

# A Tks4 állványfehérje vizsgálata rákos sejtek mozgásában



**MEDINPROT**

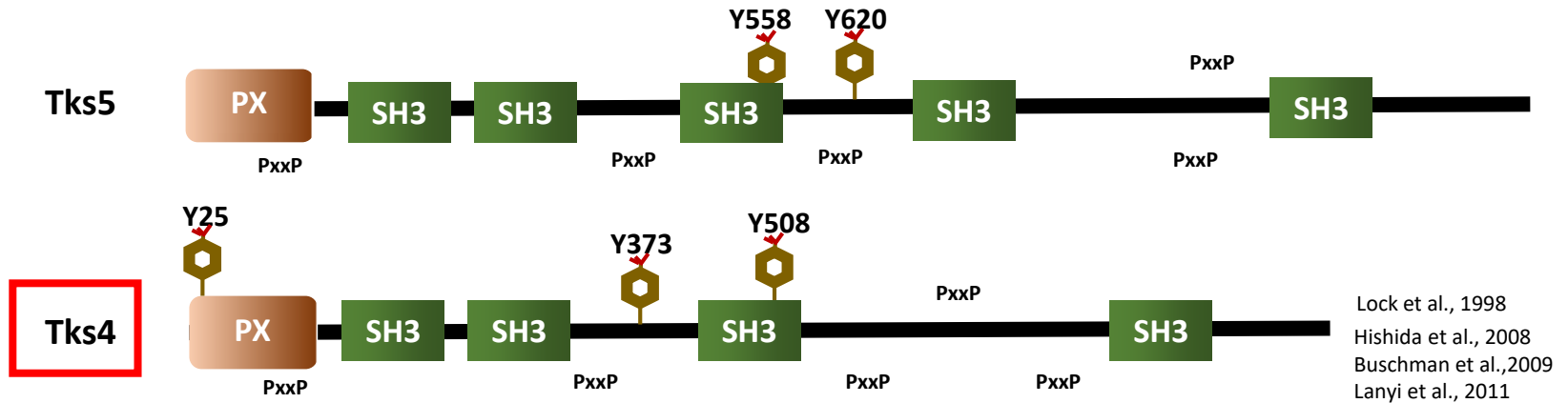
2018.11.10.

*Czirók András és Buday László*

*Előadó: Szeder Bálint*



# A Tks fehérjecs család



- **Tks = *Tyrosine Kinase Substrate*:** Az *Src* tirozin kináz szubsztrátjai
- **PX domén:** lipid-kötő domén (főleg PI3P és PI(3,4)P<sub>2</sub>)
- **SH3 domén:** prolin-gazdag régiókat megkötő fehérje-interakciós domén
- **PxxP:** prolin-gazdag régiók; az SH3 domén kötőmotívumai

# Tks4<sup>-/-</sup>, Frank-ter Haar szindróma

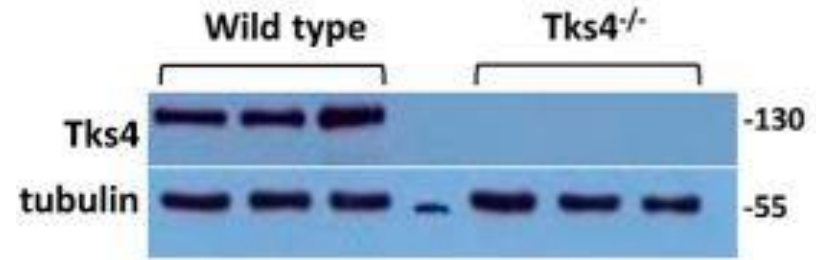
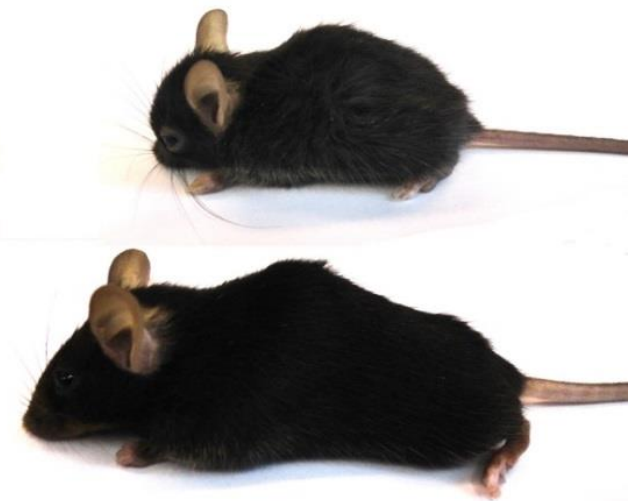
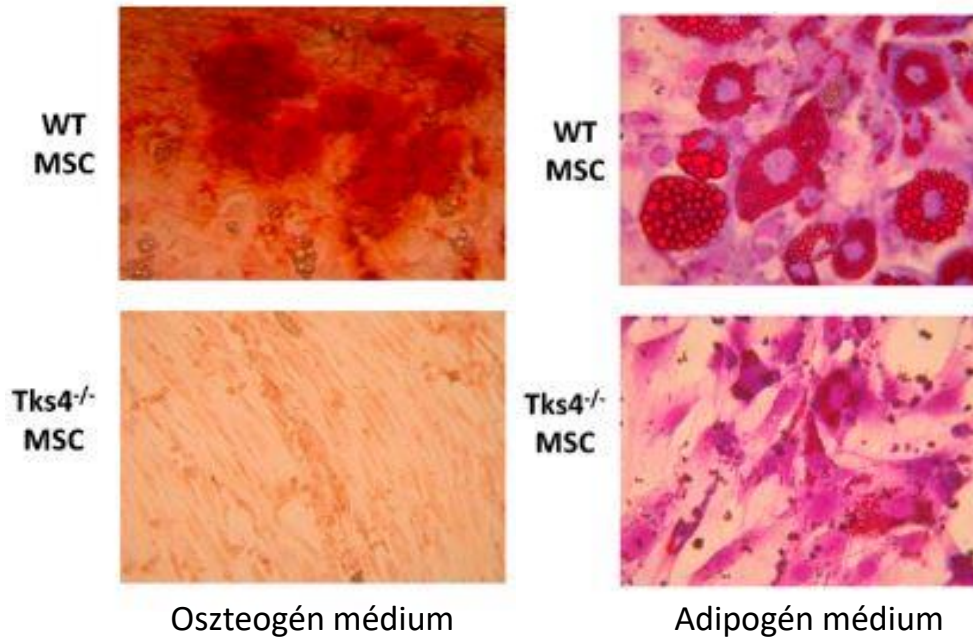


- Távolülő szemek
- Píse orr
- Megalocornea
- Rövidfejűség
- Rövid, görbült csöves csontok
- Híti kiphosis
- Szívzörej

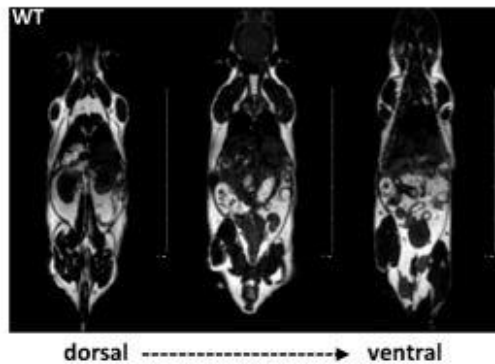
Iqbal, 2008

# Tks4<sup>-/-</sup> génhiányos egérmmodell

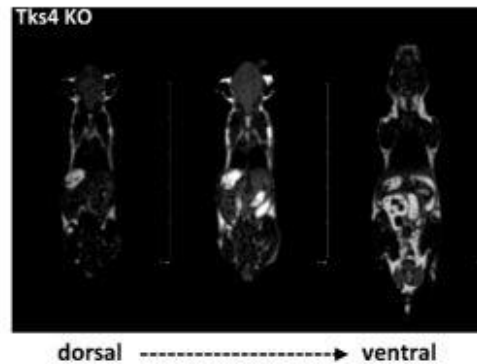
## Mesenchimalis sztrómasejtek differenciációja



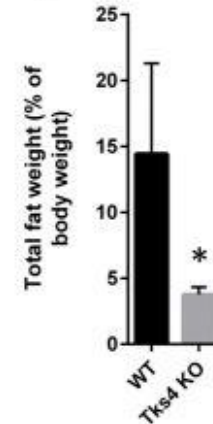
a



b

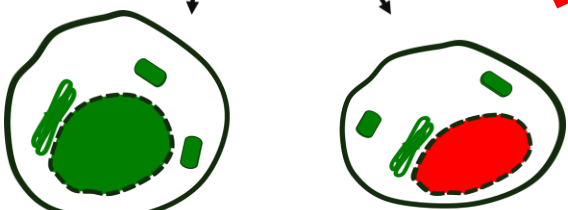


c



# Tks4<sup>-/-</sup> génhiányos sejt vonal

Génmódosítás/CRISPR



Vad típusú

Tks4 génhiányos

Szekvenálás

**Vad típus:** CTTGCTGTAGCCCGGTAATGGCTCGGTGGAGCCGCTGGACCAGTGGACCG  
**Génhiányos klón (KO19):** CTTGCTGTAGCCCGGTAATGGCTCGGTGGAGCCACTGGACCAGTTGCTCTGCCGA  
 CTTGCTGTAGCCCGGTAATGGCTCGGTGGAGCCACTGGACCAGTTGCTCTGCCGA  
 CTTGCTGTAGCCCGGTAATGGCTCGGTGGAGCCACTGGACCAGTTGCTCTGCCGA

**Második allél**

**Vad típus:** AGCAACAAGCACATTATTTGGTCTCAAAGTAATGGATGTCATTCTTTTTTTTTGAG  
**Génhiányos klón (KO19):** AGCAACAAGCACATTATTTGGTCTCAAAGTAATGTTCTTTTTTTTTGAG  
 AGCAACAAGCACATTATTTGGTCTCAAAGTAATGTTCTTTTTTTTTGAG

**Deléció 7 bázis**

Információ mind a két allélról!

**Első allél**

**Vad típus:** GAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTG  
**Génhiányos klón (KO19):** GAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTG  
 GAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTG  
 GAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTG

**Inzerció 179 bázis**

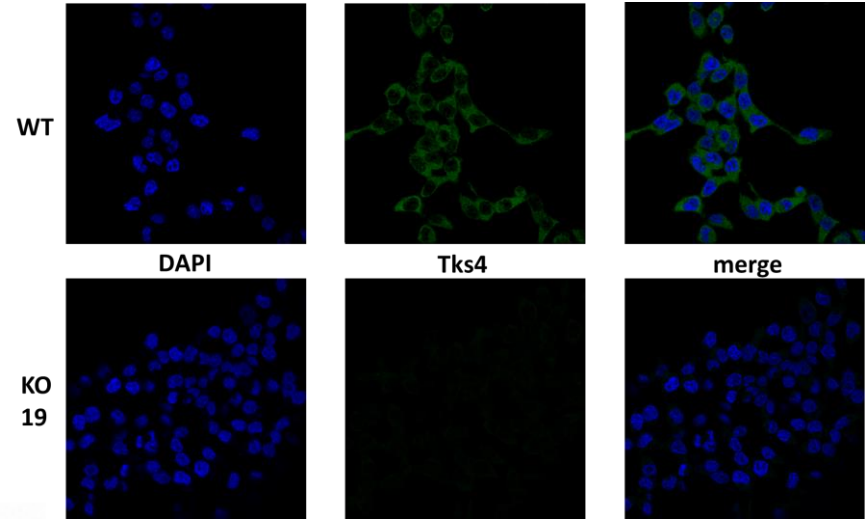
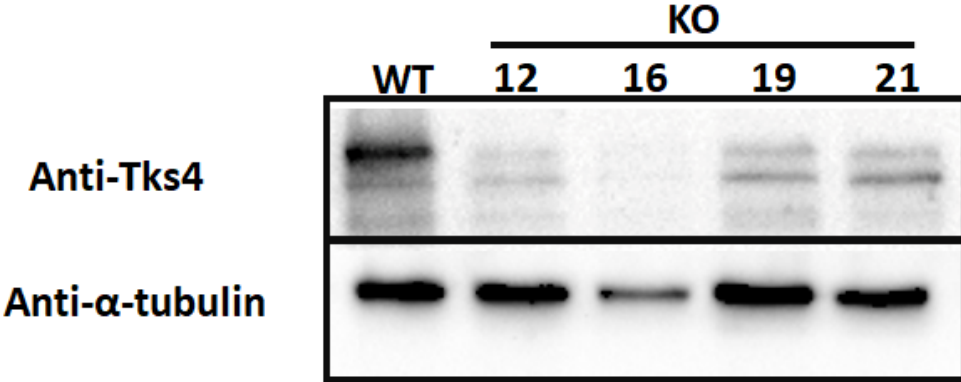
**Vad típus:** CCCATTGACCAACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGG  
**Génhiányos klón (KO19):** CCCATTGACCAACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGG  
 CCCATTGACCAACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGG  
 CCCATTGACCAACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGG

**Inzerció 179 bázis**

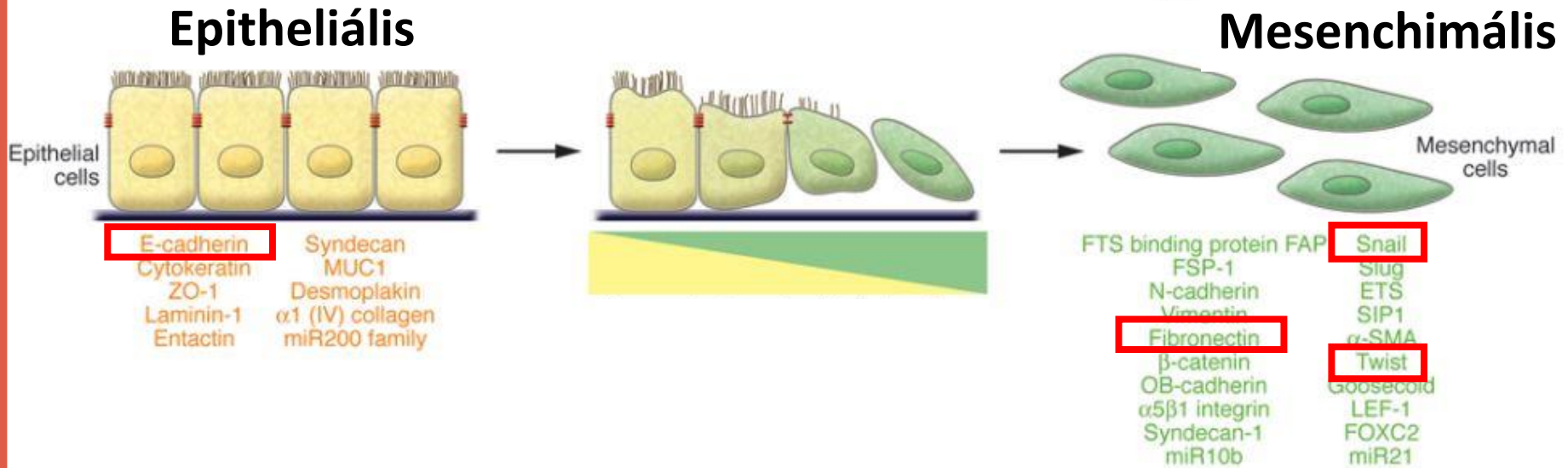
**Vad típus:** TCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGGACCGGGATGATG  
**Génhiányos klón (KO19):** TCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGGACCGGGATGATG  
 TCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGGACCGGGATGATG  
 TCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGGACCGGGATGATG

HCT116 kolorektális karcinóma sejt vonal

Ellenőrzés fehérje szinten

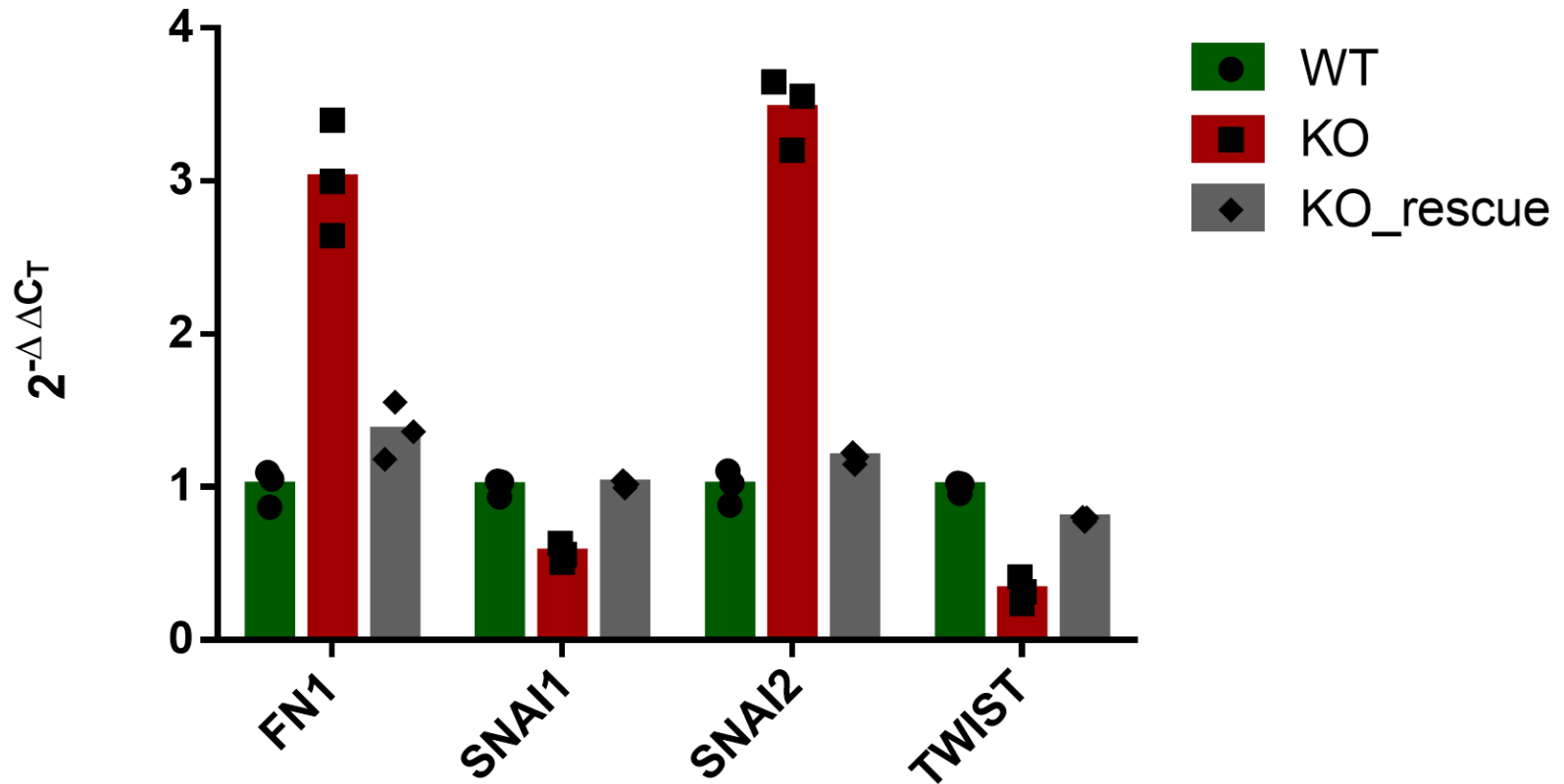


# Az epitheliális-mezenchimális átmenet



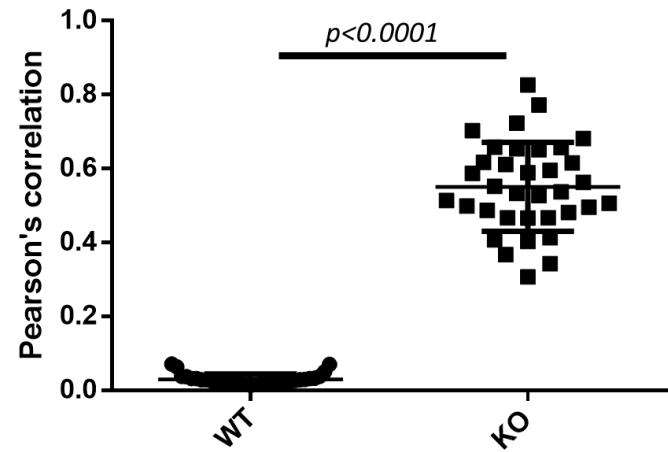
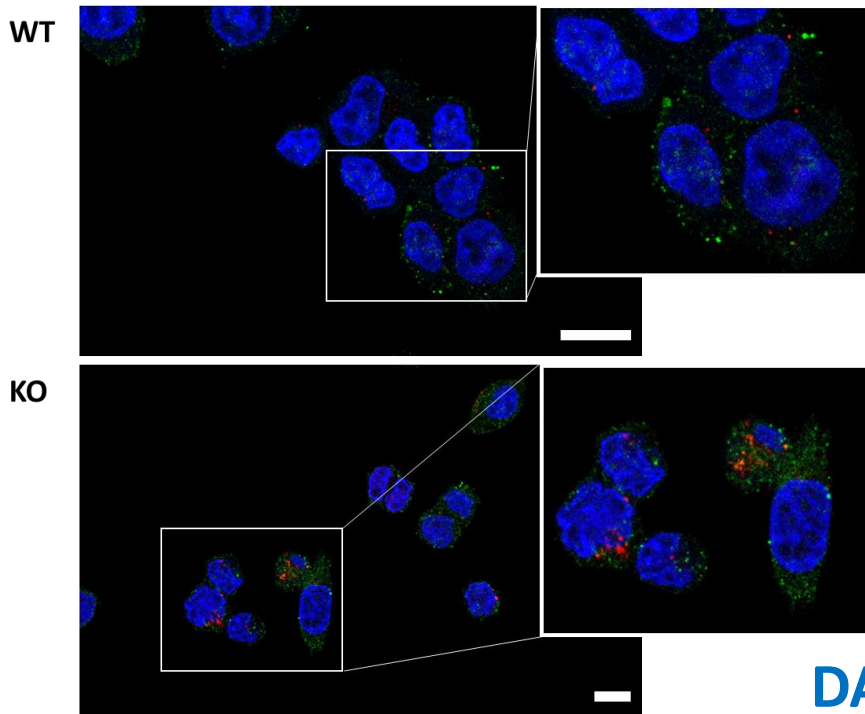
- **Morfológiai változások:** szorosan kapcsolódó lekerekedett „*cobblestone*” sejtek, elkülönült „*spear-head*” morfológia
- **E-cadherin:** sejt-sejt kapcsolat kialakítása, epithél marker
- **Snail, Twist:** transzkripciós faktorok, **E-cadherin leszabályozás (E-box)**, *lamina basalis* lebontás (Snail)
- **Fibronectin:** mesenchimális marker, ECM komponens

# EMT transzkripciós faktorok vizsgálata



Szignifikánsan emelkedett a **SNAI2**, és a **mezenchimális marker (FN1)**. A Tks4 tranziens expressziója KO sejtekben, **revertálja** a mért expressziós szinteket.

# E-cadherin represszió vizsgálata

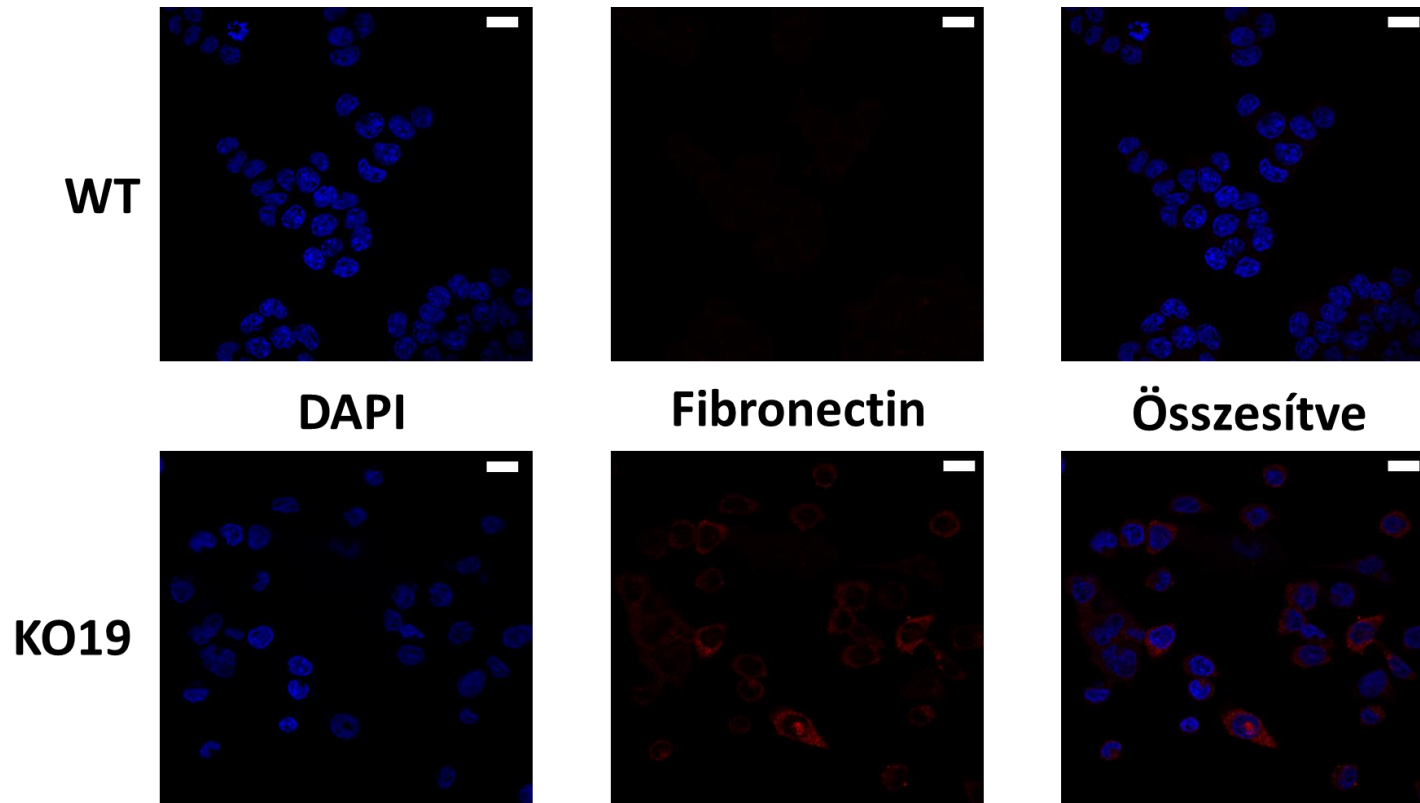


DAPI/E-cadherin/Lysotracker

Megváltozott E-cadherin lokalizáció. A KO-ban fokozott diffúzitás, **kolokalizáció savas lizoszómákkal**. Ez jelentheti az E-cadherin **kezdeti represszióját**. Vonalzó: 30 $\mu$ m.

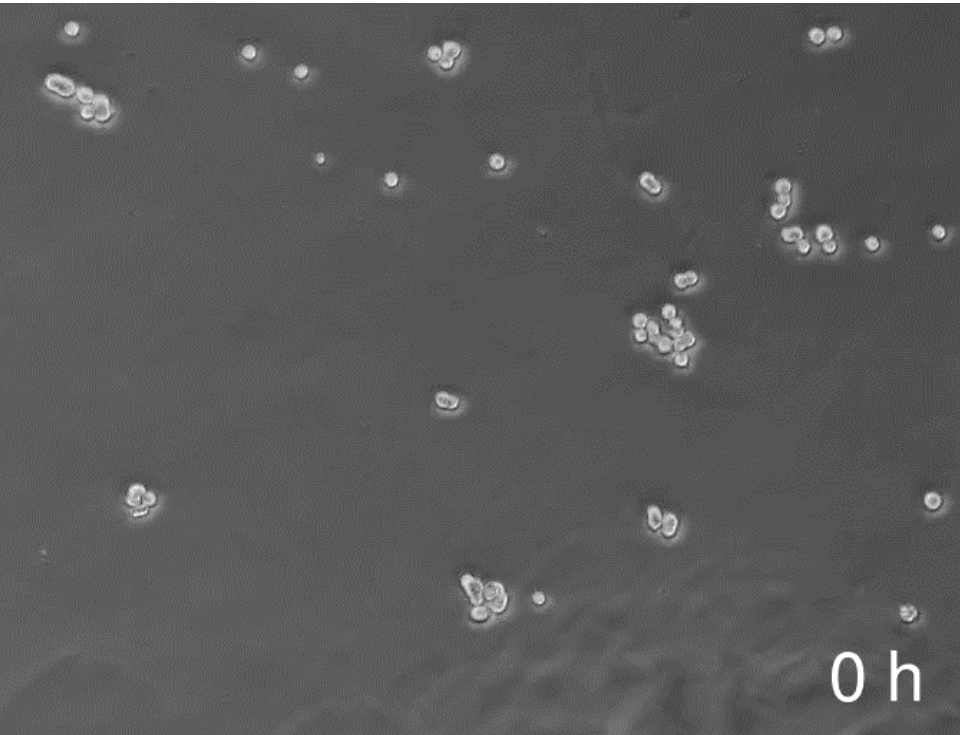


# Fibronectin expressziójának vizsgálata

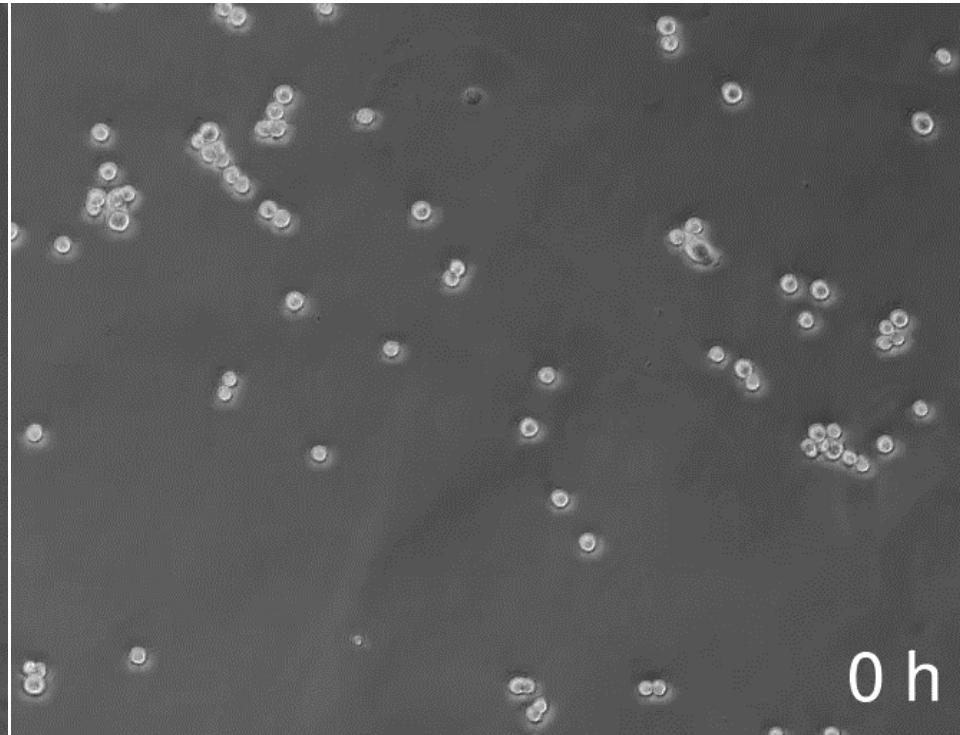


A **fibronectin** mezenchimális marker **emelkedett mRNS** szintjével összefüggően a KO sejtekben a **fibronectin fehérje** szintje is **megemelkedett**. Vonalzó: 30 $\mu$ m.

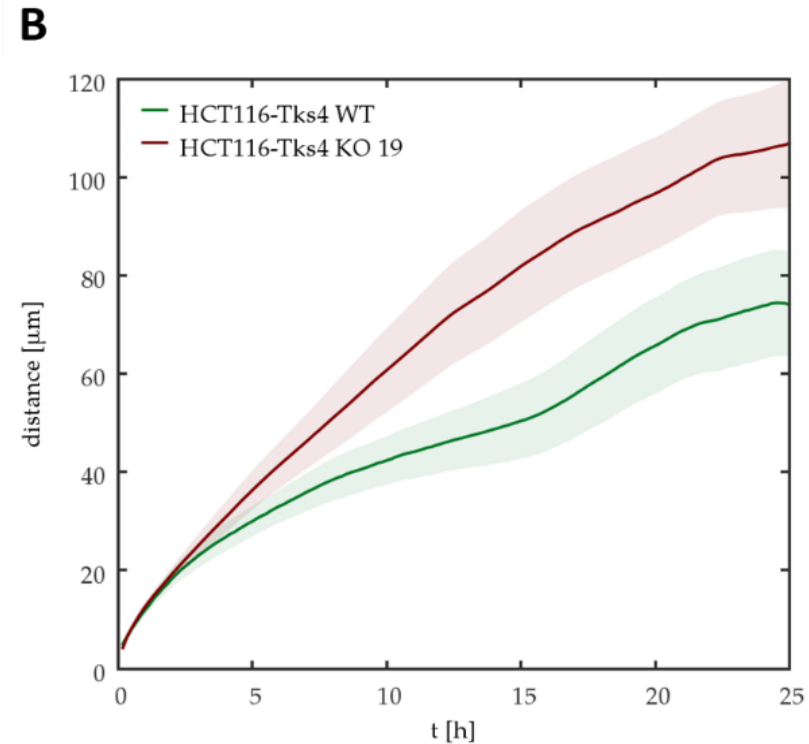
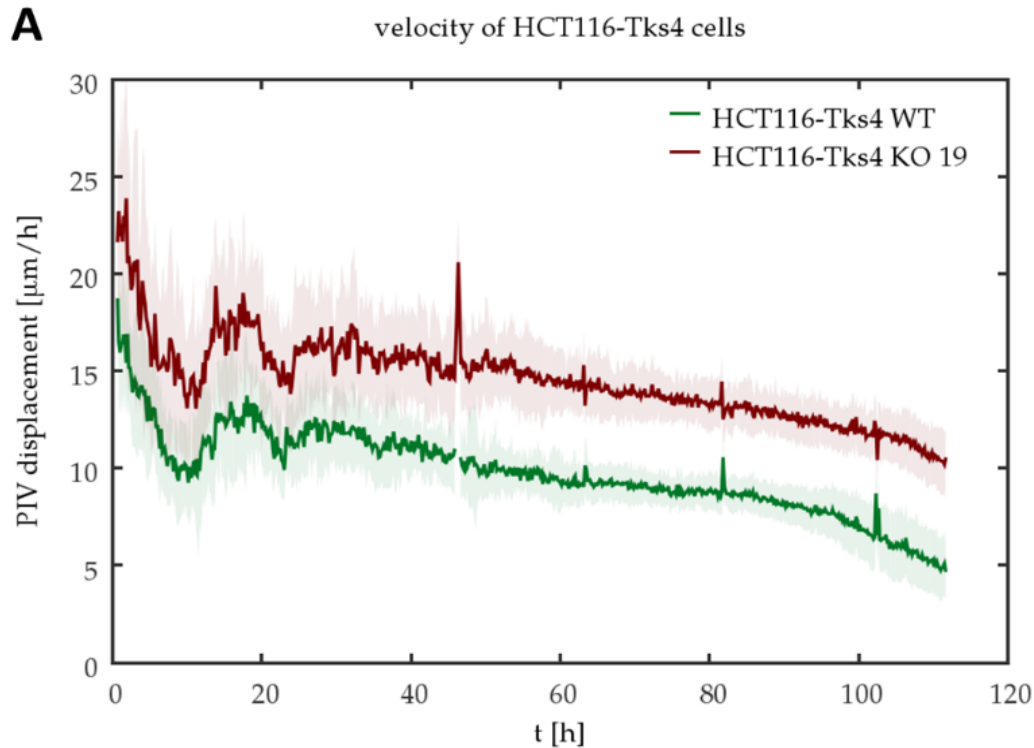
**WT**



**KO**



# Monolayer kultúrák vizsgálata

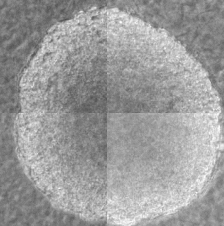
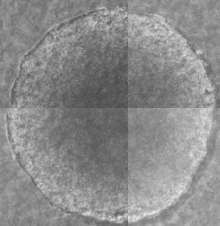


A) KO sejtek átlagosan **gyorsabb** mozgásra voltak képesek.

B) Véletlenszerűen kiválasztott 20 sejtet vizsgálva, KO sejtek **nagyobb távolságot** tettek meg adott idő alatt.

**WT**

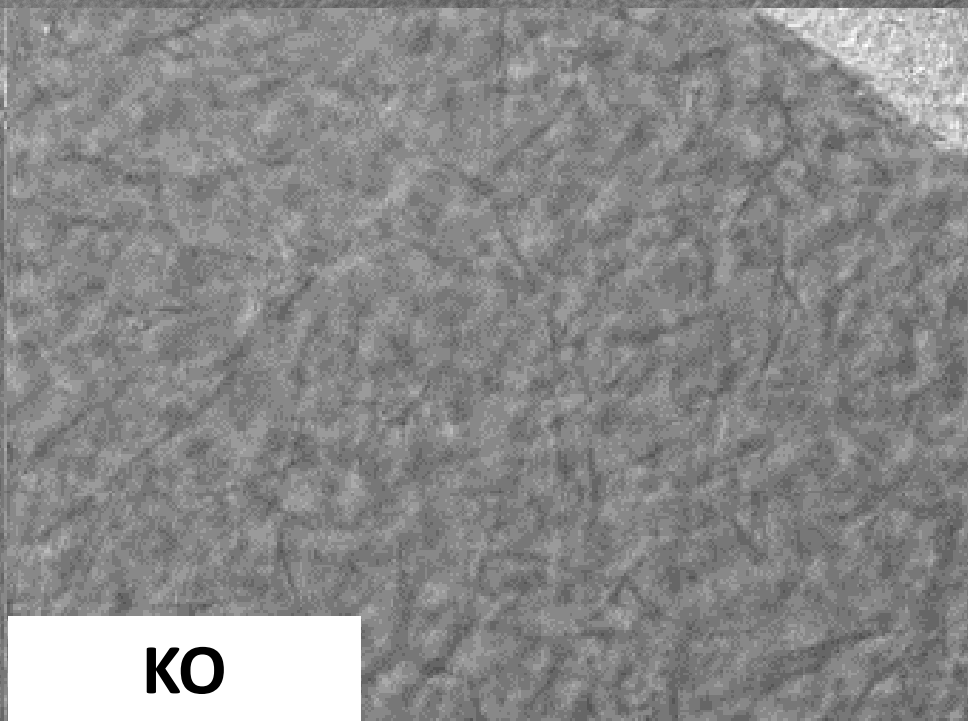
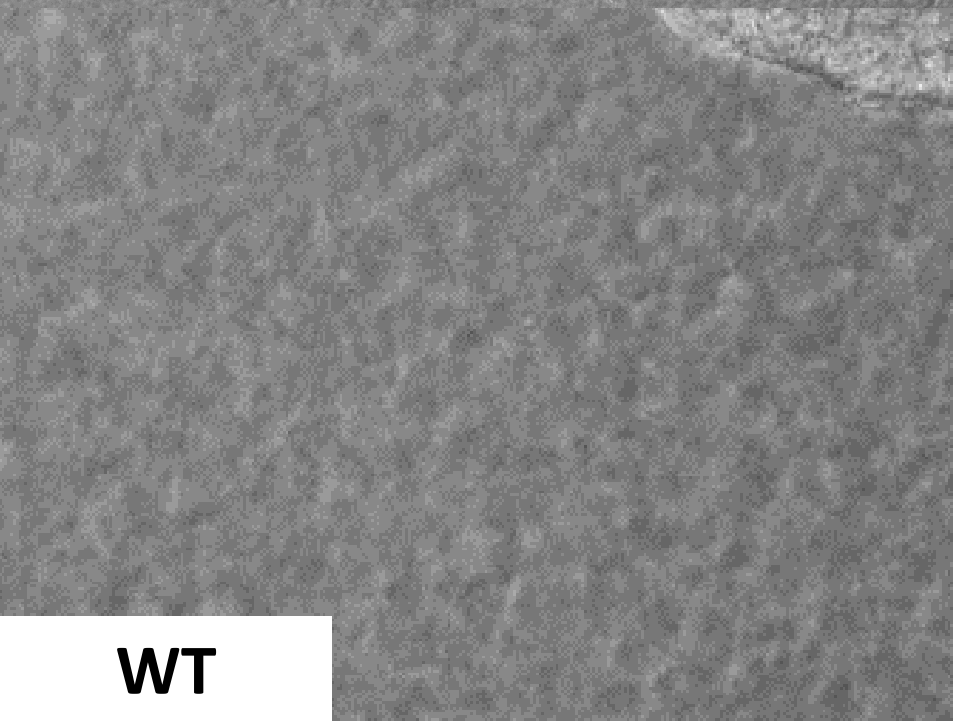
**KO**



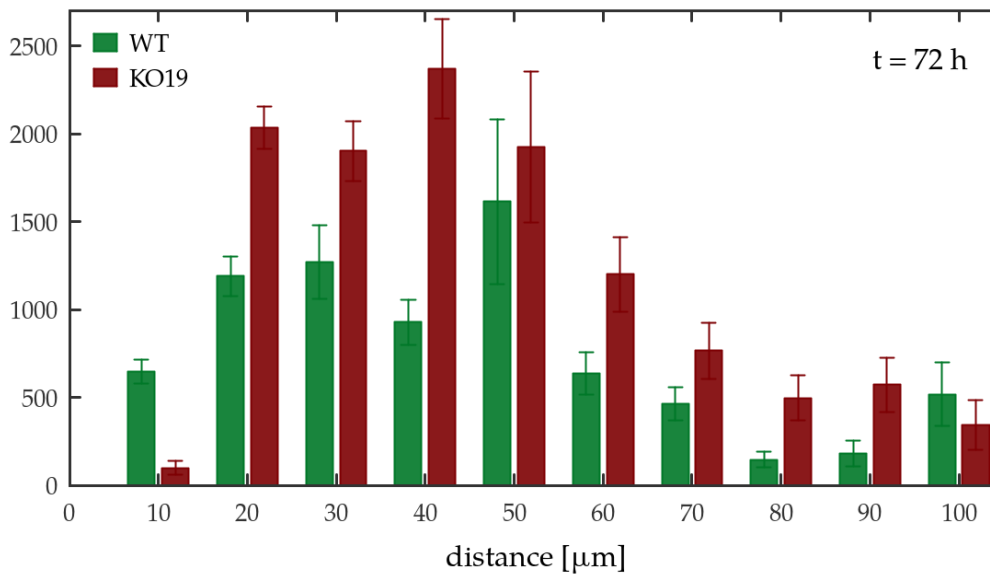
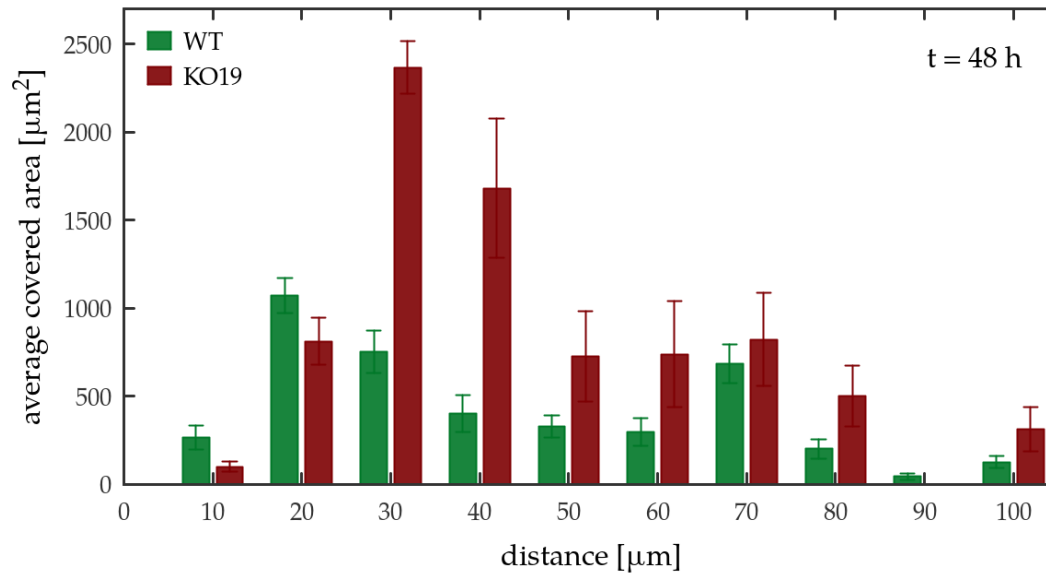
**0 h**

**WT**

**KO**



# Szferoidok vizsgálata



# Összefoglalás

1. A KO sejtek gyorsabban és távolabbra mozognak a vad típushoz képest
2. A KO sejtek könnyebben elszakadnak egymástól
3. A Tks4 fehérje kiütése a SNAI2 és fibronectin felszabályozását eredményezi
4. A Tks4 fehérje kiütése az E-cadherin sejten belüli elhelyezkedésében változást indukál

# Köszönetnyilvánítás

**Dr. Czirók András**

Lakatos Dóra

Dr. Méhes Előd

Tárnoki-Zách Júlia



**MEDINPROT**

**Dr. Buday László**

Dr. Vas Virág

Dülk Metta

Koprivanacz Kitti

Dr. Kudlik Gyöngyi

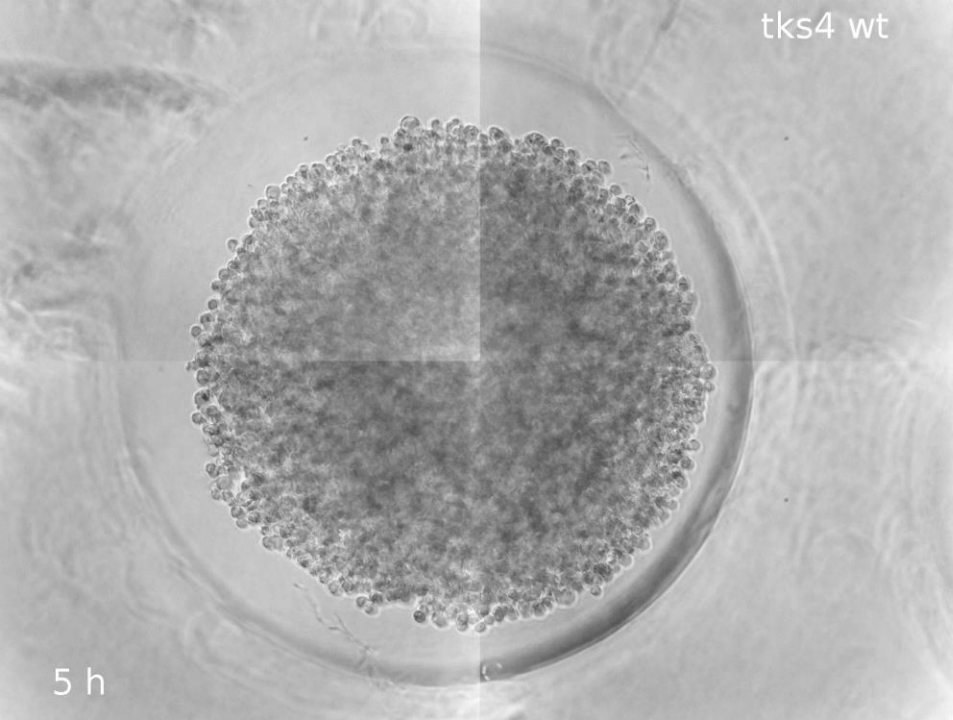
Merő Balázs

Mező Diána

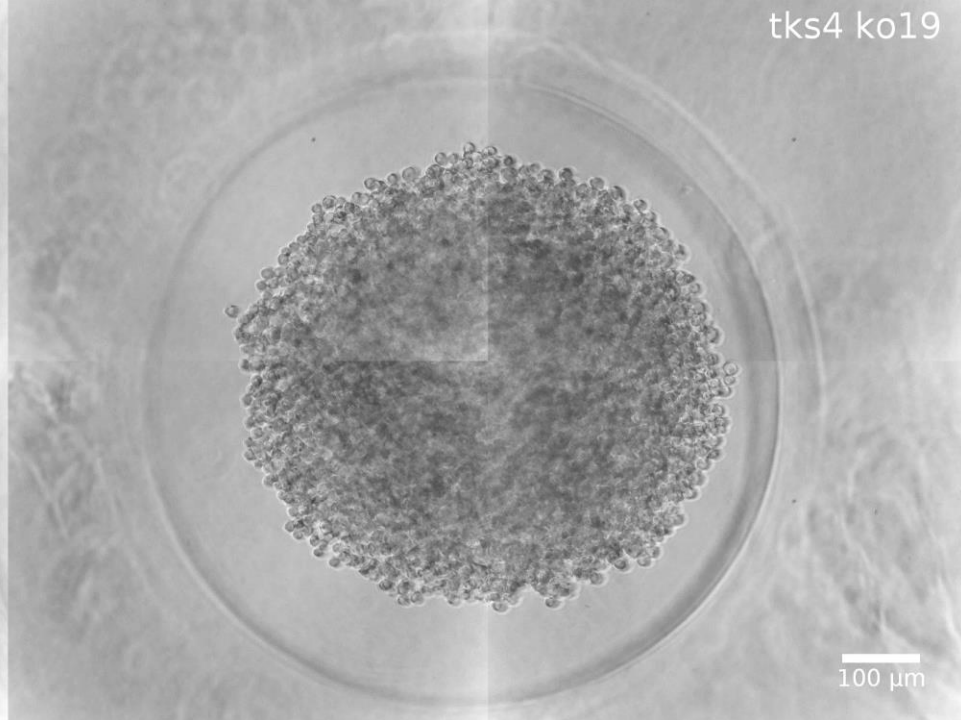
Szedes Bálint

**Az együttműködés a SZINERGIA VII. pályázat keretein belül  
jöhetett létre.**

tk<sub>s</sub>4 wt



tk<sub>s</sub>4 ko19





Comparison of HCT116 wt and tks4 ko spheroid formation

