

# **A Tks4 állványfehérje szerepe normál és tumoros sejtek jelátvitelében**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

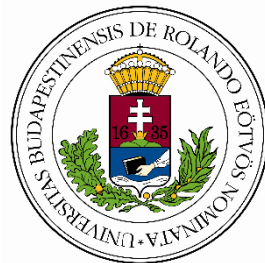
**ELTE, Biológia Doktori Iskola**

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

**Szerkezeti Biokémia Doktori Program**

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

**HUN  
REN**



**Budapest**

**2024**

## **Bevezetés**

Az epitheliális-mezenchimális átmenet (EMT) egy olyan folyamat, amely során a sejtek elvesztik epitheliális fenotípusos jellegüket és mezenchimális tulajdonságokat nyernek. Az EMT-nek három típusa ismert, az első típus: az embrionális fejlődésben (implantáció, gastruláció, velőcső kialakulás) megjelenő, a második típus a sebgyógyulás, szövet regeneráció folyamatában előforduló, a harmadik típus a tumor progresszióval és metasztázissal összekapcsolható EMT [1]. Nemrég jelent meg a hibrid EMT vagy másnéven részleges EMT fogalma, amelynek jelentése az, hogy a sejtek együttesen expresszálják az epitheliális és a mezenchimális markereket, egyfajta plaztikus állapot, amely során a sejtek rugalmasan mozognak az epitheliális-mezenchimális tengelyen, tehát képesek szabadon átalakulni az egyik állapotból a másikba (epitheliálisból mezenchimálisba, mezenchimálisból epitheliálisba, ezt az utóbbi folyamatot MET-nek nevezzük)[1–4]. Munkám során az embrionális fejlődésben végbemenő EMT és a tumorszövetben megfigyelhető EMT-szerű folyamatokat vizsgáltam.

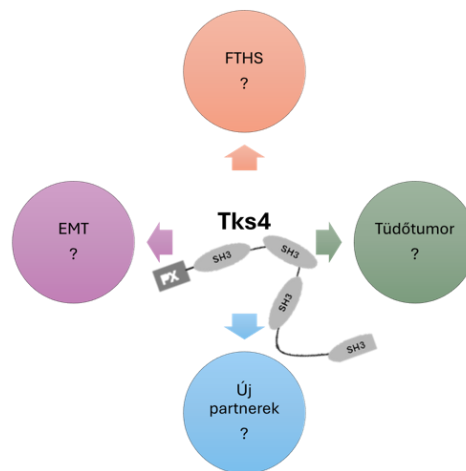
A Tks4 (gén név: SH3PXD2B) fehérje a Frank-Ter Haar szindróma (FTHS) vizsgálata során került a tudományos kutatások fókuszába. Az FTHS egy ritka, veleszületett fejlődési rendellenesség, amelynek hátterében egyedül a Tks4 gén mindkét allélját érintő mutációja áll [5]. Az érintett gyerekek tüneteik között szerepelnek koponya- és csontdeformitások (görbült és megrövidült csontok, kidülledő szemek, fogazati rendelleneségek), valamint szem-(glaukóma), szívproblémák és zsírdifferenciációs problémák [5–8]. A monogénes betegség hátterében álló molekuláris folyamatokat vizsgálhatjuk a már rendelkezésre álló Tks4-KO egérmodelleken keresztül (munkacsoportunk is állított elő Tks4-KO egér törzset-e célból [6]), de az ugyancsak hasznos humán őssejtalapú *in vitro* modell még nem állt rendelkezésünkre. A Tks4 biológiáját kutatva, 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 és invadopodia képzést befolyásoló funkciójával [9–14].

## **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 is (1.ábra).

Célok:

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



**1.ábra:** Célkitűzéseim: a Tks4 szerepének átfogó vizsgálata.

### Anyagok és módszerek

*In vitro* és *in silico* módszereket alkalmaztunk a Tks4 EMT-ben betöltött szerepének vizsgálatához. CRISPR-Cas9 módszerrel a Tks4-hiányos HUES9 embrionális őssejtvonalat és A549 tüdő adenokarcinóma sejtvonalat hoztam létre. A HUES9 sejteket spontán differenciáltattuk embrioid testecske (EB) képzésen keresztül, valamint mezenchimális őssejt irányba differenciáltattuk a TTK Humán Pluripotens Őssejt Laboratóriumában Dr. Apáti Ágota csoportja segítségével, hogy vizsgáljuk a Tks4-KO sejtek differenciációs képességeit. Az A549 humán tüdő adenocarcinoma sejtekben invadopodia képződés mértékét vizsgáltam F-aktin és cortactin festéssel, EMT markerek szintjeit mértem RT-qPCR-al, Western blottal és immuncitokémiával. A Tks4 mRNS szintjét vizsgáltam humán tüdő tumor mintákban bioinformatikai elemzés (GEPIA2) és TissueScan cDNS array segítségével (RT-qPCR). A Tks4 interakomját azonosítottam Tks4-IP-tömegspektrometriás módszerrel különböző tumor

sejtekben (MCF7- emlőrák, HPAC- hasnyálmirigy-rák, N87- gyomorrák, HCT116- vastagbél-rák, és A549- tüdő-rák). Munkám során, a CAPZA1 (F-actin-capping protein subunit alpha-1) eddig még nem ismert Tks4 partner fehérjét azonosítottam, amelynek lokalizációját és a Tks4-el való interakcióját mutattam ki Duolink proximity ligációs esszével három tüdő-rák sejt vonalban (NCI-H460, HOP-92, A549), valamint prediktáltuk a CAPZA1 Tks4-hez való kötődésének valószínűsíthető helyét Dr. Pancsa Rita segítségével. Ezt követően hálózatelemzéssel, irodalmi adatok és saját kísérletes adatok alapján felvázoltam a Tks4-interaktomot, amelyből az EMT-ben szerepet játszó partnereket vizsgáltam Tks4-IP-Western blot módszerrel HUES9, A549, NCI-H460, HOP-92 sejtekben.

## Eredmények

- Sikeresen létrehoztunk két homozigóta Tks4-KO klónt és két heterozigóta Tks4-KO klónt a normál kariotípusú HUES9 embrionális pluripotens őssejt vonalból (Őssejt Laboratórium segítségével).
- A Tks4-KO HUES9 sejtek mind a három csíralemez irányba képesek voltak differenciálódni, hasonlóan az eredeti WT HUES9 sejtekhez.
- A HUES9 embrionális pluripotens őssejt vonalból mezenchimális őssejteket differenciáltattunk (Őssejt Laboratórium segítségével) és vizsgáltam a különböző differenciációs markerek szintjét, amely során csökkent E-cadherin és Snai1 fehérje szinteket és a csontszövet kialakulásában szerepet játszó (GATA4, GSC) transzkripciós faktorok alacsonyabb expressziós szintjét mértem Tks4-KO sejtekben.
- Két homozigóta Tks4-KO klónt hoztam létre A549 tüdő adenokarcinóma sejtekből. Megállapítottam, hogy a Tks4-KO A549 klónok morfológiája megváltozott, elogáltabb fenotípust mutatnak, amelyet az F-aktinnal festett sejtek formafaktor számításával erősítettem meg (1-hez közeli érték kerekébb alakot jelent [15]).
- Kimutattam a cortactin és F-aktin kolokalizációja segítségével, hogy a Tks4-KO A549 sejtekben invadopodia struktúrák száma csökkent a vad típusú sejtekhez képest. A wound healing esszé eredményei a Tks4-KO sejtek migrációs képességének enyhe csökkenését mutatták a vad típusú sejtekhez képest.
- Vizsgáltam a Tks4-hiányának hatását az EMT folyamatra, ahol azt találtam, hogy az EMT markerek génexpressziós profilja megváltozott: mindkét Tks4-KO klónban a fibronectin, Snai2, N-cadherin 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. A vimentin és a

fibronectin a Tks4-KO sejtekben a vad típusú sejtekhez képest megnövekedett expressziót mutat ICC és WB mérések alapján is. A Tks4-KO sejtekben más EMT markerek, például az N-cadherin expressziós szintjében nem észleltem szignifikáns különbségeket. Összességében, tehát a tüdő adenokarcinóma sejtek Tks4 hiányában egy EMT-szerű állapotban kerültek és kevert mezenhimális/epiteliális fenotípust mutattak.

- A Tks4 lehetséges biomarker való alkalmazhatóságát vizsgáltam adatbázis elemzéssel (GEPIA2), ahol a Tks4 mRNS expressziójának szignifikáns csökkenését mutattam ki a tumoros tüdőszövetekben a normál tüdőszövetekhez képest. Továbbá azt is megfigyeltem, hogy a Tks4 mRNS csökkent szintje a tüdőrákos betegek rosszabb túlélésével korrelál.
- A betegekből származó tüdőtumor cDNS array-ben ugyancsak a Tks4 mRNS szintjét vizsgáltam, méréseim megerősítették az adatbázis-elemzés eredményeit, ugyanis Tks4 expressziójának csökkenését mutatták a tüdőrákos minták a normál mintákhoz képest.
- A Tks4-IP-MS-analízis során azonosított új potenciális partnerfehérjék közül a CAPZA1-re fókuszáltam hiszen a CAPZA1 mind az öt elemzett sejtvonalban jelen volt, mint potenciális Tks4 partnermolekula.
- A Tks4 és a CAPZA1 interakciójának megerősítésére megvizsgáltam a lokalizációját három tüdőrákos sejtvonalban (A549, HOP-92 és NCI-H460), ami azt mutatta, hogy mind a Tks4, mind a CAPZA1 a membrán alatti struktúrákban és a sejtek citoplazmájában van jelen. Azonosítottuk azt a rövid lineáris motívumot a Tks4-en belül (636-654 közötti aminosav szekvencia), mely lehetséges „capping protein interacting (CPI) motívumnak” tekinthető, tehát ahová kötődhet a CAPZA1.
- Továbbá proximity ligációs esszét (PLA) is végeztem annak megerősítésére, hogy a két fehérje a sejtekben is kölcsönhatásban van egymással, amely a két fehérje szoros közelségét és kötődését bizonyítja a mindhárom tüdőrákos sejtvonal sejteinek citoplazmájában.
- Vizsgáltam az alacsony oxigénkoncentrációjú állapot hatását az EMT-szerű fenotípusra A549 tüdőráksejtekben és azt tapasztaltam, hogy a Tks4-KO sejtvonalak kifejezettebb EMT-szerű állapotot mutattak, mint a vad típusú sejtek, és gyorsabb választ mutattak az EMT-indukáló alacsony oxigénszintű környezetre: a Snai2 és a Twist mRNS szintje jelentősebb emelkedést, valamint az E-cadherin mRNS szintje csökkenést mutatott a Tks4-KO klónokban. Továbbá a CAPZA1 szintje is lecsökkent a Tks4 hiányos sejtekben alacsony oxigénkoncentrációs körülmények között.

- A Tks4 interakciós hálózatát HUES9 embrionális őssejtekben és tüdőtumorsejtekben (A549, HOP-92, NCI-H460) tanulmányoztam. A STRING adatbázis segítségével, kísérleti adatainkat beépítve létrehoztam egy Tks4-alapú fehérje interakciós hálózatot, amelyből kiválasztottam az EMT-ben szerepet játszó fehérjéket (Grb2, Cortactin, CD2AP, CAPZA1), és Tks4-IP Western blot kísérletekkel igazoltam, hogy ezek a fehérjék Tks4 partnerek ezekben a sejtvonalakban.

### **Következtetések**

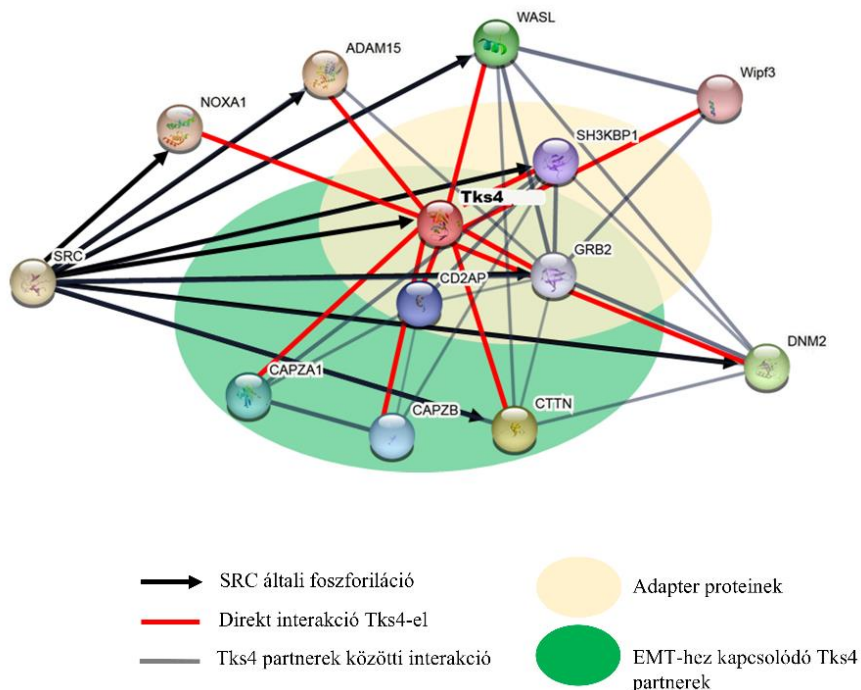
Az embrionális őssejtek esetében a Tks4-hiánya nem zavarta az alapvető csíralemez-képződést, ami az FTHS és Tks4-KO egerekben is így alakul, ugyanis a betegség ellenére életképesek az utódok, nem meglepő, hogy a Tks4-KO HUES9 sejtek is megőrizték széleskörű differenciálódási képességüket. Így a Tks4 hiánya nem ezen a szinten okoz problémát az embrionális fejlődés során. Ezekután a pluripotens őssejtekből mezenchimális őssejteket differenciáltattunk és differenciációs markerek szintjeit vizsgáltuk, ahol a főbb EMT markerek (E-cadherin és Snai1) expressziós szintje megváltozott. Ezek alapján feltételezzük, hogy a Tks4 nem kulcsszabályozója az EMT-nek, de szerepet játszik e folyamat finomhangolásában. Valamint a csontszövet kialakulásában szerepet játszó (GATA4, GSC [16,17]) transzkripciós faktorok alacsonyabb szintje a Tks4-KO MSCk-ben arra utalnak, hogy a differenciálódási folyamat kinetikája megváltozott, ami az FTHS-hez kapcsolódó szöveti összetételt eredményezhet. Ezek az adatok összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, hogy a Tks4-nek szerepe van a csontszövet-képződésben [5,7], ami összefügghet az FTHS betegek csontfenotípusával.

A Tks4 tumorbiológiában betöltött szerepét is egyre több kutatócsoport vizsgálja, ugyanis biomarkerként való alkalmazhatóságát már kimutatták gyomorrákban, hepatocelluláris karcinómában és melanómában azonban a tüdőrákban betöltött szerepét eddig még nem tanulmányozták [10,11,18]. Ezért adatbázis-elemzést és humán tüdőrák szöveti minták qPCR méréseit is elvégeztem. Az eredmények során azt tapasztaltam, hogy a Tks4 mRNS szintje alacsonyabb a tüdőrák szövetekben, mint az egészséges szövetekben. Ez arra utal, hogy a Tks4 potenciális biomarkerként szolgálhat az egészséges és a rákos tüdőszövetek megkülönböztetésére. Emellett a legalacsonyabb Tks4 expressziós szintet a tüdőrák legelőrehaladottabb stádiumában mértem. Ennek megfelelően a Tks4 mRNS expressziós szintjének qPCR-rel történő mérése a sebészileg eltávolított tüdőszövet mintákban segíthet a betegség lehetséges prognózisának meghatározásában.

Továbbá tüdő adenokarcinóma sejtekben (A549) *in vitro* módszerekkel is tanulmányoztam a Tks4-hiányát, amely egy elongált, mezenchimális-szerű fenotípust eredményezett. Ez hasonló ahhoz, amit korábban Tks4-KO vastagbélrák sejtekben is megfigyelt a munkacsoportunk, ahol megnyúlt és kevésbé kör alakú sejtalakot fedeztünk fel [12]. Ezen túlmenően, a Tks4-KO tüdőrák sejtekben eredményeim egy epiteliális-mezenchimális hibrid fenotípus jelenlétét sugallják, amelyet a mezenchimális markerek, mint például a fibronectin, az N-cadherin és a Snai2 transzkripció faktor fokozott génexpressziója jellemez és az epiteliális marker, az E-cadherin csökkent expressziója mutat a Tks4-KO klónokban, amelyek az EMT folyamat jellegzetességei. Fontos kiemelni, hogy nem minden EMT-hez kapcsolódó marker fehérjeszintje mutatott egységes változást, mivel az N-cadherin szintje a vad típusú sejtekhez hasonlóan megmaradt a Tks4-KO sejtekben is. Általánosságban elmondható, hogy a migrációs képesség és az invadopódia kialakulása az invazív rákos sejtek jellegzetességei. Érdekes módon a Tks4-KO rákos sejtek migrációs képessége kissé csökkent, illetve a Tks4 hiányában a sejtek invadopódia képződése is csökkent mértéket mutat. Feltételeztük, hogy az eltérő hatások (csökkent invadopódia képzés, megemelkedett EMT marker expresszió, csökkent migrációs képesség) 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 az EMT folyamatok kimenetélre. A Tks4-interaktom leírásához Tks4-IP-tömegspektromterias elemzést végeztem, ahol új Tks4 partnereket azonosítottam: a CAPZA1 fehérjét. A Tks4-CAPZA1 interakcióját Tks4-IP-t követő western blottal, Duolink proximity ligációs esszével, valamint Dr. Pancsa Rita segítségével predikciós analízissel validáltam. Hepatocelluláris karcinóma sejtekben azt is kimutatták, hogy a CAPZA1 csökkent expressziója hajta az alacsony oxigénszint által indukált EMT folyamatot [19], illetve egy másik kutatócsoport kimutatta, hogy az általunk is alkalmazott A549 sejtvonalban az oxigénszint csökkenése az EMT folyamatot indukálja [20], így ezt is megvizsgáltam a Tks4-hiányos tüdőrák sejtvonalban. Az tapasztaltam, hogy 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 mutathatják, hogy alapvetően a Tks4 kiütése egy plasztikusabb, EMT indukcióra gyorsabban reagáló sejtípust eredményezett.

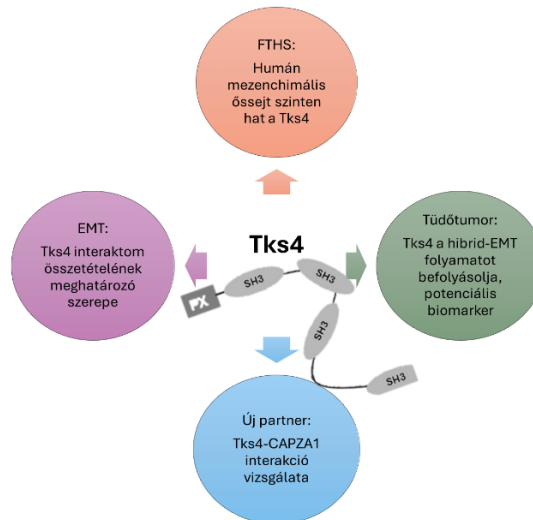
Hipotézisünk szerint a Tks4 állványfehérjéhez kapcsolódó jeltovábbító molekulák aktuális jelenléte és a közöttük lévő kötődési viszonyok különböző módon befolyásolhatják a Tks4 utáni jelátviteli folyamatokat, ezért további Tks4 interaktom vizsgálatokat végeztünk, hogy

azonosítsuk a Tks4 partnermolekulákat. Ezekbe a kísérlet sorozatokba bevontam három tüdő rák sejtvonalat (A549, NCI-H460, HOP-92) és a HUES9 embrionális sejtvonalat, hogy Tks4-IP-WB kísérleteket végezzek. Ahhoz, hogy a cél fehérjét kiválasszam ehhez a kísérlethez elsőként STRING adatbázis, irodalmi adatok és saját kutatási adataink alapján egy fehérje-fehérje interakciós hálózatot hoztam létre (2.ábra), amelyből további irodalmi adatok alapján azok kapcsolatát validált a Tks4 fehérjével, amelyek az EMT folyamatában részt vesznek (Grb2 [21], CAPZA1 [19], CD2AP [13], Cortactin [22]). Az eredmények azt mutatják, hogy a partnerfehérjék jelen vannak az embrionális mezenchimális őssejtekben és a három tüdőrák sejtben is a Tks4 interaktomban.



**2.ábra:** A Tks4 partner molekulák fehérje-fehérje kölcsönhatásainak elemzése: A Tks4 teljes interakciós hálózata. Az interakciós elemzést a STRING (<https://string-db.org/>). segítségével vizualizáltam, beépítve kísérleti és az irodalmi adatokat.

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 részt vevő molekulák jelenléte együttesen járulnak hozzá az EMT-szerű folyamatokhoz, az invadopodia képződéshez 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 (3.ábra).



**3.ábra:** PhD disszertációmban bemutatott eredmények összefoglalása.

**Tézis alapjául szolgáló közlemények:**

**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.

**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.

**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.

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.

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.

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.

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.

**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.

**Irodalomjegyzék**

1. 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, Vol. 7, Page 1 **2018**, 7, 1, doi:10.3390/JCM7010001.
2. Saitoh, M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J. Biochem.* **2018**, 164, 257–264, doi:10.1093/JB/MVY047.
3. 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.
4. 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.
  5. 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.
  6. Dülk, M.; Kudlik, G.; Fekete, A.; Ernszt, 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.
  7. 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.
  8. 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.
  9. 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.
  10. 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.
  11. Izuka, 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. Szébenyi, 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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.
  20. 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  $\beta$ -Catenin. *Anticancer Res.* **2018**, *38*, 6299–6308, doi:10.21873/ANTICANRES.12986.
  21. 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.
  22. 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.