheong, A.; Taylor, C.T. REST mediates resolution of HIF-dependent gene expression in prolonged hypoxia. *Sci. Reports 2015 51* **2015**, *5*, 1–12, doi:10.1038/srep17851.
96. Liu, K.H.; Tsai, Y.T.; Chin, S.Y.; Lee, W.R.; Chen, Y.C.; Shen, S.C. Hypoxia Stimulates the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells Through Accumulation of Nuclear β -Catenin. *Anticancer Res.* **2018**, *38*, 6299–6308, doi:10.21873/ANTICANRES.12986.
97. Zhao, J.; Bruck, S.; Cemerski, S.; Zhang, L.; Butler, B.; Dani, A.; Cooper, J.A.; Shaw, A.S. CD2AP Links Cortactin and Capping Protein at the Cell Periphery To Facilitate Formation of Lamellipodia. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 38–47, doi:10.1128/MCB.00734-12.
98. Carlier, M.F.; Nioche, P.; Broutin-L'hermite, I.; Boujemaa, R.; Le Clainche, C.; Egile, C.; Garbay, C.; Ducruix, A.; Sansonetti, P.; Pantaloni, D. GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural wiskott-aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21946–21952, doi:10.1074/jbc.M000687200.
99. Mitra, P.; Kalailingam, P.; Tan, H.B.; Thanabalu, T. Overexpression of GRB2 Enhances Epithelial to Mesenchymal Transition of A549 Cells by Upregulating SNAIL

- Expression. *Cells* 2018, Vol. 7, Page 97 **2018**, 7, 97, doi:10.3390/CELLS7080097.
100. Weaver, A.M.; Karginov, A. V.; Kinley, A.W.; Weed, S.A.; Li, Y.; Parsons, J.T.; Cooper, J.A. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 370–374, doi:10.1016/S0960-9822(01)00098-7.
 101. Ji, R.; Zhu, X.J.; Wang, Z.R.; Huang, L.Q. Cortactin in Epithelial–Mesenchymal Transition. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 585619, doi:10.3389/FCELL.2020.585619/BIBTEX.
 102. Huang, C.; Liu, J.; Haudenschild, C.C.; Zhan, X. The Role of Tyrosine Phosphorylation of Cortactin in the Locomotion of Endothelial Cells*. **1998**.
 103. Kourtidis, A.; Necela, B.; Lin, W.H.; Lu, R.; Feathers, R.W.; Asmann, Y.W.; Aubrey Thompson, E.; Anastasiadis, P.Z. Cadherin complexes recruit mRNAs and RISC to regulate epithelial cell signaling. *J. Cell Biol.* **2017**, *216*, 3073–3085, doi:10.1083/JCB.201612125.
 104. Han, T.; Jiang, S.; Zheng, H.; Yin, Q.; Xie, M.; Little, M.R.; Yin, X.; Chen, M.; Song, S.J.; Beg, A.A.; et al. Interplay between c-Src and the APC/C co-activator Cdh1 regulates mammary tumorigenesis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, doi:10.1038/S41467-019-11618-7.
 105. Bögel, G.; Gujdár, A.; Geiszt, M.; Lányi, Á.; Fekete, A.; Sipeki, S.; Downward, J.; Buday, L. Frank-ter Haar Syndrome Protein Tks4 Regulates Epidermal Growth Factor-dependent Cell Migration. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 31321–31329, doi:10.1074/JBC.M111.324897.
 106. Wan, K.F.; Sambhi, B.S.; Tate, R.; Waters, C.; Pyne, N.J. The inhibitory γ subunit of the type 6 retinal cGMP phosphodiesterase functions to link c-Src and G-protein-coupled receptor kinase 2 in a signaling unit that regulates p42/p44 mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 18658–18663, doi:10.1074/jbc.M212103200.
 107. Saci, A.; Liu, W.Q.; Vidal, M.; Garbay, C.; Rendu, F.; Bachelot-Loza, C. Differential effect of the inhibition of Grb2-SH3 interactions in platelet activation induced by thrombin and by Fc receptor engagement. *Biochem. J.* **2002**, *363*, 717–725, doi:10.1042/0264-6021:3630717.
 108. Jones, D.A.; Benjamin, C.W. Phosphorylation of growth factor receptor binding protein-2 by pp60(c- src) tyrosine kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *337*, 143–148, doi:10.1006/abbi.1996.9789.
 109. Schroeder, B.; Srivatsan, S.; Shaw, A.; Billadeau, D.; McNiven, M.A. CIN85 phosphorylation is essential for EGFR ubiquitination and sorting into multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 3602–3611, doi:10.1091/mbc.E11-08-0666.
 110. Narita, T.; Nishimura, T.; Yoshizaki, K.; Taniyama, T. CIN85 associates with TNF receptor 1 via Src and modulates TNF- α -induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* **2005**, *304*, 256–264, doi:10.1016/j.yexcr.2004.11.005.
 111. Emerman, A.B.; Zhang, Z.-R.; Chakrabarti, O.; Hegde, R.S. c-Src-mediated phosphorylation of NOXA1 and Tks induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 4325–4337, doi:10.1091/mbc.E10.

112. Kärkkäinen, S.; Hiipakka, M.; Wang, J.-H.; Kleino, I.; Vähä-Jaakkola, M.; Renkema, G.H.; Liss, M.; Wagner, R.; Saksela, K. Identification of preferred protein interactions by phage-display of the human Src homology-3 proteome. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 186–91, doi:10.1038/sj.embor.7400596.
113. Poghosyan, Z.; Robbins, S.M.; Houslay, M.D.; Webster, A.; Murphy, G.; Edwards, D.R. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4999–5007, doi:10.1074/jbc.M107430200.
114. Zhong, J.L.; Poghosyan, Z.; Pennington, C.J.; Scott, X.; Handsley, M.M.; Warn, A.; Gavrilovic, J.; Honert, K.; Krüger, A.; Span, P.N.; et al. Distinct functions of natural ADAM-15 cytoplasmic domain variants in human mammary carcinoma. *Mol. Cancer Res.* **2008**, *6*, 383–394, doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-2028.
115. Solomaha, E.; Szeto, F.L.; Yousef, M.A.; Palfrey, H.C. Kinetics of Src homology 3 domain association with the proline-rich domain of dynamins: Specificity, occlusion, and the effects of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 23147–23156, doi:10.1074/jbc.M501745200.
116. Wang, Y.; Cao, H.; Chen, J.; McNiven, M.A. A direct interaction between the large GTPase dynamin-2 and FAK regulates focal adhesion dynamics in response to active Src. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 1529–1538, doi:10.1091/mbc.E10-09-0785.
117. Patel, A.; Sabbineni, H.; Clarke, A.; Somanath, P.R. Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis. *Life Sci.* **2016**, *157*, 52–61, doi:10.1016/J.LFS.2016.05.036.
118. Drake, J.M.; Graham, N.A.; Stoyanova, T.; Sedghi, A.; Goldstein, A.S.; Cai, H.; Smith, D.A.; Zhang, H.; Komisopoulou, E.; Huang, J.; et al. Oncogene-specific activation of tyrosine kinase networks during prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 1643–1648, doi:10.1073/PNAS.1120985109/SUPPL_FILE/SD02.XLSX.
119. Tatarov, O.; Mitchell, T.J.; Seywright, M.; Leung, H.Y.; Brunton, V.G.; Edwards, J. Src family kinase activity is up-regulated in hormone-refractory prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 3540–3549, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1857/346571/P/SRC-FAMILY-KINASE-ACTIVITY-IS-UP-REGULATED-IN.
120. Nagathihalli, N.S.; Merchant, N.B. Src-mediated regulation of E-cadherin and EMT in pancreatic cancer. *Front. Biosci.* **2012**, *17*, 2059–2069, doi:10.2741/4037/PDF.
121. Liu, X.; Feng, R. Inhibition of epithelial to mesenchymal transition in metastatic breast carcinoma cells by c-Src suppression. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **2010**, *42*, 496–501, doi:10.1093/ABBS/GMQ043.
122. Bisson, N.; James, D.A.; Ivosev, G.; Tate, S.A.; Bonner, R.; Taylor, L.; Pawson, T. Selected reaction monitoring mass spectrometry reveals the dynamics of signaling through the GRB2 adaptor. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 653–658, doi:10.1038/nbt.1905.
123. Oikawa, T.; Itoh, T.; Takenawa, T. Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *J. Cell Biol.* **2008**, *182*, 157–169, doi:10.1083/JCB.200801042.
124. Crimaldi, L.; Courtneidge, S.A.; Gimona, M. Tks5 recruits AFAP-110, p190RhoGAP, and cortactin for podosome formation. *Exp. Cell Res.* **2009**, *315*, 2581–2592,

doi:10.1016/J.YEXCR.2009.06.012.

125. Gabant, P.; Forrester, L.; Nichols, J.; Van Reeth, T.; De Mees, C.; Pajack, B.; Watt, A.; Smitz, J.; Alexandre, H.; Szpirer, C.; et al. Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12865–12870, doi:10.1073/PNAS.202215399/ASSET/E451F69C-D0E0-4424-97F3-CA80CCD05835/ASSETS/GRAPHIC/PQ2022153006.JPEG.
126. Das, S.; Kharat, K.; Singh, S. Role of SH3PXD2B in Breast Cancer Lung Metastasis through Computational Structural and Systems Perspective. **2023**, doi:10.20944/PREPRINTS202309.0852.V1.
127. Iizuka, S.; Abdullah, C.; Buschman, M.D.; Diaz, B.; Courtneidge, S.A.; Iizuka, S.; Abdullah, C.; Buschman, M.D.; Diaz, B.; Courtneidge, S.A. The role of Tks adaptor proteins in invadopodia formation, growth and metastasis of melanoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 78473–78486, doi:10.18632/ONCOTARGET.12954.
128. Jacksi, M.; Schad, E.; Tantos, A. Morphological Changes Induced by TKS4 Deficiency Can Be Reversed by EZH2 Inhibition in Colorectal Carcinoma Cells. *Biomolecules* **2024**, *14*, 445, doi:10.3390/BIOM14040445/S1.
129. Lee, M.S.; Kim, S.; Kim, B.G.; Won, C.; Nam, S.H.; Kang, S.; Kim, H.J.; Kang, M.; Ryu, J.; Song, H.E.; et al. Snail1 induced in breast cancer cells in 3D collagen I gel environment suppresses cortactin and impairs effective invadopodia formation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2014**, *1843*, 2037–2054, doi:10.1016/J.BBAMCR.2014.05.007.
130. Santio, N.M.; Vainio, V.; Hoikkala, T.; Mung, K.L.; Lång, M.; Vahakoski, R.; Zdrojewska, J.; Coffey, E.T.; Kremneva, E.; Rainio, E.M.; et al. PIM1 accelerates prostate cancer cell motility by phosphorylating actin capping proteins. *Cell Commun. Signal.* **2020**, *18*, 1–18, doi:10.1186/S12964-020-00618-6/FIGURES/6.
131. LEE, Y.-J.; JEONG, S.-H.; HONG, S.-C.; CHO, B.-I.; HA, W.-S.; PARK, S.-T.; CHOI, S.-K.; JUNG, E.-J.; JU, Y.-T.; JEONG, C.-Y.; et al. Prognostic value of CAPZA1 overexpression in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* **2013**, *42*, 1569–1577, doi:10.3892/ijo.2013.1867.
132. Wei, J.; Meng, G.; Wu, J.; Wei, Z.; Zhang, Q.; Bao, J.; Zhang, J. CAPZA1 is low expressed in non-small cell lung cancer and contributed to tumor cell proliferation and metastasis. *Minerva Med.* **2023**, *114*, 124–126, doi:10.23736/S0026-4806.20.06910-4.
133. Wang, L.N.; Zhang, Z.T.; Wang, L.; Wei, H.X.; Zhang, T.; Zhang, L.M.; Lin, H.; Zhang, H.; Wang, S.Q. TGF- β 1/SH2B3 axis regulates anoikis resistance and EMT of lung cancer cells by modulating JAK2/STAT3 and SHP2/Grb2 signaling pathways. *Cell Death Dis.* **2022**, *13*, 1–12, doi:10.1038/s41419-022-04890-x.
134. Mustonen, H.; Lepistö, A.; Lehtonen, S.; Lehtonen, E.; Puolakkainen, P.; Kivilaakso, E. CD2AP contributes to cell migration and adhesion in cultured gastric epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *332*, 426–432, doi:10.1016/J.BBRC.2005.04.140.
135. Tilajka, Á.; Kurilla, A.; László, L.; Lovrics, A.; Novák, J.; Takács, T.; Buday, L.; Vas, V. Predictive value analysis of the interaction network of Tks4 scaffold protein in colon cancer. *Front. Mol. Biosci.* **2024**, *11*, 1–15, doi:10.3389/fmolb.2024.1414805.

136. Bandela, M.; Belvitch, P.; Garcia, J.G.N.; Dudek, S.M. Cortactin in Lung Cell Function and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, Vol. 23, Page 4606 **2022**, 23, 4606, doi:10.3390/IJMS23094606.
137. Hutchingst, N.J.; Clarkson, N.; Chalkley, R.; Barclay, A.N.; Brown, M.H. Linking the T cell surface protein CD2 to the actin-capping protein CAPZ via CMS and CIN85. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 22396–22403, doi:10.1074/jbc.M302540200.
138. Lynch, D.K.; Winata, S.C.; Lyons, R.J.; Hughes, W.E.; Lehrbach, G.M.; Wasinger, V.; Corthals, G.; Cordwell, S.; Daly, R.J. A cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 21805–21813, doi:10.1074/jbc.M211407200.

11. Függelék

1.táblázat: Tks4 eddig azonosított interakciós partnerei.

Tks4 partner molekulák	Interakciós partnerek	Alkalmazott módszerek a fehérje-fehérje interakciók validálására
Src (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src)	WASL/N-WASP	enzimátikus vizsgálat [1]
	Cortactin	in vitro és in vivo esszék [2] anti-bait koimmunprecipitációs próba [3] pull down esszé [4]
	Grb2	affinitás kromatográfiás esszé[5,6] in vitro és in vivo esszék [7]
	DNM2	affinitás kromatográfiás esszé [8] felületi plazmon rezonancia vizsgálat [9]
	ADAM15	fág display esszé [10] pull down esszé [11] affinitás kromatográfiás esszé [12]
	SH3KBP1/CIN85	affinitás kromatográfiás esszé [13,14] anti-bait koimmunprecipitációs próba [15]
	NOXA1	in vitro esszé [16]
Cortactin (Src substrate cortactin)	Tks4	Ko-immunprecipitáció [17], Ko-expresszió [18] GST pull-down [17] Fluoreszcencia-polarizációs esszé [3] Duolink proximity ligációs esszé [3]
	WASL	far western blot esszé [19] affinitás kromatográfiás esszé [20] anti tag ko-immunprecipitációs esszé [21] fluoreszcens mikroszkópia [22]
	DNM2	molekulaszűrő vizsgálat [23] anti tag ko-immunprecipitációs esszé [21,24] in vitro és in vivo esszék [25]
	Grb2	anti tag ko-immunprecipitációs esszé [21] in vitro esszé [26]

	Tks4	kolokalizáció és ko-immunprecipitáció [27,28]
ADAM15 (Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 15)	Grb2	szűrő kötődési vizsgálat [29] affinitás kromatográfiás esszé [12] pull down esszé [11]
	Tks4	GST-pull down esszé [30]
DNM2 (Dynamin-2)	SH3KBP1/CIN85	pull down esszé [31] affinitás kromatográfiás esszé [32] biokémiai esszé [33]
	Grb2	felületi plazmon rezonancia vizsgálat [9,34] anti tag ko-immunprecipitációs esszé [21] kettős-hibrid módszer [35]
	Tks4	GST-pull down esszé [36]
Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)	SH3KBP1	pull down esszé [37,38]
	WASL	pull down esszé [39] anti tag ko-immunprecipitációs esszé [21] kettős-hibrid módszer [35] in vitro és in vivo esszék [40]
	WIPF3/CR16	anti tag ko-immunprecipitációs esszé [21]
	Tks4	affinitás-tisztított tömegspektrometria [21]

WASL (Actin nucleation-promoting factor WASL)	WIPF3/CR16	anti tag ko-immunprecipitációs esszé [21,41]
	Tks4	GST-pull down esszé [36]
SH3KBP1 (SH3 domain-containing kinase-binding protein 1)	CD2AP	affinitás kromatográfiás esszé [42,43] anti bait/tag ko-immunprecipitációs esszé [15,41]
	CAPZB	affinitás kromatográfiás esszé [44] anti tag ko-immunprecipitációs esszé [41]
	Tks4	GST-pull down esszé [45]
CD2AP (CD2-associated protein)	CAPZB	affinitás kromatográfiás esszé [46] anti tag ko-immunprecipitációs esszé [41]
	Tks4	tömegspektrometria, Ko-immunprecipitáció, Duolink proximity ligációs esszé, peptid array [47]
WIPF3/CR16 (WAS/WASL-interacting protein family member 3)	Tks4	GST-pull down esszé [36]
NOXA1 (NADPH oxidase activator 1)	Tks4	Ko-immunprecipitáció, GST pull-down esszé [16]

1. Park, S.J.; Suetsugu, S.; Takenawa, T. Interaction of HSP90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation. *EMBO J.* 2005, 24, 1557–1570, doi:10.1038/sj.emboj.7600586.
2. Huang, C.; Liu, J.; Haudenschild, C.C.; Zhan, X. The Role of Tyrosine Phosphorylation of Cortactin in the Locomotion of Endothelial Cells*. 1998.
3. Dülk, M.; Szeder, B.; Glatz, G.; Merő, B.L.; Koprivanacz, K.; Kudlik, G.; Vas, V.; Sipeki, S.; Cserkaszy, A.; Radnai, L.; et al. EGF Regulates the Interaction of Tks4 with Src through Its SH2 and SH3 Domains. *Biochemistry* 2018, 57, 4186–4196, doi:10.1021/acs.biochem.8b00084.
4. Han, T.; Jiang, S.; Zheng, H.; Yin, Q.; Xie, M.; Little, M.R.; Yin, X.; Chen, M.; Song, S.J.; Beg, A.A.; et al. Interplay between c-Src and the APC/C co-activator Cdh1 regulates mammary tumorigenesis. *Nat. Commun.* 2019, 10, doi:10.1038/S41467-019-11618-7.

5. Wan, K.F.; Sambhi, B.S.; Tate, R.; Waters, C.; Pyne, N.J. The inhibitory γ subunit of the type 6 retinal cGMP phosphodiesterase functions to link c-Src and G-protein-coupled receptor kinase 2 in a signaling unit that regulates p42/p44 mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 18658–18663, doi:10.1074/jbc.M212103200.
6. Saci, A.; Liu, W.Q.; Vidal, M.; Garbay, C.; Rendu, F.; Bachelot-Loza, C. Differential effect of the inhibition of Grb2-SH3 interactions in platelet activation induced by thrombin and by Fc receptor engagement. *Biochem. J.* 2002, 363, 717–725, doi:10.1042/0264-6021:3630717.
7. Jones, D.A.; Benjamin, C.W. Phosphorylation of growth factor receptor binding protein-2 by pp60(c-src) tyrosine kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997, 337, 143–148, doi:10.1006/abbi.1996.9789.
8. Wang, Y.; Cao, H.; Chen, J.; McNiven, M.A. A direct interaction between the large GTPase dynamin-2 and FAK regulates focal adhesion dynamics in response to active Src. *Mol. Biol. Cell* 2011, 22, 1529–1538, doi:10.1091/mbc.E10-09-0785.
9. Solomaha, E.; Szeto, F.L.; Yousef, M.A.; Palfrey, H.C. Kinetics of Src homology 3 domain association with the proline-rich domain of dynamins: Specificity, occlusion, and the effects of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 23147–23156, doi:10.1074/jbc.M501745200.
10. Kärkkäinen, S.; Hiipakka, M.; Wang, J.-H.; Kleino, I.; Vähä-Jaakkola, M.; Renkema, G.H.; Liss, M.; Wagner, R.; Saksela, K. Identification of preferred protein interactions by phage-display of the human Src homology-3 proteome. *EMBO Rep.* 2006, 7, 186–191, doi:10.1038/sj.embor.7400596.
11. Poghosyan, Z.; Robbins, S.M.; Houslay, M.D.; Webster, A.; Murphy, G.; Edwards, D.R. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 4999–5007, doi:10.1074/jbc.M107430200.
12. Zhong, J.L.; Poghosyan, Z.; Pennington, C.J.; Scott, X.; Handsley, M.M.; Warn, A.; Gavrilovic, J.; Honert, K.; Krüger, A.; Span, P.N.; et al. Distinct functions of natural ADAM-15 cytoplasmic domain variants in human mammary carcinoma. *Mol. Cancer Res.* 2008, 6, 383–394, doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-2028.
13. Narita, T.; Nishimura, T.; Yoshizaki, K.; Taniyama, T. CIN85 associates with TNF receptor 1 via Src and modulates TNF- α -induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* 2005, 304, 256–264, doi:10.1016/j.yexcr.2004.11.005.
14. Schroeder, B.; Srivatsan, S.; Shaw, A.; Billadeau, D.; McNiven, M.A. CIN85 phosphorylation is essential for EGFR ubiquitination and sorting into multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell* 2012, 23, 3602–3611, doi:10.1091/mbc.E11-08-0666.
15. Kourtidis, A.; Necela, B.; Lin, W.H.; Lu, R.; Feathers, R.W.; Asmann, Y.W.; Aubrey Thompson, E.; Anastasiadis, P.Z. Cadherin complexes recruit mRNAs and RISC to regulate epithelial cell signaling. *J. Cell Biol.* 2017, 216, 3073–3085, doi:10.1083/JCB.201612125.
16. Emerman, A.B.; Zhang, Z.-R.; Chakrabarti, O.; Hegde, R.S. c-Src-mediated phosphorylation of NOXA1 and Tks induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *Mol. Biol. Cell* 2010, 21, 4325–4337, doi:10.1091/mbc.E10.
17. Bögel, G.; Gujdar, A.; Geiszt, M.; Lányi, Á.; Fekete, A.; Sipeki, S.; Downward, J.; Buday, L. Frank-ter Haar Syndrome Protein Tks4 Regulates Epidermal Growth Factor-dependent Cell Migration. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 31321–31329, doi:10.1074/JBC.M111.324897.
18. Buschman, M.D.; Bromann, P.A.; Cejudo-Martin, P.; Wen, F.; Pass, I.; Courtneidge, S.A. The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation. *Mol. Biol. Cell* 2009, 20, 1302–11, doi:10.1091/mbc.E08.
19. Mizutani, K.; Miki, H.; Takenawa, T.; Maruta, H.; Takenawa, T.; He, H.; Maruta, H. Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res.* 2002, 62, 669–674.
20. Lynch, D.K.; Winata, S.C.; Lyons, R.J.; Hughes, W.E.; Lehrbach, G.M.; Wasinger, V.; Corthals, G.; Cordwell, S.; Daly, R.J. A cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 21805–21813, doi:10.1074/jbc.M211407200.
21. Bisson, N.; James, D.A.; Ivosev, G.; Tate, S.A.; Bonner, R.; Taylor, L.; Pawson, T. Selected reaction monitoring mass spectrometry reveals the dynamics of signaling through the GRB2 adaptor. *Nat. Biotechnol.* 2011, 29, 653–658, doi:10.1038/nbt.1905.
22. Grassart, A.; Dujeancourt, A.; Lazarow, P.B.; Dautry-Varsat, A.; Sauvonnnet, N. Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. *EMBO Rep.* 2008, 9, 356–362, doi:10.1038/embor.2008.28.
23. Hashimoto, S.; Hirose, M.; Hashimoto, A.; Morishige, M.; Yamada, A.; Hosaka, H.; Akagi, K.I.; Ogawa, E.; Oneyama, C.; Agatsuma, T.; et al. Targeting AMAP1 and cortactin binding bearing an atypical src homology 3/proline interface for prevention of breast cancer invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 103, 7036–7041, doi:10.1073/pnas.0509166103.
24. Lee, J.H.; Han, J.H.; Kim, H.; Park, S.M.; Joe, E.H.; Jou, I. Parkinson's disease-associated LRRK2-G2019S mutant acts through regulation of SERCA activity to control ER stress in astrocytes. *Acta Neuropathol. Commun.* 2019, 7, 68, doi:10.1186/s40478-019-0716-4.
25. Schafer, D.A.; Weed, S.A.; Binns, D.; Karginov, A. V.; Parsons, J.T.; Cooper, J.A. Dynamin2 and cortactin regulate actin assembly and filament organization. *Curr. Biol.* 2002, 12, 1852–1857, doi:10.1016/S0960-9822(02)01228-9.
26. Crostella, L.; Lidder, S.; Williams, R.; Skouteris, G.G. Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-induces phosphorylation of cortactin in A431 cells in a Src kinase-independent manner. *Oncogene* 2001, 20, 3735–3745, doi:10.1038/sj.onc.1204474.
27. Lányi, Á.; Baráth, M.; Péterfi, Z.; Bögel, G.; Orient, A.; Simon, T.; Petrovszki, E.; Kis-Tóth, K.; Sirokmány, G.; Rajnavölgyi, É.; et al. The Homolog of the Five SH3-Domain Protein (HOFI/SH3PXD2B) Regulates Lamellipodia Formation and Cell Spreading. *PLoS One* 2011, 6, e23653, doi:10.1371/journal.pone.0023653.
28. Leong, H.S.; Robertson, A.E.; Stoleto, K.; Leith, S.J.; Chin, C.A.; Chien, A.E.; Hague, M.N.; Ablack, A.; Carmine-Simmen, K.; McPherson, V.A.; et al. Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis. *Cell Rep.* 2014, 8, 1558–1570, doi:10.1016/j.celrep.2014.07.050.
29. Kärkkäinen, S.; Hiipakka, M.; Wang, J.H.; Kleino, I.; Vähä-Jaakkola, M.; Renkema, G.H.; Liss, M.; Wagner, R.; Saksela, K. Identification of preferred protein interactions by phage-display of the human Src homology-3 proteome. *EMBO Rep.* 2006, 7, 186–191, doi:10.1038/sj.embor.7400596.
30. Ae, M.M.; Thedens, D.R.; Bo, A.E.; Ae, C.; Ae, B.S.H.; Yin, Q.; Ae, Z.; Johnson, K.R.; Leah, A.E.; Donahue, R.; et al. The podosomal-adaptor protein SH3PXD2B is essential for normal postnatal development. doi:10.1007/s00335-009-9210-9.
31. Schroeder, B.; Weller, S.G.; Chen, J.; Billadeau, D.; McNiven, M.A. A Dyn2-CIN85 complex mediates degradative traffic of the EGFR by regulation of late endosomal budding. *EMBO J.* 2010, 29, 3039–3053, doi:10.1038/emboj.2010.190.
32. Havrylov, S.; Rzhetsky, Y.; Malinowska, A.; Drobot, L.; Redowicz, M.J. Proteins recruited by SH3 domains of Ruk/CIN85 adaptor identified by LC-MS/MS. *Proteome Sci.* 2009, 7, doi:10.1186/1477-5956-7-21.

33. Wan, C.; Borgeson, B.; Phanse, S.; Tu, F.; Drew, K.; Clark, G.; Xiong, X.; Kagan, O.; Kwan, J.; Bezginov, A.; et al. Panorama of ancient metazoan macromolecular complexes. *Nature* 2015, 525, 339–344, doi:10.1038/nature14877.
34. Elhamdani, A.; Azizi, F.; Solomaha, E.; Palfrey, H.C.; Artalejo, C.R. Two mechanistically distinct forms of endocytosis in adrenal chromaffin cells: Differential effects of SH3 domains and amphiphysin antagonism. *FEBS Lett.* 2006, 580, 3263–3269, doi:10.1016/j.febslet.2006.04.083.
35. Yachie, N.; Petsalaki, E.; Mellor, J.C.; Weile, J.; Jacob, Y.; Verby, M.; Ozturk, S.B.; Li, S.; Cote, A.G.; Mosca, R.; et al. Pooled-matrix protein interaction screens using Barcode Fusion Genetics. *Mol. Syst. Biol.* 2016, 12, 863, doi:10.15252/msb.20156660.
36. Kropyvko, S. V. New partners of TKS4 scaffold protein. *Biopolym. Cell* 2015, 31, 395–401, doi:10.7124/bc.0008FC.
37. Gout, I.; Middleton, G.; Adu, J.; Ninkina, N.N.; Drobot, L.B.; Filonenko, V.; Matsuka, G.; Davies, A.M.; Waterfield, M.; Buchman, V.L. Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *EMBO J.* 2000, 19, 4015–4025, doi:10.1093/emboj/19.15.4015.
38. Borinstein, S.C.; Hyatt, M.A.; Sykes, V.W.; Straub, R.E.; Lipkowitz, S.; Boulter, J.; Bogler, O. SETA is a multifunctional adapter protein with three SH3 domains that binds Grb2, Cbl, and the novel SB1 proteins. *Cell. Signal.* 2000, 12, 769–779, doi:10.1016/S0898-6568(00)00129-7.
39. Carlier, M.F.; Nioche, P.; Broutin-L'hermite, I.; Boujemaa, R.; Le Clairche, C.; Egile, C.; Garbay, C.; Ducruix, A.; Sansonetti, P.; Pantaloni, D. GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural wiskott-aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 21946–21952, doi:10.1074/jbc.M000687200.
40. Ramesh, N.; Antón, I.M.; And, N.M.-Q.; Geha, R.S. Waltzing with WASP. *Trends Cell Biol.* 9.
41. Huttlin, E.L.; Bruckner, R.J.; Paulo, J.A.; Cannon, J.R.; Ting, L.; Baltier, K.; Colby, G.; Gebreab, F.; Gygi, M.P.; Parzen, H.; et al. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature* 2017, 545, 505–509, doi:10.1038/nature22366.
42. Tossidou, I.; Teng, B.; Drobot, L.; Meyer-Schwesinger, C.; Worthmann, K.; Haller, H.; Schiffer, M. CIN85/RukL is a novel binding partner of nephrin and podocin and mediates slit diaphragm turnover in podocytes. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 25285–25295, doi:10.1074/jbc.M109.087239.
43. Gaidos, G.; Soni, S.; Oswald, D.J.; Toselli, P.A.; Kirsch, K.H. Structure and function analysis of the CMS/CIN85 protein family identifies actin-bundling properties and heterotypic-complex formation. *J. Cell Sci.* 2007, 120, 2366–2377, doi:10.1242/jcs.004333.
44. Bior, B.K.; Ballif, B.A. Dab1 stabilizes its interaction with Cin85 by suppressing Cin85 phosphorylation at serine 587. *FEBS Lett.* 2013, 587, 60–66, doi:10.1016/j.febslet.2012.10.051.
45. Bazalii, A. V.; Samoylenko, A.A.; Petukhov, D.M.; Rynditch, A. V.; Redowicz, M.J.; Drobot, L.B. Interaction between adaptor proteins Ruk/CIN85 and Tks4 in normal and tumor cells of different tissue origins. *Biopolym. Cell* 2015, 30, 37–41, doi:10.7124/bc.00087A.
46. Bao, M.; Hanabuchi, S.; Facchinetti, V.; Du, Q.; Bover, L.; Plumas, J.; Chaperot, L.; Cao, W.; Qin, J.; Sun, S.-C.; et al. CD2AP/SHIP1 Complex Positively Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Receptor Signaling by Inhibiting the E3 Ubiquitin Ligase Cbl. *J. Immunol.* 2012, 189, 786–792, doi:10.4049/jimmunol.1200887.
47. Kurilla, A.; László, L.; Takács, T.; Tilajka, Á.; Lukács, L.; Novák, J.; Pancsa, R.; Buday, L.; Vas, V. Exploring the Interdependence of TKS4 and CD2AP: Implications for EMT Process and Early Detection in Colon Cancer. *bioRxiv* 2023, doi:10.1101/2023.01.13.523903.

2.táblázat: A PhD dolgozatban alkalmazott ellenanyagok, festékek és azok hígításaik.

Antitestek, festékek	katalógusszám	hígítás
Vimentin (nyúl, poliklonális)	Abcam: ab137321	WB: 1000x, ICC: 100x
E-Cadherin (nyúl, poliklonális)	Abcam: ab15148	WB: 500x
Fibronectin (nyúl, poliklonális)	Abcam: ab45688	WB: 2000x, ICC:100x
N-Cadherin (3B9, egér, monoklonális)	ThermoFisher Scientific: 333900	WB: 500x, ICC: 100x
alpha-Tubulin (egér, monoklonális)	Merck, Sigma-Aldrich: T6199	WB: 1000x
Phalloidin, CF 543	Biotium: 00043	ICC: 40x
CAPZA1 (H-9, egér, monoklonális)	Santa Cruz: sc-374302	WB: 500x ICC: 50x PLA: 50x
CAPZA1 (A2E7, egér, monoklonális)	Invitrogen: MA5-36109	WB: 500x
Tks4 (nyúl poliklonális)	Lányi és kutatócsoportja által létrehozott ellenanyag [75]	WB: 1000x, ICC: 1000 x, PLA: 100x IP: 10 ul/minta
Cortactin (H-191, nyúl, poliklonális)	Santa Cruz: sc-11408	ICC: 100x
Cortactin (H-5, egér, monoklonális)	Santa Cruz: sc-55579	WB: 1000x
Tks5 (SH3PXD2A, nyúl poliklonális)	proteintech: 18976-1-AP	WB: 500x ICC: 25x
CD2AP (5F8, egér, monoklonális)	Invitrogen: MA5-33009	WB: 1000x
Grb2 (3F2, egér, monoklonális)	Sigma-Aldrich: 05-372	WB: 1000x

Anti-egér IgG (whole molecule)–Peroxidase (birka)	Merck, Sigma-Aldrich: A6782	WB: 1000x
Anti-nyúl IGG HRP-LINKED WHOLE AB (szamár)	avantor by vwr: NA934	WB: 1000x
DAPI	Thermofisher Scientific: 62248	ICC: 1000x
PROTEIN A SEPHAROSE 4 FAST FLOW	Merck, Sigma-Aldrich: P9424	IP: 50 ul gyöngy/minta
Kecske-anti-egér antitest, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific: A-11029	ICC: 1000x
Kecske-anti-nyúl antitest, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific A-11008	ICC: 1000x
Kecske-anti-nyúl antitest, Alexa Fluor 546	Thermo Fisher Scientific: A11035	ICC: 1000x
HIF-1-alfa (EPR16897, nyúl, monoklonális)	Abcam: ab179483	WB: 500x
Oct 3/4 (egér, monoklonális)	Santa Cruz: sc-5279	ICC: 50x
Nanog (kecske, poliklonális)	R and D Systems: AF1997	ICC: 100x
SSEA-4 (egér, monoklonális)	R and D Systems: FAB1435P	Áramlási citometria: 100x
IgG3 PE-conjugated antibody (egér, izotípus kontroll)	R and D Systems: IC007P	Áramlási citometria: 100x
AFP (egér, monoklonális)	Sigma-Aldrich: A8452	ICC: 500x
SMA (egér, monoklonális)	Abcam: ab7817	ICC: 500x
β-III-Tubulin (egér, monoklonális)	R and D Systems: MAB1195	ICC: 2000x
BMP4 (nyúl, monoklonális)	Abcam: ab124715	ICC: 200x
Kecske-anti-egér (H + L) Cross-Adsorbed Secondary antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific: A-11029	ICC: 250x
Szamár-anti-kecske (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific: A-11055	ICC: 250x
PE egér Anti-Human CD73	BD Pharmingen™ Cat# 550257	Áramlási citometria: 25x
PE egér Anti-Human CD90	BD Pharmingen™ Cat# 561970	Áramlási citometria: 25x
PE egér IgG1, κ Izotípus kontroll	BD Pharmingen™ Cat# 559320	Áramlási citometria: 50x
FITC egér Anti-Human CD44	BD Pharmingen™ Cat# 555478	Áramlási citometria: 25x
FITC egér IgG2b κ Izotípus kontroll	BD Pharmingen™ Cat# 555742	Áramlási citometria: 50x
PE egér Anti-Human CD45	BD Pharmingen™ Cat# 555483	Áramlási citometria: 25x
PE egér Anti-Human CD34	Becton Dickinson, Cat# 345802	Áramlási citometria: 25x
PE egér Anti-Human CD133	MACS, Miltenyi Biotec, Cat# 130080801	Áramlási citometria: 25x
PE egér IgG Izotípus kontroll	Becton Dickinson, Cat# 345816	Áramlási citometria: 50x
Alexa 647 egér Anti-Human TRA-1-81	BD Pharmingen™ Cat# 51-9006219	Áramlási citometria: 25x
Alexa 647 egér IgM Izotípus kontroll	BD Pharmingen™ Cat# 51-9006225	Áramlási citometria: 50x

3.táblázat: A PhD dolgozatban alkalmazott primerek és próbák listája.

RT-qPCR reagensek (Taqman próbák, primerek, stb.)	katalógusszám
FIRST STRAND CDNA SYNT. KIT FOR RT-PCR	Meck, Roche: 11483188001
Direct-zol™ RNA Miniprep Kit	Zymo Research: R2052
TRIzol Reagent	ambion, Life Technologies: 15596026
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Thermofisher Scientific: 4444557
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	Thermofisher Scientific: 4368577
TWIST1 Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs04989912_s1
GAPDH Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs04420632_g1

FN1 Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs01549976 ml
SNAI1 Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs00195591 ml
SNAI2 Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs00161904 ml
GLUT1/ SLC2A1 Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs00892681 ml
Vimentin forward primer	sequence: TACAGGAAGCTGCTGGAAGG
Vimentin reverz primer	sequence: ACCAGAGGGAGTGAATCCAG
N-cadherin forward primer	sequence: TGACAATGACCCACAGCTC
N-cadherin reverz primer	sequence: GTCCTGCTCACCACACTAC
Zeb1 forward primer	sequence: GGGAGGAGCAGTGAAAGAGA
Zeb1 reverz primer	sequence: TTTCTTGCCCTTCCTTTCTG
GAPDH forward primer	sequence: TGCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH reverz primer	sequence: GGCATGGACTGTGGTCATGAG
E-Cadherin forward primer	sequence: TGCCCAGAAAATGAAAAAGG
E-Cadherin reverz primer	sequence: GTGTATGTGGCAATGCGTTC
Nanog Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs02387400 gl
PAX6 Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs00240871 ml
AFP Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs00173490 ml
BRY Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs00610080 ml
GATA4 Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs00171403 ml
NESTIN Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs04187831 gl
RPLP0 Taqman próba	Thermofisher Scientific, Assay ID:Hs99999902 ml

4.táblázat: TissueScan tüdőtumor cDNS Array adattáblája.

well pozíció	nem	kor	szövettípus	diagnózis a patológiai vizsgálatból	stádium	eredmény: 2 ^{-ΔΔCt}
C01	Nő	69	Normál	egészséges	-	1,202584
C02	Férfi	63	Normál	egészséges	-	0,773505
C03	Férfi	72	Normál	egészséges	-	0,992193
C04	Nő	64	Normál	egészséges	-	1,037881
C05	Nő	66	Normál	egészséges	-	0,904898
C06	Férfi	45	Normál	egészséges	-	0,817249
C07	Férfi	78	Normál	egészséges	-	1,375502
C08	Nő	72	Normál	egészséges	-	1,026272
C09	Férfi	69	Tumor	laphámsejtes karcinóma	IA	0,456448
C10	Nő	41	Tumor	nagysejtes karcinóma	IA	0,250672
C11	Nő	61	Tumor	adenokarcinóma	IA	0,28112
C12	Nő	68	Tumor	bronchioloalveoláris, nem mucinózus karcinóma	IA	0,842831
D01	Nő	34	Tumor	adenokarcinóma	IA	1,262933
D02	Férfi	67	Tumor	adenokarcinóma	IA	0,450399
D03	Nő	71	Tumor	laphámsejtes karcinóma	IB	0,188854
D04	Férfi	74	Tumor	laphámsejtes karcinóma	IB	0,115397
D05	Férfi	77	Tumor	laphámsejtes karcinóma	IB	0,21377
D06	Nő	74	Tumor	adenokarcinóma	IB	0,682937
D07	Nő	49	Tumor	neuroendokrin karcinóma	IB	0,286001
D08	Férfi	80	Tumor	laphámsejtes karcinóma	IB	0,421481
D09	nem meghatározott	71	Tumor	adenokarcinóma	IIA	0,164536
D10	Férfi	63	Tumor	kissejtes karcinóma, metasztatikus	IIA	0,227609
D11	Férfi	69	Tumor	laphámsejtes karcinóma	IIA	0,441119
D12	Férfi	72	Tumor	adenokarcinóma	IIB	0,640254
E01	Férfi	61	Tumor	laphámsejtes karcinóma	IIB	0,168581

E02	Férfi	55	Tumor	adenokarcinóma	IIB	0,297345
E03	Férfi	55	Tumor	laphámsejtes karcinóma	IIB	0,659688
E04	Nő	79	Tumor	adenokarcinóma	IIB	0,409387
E05	Nő	66	Tumor	adenokarcinóma	IIB	0,197045
E06	Férfi	65	Tumor	laphámsejtes karcinóma	IIB	0,366078
E07	Férfi	90	Tumor	laphámsejtes karcinóma	IIB	0,092435
E08	Férfi	74	Tumor	laphámsejtes karcinóma	IIIA	0,300184
E09	Nő	71	Tumor	adenosquamous karcinóma	IIIA	0,416219
E10	Férfi	69	Tumor	nagysejtes karcinóma	IIIA	0,391308
E11	Férfi	68	Tumor	kissejtes karcinóma	IIIA	0,273858
E12	Férfi	75	Tumor	adenokarcinóma	IIIA	0,290345
F01	Férfi	81	Tumor	szarkomatoid karcinóma	IIIB	0,506136
F02	Nő	64	Tumor	bronchioloalveoláris adenokarcinóma	IIIB	0,632765
F03	Nő	56	Tumor	adenosquamous karcinóma	IIIB	0,318392
F04	Férfi	44	Tumor	bronchioloalveoláris adenokarcinómá	IIIB	0,598067
F05	Férfi	51	Tumor	laphámsejtes karcinóma	IIIB	0,153541
F06	Nő	46	Tumor	adenokarcinóma	IV	0,563833
F07	Férfi	61	Tumor	nem kissejtes karcinóma, metasztatikus	IV	0,064946
F08	Nő	64	Tumor	nem kissejtes karcinóma, metasztatikus	IV	0,145303
F09	Nő	63	Tumor	laphámsejtes karcinóma, metasztatikus	IV	0,096689
F10	Férfi	72	Tumor	adenokarcinóma	IV	0,130062
F11	Férfi	77	Tumor	adenokarcinóma, metasztatikus	IV	0,202263
F12	Férfi	65	Tumor	adenokarcinóma, metasztatikus	IV	0,32084

5.táblázat: Tks4 immunprecipitációs (IP)-tömegspektrometriás (MS) elemzés eredménye öt sejtvonalon (A549, HCT116, MCF7, HPAC, N87).

vizsgált sejtvonal:					peptidszám	
A549	MS-azonosított fehérje	Azonosító	Alternatív ID	MW	Anti-Tks4-IP minta	kontroll minta
1	Plectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEC PE=1 SV=3	Q15149	PLEC	532 kDa	95	0
2	Albumin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=2	P02768 (+2)	ALB	69 kDa	7	0
3	SH3 and PX domain-containing protein 2B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3PXD2B PE=1 SV=3	A1X283	SH3PXD2B	102 kDa	19	0
4	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WARS1 PE=1 SV=2	P23381	WARS1	53 kDa	14	0
5	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCAR1 PE=1 SV=2	Q8IX12	CCAR1	133 kDa	17	0
6	Alpha-amylase 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AMY1B PE=1 SV=1	P0DTE7 (+2)	AMY1B	58 kDa	5	3
7	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA8 PE=1 SV=1	P11142	HSPA8	71 kDa	16	0
8	Complement C4-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4A PE=1 SV=2	P0C0L4	C4A	193 kDa	5	0
9	CD2-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD2AP PE=1 SV=1	Q9Y5K6	CD2AP	71 kDa	14	0
10	Kinesin-1 heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF5B PE=1 SV=1	P33176	KIF5B	110 kDa	6	0

11	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1A PE=1 SV=1	P0DMV8 (+1)	HSPA1A	70 kDa	6	0
12	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	P52907	CAPZA1	33 kDa	4	0
13	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5	Q14204	DYNC1H1	532 kDa	10	0
14	Sorcin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRI PE=1 SV=1	P30626	SRI	22 kDa	7	0
15	F-actin-capping protein subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZB PE=1 SV=4	P47756	CAPZB	31 kDa	5	0
16	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM21 PE=1 SV=1	P19474	TRIM21	54 kDa	7	0
17	F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA2 PE=1 SV=3	P47755	CAPZA2	33 kDa	4	0
18	60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL11 PE=1 SV=2	P62913	RPL11	20 kDa	4	0
19	Nucleoside diphosphate kinase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NME4 PE=1 SV=1	O00746	NME4	21 kDa	5	0
20	40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS2 PE=1 SV=2	P15880	RPS2	31 kDa	4	0
21	Endoplasmic reticulum chaperone BIP OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA5 PE=1 SV=2	P11021	HSPA5	72 kDa	4	0
22	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTB PE=1 SV=1	P60709 (+1)	ACTB	42 kDa	0	8
23	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O- methyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCMT1 PE=1 SV=4	P22061	PCMT1	25 kDa	0	3
24	Dermcidin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCD PE=1 SV=2	P81605	DCD	11 kDa	0	3

vizsgált sejtvonal:	MS azonosított fehérje	Azonosító	Alternatív ID	MW	peptidszám	
					Anti- Tks4-IP minta	kontroll minta
HCT116						
1	SH3 and PX domain-containing protein 2B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3PXD2B PE=1 SV=3	SPD2B_HUMAN	SH3PXD2B	102 kDa	16	0
2	Plectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEC PE=1 SV=3	PLEC_HUMAN	PLEC	532 kDa	116	1
3	CD2-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD2AP PE=1 SV=1	CD2AP_HUMAN	CD2AP	71 kDa	23	0
4	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCAR1 PE=1 SV=2	CCAR1_HUMAN	CCAR1	133 kDa	32	0
5	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	CAZA1_HUMAN	CAPZA1	33 kDa	9	1
6	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WARS1 PE=1 SV=2	SYWC_HUMAN	WARS1	53 kDa	10	0
7	Kinesin-1 heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF5B PE=1 SV=1	KINH_HUMAN	KIF5B	110 kDa	15	0
8	F-actin-capping protein subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZB PE=1 SV=4	CAPZB_HUMAN	CAPZB	31 kDa	8	0
9	SH3 domain-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3BP1 PE=1 SV=3	3BP1_HUMAN	SH3BP1	76 kDa	4	0
10	SWISS-PROT:Q3Y5Z3 (Bos taurus) Adiponectin precursor	Q3Y5Z3 (+1)		26 kDa	5	0
11	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3KBP1 PE=1 SV=2	SH3K1_HUMAN	SH3KBP1	73 kDa	9	0
12	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5	DYHC1_HUMAN	DYNC1H1	532 kDa	3	0
13	F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA2 PE=1 SV=3	CAZA2_HUMAN	CAPZA2	33 kDa	3	0
14	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX17 PE=1 SV=2	DDX17_HUMAN	DDX17	80 kDa	3	1
15	Polyadenylate-binding protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC4 PE=1 SV=1	PABP4_HUMAN	PABPC4	71 kDa	4	1
16	Nuclear fragile X mental retardation- interacting protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUFIP2 PE=1 SV=1	NUFP2_HUMAN	NUFIP2	76 kDa	3	1

17	ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATAD3A PE=1 SV=2	ATD3A_HUMAN	ATAD3A	71 kDa	4	0
18	60S ribosomal protein L13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL13 PE=1 SV=4	RL13_HUMAN	RPL13	24 kDa	5	2
19	Spermatogenesis-associated serine-rich protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPATS2 PE=1 SV=1	SPAS2_HUMAN	SPATS2	60 kDa	4	0
20	Microtubule-associated protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=3	MAP4_HUMAN	MAP4	121 kDa	6	0
21	60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL6 PE=1 SV=3	RL6_HUMAN	RPL6	33 kDa	3	0
22	Fibronectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FN1 PE=1 SV=5	FINC_HUMAN	FN1	272 kDa	6	0

vizsgált sejtvonala:	MS azonosított fehérje	Azonosító	Alternatív ID	MW	peptidszám	
					Anti-Tks4-IP minta	kontroll minta
MCF7						
1	SH3 and PX domain-containing protein 2B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3PXD2B PE=1 SV=3	SPD2B_HUMAN	SH3PXD2B	102 kDa	23	1
2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2	ROA2_HUMAN	HNRNPA2B1	37 kDa	3	0
3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=5	ROA1_HUMAN	HNRNPA1	39 kDa	3	0
4	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=2	CH60_HUMAN	HSPD1	61 kDa	3	0
5	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=4	KPYM_HUMAN	PKM	58 kDa	4	0
6	Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBA1A PE=1 SV=1	TBA1A_HUMAN	TUBA1A	50 kDa	3	0
7	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=2	NPM_HUMAN	NPM1	33 kDa	4	0
8	Calmodulin-like protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALML5 PE=1 SV=2	CALL5_HUMAN	CALML5	16 kDa	5	2
9	Plectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEC PE=1 SV=3	PLEC_HUMAN	PLEC	532 kDa	119	0
10	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCAR1 PE=1 SV=2	CCAR1_HUMAN	CCAR1	133 kDa	27	0
11	CD2-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD2AP PE=1 SV=1	CD2AP_HUMAN	CD2AP	71 kDa	23	0
12	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA8 PE=1 SV=1	HSP7C_HUMAN	HSPA8	71 kDa	11	3
13	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WARS1 PE=1 SV=2	SYWC_HUMAN	WARS1	53 kDa	6	0
14	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	CAZA1_HUMAN	CAPZA1	33 kDa	4	0
15	Kinesin-1 heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF5B PE=1 SV=1	KINH_HUMAN	KIF5B	110 kDa	18	0
16	F-actin-capping protein subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZB PE=1 SV=4	CAPZB_HUMAN	CAPZB	31 kDa	7	0
17	SWISS-PROT:Q2UVX4 (Bos taurus) Complement C3 precursor	Q2UVX4 (+1)		187 kDa	5	0
18	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1A PE=1 SV=1	HS71A_HUMAN (+1)	HSPA1A	70 kDa	4	1
19	Microtubule-associated protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=3	MAP4_HUMAN	MAP4	121 kDa	14	0
20	Filamin-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNA PE=1 SV=4	FLNA_HUMAN	FLNA	281 kDa	7	0
21	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5	DYHC1_HUMAN	DYNC1H1	532 kDa	4	1
22	Calmodulin-like protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALML5 PE=1 SV=2	CALL5_HUMAN	CALML5	16 kDa	5	2
23	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3KBP1 PE=1 SV=2	SH3K1_HUMAN	SH3KBP1	73 kDa	3	0
24	Galectin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS3 PE=1 SV=5	LEG3_HUMAN	LGALS3	26 kDa	5	0

25	Genetic suppressor element 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSE1 PE=1 SV=3	GSE1_HUMAN	GSE1	136 kDa	8	0
26	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAPDH PE=1 SV=3	G3P_HUMAN	GAPDH	36 kDa	3	0
27	Desmoglein-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSG1 PE=1 SV=2	DSG1_HUMAN	DSG1	114 kDa	4	2
28	ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATAD3A PE=1 SV=2	ATD3A_HUMAN	ATAD3A	71 kDa	1	0
29	Kinesin light chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KLC1 PE=1 SV=2	KLC1_HUMAN	KLC1	65 kDa	3	0
30	Lysine-specific histone demethylase 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KDM1A PE=1 SV=2	KDM1A_HUMAN	KDM1A	93 kDa	4	0
31	Desmoplakin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSP PE=1 SV=3	DESP_HUMAN	DSP	332 kDa	5	0
32	sp Q9Y5Y9 SCNAA_HUMAN	SCNAA_HUMAN- DECOY		?	3	0

vizsgált sejtvonat:	MS azonosított fehérje	Azonosító	Alternatív ID	MW	peptidszám	
					Anti- Tks4-IP minta	kontroll minta
HPAC						
1	SH3 and PX domain-containing protein 2B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3PXD2B PE=1 SV=3	SPD2B_HUMAN	SH3PXD2B	102 kDa	4	0
2	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA8 PE=1 SV=1	HSP7C_HUMAN	HSPA8	71 kDa	20	2
3	Nucleolin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCL PE=1 SV=3	NUCL_HUMAN	NCL	77 kDa	11	1
4	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX5 PE=1 SV=1	DDX5_HUMAN	DDX5	69 kDa	8	1
5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA5 PE=1 SV=2	BIP_HUMAN	HSPA5	72 kDa	12	1
6	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1A PE=1 SV=1	HS71A_HUMAN (+1)	HSPA1A	70 kDa	6	1
7	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFPQ PE=1 SV=2	SFPQ_HUMAN	SFPQ	76 kDa	7	2
8	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMPO PE=1 SV=2	LAP2A_HUMAN	TMPO	75 kDa	17	2
9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU PE=1 SV=6	HNRNPU_HUMAN	HNRNPU	91 kDa	6	2
10	Polyadenylate-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC1 PE=1 SV=2	PABP1_HUMAN	PABPC1	71 kDa	7	0
11	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPK PE=1 SV=1	HNRPK_HUMAN	HNRNPK	51 kDa	7	1
12	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYNCRIP PE=1 SV=2	HNRPQ_HUMAN	SYNCRIP	70 kDa	4	1
13	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS4X PE=1 SV=2	RS4X_HUMAN	RPS4X	30 kDa	6	1
14	X-ray repair cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRCC6 PE=1 SV=2	XRCC6_HUMAN	XRCC6	70 kDa	3	0
15	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	HS90A_HUMAN	HSP90AA1	85 kDa	4	1
16	FACT complex subunit SSRP1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SSRP1 PE=1 SV=1	SSRP1_HUMAN	SSRP1	81 kDa	3	0
17	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCAR1 PE=1 SV=2	CCAR1_HUMAN	CCAR1	133 kDa	33	0
18	CD2-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD2AP PE=1 SV=1	CD2AP_HUMAN	CD2AP	71 kDa	31	0
19	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WARS1 PE=1 SV=2	SYWC_HUMAN	WARS1	53 kDa	17	0
20	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	CAZA1_HUMAN	CAPZA1	33 kDa	12	1
21	Kinesin-1 heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF5B PE=1 SV=1	KINH_HUMAN	KIF5B	110 kDa	12	0
22	F-actin-capping protein subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZB PE=1 SV=4	CAPZB_HUMAN	CAPZB	31 kDa	12	0
23	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2	HBB_HUMAN	HBB	16 kDa	10	0

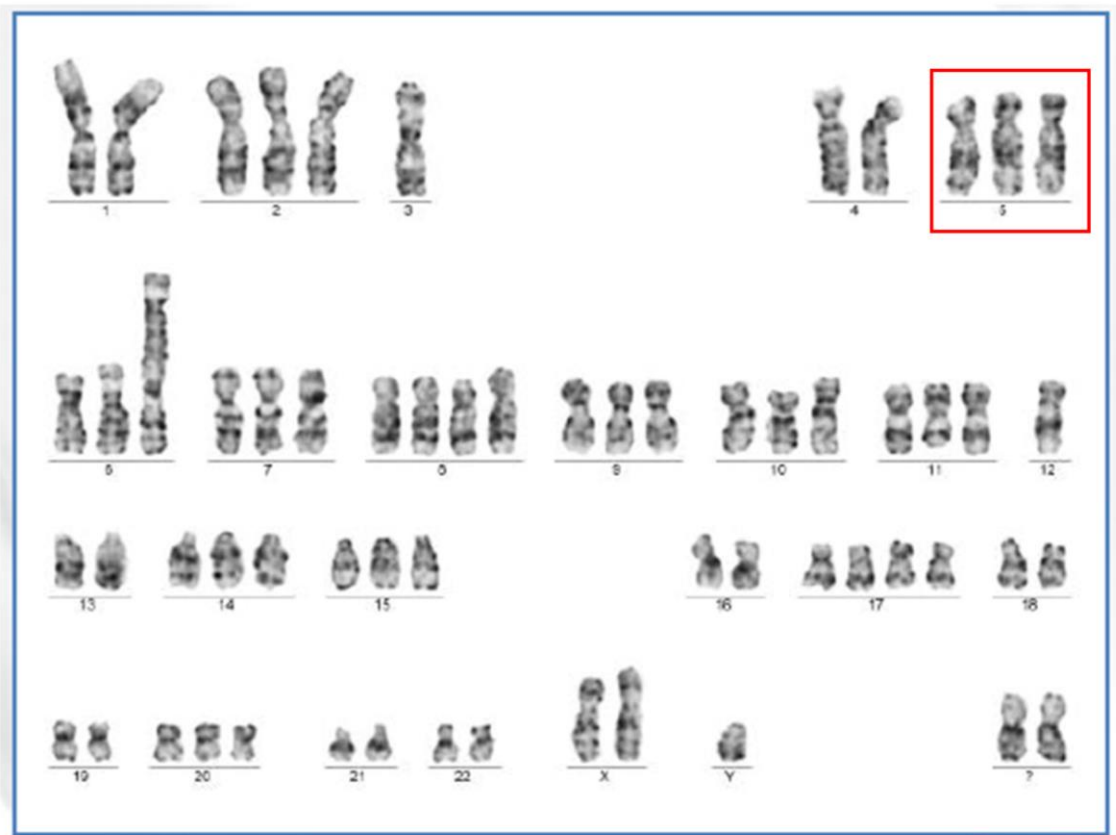
24	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBA1 PE=1 SV=2	HBA_HUMAN	HBA1	15 kDa	6	0
25	Histone H3.2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3C15 PE=1 SV=3	H32_HUMAN	H3C15	15 kDa	10	2
26	60S ribosomal protein L23a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL23A PE=1 SV=1	RL23A_HUMAN	RPL23A	18 kDa	4	1
27	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=4	HNRPC_HUMAN	HNRNPC	34 kDa	6	2
28	Microtubule-associated protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=3	MAP4_HUMAN	MAP4	121 kDa	6	0
29	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=2	NPM_HUMAN	NPM1	33 kDa	3	2
30	Matrin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MATR3 PE=1 SV=2	MATR3_HUMAN	MATR3	95 kDa	8	2
31	40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS7 PE=1 SV=1	RS7_HUMAN	RPS7	22 kDa	7	0
32	60S ribosomal protein L9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL9 PE=1 SV=1	RL9_HUMAN	RPL9	22 kDa	3	1
33	F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA2 PE=1 SV=3	CAZA2_HUMAN	CAPZA2	33 kDa	6	0
34	Core histone macro-H2A.1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MACROH2A1 PE=1 SV=4	H2AY_HUMAN	MACROH2A1	40 kDa	4	1
35	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5	DYHC1_HUMAN	DYNC1H1	532 kDa	8	0
36	Annexin A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=2	ANXA2_HUMAN	ANXA2	39 kDa	12	2
37	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3KBP1 PE=1 SV=2	SH3K1_HUMAN	SH3KBP1	73 kDa	9	0
38	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BAIAP2L1 PE=1 SV=2	BI2L1_HUMAN	BAIAP2L1	57 kDa	11	0
39	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PUF60 PE=1 SV=1	PUF60_HUMAN	PUF60	60 kDa	4	0
40	40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS11 PE=1 SV=3	RS11_HUMAN	RPS11	18 kDa	7	0
41	Complement C4-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4A PE=1 SV=2	CO4A_HUMAN	C4A	193 kDa	8	0
42	RNA-binding motif protein, X chromosome OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBMX PE=1 SV=3	RBMX_HUMAN	RBMX	42 kDa	4	1
43	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPLP0 PE=1 SV=1	RLA0_HUMAN	RPLP0	34 kDa	4	1
44	Sorcin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRI PE=1 SV=1	SORCN_HUMAN	SRI	22 kDa	5	0
45	Regulation of nuclear pre-mRNA domain- containing protein 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPRD1B PE=1 SV=1	RPR1B_HUMAN	RPRD1B	37 kDa	7	0
46	SH3 domain-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3BP1 PE=1 SV=3	3BP1_HUMAN	SH3BP1	76 kDa	8	0
47	FACT complex subunit SPT16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUPT16H PE=1 SV=1	SP16H_HUMAN	SUPT16H	120 kDa	3	2
48	60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL11 PE=1 SV=2	RL11_HUMAN	RPL11	20 kDa	5	0
49	60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL12 PE=1 SV=1	RL12_HUMAN	RPL12	18 kDa	4	0
50	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PARP1 PE=1 SV=4	PARP1_HUMAN	PARP1	113 kDa	6	1
51	60S ribosomal protein L10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL10 PE=1 SV=4	RL10_HUMAN	RPL10	25 kDa	5	0
52	Histone H2B type 1-O OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC17 PE=1 SV=3	H2B1O_HUMAN	H2BC17	14 kDa	4	0
53	40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS18 PE=1 SV=3	RS18_HUMAN	RPS18	18 kDa	4	0
54	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH3 PE=1 SV=2	HNRH3_HUMAN	HNRNPH3	37 kDa	3	1
55	RNA-binding protein 25 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM25 PE=1 SV=3	RBM25_HUMAN	RBM25	100 kDa	4	0
56	RNA-binding protein 39 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM39 PE=1 SV=2	RBM39_HUMAN	RBM39	59 kDa	6	0
57	Peroxioredoxin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX1 PE=1 SV=1	PRDX1_HUMAN	PRDX1	22 kDa	4	0
58	40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS10 PE=1 SV=1	RS10_HUMAN	RPS10	19 kDa	3	0
59	ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATAD3A PE=1 SV=2	ATD3A_HUMAN	ATAD3A	71 kDa	4	0
60	Fibronectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FN1 PE=1 SV=5	FINC_HUMAN	FN1	272 kDa	6	0
61	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=A2M PE=1 SV=3	A2MG_HUMAN	A2M	163 kDa	3	0

62	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPF PE=1 SV=3	HNRPF_HUMAN	HNRNPF	46 kDa	3	0
63	60S ribosomal protein L18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL18 PE=1 SV=2	RL18_HUMAN	RPL18	22 kDa	4	0
64	Kinesin light chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KLC1 PE=1 SV=2	KLC1_HUMAN	KLC1	65 kDa	4	0
65	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CEACAM5 PE=1 SV=3	CEAM5_HUMAN	CEACAM5	77 kDa	4	0
66	60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL22 PE=1 SV=2	RL22_HUMAN	RPL22	15 kDa	4	0
67	60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL23 PE=1 SV=1	RL23_HUMAN	RPL23	15 kDa	4	0
68	ELAV-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ELAVL1 PE=1 SV=2	ELAV1_HUMAN	ELAVL1	36 kDa	3	0
69	60S ribosomal protein L31 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL31 PE=1 SV=1	RL31_HUMAN	RPL31	14 kDa	5	0
70	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPR PE=1 SV=1	HNRPR_HUMAN	HNRNPR	71 kDa	3	0
71	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SSBP1 PE=1 SV=1	SSBP_HUMAN	SSBP1	17 kDa	5	0
72	Lamin-B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNB1 PE=1 SV=2	LMNB1_HUMAN	LMNB1	66 kDa	4	0
73	60S ribosomal protein L18a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL18A PE=1 SV=2	RL18A_HUMAN	RPL18A	21 kDa	4	0
74	REST corepressor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RCOR1 PE=1 SV=2	RCOR1_HUMAN	RCOR1	53 kDa	3	0
75	Laminin subunit alpha-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAMA3 PE=1 SV=2	LAMA3_HUMAN	LAMA3	367 kDa	4	0
76	40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS14 PE=1 SV=3	RS14_HUMAN	RPS14	16 kDa	4	0
77	Optineurin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OPTN PE=1 SV=3	OPTN_HUMAN	OPTN	66 kDa	3	0
78	DNA topoisomerase 2-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOP2A PE=1 SV=3	TOP2A_HUMAN	TOP2A	174 kDa	3	0
79	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TGM2 PE=1 SV=2	TGM2_HUMAN	TGM2	77 kDa	5	0
80	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM21 PE=1 SV=1	RO52_HUMAN	TRIM21	54 kDa	4	0
81	Coiled-coil domain-containing protein 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC7 PE=1 SV=3	CCDC7_HUMAN	CCDC7	157 kDa	4	0
82	Epiplakin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPPK1 PE=1 SV=3	EPIPL_HUMAN	EPPK1	556 kDa	3	0
83	Acylamino-acid-releasing enzyme OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APEH PE=1 SV=4	ACPH_HUMAN	APEH	81 kDa	3	0
84	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SORBS2 PE=1 SV=3	SRBS2_HUMAN	SORBS2	124 kDa	3	0
85	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRPPRC PE=1 SV=3	LRPPRC_HUMAN	LRPPRC	158 kDa	4	0
86	60S ribosomal protein L35 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL35 PE=1 SV=2	RL35_HUMAN	RPL35	15 kDa	3	0
87	40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS13 PE=1 SV=2	RS13_HUMAN	RPS13	17 kDa	3	0
88	Golgin subfamily A member 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GOLGA4 PE=1 SV=1	GOGA4_HUMAN	GOLGA4	261 kDa	3	0
89	60S ribosomal protein L24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL24 PE=1 SV=1	RL24_HUMAN	RPL24	18 kDa	3	0

vizsgált sejtvonal:		Azonosító	Alternatív ID	MW	peptidszám	
					Anti- Tks4- IP minta	kontroll minta
N87	MS azonosított fehérje					
1	Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTG1 PE=1 SV=1	P63261	ACTG1	42 kDa	14	0
2	Albumin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=2	P02768 (+2)	ALB	69 kDa	32	0
3	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN4 PE=1 SV=2	O43707	ACTN4	105 kDa	4	0
4	Alpha-amylase 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AMY1B PE=1 SV=1	P0DTE7 (+2)	AMY1B	58 kDa	6	4

5	CD2-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD2AP PE=1 SV=1	Q9Y5K6	CD2AP	71 kDa	9	0
6	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCAR1 PE=1 SV=2	Q8IX12	CCAR1	133 kDa	8	0
7	Core histone macro-H2A.1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MACROH2A1 PE=1 SV=4	O75367	MACROH2A1	40 kDa	4	0
8	Desmoplakin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSP PE=1 SV=3	P15924	DSP	332 kDa	3	0
9	Endoplasmic reticulum chaperone BiP OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA5 PE=1 SV=2	P11021	HSPA5	72 kDa	3	0
10	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	P52907	CAPZA1	33 kDa	4	0
11	Fibronectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FN1 PE=1 SV=5	P02751	FN1	272 kDa	5	0
12	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA8 PE=1 SV=1	P11142	HSPA8	71 kDa	12	5
13	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPK PE=1 SV=1	P61978	HNRNPK	51 kDa	3	0
14	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2	P22626	HNRNPA2B1	37 kDa	5	0
15	Histone H2A type 1-B/E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2AC4 PE=1 SV=2	P04908 (+2)	H2AC4	14 kDa	4	0
16	Histone H2B type 1-D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC5 PE=1 SV=2	P58876 (+6)	H2BC5	14 kDa	13	0
17	Histone H3.1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3C1 PE=1 SV=2	P68431	H3C1	15 kDa	5	0
18	Histone H4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H4C1 PE=1 SV=2	P62805	H4C1	11 kDa	6	0
19	Hornerin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HRNR PE=1 SV=2	Q86YZ3 (+1)	HRNR	282 kDa	5	0
20	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHG1 PE=1 SV=1	P01857 (+1)	IGHG1	36 kDa	6	0
21	Junction plakoglobin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=JUP PE=1 SV=3	P14923	JUP	82 kDa	5	0
22	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT14 PE=1 SV=4	P02533 (+1)	KRT14	52 kDa	3	0
23	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT16 PE=1 SV=4	P08779 (+1)	KRT16	51 kDa	3	0
24	Keratin, type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT18 PE=1 SV=2	P05783	KRT18	48 kDa	15	0
25	Nebulin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NEB PE=1 SV=5	P20929	NEB	773 kDa	3	0
26	Plectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEC PE=1 SV=3	Q15149	PLEC	532 kDa	102	0
27	Polypyrimidine tract-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTBP1 PE=1 SV=1	P26599	PTBP1	57 kDa	3	0
28	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNA PE=1 SV=1	P02545	LMNA	74 kDa	9	0
29	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX5 PE=1 SV=1	P17844	DDX5	69 kDa	4	0
30	Serotransferrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TF PE=1 SV=3	P02787	TF	77 kDa	3	0
31	SH3 and PX domain-containing protein 2B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3PXD2B PE=1 SV=3	A1X283	SH3PXD2B	102 kDa	5	0
32	Sorcin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRI PE=1 SV=1	P30626	SRI	22 kDa	5	0
33	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA9 PE=1 SV=2	P38646	HSPA9	74 kDa	3	0
34	Titin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TTN PE=1 SV=4	Q8WZ42	TTN	3816 kDa	11	0
35	Transketolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TKT PE=1 SV=3	P29401	TKT	68 kDa	3	0
36	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WARS1 PE=1 SV=2	P23381	WARS1	53 kDa	7	0
37	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTB PE=1 SV=1	P60709 (+1)	ACTB	42 kDa	0	4
38	Transformation/transcription domain-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRRAP PE=1 SV=3	Q9Y4A5	TRRAP	438 kDa	0	3

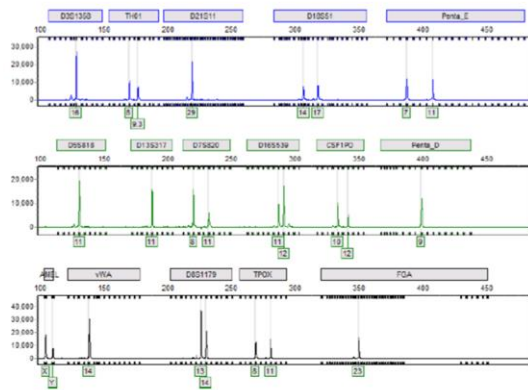
1.ábra: A549 sejtek kariotipizálási eredménye (UD-GenoMed Medical által). Pirossal jelölve az 5.kromoszóma, amelyen a Tks4 gén található.



2.ábra: Az A549 WT és Tks4-KO sejtvonalak SNP autentifikációs analízise Microsynth AG által.

A549 WT: A küldött minta 100 %-ban megegyezik az A549 sejtvonala DNS-profiljával (Cellosaurus, RRID:CVCL_0023).

4.2. Electropherogram



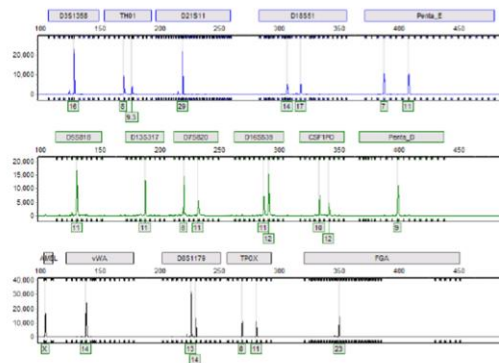
4. Analysis Results

4.1. Summary Table of the STR Profile

Locus	Chromosomal Location	Core STR Marker	Customer Sample Typed Alleles	Database Alleles	Comments
D3S1358	Chr03		16	16	
TH01	Chr11	Yes	8/9.3	8/9.3	
D21S11	Chr21		29	29	
D18S51	Chr18		14/17	14/17	
Penta_E	Chr15		7/11	7/11	
D5S818	Chr05	Yes	11	11	
D13S317	Chr13	Yes	11	11	
D7S820	Chr07	Yes	8/11	8/11	
D16S539	Chr16	Yes	11/12	11/12	
CSF1PO	Chr05	Yes	10/12	10/12	
Penta_D	Chr21		9	9	
AMEL	X/Y	Yes	X/Y	X/Y	
vWA	Chr12	Yes	14	14	
D8S1179	Chr08		13/14	13/14	
TPOX	Chr2	Yes	8/11	8/11	
FGA	Chr04		23	23	

A549 Tks4-KO 1: A küldött minta 100 %-ban megegyezik az A549 sejtvonala DNS-profiljával (Cellosaurus, RRID:CVCL_0023).

4.2. Electropherogram



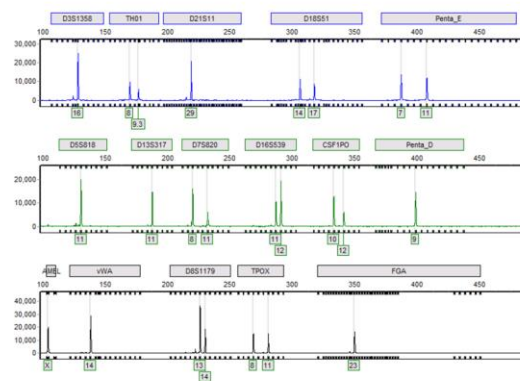
4. Analysis Results

4.1. Summary Table of the STR Profile

Locus	Chromosomal Location	Core STR Marker	Customer Sample Typed Alleles	Database Alleles	Comments
D3S1358	Chr03		16	16	
TH01	Chr11	Yes	8/9.3	8/9.3	
D21S11	Chr21		29	29	
D18S51	Chr18		14/17	14/17	
Penta_E	Chr15		7/11	7/11	
D5S818	Chr05	Yes	11	11	
D13S317	Chr13	Yes	11	11	
D7S820	Chr07	Yes	8/11	8/11	
D16S539	Chr16	Yes	11/12	11/12	
CSF1PO	Chr05	Yes	10/12	10/12	
Penta_D	Chr21		9	9	
AMEL	X/Y	Yes	X	X/Y	
vWA	Chr12	Yes	14	14	
D8S1179	Chr08		13/14	13/14	
TPOX	Chr2	Yes	8/11	8/11	
FGA	Chr04		23	23	

A549 Tks4-KO 2: A küldött minta 100 %-ban megegyezik az A549 sejtvonala DNS-profiljával (Cellosaurus, RRID:CVCL_0023).

4.2. Electropherogram



4. Analysis Results

4.1. Summary Table of the STR Profile

Locus	Chromosomal Location	Core STR Marker	Customer Sample Typed Alleles	Database Alleles	Comments
D3S1358	Chr03		16	16	
TH01	Chr11	Yes	8/9.3	8/9.3	
D21S11	Chr21		29	29	
D18S51	Chr18		14/17	14/17	
Penta_E	Chr15		7/11	7/11	
D5S818	Chr05	Yes	11	11	
D13S317	Chr13	Yes	11	11	
D7S820	Chr07	Yes	8/11	8/11	
D16S539	Chr16	Yes	11/12	11/12	
CSF1PO	Chr05	Yes	10/12	10/12	
Penta_D	Chr21		9	9	
AMEL	X/Y	Yes	X	X/Y	
vWA	Chr12	Yes	14	14	
D8S1179	Chr08		13/14	13/14	
TPOX	Chr2	Yes	8/11	8/11	
FGA	Chr04		23	23	