

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**MAGDALENA KRATOCHVÍLOVÁ**

**Úloha glykoproteinů NG2 v regulaci Rho/ROCK signalizace**

**The role of NG2 glycoprotein in regulation of Rho/ROCK signaling**

**Bakalářská práce**

**Školitel: RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.**

**PRAHA 2011**

## PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří všem, kteří mi pomohli při psaní této práce, především mému školiteli RNDr. Danielovi Röslovi, Ph.D. za jeho užitečné rady a připomínky a za čas, který mi věnoval.

## PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci „Úloha glykoproteinu NG2 v regulaci Rho/ROCK signalizace“ zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 1. května 2011

Magdalena Kratochvílová

## ABSTRAKT

NG2 je transmembránový glykoprotein, který se účastní buněčných procesů jako je adheze, migrace nebo invazivita, které jsou významné jednak pro vyvíjející se tkáň, ale také pro tvorbu nádorů a metastáz. NG2 mimo jiné způsobuje inhibici růstu neuritů, a je zřejmě významný pro améboidní invazivitu buněk. Oba tyto procesy jsou si v mnoha ohledech podobné. Jak při inhibici růstu neuritů, tak i při mezenchymální-améboidním přechodu dochází k morfologickým změnám buněk, jejichž výsledkem je ztráta buněčných výběžků a získání kulatého tvaru. Pro oba procesy je také zásadní aktivace Rho/ROCK signalizace. Propojení NG2 se signální dráhou Rho/ROCK bylo naznačeno právě v procesu inhibice růstu neuritů. Mechanismus regulace Rho/ROCK signalizace pomocí glykoproteinu NG2 ale zatím není znám. V této práci je navržen možný molekulární mechanismus aktivace Rho/ROCK dráhy, a to pomocí signalizačního komplexu NG2/MUPP1/Syx. Kdy „scaffold“ protein MUPP1, vázaný na NG2, umožňuje vazbu a aktivaci proteinu Syx. Ten pak jakožto RhoGEF aktivuje Rho/ROCK signalizaci. Aktivovaná Rho/ROCK dráha vede jednak k inhibici růstu výběžků, tak i zvýšené kontraktilitě buněk a zvýšení jejich trakčních sil. Tyto procesy jsou přitom zcela zásadní pro améboidní způsob invazivity buněk. NG2 by mohl navíc fungovat i jako integriny zastupující adhezivní molekula. Glykoprotein NG2 je tedy možná jednou z velmi důležitých molekul, která prostřednictvím aktivace Rho/ROCK signalizace a na integrinech nezávislé adheze vede k améboidní invazi buněk.

### KLÍČOVÁ SLOVA:

NG2 glykoprotein, Rho, ROCK, signalizace, adheze, migrace, invazivita

## ABSTRACT

NG2 is a transmembrane glycoprotein, which takes part in cellular processes such as adhesion, migration or invasivity, i.e., in processes important in tissue development but also in tumor and metastasis formation. Among other things, NG2 leads to an inhibition of neurite growth, and probably plays an important role in amoeboid type of cell invasion. These processes are in many respects similar. Both in inhibition of neurite growth and in mesenchymal-amoeboid transition occur morphological changes which lead to a loss of cell protrusions and a transition to a rounded shape. In both of these processes Rho/ROCK signaling also plays a crucial role. Connection between NG2 and the Rho/ROCK signaling pathway has been indicated in the process of inhibition of neurite growth. The mechanism of Rho/ROCK signaling regulation by NG2 glycoprotein is, however, still unknown. In this thesis is proposed a molecular mechanism of Rho/ROCK pathway activation by glycoprotein NG2 which relies on the NG2/MUPP1/Syx signaling complex where the scaffold protein MUPP1, bound to activated NG2, enables binding and activation of the Syx protein. Syx then as RhoGEF activates Rho/ROCK signaling, and the activated Rho/ROCK pathway leads to inhibition of neurite growth, increased cell contractility and traction forces. These processes are crucial for amoeboid type of cell invasion. It is also possible that NG2 functions as an integrin- substitute adhesion molecule. Glycoprotein NG2 might therefore be one of the crucial molecules which through activation of Rho/ROCK signaling and integrin-independent adhesion leads to amoeboid cell invasion.

## KEYWORDS:

NG2 glycoprotein, Rho, ROCK, signaling, adhesion, migration, invasivity

## SEZNAM ZKRATEK:

<b>AMT</b>	Améboidně-mezenchymální přechod ( <u>a</u> moeboid- <u>m</u> esenchymal <u>t</u> ransition)
<b>CSPG</b>	Chondroitin-sulfát proteoglykan ( <u>c</u> hondroitin- <u>s</u> ulfate <u>p</u> roteoglycan)
<b>ECM</b>	Mezibuněčná hmota ( <u>e</u> xtrac <u>e</u> llular <u>m</u> atrix)
<b>ERM</b>	<u>e</u> zrin/ <u>r</u> adixin/ <u>m</u> oesin proteiny
<b>GAP</b>	<u>G</u> TPase- <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein
<b>GDI</b>	<u>G</u> uanine nukleotide <u>d</u> issociation <u>i</u> nhibitor
<b>GEF</b>	<u>G</u> uanine nukleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor
<b>HMW-MAA</b>	<u>H</u> igh <u>m</u> olecular <u>w</u> eight- <u>m</u> elanoma <u>a</u> ssociated <u>a</u> ntigen
<b>LIMK</b>	<u>L</u> im domain-containing <u>k</u> inase
<b>MAT</b>	Mezenchymálně-améboidní přechod ( <u>m</u> esenchymal- <u>a</u> moeboid <u>t</u> ransition)
<b>MCSP</b>	<u>M</u> elanoma-associated <u>c</u> hondroitin <u>s</u> ulfate <u>p</u> roteoglycan
<b>MLC</b>	Lehký řetězec myozinu ( <u>m</u> ynosin <u>l</u> ight <u>c</u> hain)
<b>MLCP</b>	Fosfatáza lehkého řetězce myozinu ( <u>m</u> ynosin <u>l</u> ight <u>c</u> hain <u>p</u> hosphatase)
<b>MUPP1</b>	<u>M</u> ultiple <u>P</u> DZ domain <u>p</u> rotein <u>1</u>
<b>NG2</b>	<u>N</u> erve/ <u>g</u> lial antigen <u>2</u>
<b>PKC<math>\alpha</math></b>	Protein kináza C $\alpha$ (protein <u>k</u> inase <u>C</u> <u><math>\alpha</math></u> )
<b>Rho</b>	<u>R</u> as <u>h</u> omolog
<b>ROCK</b>	Rho-kináza ( <u>R</u> h <u>o</u> -associated <u>c</u> oiled-coil-containing protein <u>k</u> inase)
<b>Syx</b>	<u>S</u> ynectin-binding RhoA <u>e</u> xchange factor

# OBSAH

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK: .....</b>	<b>5</b>
<b>OBSAH .....</b>	<b>6</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>2. GLYKOPROTEIN NG2.....</b>	<b>8</b>
2.1. STRUKURA NG2.....	8
2.2. GLYKOPROTEIN NG2 V NÁDOROVÉ TRANSFORMACI A PROGRESI.....	10
2.3. NG2 JAKO INTEGRINY ZASTUPUJÍCÍ ADHEZIVNÍ MOLEKULA .....	11
2.4. GLYKOPROTEIN NG2 A INHIBICE RŮSTU NEURITŮ .....	12
<b>3. RHO/ROCK SIGNALIZACE .....</b>	<b>14</b>
3.1. RHO GTPÁZY.....	14
3.2. REGULACE RHO GTPÁZ .....	14
3.3. RHO/ROCK SIGNALIZACE.....	16
3.4. RHO/ROCK A BUNĚČNÁ INVAZIVITA.....	17
3.5. PARALELY MEZI INHIBICÍ RŮSTU NEURITŮ A MAT .....	18
<b>4. MOŽNÝ MECHANISMUS PŮSOBENÍ NG2 NA RHO/ROCK SIGNALIZACI .....</b>	<b>19</b>
4.1. NG2 VÁŽE PROTEIN MUPP1.....	19
4.2. GEF PROTEIN SYX.....	20
4.3. MOŽNÉ PROPOJENÍ PROTEINŮ MUPP1 A SYX .....	21
4.4. SIGNALIZAČNÍ KOMPLEX NG2/MUPP1/SYX ?.....	22
4.5. JINÉ MOŽNOSTI PROPOJENÍ? .....	23
<b>5. ZÁVĚR .....</b>	<b>24</b>
<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>25</b>

## 1. ÚVOD

NG2 je veliký (250 kDa) a strukturně jedinečný glykoprotein. Poprvé byl popsán v roce 1981 v nervové tkáni potkana a byl pojmenován jako nerve/gliial antigen 2 (odtud NG2) (Stallcup, 1981). O dva roky později se ukázalo, že se jedná o membránový chondroitin sulfát proteoglykan (Stallcup et al., 1983 citováno v Stallcup, 2002). Často se tak můžeme setkat s tím, že je označován jako chondroitin sulfát proteoglykan 4 (CSPG4). Jeho lidským homologem je MCSP (melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglykan) nazývaný také HMW-MAA (high molecular weight-melanoma associated antigen).

Expres NG2 je spojená hlavně s vyvíjející se tkání. NG2 je exprimovaný buňkami gliových prekurzorů, chondroblasty vyvíjející se chrupavky i myocyty hladké a kosterní svaloviny (Nishiyama et al., 1991b). Mimo to je jeho exprese spojena s řadou nádorů (Stallcup and Huang, 2008).

Jeho funkcí je účast na procesech, jako je buněčná migrace (Burg et al., 1997; Fang et al., 1999), proliferace (Grako et al., 1999; Nishiyama et al., 1996) nebo adheze (Tillet et al., 2002), které jsou významné jednak pro vyvíjející se buňky, ale také pro tvorbu nádorů a metastáz. Je známo několik mechanismů, kterými může NG2 tyto procesy ovlivňovat. Mezi ně patří především vazba složek mezibuněčné hmoty, jako je kolagen VI (Burg et al., 1996; Tillet et al., 2002; Tillet et al., 1997), aktivace integrinové signalizace (Makagiansar et al., 2007; Stallcup and Huang, 2008), zesílení signalizace růstovými faktory (Goretzki et al., 1999; Grako et al., 1999) a zřejmě také aktivace Rho/ROCK signalizace.

Cílem této práce je poukázat právě na propojení glykoproteinu NG2 se signální dráhou Rho/ROCK a navrhnout možný molekulární mechanismus tohoto působení.

## 2. GLYKOPROTEIN NG2

### 2.1. STRUKURA NG2


NG2 je 250kDa velký chondroitin sulfát proteoglykan, který jedenkrát prochází plazmatickou membránou. Jeho primární struktura byla poprvé popsána v roce 1991 (Nishiyama et al., 1991a). Tento strukturně jedinečný glykoprotein je tvořen 2325 aminokyselinami. Největší část tvoří extracelulární doména (2225 aminokyselin), která je složená ze tří ektodomén: aminotermiální oblasti bohaté na cystein (Nishiyama et al., 1991a), stabilizované disulfidickými můstky; centrální domény, bohaté na serin a glycin a globulární oblasti bohaté na cystein. Na jeho N-konci můžeme nalézt dva laminin-G (LNS) motivy. Centrální část extracelulární domény obsahuje vazebné místo pro kolageny typu V a VI (Burg et al., 1997; Tillet et al., 1997). Byly zde také popsány dvě konsenzus sekvence pro vazbu chondroitin sulfátu na serinu 999 (EGSGD) a serinu 1342 (SGLG) (Nishiyama et al., 1991a). Později se však ukázalo, že NG2 obsahuje pouze jediný chondroitin-sulfátový řetězec, a to na serinu 999 (Stallcup and Dahlin-Huppe, 2001). Úloha tohoto řetězce není zcela jasná, je však možné, že je důležitý pro lokalizaci glykoproteinu do buněčných mikrodomén (Stallcup and Dahlin-Huppe, 2001). Druhá z globulárních domén obsahuje místa proteolytického štěpení (Nishiyama et al., 1995) a sekvence, na které se váže galektin-3 (Wen et al., 2006).

Následuje transmembránová doména (25 aminokyselin) a poté poměrně krátká (76 aminokyselin) cytoplazmatická doména. Ta obsahuje několik treoninů, přičemž minimálně dva z nich jsou místy funkčně důležité fosforylace: Thr-2256 je fosforylován PKC $\alpha$  (Makagiansar et al., 2004) a Thr-2314 je fosforylován ERK (Makagiansar et al., 2007). C-terminální část glykoproteinu sice obsahuje velké množství prolinu, klasický motiv vázající SH3 doménu (PXXP) se zde ale nenachází. Konečně, na úplném C-konci NG2 se nachází PDZ<sup>1</sup>-vazebný motiv. Schematicky znázorňuje strukturu NG2 glykoproteinu obr. 1.

---

<sup>1</sup> Označení PDZ domény je odvozeno od názvů tří proteinů, které tuto doménu obsahují: PSD-95 (postsynaptic density 95), DlgA (discs-large tumor suppressor protein) a ZO-1(zona occludens-1).

### EXTRACELULÁRNÍ DOMÉNA




-  - LNS 1 doména
-  - LNS 2 doména
-  - disulfidické můstky
-  - oblast vázající kolagen
-  - chondroitin sulfátový řetězec
-  - N-vázané oligosacharidy
-  - místa proteolytického štěpení

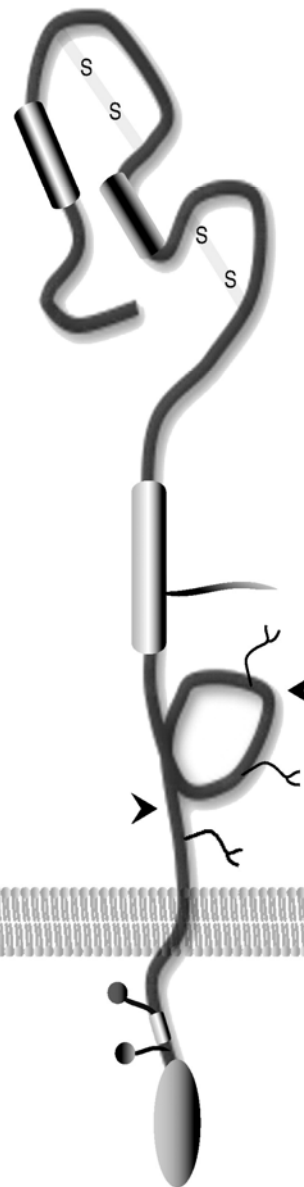
### TRANSMEMBRÁNOVÁ DOMÉNA

-  - transmembránový helix

### NG2 cell membrane

### CYTOPLAZMATICKÁ DOMÉNA

-  - místa fosforylace threoninu
-  - oblast bohatá na prolin
-  - PDZ-vazebný motiv (váže MUPP1, GRIP či Syntenin)



Obr.1: Schéma struktury NG2. Převzato z (Trotter et al., 2010).

Jako transmembránová molekula může NG2 vázat interakční partnery na obou stranách plazmatické membrány a zprostředkovávat tak přenos signálu. Na PDZ-vazebný motiv na C-konci cytoplazmatické domény NG2 se může vázat několik proteinů. Mezi ně patří GRIP1 (Stegmuller et al., 2003), syntenin 1 (Chatterjee et al., 2008) a MUPP1 (Barritt et al., 2000). Všechny patří mezi proteiny obsahující několik PDZ domén.

GRIP1 se váže k PDZ-vazebnému motivu NG2, ale také k podjednotce (GluRB) AMPA glutamátového receptoru. GRIP1 tak zprostředkovává jejich propojení a tvorbu signalizačního komplexu NG2/GRIP1/AMPA. (Stegmuller et al., 2003)

Syntenin1 byl identifikován jako protein vázající syndekan. Později se ukázalo, že je schopen interagovat s mnoha transmembránovými proteiny přes jejich PDZ-vazebné motivy na C-koncích. Obsahuje dvě PDZ domény a je zřejmě důležitý pro buněčnou migraci a invazi (Meerschaert et al., 2007).

Protein MUPP1 obsahuje 13 PDZ domén a prostřednictvím první z nich interaguje s NG2 (Barritt et al., 2000). Struktura a funkce tohoto proteinu bude podrobněji popsána v pozdějších kapitolách této práce.

## 2.2. GLYKOPROTEIN NG2 V NÁDOROVÉ TRANSFORMACI A PROGRESI

Sledujeme-li, kdy dochází k expresi NG2, zjistíme, že multipotentní kmenové buňky NG2 neexprimují. Když začne docházet k částečné diferenciaci buněk (buňky jsou stále vývojově plastické, proliferují a migrují), je exprese NG2 výrazně zvýšená. Poté, při terminální diferenciaci buněk se exprese opět sníží. Při patologických situacích, kdy dochází k obnově buněčné migrace a proliferace (typicky v nádorech), je exprese NG2 znovu obnovena. (Stallcup and Huang, 2008)

Zvýšená exprese NG2 je spojená s progresí řady nádorů, především melanomů (Burg et al., 1998), gliomů (Stallcup and Huang, 2008), sarkomů měkkých tkání (Benassi et al., 2009) či myeloidní leukemie (Smith et al., 1996). V melanomových buňkách zvyšuje exprese NG2 tumorogenní a metastatický potenciál (Burg et al., 1998). Jeho zvýšená exprese koreluje také s metastatickým potenciálem gliomů (Stallcup and Huang, 2008) a sarkomů měkkých tkání (Benassi 2009).

### 2.3. NG2 JAKO INTEGRINY ZASTUPUJÍCÍ ADHEZIVNÍ MOLEKULA

Interakce mezi buňkou a mezibuněčnou hmotou (ECM) je zprostředkována různými druhy povrchových molekul. Hlavními povrchovými proteiny zprostředkovávajícími tuto interakci jsou integriny (Hynes, 1992). Kromě integrinů se na interakci buňky s ECM podílejí také mnohé glykoproteiny, mezi nimi i NG2. Jak bylo výše zmíněno, glykoprotein NG2 je schopen vázat kolagen, především typu VI a V (Burg et al., 1996; Tillet et al., 1997). Studium mechanismu buněčné odpovědi na tuto vazbu je však komplikováno tím, že je tato odpověď zastíněna aktivací integrinových receptorů, které interagují se stejnými ligandy. Proto byly pro účely studia interakce NG2 s jeho fyziologickými ligandy použity buněčné linie GD25, které neexprimují  $\beta 1$  integrin, jenž je zodpovědný za většinu interakcí buňky s ECM (Tillet et al., 2002). Byla testována schopnost GD25 buněk, a GD25 buněk exprimujících NG2 adherovat a rozprostírat se na površích pokrytých fibronectinem, lamininem-1, a různými typy kolagenu (V, VI, I a IV). Ukázalo se, že glykoprotein NG2 je zodpovědný za adhezi buněk na povrchy pokryté kolageny typu V a VI, ne však na povrchy pokryté fibronectinem, lamininem-1 a kolageny typu I a IV. Přičemž jediné interakce s kolagenem typu VI vedla u GD25/NG2 buněk (a nikoli u GD25) k efektivní adhezi buněk. Interakce NG2 s kolagenem typu VI tedy vyvolává buněčnou odpověď spojenou s reorganizací aktinového cytoskeletu. (Tillet et al., 2002)

## 2.4. GLYKOPROTEIN NG2 A INHIBICE RŮSTU NEURITŮ

Mnoho prací ukázalo, že NG2, stejně jako i další chondroitin sulfát proteoglykany, způsobuje inhibici růstu neuritů (Chen et al., 2002; Dou and Levine, 1994; Fidler et al., 1999), přičemž právě NG2 má největší inhibiční účinky (Fidler et al., 1999). Vzhledem k tomu, že NG2 způsobuje inhibici růstu neuritů i po opůsobení ABC chondroitinázou, můžeme usuzovat, že je za inhibiční účinek NG2 zodpovědné core proteinu, a nejen jeho kovalentně vázané chondroitin-sulfátové glykosaminoglykanové řetězce (Dou and Levine, 1994).

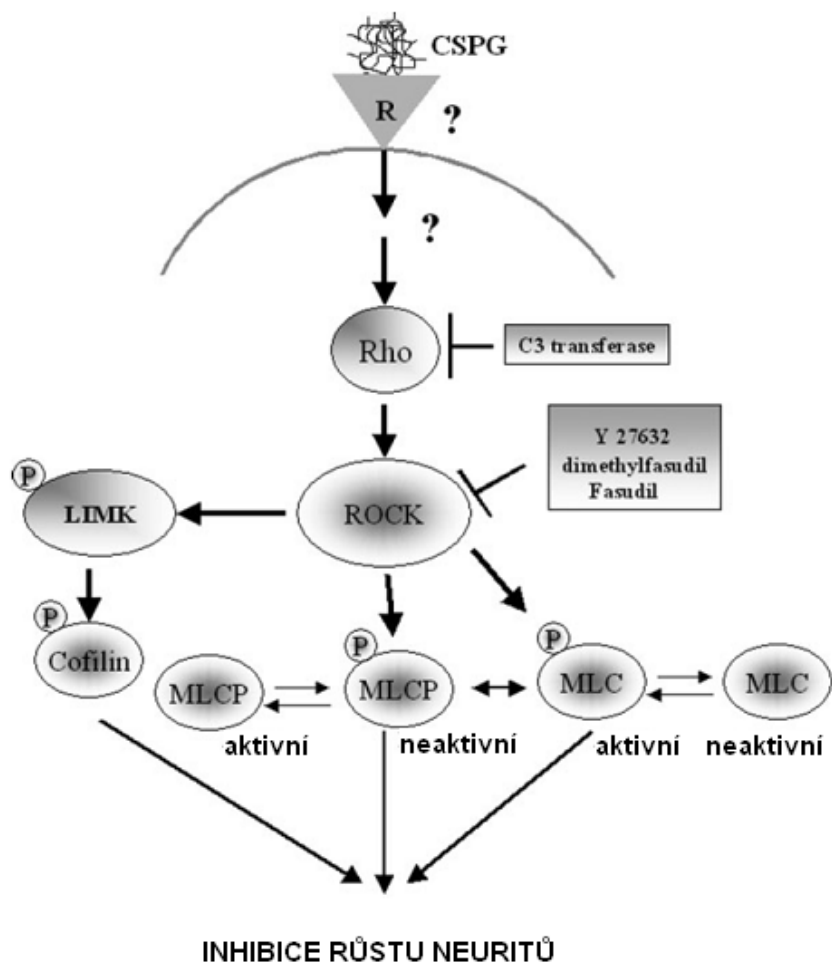
Jakým mechanismem tedy NG2 (nebo obecně chondroitin-sulfát proteoglykany) způsobuje inhibici růstu neuritů?

Při růstu neuritů, kdy dochází k tvorbě výběžků z původně kulaté buňky, je důležitá dynamika aktinového cytoskeletu. Tu mohou regulovat proteiny z rodiny malých GTPáz Rho. Většina molekul inhibujících růst neuritů působí právě přes regulaci Rho (Mueller, 1999; Tang, 2003).

Právě Rho a jeho efektor serine/threoninová kináza ROCK jsou důležitými regulátory aktinového cytoskeletu a jejich aktivace vede mimo jiné k retrakci neuritů nebo k inhibici jejich růstu (Govek et al., 2005; Lehmann et al., 1999; Wahl et al., 2000).

Bylo nepřímo (pomocí inhibitorů) prokázáno, že k inhibici růstu neuritů způsobené chondroitin-sulfát proteoglykany dochází právě v důsledku aktivace Rho/ROCK signalizace. Inhibice růstu neuritů způsobená chondroitin-sulfát proteoglykany byla totiž potlačena přidáním jak Rho inhibitorů (C3-transferáza), tak ROCK inhibitorů (Y27632, fasudil, dimethylfasudil) (Gopalakrishnan et al., 2008; Monnier et al., 2003). Při další analýze bylo zjištěno, že chondroitin-sulfát proteoglykany také zvyšují fosforylaci fosfatázy lehkého řetězce myozinu (MLCP), která je po přidání inhibitorů (fasudil, dimethylfasudil, Y27632) opět snížena. (Gopalakrishnan et al., 2008)

Všechny tyto experimenty ukazují, že NG2 pravděpodobně inhibuje růst neuritů skrze aktivaci Rho/ROCK signalizace. Navrhovaný mechanismus působení chondroitin-sulfát proteoglykanů (CSPG) na inhibici růstu neuritů je znázorněn na obr. 2



Obr. 2: Navrhovaný mechanismus inhibice růstu neuritů pomocí CSPG v buňkách PC12.

Aktivace ROCK pomocí CSPG způsobuje fosforylaci fosfatázy lehkého řetězce myozinu (MLCP). To vede k inhibici MLCP, zvýšené fosforylaci lehkého řetězce myozinu (MLC). ROCK aktivovaný pomocí CSPG fosforyluje (pomocí LIMK) také kofilin. To vede ke stabilizaci aktinových vláken a poklesu růstu neuritů. Inhibitory ROCK (jako Y27632, dimethylfasudil a fasudil) blokuji efekt CSPG na růst neuritů, MLCP a kofilin. Převzato z (Gopalakrishnan et al., 2008).

## 3. RHO/ROCK SIGNALIZACE

### 3.1. RHO GTPÁZY

Rho (Ras homologous) proteiny jsou malé (21 kDa) GTPázy patřící do nadrodiny Ras GTPáz. Rodina Rho GTPáz je tvořena několika skupinami, z nichž nejvýznamnější a nejznámější jsou Rho proteiny, Rac proteiny a Cdc42-like proteiny. Rho GTPázy regulují buněčnou adhezi, invazivitu, migraci, tvorbu filopodií, lamelopodií a stresových vláken, reorganizaci cytoskeletu či buněčnou kontraktilitu. Mohou být buď ve formě inaktivované (kdy váží GDP), nebo ve formě aktivované (vázející GTP). Přičemž pouze v aktivované formě mohou vázat a ovlivňovat efektorové proteiny. Rho GTPázy jsou post-translačně izoprenylovány. To jim umožňuje asociaci s membránou, kde mohou ovlivňovat efektorové proteiny. (Bishop and Hall, 2000; Ellenbroek and Collard, 2007; Evers et al., 2000; Raftopoulou and Hall, 2004)

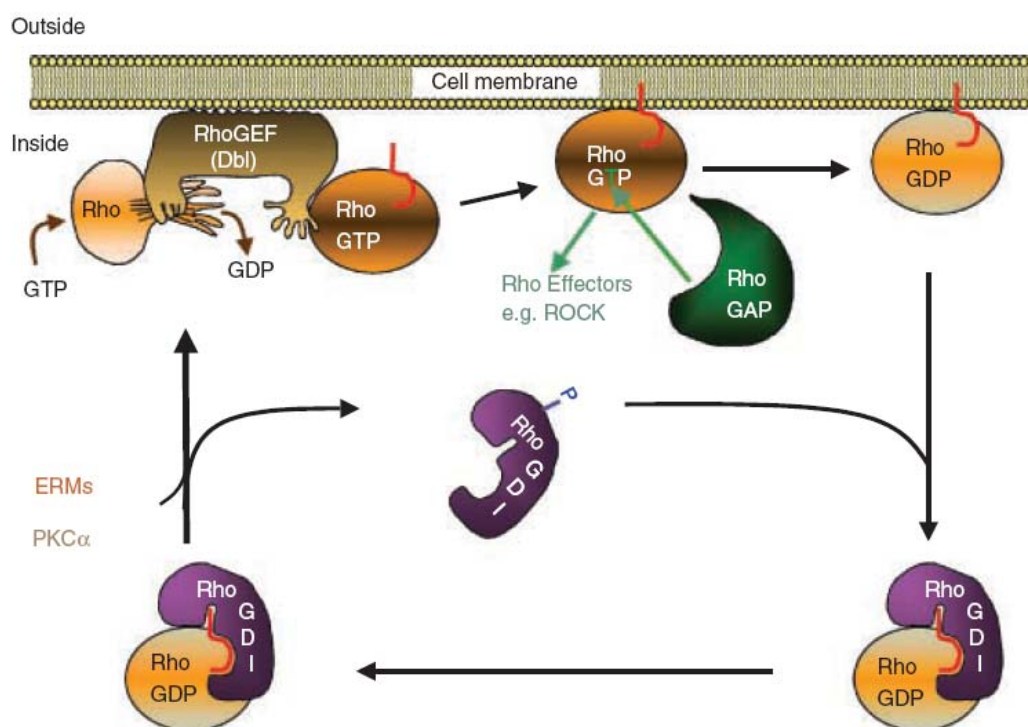
### 3.2. REGULACE RHO GTPÁZ

Aktivita Rho GTPáz je regulována třemi skupinami proteinů: GEF (guanine nukleotide exchange factor), GAP (GTPase-activating protein) a GDI (guanine nukleotide dissociation inhibitor). Regulace Rho GTPáz je znázorněna na obr. 3

GEF katalyzují výměnu GDP za GTP. Vazba GTP má za následek konformační změnu Rho GTPázy, což nakonec vede ke zvýšené afinitě Rho k efektorovému proteinu a tím k aktivaci následných signálních drah. Rho GEF obsahují DH (Dbl homology) doménu a obvykle také PH (Pleckstrin homology) doménu. DH doména je zodpovědná za vlastní katalytickou funkci, tj. uvolnění GDP z Rho, které může být poté nahrazeno GTP (to je v cytoplasmě ve vyšší koncentraci než GDP) (Hart et al., 1994). PH doména interaguje s fosfolipidy a může tak lokalizovat Rho GEF na plazmatickou membránu (Rossman et al., 2005). Pro efektivní vazbu je ale PH doména sama o sobě nedostatečná, a k lokalizaci na plazmatickou membránu zřejmě přispívají ještě další domény těchto proteinů (Baumeister et al., 2006; Rossman et al., 2005; Snyder et al., 2001).

GAP zvyšují jinak slabou schopnost Rho GTPáz hydrolyzovat GTP a tím vedou k inaktivaci Rho a utlumení následných signálních drah.

GDI se váží na izoprenylovou skupinu Rho GTPáz a zabraňují tak jejich lokalizaci na membránu a aktivaci pomocí GEF. Vazba GDI na RhoGDP může být také regulována. Například prostřednictvím ERM (ezrin, radixin, moesin) proteinů (Ivetic and Ridley, 2004) nebo pomocí fosforylace PKC $\alpha$  (je známo, že fosforylace GDI na serinu 34 vede k poklesu afinity GDI $\alpha$  ke RhoA, a tím k jeho uvolnění) (Dovas et al., 2010; Mehta et al., 2001).



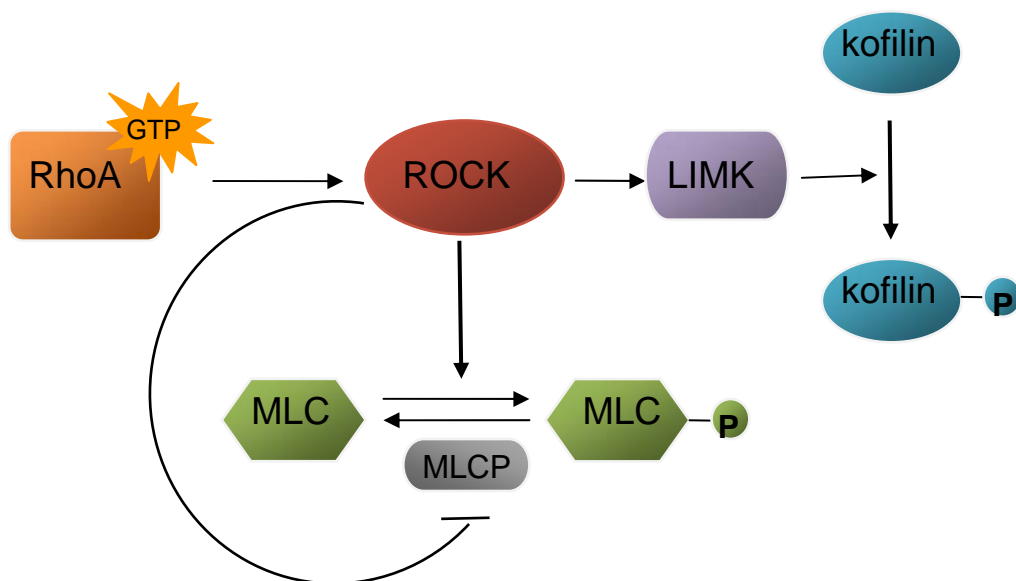
Obr.3: Regulace Rho GTPáz.

*V nestimulovaných buňkách jsou Rho GTPázy udržovány v inaktivním stavu v cytoplazmě pomocí vazby RhoGDI (znázorněno fialově) na jejich izoprenylovou skupinu (červeně). Disociace Rho GDI od Rho může být způsobena fosforylací nebo interakcí s aktivovanými ezrin/radixin/moesin (ERM) proteiny. To umožní inkorporaci izoprenylové skupiny do membrány. Na membráně dochází k interakci s Rho GEF, který indukuje výměnu GDP za GTP. Rho s navázaným GTP váže a aktivuje další proteiny (např. ROCK). Rho GAP (zeleně) inaktivují Rho GTPázy tím, že zvyšují jejich GTPázovou aktivitu. To vede k urychlení hydrolyzy GTP na GDP. Rho GTPáza vázající GDP může být odstraněna z membrány navázáním Rho GDI. Převzato z (Ivetic and Ridley, 2004).*

### 3.3. RHO/ROCK SIGNALIZACE

Jedním z efektorových proteinů Rho GTPázy je serin/treoninová kináza ROCK (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase) (Ishizaki et al., 1996). ROCK obsahuje katalytickou doménu na N-konci, centrální „coiled coil“ doménu a C-terminální PH doménu. Rho aktivuje ROCK tím, že se naváže na C-konec „coiled coil“ domény (Amano et al., 2010). Je známo, že ROCK reguluje dynamiku aktinového cytoskeletu, buněčnou migraci, aktomyozinem zprostředkovanou buněčnou kontrakci, trakční síly buňky, růst neuritů či buněčnou adhezi (Riento and Ridley, 2003).

ROCK zesiluje trakční síly a zvyšuje kontraktilitu buněk několika různými způsoby. Jednak fosforylací inhibičních míst (Thr 853 a Thr 696) regulační podjednotky fosfatázy lehkého řetězce myozinu (MLCP) (Kimura et al., 1996), dále pak přímou fosforylací lehkého řetězce myozinu (MLC) (Amano et al., 1996; Wyckoff et al., 2006) a pomocí aktivace LIMK (Maekawa et al., 1999). Aktivovaná LIMK vede k fosforylaci a tím následné inaktivaci aktin-depolymeračního faktoru kofilinu a stabilizaci aktinových filament. (Amano et al., 2010) Tyto procesy jsou znázorněny na obr. 4.



Obr. 4: Rho/ROCK signalizace.

*Rho s navázaným GTP aktivuje ROCK. Ten může buď přímo nebo zprostředkovaně, pomocí inhibice MLCP, fosforylovat MLC. ROCK také fosforyluje LIMK, což vede k její aktivaci. LIMK fosforyluje kofilin a tím ho inaktivuje.*

### 3.4. RHO/ROCK A BUNĚČNÁ INVAZIVITA

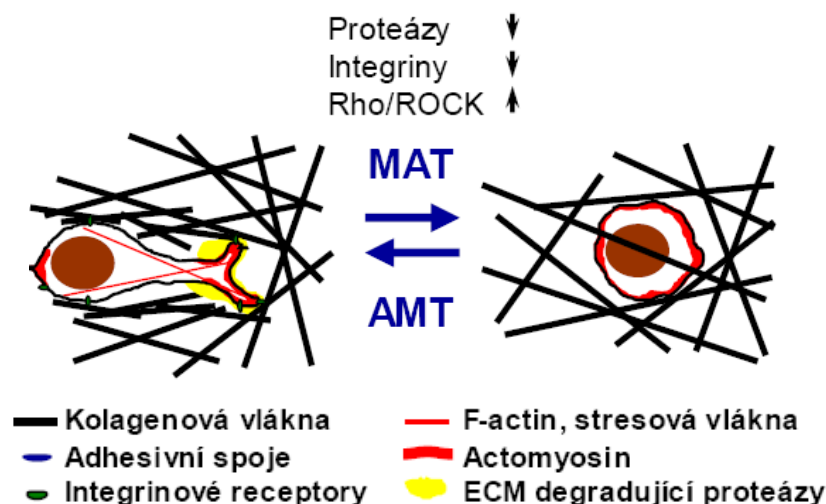
Míra vlivu Rho/ROCK signalizace v buněčné migraci je závislá na typu buněčné invazivity (Nakayama et al., 2005).

Rozlišujeme dva základní druhy invazivity: kolektivní a individuální. Při kolektivní invazivně migrují buňky ve skupinách, kde jsou mezi sebou propojeny mezibuněčnými spoji (Friedl and Gilmour, 2009). V případě individuální invazivity migrují buňky jednotlivě. Rozeznáváme dva odlišné způsoby individuální invazivity: mezenchymální a améboidní, viz obr. 4. (Friedl, 2004).

Mezenchymální způsob invazivity je závislý na proteolytické degradaci ECM. U buněk vykazujících mezenchymální typ invazivity byla pozorována zvýšená exprese integrinů a proteáz. Ve 3D kolagenu mají nádorové buňky mezenchymálního typu protáhlý tvar s filopodií a lamelopodií na předním konci. Tvorba těchto struktur je závislá na aktivaci GTPáz podrodiny Rac. (Friedl, 2004; Pankova et al., 2010)

Améboidně migrující buňky mají ve 3D prostředí kulatý tvar a jejich migrace je nezávislá na proteázové degradaci ECM (Wolf et al., 2003). Invaze skrz mezibuněčnou hmotu jsou tyto buňky schopny zejména díky zvýšené kontraktilitě a trakční síle. K těmto procesům vede právě aktivace Rho/ROCK signalizace, a proto je pro tento způsob invazivity Rho/ROCK signalizace klíčová (Rosel et al., 2008). Améboidně migrující buňky mají sníženou expresi proteáz a integrinů, a je pro ně typický kortikální aktomyosin. Améboidní způsob migrace je také řádově rychlejší než mezenchymální. (Pankova et al., 2010; Sahai and Marshall, 2003)

Oba typy invazivity jsou přitom vzájemně zaměnitelné a přepnutí mezi nimi je možné vyvolat zvýšením, nebo naopak potlačením molekulárních drah, specifických pro jeden z módů. Tento proces se nazývá mezenchymálně-améboidní přechod (MAT) respektive améboidně-mezenchymální přechod (AMT). (Friedl, 2004; Pankova et al., 2010; Sahai and Marshall, 2003; Wolf et al., 2003)



Obr.4: Améboidní a mezenchymální způsob invazivity a přechod mezi nimi.

Mezenchymální buňky jsou ve 3D prostředí protáhlé, polarizované a aktomyozin mají lokalizovaný na přední straně buňky, zatímco améboidní buňky mají ve 3D prostředí typicky kulatý tvar s aktomyosinem po okraji buňky. Snížení aktivity integrinů či proteáz nebo zvýšení aktivity Rho/ROCK signalizace vede u mezenchymálních buněk k přechodu na améboidní migraci (MAT). Naopak inhibice Rho/ROCK signalizace může vést k přechodu améboidně-mezenchymálnímu (AMT). Převzato a upraveno podle (Brabek et al., 2010).

Jak již bylo výše zmíněno, v améboidně migrujících buňkách je adheze k ECM dynamičtější a exprese integrinů je významně snížena (Friedl, 2004). Adhezi takových buněk k ECM tedy zřejmě více než integriny zajišťují jiné molekuly. O glykoproteinu NG2 je přitom známo, že může fungovat jako adhezivní molekula zastupující integriny. Navíc v améboidně migrujících buňkách byla pozorována výrazně zvýšená exprese NG2. Je tedy možné, že právě NG2 je molekulou, která zprostředkovává na integrinech nezávislou adhezi, kterou améboidně migrující buňky potřebují.

### 3.5. PARALELY MEZI INHIBICÍ RŮSTU NEURITŮ A MAT

Inhibice růstu neuritů a mezenchymálně-améboidní přechod jsou si v mnoha ohledech podobné. Při obou procesech například dochází k obdobným morfologickým změnám. Při MAT se mezenchymální buňky s invadopodií mění na kulaté améboidní buňky; během inhibice růstu neuritů dochází k redukci počtu a délky neuritů. V obou případech se tedy buňky, které mají hodně výběžků, mění na buňky kulatého tvaru, s menším počtem výběžků. Jak bylo výše popsáno, je také pro oba procesy zásadní aktivovaná Rho/ROCK signalizace. V neposlední řadě oba procesy spojuje také glykoprotein NG2.

## 4. MOŽNÝ MECHANISMUS PŮSOBENÍ NG2 NA RHO/ROCK SIGNALIZACI

Jestliže je tedy NG2 zodpovědný za změny aktinového cytoskeletu, zvýšenou invazivitu a metastatický potenciál nádorových buněk, bylo by velmi žádoucí znát molekulární mechanismy tohoto působení. V poslední době přibývá prací poukazujících na propojení glykoproteinu NG2 a Rho/ROCK signalizace. V předchozích kapitolách této práce bylo popsáno, že:

- glykoprotein NG2 způsobuje inhibici růstu neuritů zřejmě prostřednictvím aktivace Rho/ROCK dráhy
- Rho, ROCK i NG2 jsou zodpovědné za změny aktinového cytoskeletu
- zvýšená exprese Rho, ROCK i NG2 byla popsána u vysoce metastatických melanomových buněk
- NG2 by mohl sloužit jako adhezivní molekula v améboidně migrujících buňkách.

Navíc množství ROCK (Itoh et al., 1999; Wang et al., 2002), stejně tak jako NG2 (Cavanna et al., 2007) koreluje s metastatickým potenciálem nádorových buněk. Vše tedy naznačuje, že změnu aktinového cytoskeletu a zvýšenou invazivitu nádorových buněk způsobuje NG2 pomocí aktivace Rho/ROCK signalizace.

Jaký je tedy možný molekulární mechanismus tohoto působení?

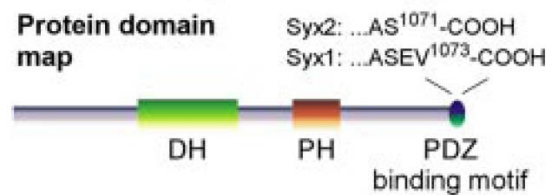
### 4.1. NG2 VÁŽE PROTEIN MUPP1

Pro buněčnou migraci a adhezi buňky je nezbytná jeho cytoplazmatická doména (Fang et al., 1999). NG2 má na C-konci cytoplazmatické domény PDZ vazebný motiv, který interaguje s proteinem MUPP1 (Barritt et al., 2000). MUPP1 je 2054 aminokyselin dlouhý protein, který obsahuje 13 PDZ domén, ale žádnou katalytickou doménu (Ullmer et al., 1998). Svoji první PDZ doménou interaguje s NG2, a může ho tak propojovat s dalšími cytoplazmatickými proteiny obsahujícími PDZ-vazebné motivy a umožnit vytvoření multimerních signálních komplexů.

## 4.2. GEF PROTEIN SYX

Aktivace Rho/ROCK dráhy vyžaduje Rho vázající GTP. Pro aktivaci Rho/ROCK dráhy je tedy zásadní některý z GEF, zprostředkovávající aktivaci Rho. Jedním z RhoA specifických GEF je i Syx (synectin-binding RhoA exchange factor; označovaný také jako GEF720 nebo PLEKHG5) (De Toledo et al., 2001). Kromě PH a DH domény, společné pro všechny RhoGEF, obsahuje Syx na svém C-konci ještě PDZ-vazebný motiv.

Byly identifikovány dvě sestříhové varianty tohoto proteinu: Syx1 a Syx2. Ty se od sebe liší pouze tím, že Syx2 je o dvě aminokyseliny kratší než Syx1, takže Syx2 neobsahuje PDZ-vazebný motiv (obr. 5).



Obr.5: Dvě sestříhové varianty Syx: Syx1 a o dvě aminokyseliny kratší Syx2.

Převzato z (Liu and Horowitz, 2006).

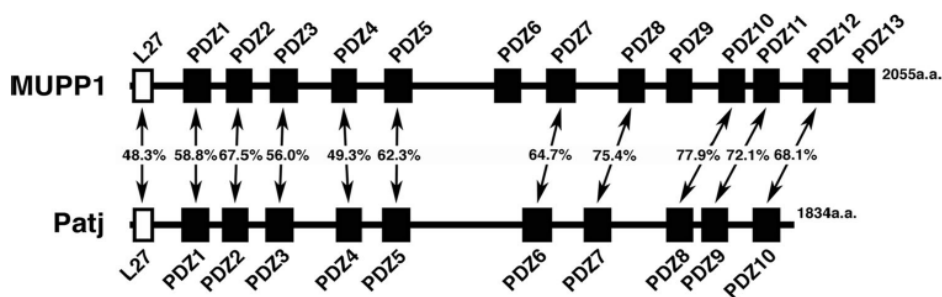
Přestože se od sebe jednotlivé sestříhové varianty liší pouze o dvě koncové aminokyseliny, jejich vlastnosti jsou velmi rozdílné. Většina Syx1 je lokalizována na plazmatické membráně, zatímco většina Syx2 je cytoplazmatická. Exprese Syx1 zvyšuje schopnost migrace endoteliálních buněk, exprese Syx2 nikoli. PDZ vazebný motiv je tedy zřejmě zásadní pro správnou lokalizaci Syx a jeho katalytickou funkci (tj. schopnost aktivovat RhoA). (Liu and Horowitz, 2006)

### 4.3. MOŽNÉ PROPOJENÍ PROTEINŮ MUPP1 A SYX

Nedávné výsledky naznačují propojení mezi proteiny MUPP1 a Syx. Ukázalo se, že Tech (Transkript highly enriched in cortex and hippocampus; označovaný také jako Plekhg5), potkaní ortolog proteinu Syx, interaguje *in vivo* s PDZ doménou (10 nebo 13) proteinu MUPP1 (Estevez et al., 2008). Dále bylo zjištěno, že Syx interaguje s proteinem Patj, který je paralogem proteinu MUPP1, a že komplex Amot/Patj/Syx reguluje GTPázovou aktivitu RhoA (Ernkvist et al., 2009).

Patj a MUPP1 jsou přitom velmi podobné proteiny (obr. 6). Oba dva obsahují L27 doménu a velké množství PDZ domén (Patj jich má 10, MUPP1 13). Mají také mnoho společných vazebných partnerů (jako např.: JAM1, ZO-3, Pals1, nectin) a obdobnou buněčnou lokalizaci. Oba také fungují jako tzv. „scaffold“ proteiny, a mohou tedy propojovat jednotlivé proteiny a zajišťovat jejich buněčnou lokalizaci. (Adachi et al., 2009)

Jestliže se tedy Syx váže k Patj (paralogu proteinu MUPP1) a zároveň se Tech (ortolog proteinu Syx) váže k MUPP1, můžeme předpokládat, že se i Syx může vázat k MUPP1.



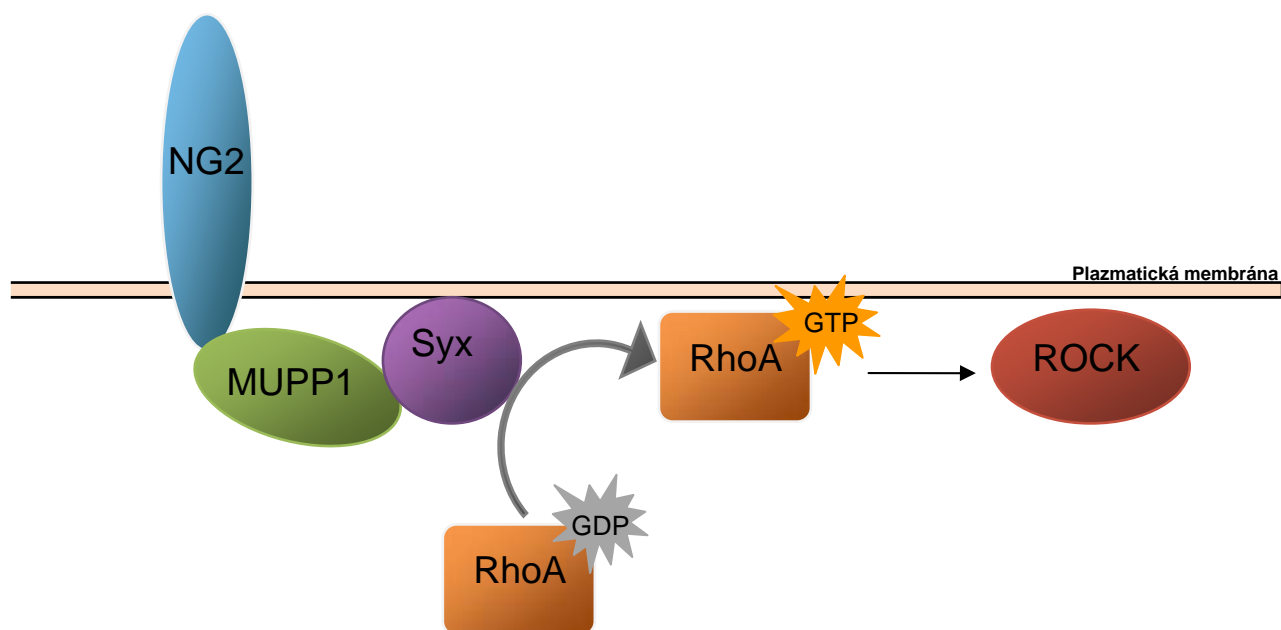
Obr. 6.: Schematické znázornění MUPP1 a Patj.

MUPP1 má L27 doménu a 13 PDZ domén, zatímco Patj má L27 doménu a 10 PDZ domén. Znázorněná je také (aminokyselinová) sekvenční identita mezi jednotlivými L27 a PDZ doménami. Všimněte si, že Patj neobsahuje domény, které odpovídají PDZ doménám 6 až 9 a 13 proteinu MUPP1. PDZ doména 10 proteinu MUPP1 vykazuje nejvyšší sekvenční identitu s homologickou PDZ doménou 8 proteinu Patj. Hodnoty sekvenční identity jsou vypočítány pomocí programu Genetyx Mac. Převzato z (Adachi et al., 2009).

#### 4.4. SIGNALIZAČNÍ KOMPLEX NG2/MUPP1/SYX ?

Vydeme-li z výše uvedených předpokladů, můžeme dospět k následující úvaze:

C-konec cytoplazmatické domény NG2 váže protein MUPP1. Ten patří mezi PDZ proteiny a jako takový má funkci adaptorového proteinu. Je známo, že proteiny s PDZ doménami interagují s C-konci membránových receptorů a tím zajišťují jejich propojení s cytoskeletálními či signalizačními proteiny (Craven and Brecht, 1998). Na PDZ doménu proteinu MUPP1 se zřejmě může vázat RhoA specifický GEF Syx. A jestliže víme, že PDZ vazebný motiv tohoto proteinu je důležitý pro jeho funkci a lokalizaci na plazmatickou membránu, mohla by být jeho vazba k proteinu MUPP1, který je díky vazbě k NG2 lokalizován v blízkosti plazmatické membrány, zásadní pro správnou lokalizaci a funkci proteinu Syx. Syx by pak jakožto RhoGEF mohl aktivovat signální dráhu Rho/ROCK. Obr. 7 zobrazuje tuto navrhovanou hypotézu.



Obr. 7: Navrhovaný mechanismus regulace Rho/ROCK signalizace glykoproteinem NG2.

Na PDZ-vazebný motiv aktivovaného NG2 se váže protein MUPP1. PDZ doména proteinu MUPP1 může zároveň interagovat s RhoA specifickým GEF proteinem Syx. Signalizační komplex NG2/MUPP1/Syx by pak mohl vést k aktivaci Rho/ROCK signalizace.

#### 4.5. JINÉ MOŽNOSTI PROPOJENÍ?

Vzhledem k tomu, že zatím ještě nebyla zkoumána existence signálního komplexu NG2/MUPP1/Syx a jeho úloha v aktivaci Rho/ROCK signalizace, je možné, že k aktivaci Rho/ROCK dráhy prostřednictvím NG2 dochází přes jiné signální molekuly než MUPP1 a Syx. Je například možné, že se aktivace Rho v této dráze účastní jiný Rho GEF, obsahující podobně jako Syx PDZ-vazebný motiv.

V úvahu připadá také protein Syntenin1, který se váže na stejné místo (PDZ-vazebný motiv) NG2 jako protein MUPP1. Syntenin1, který obsahuje dvě PDZ domény, je totiž spojován s aktivací RhoA (Bass and Humphries, 2002; Zimmermann et al., 2001) a procesy jako je buněčná migrace (Chatterjee et al., 2008), invazivita (Meerschaert et al., 2007) nebo tvorba metastáz (Sarkar et al., 2004).

## 5. ZÁVĚR

NG2 je glykoprotein účastnící se procesů významných jak pro vyvíjející se buňky, tak pro tvorbu nádorů a metastáz (jako je buněčná migrace, proliferace či adheze). Jeho vazba na kolagen VI vede k reorganizaci aktinového cytoskeletu, a mohl by tudíž zastupovat adhezivní funkci integrinů při améboidní invazi buněk. Pro tento typ invazivity je také zásadní aktivace Rho/ROCK signalizace. NG2 zřejmě může zajišťovat aktivaci této dráhy a to patrně prostřednictvím vazby proteinu MUPP1, na který se může vázat protein Syx. Syx pak jakožto RhoGEF může aktivovat Rho/ROCK signalizaci. Aktivovaný ROCK způsobuje zvýšení trakčních sil a kontraktility buňky, a tím vede ke schopnosti améboidně migrujících buněk invadovat skrz ECM.

O aktivaci Rho/ROCK signalizace pomocí NG2 je toho však zatím známo velmi málo. Zda dochází k aktivaci Rho/ROCK signalizace pomocí komplexu NG2/MUPP1/Syx je tedy teprve předmětem budoucího výzkumu.

## SEZNAM LITERATURY:

Adachi, M., Hamazaki, Y., Kobayashi, Y., Itoh, M., Tsukita, S., and Furuse, M. (2009). Similar and Distinct Properties of MUPP1 and Patj, Two Homologous PDZ Domain-Containing Tight-Junction Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 29, 2372-2389.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Journal of Biological Chemistry* 271, 20246-20249.

Amano, M., Nakayama, M., and Kaibuchi, K. (2010). Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity. *Cytoskeleton* 67, 545-554.

Barritt, D. S., Pearn, M. T., Zisch, A. H., Lee, S. S., Javier, R. T., Pasquale, E. B., and Stallcup, W. B. (2000). The multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cytoplasmic ligand for the membrane-spanning proteoglycan NG2. *Journal of Cellular Biochemistry* 79, 213-224.

Bass, M. D., and Humphries, M. J. (2002). Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *Biochemical Journal* 368, 1-15.

Baumeister, M. A., Rossman, K. L., Sondek, J., and Lemmon, M. A. (2006). The Dbs PH domain contributes independently to membrane targeting and regulation of guanine nucleotide-exchange activity. *Biochemical Journal* 400, 563-572.

Benassi, M. S., Pazzaglia, L., Chiechi, A., Alberghini, M., Conti, A., Cattaruzza, S., Wassermann, B., Picci, P., and Perris, R. (2009). NG2 Expression Predicts the Metastasis Formation in Soft-Tissue Sarcoma Patients. *Journal of Orthopaedic Research* 27, 135-140.

Bishop, A. L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal* 348, 241-255.

Brabek, J., Mierke, C. T., Rosel, D., Vesely, P., and Fabry, B. (2010). The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell Communication and Signaling* 8.

Burg, M. A., Grako, K. A., and Stallcup, W. B. (1998). Expression of the NG2 proteoglycan enhances the growth and metastatic properties of melanoma cells. *Journal of Cellular Physiology* 177, 299-312.

Burg, M. A., Nishiyama, A., and Stallcup, W. B. (1997). A central segment of the NG2 proteoglycan is critical for the ability of glioma cells to bind and migrate toward type VI collagen. *Experimental Cell Research* 235, 254-264.

Burg, M. A., Tillet, E., Timpl, R., and Stallcup, W. B. (1996). Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. *Journal of Biological Chemistry* 271, 26110-26116.

Cavanna, T., Pokorna, E., Vesely, P., Gray, C., and Zicha, D. (2007). Evidence for protein 4.1B acting as a metastasis suppressor. *Journal of Cell Science* 120, 606-616.

- Chatterjee, N., Stegmuller, J., Schatzle, P., Karram, K., Koroll, M., Werner, H. B., Nave, K. A., and Trotter, J. (2008). Interaction of syntenin-1 and the NG2 proteoglycan in migratory oligodendrocyte precursor cells. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 8310-8317.
- Chen, Z. J., Negra, M., Levine, A., Ughrin, Y., and Levine, J. M. (2002). Oligodendrocyte precursor cells: Reactive cells that inhibit axon growth and regeneration. *Journal of Neurocytology* *31*, 481-495.
- Craven, S. E., and Bredt, D. S. (1998). PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell* *93*, 495-498.
- De Toledo, M., Coulon, V., Schmidt, S., Fort, P., and Blangy, A. (2001). The gene for a new brain specific RhoA exchange factor maps to the highly unstable chromosomal region 1p36.2-1p36.3. *Oncogene* *20*, 7307-7317.
- Dou, C. L., and Levine, J. M. (1994). Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. *Journal of Neuroscience* *14*, 7616-7628.
- Dovas, A., Choi, Y., Yoneda, A., Mulhaupt, H. A. B., Kwon, S. H., Kang, D., Oh, E. S., and Couchman, J. R. (2010). Serine 34 Phosphorylation of Rho Guanine Dissociation Inhibitor (RhoGDI alpha) Links Signaling from Conventional Protein Kinase C to RhoGTPase in Cell Adhesion. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 23294-23306.
- Ellenbroek, S. I. J., and Collard, J. G. (2007). Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clinical & Experimental Metastasis* *24*, 657-672.
- Ernkvist, M., Persson, N. L., Audebert, S., Lecine, P., Sinha, I., Liu, M., Schlueter, M., Horowitz, A., Aase, K., Weide, T., *et al.* (2009). The Amot/Patj/Syx signaling complex spatially controls RhoA GTPase activity in migrating endothelial cells. *Blood* *113*, 244-253.
- Estevez, M. A., Henderson, J. A., Ahn, D., Zhu, X. R., Poschmann, G., Lubbert, H., Marx, R., and Baraban, J. M. (2008). The neuronal RhoA GEF, Tech, interacts with the synaptic multi-PDZ-domain-containing protein, MUPP1. *Journal of Neurochemistry* *106*, 1287-1297.
- Evers, E. E., Zondag, G. C. M., Malliri, A., Price, L. S., ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (2000). Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *European Journal of Cancer* *36*, 1269-1274.
- Fang, X. X., Burg, M. A., Barritt, D., Dahlin-Huppe, K., Nishiyama, A., and Stallcup, W. B. (1999). Cytoskeletal reorganization induced by engagement of the NG2 proteoglycan leads to cell spreading and migration. *Molecular Biology of the Cell* *10*, 3373-3387.
- Fidler, P. S., Schuette, K., Asher, R. A., Dobbertin, A., Thornton, S. R., Calle-Patino, Y., Muir, E., Levine, J. M., Geller, H. M., Rogers, J. H., *et al.* (1999). Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *Journal of Neuroscience* *19*, 8778-8788.
- Friedl, P. (2004). Preshaping and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* *16*, 14-23.

- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 445-457.
- Gopalakrishnan, S. M., Teusch, N., Imhof, C., Bakker, M. H. M., Schurdak, M., Burns, D. J., and Warrior, U. (2008). Role of rho kinase pathway in chondroitin sulfate proteoglycan-mediated inhibition of neurite outgrowth in PC12 cells. *Journal of Neuroscience Research* 86, 2214-2226.
- Goretzki, L., Burg, M. A., Grako, K. A., and Stallcup, W. B. (1999). High-affinity binding of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-AA to the core protein of the NG2 proteoglycan. *Journal of Biological Chemistry* 274, 16831-16837.
- Govek, E. E., Newey, S. E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & Development* 19, 1-49.
- Grako, K. A., Ochiya, T., Barritt, D., Nishiyama, A., and Stallcup, W. B. (1999). PDGF alpha-receptor is unresponsive to PDGF-AA in aortic smooth muscle cells from the NG2 knockout mouse. *Journal of Cell Science* 112, 905-915.
- Hart, M. J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S. A., Evans, T., Cerione, R. A., and Zheng, Y. (1994). cellular-transformation and guanine-nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the Dbl oncogene product. *Journal of Biological Chemistry* 269, 62-65.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins - versatility, modulation, and signaling in cell-adhesion. *Cell* 69, 11-25.
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N., and Narumiya, S. (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo Journal* 15, 1885-1893.
- Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1999). An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nature Medicine* 5, 221-225.
- Ivetic, A., and Ridley, A. J. (2004). Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology* 112, 165-176.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J. H., Nakano, T., Okawa, K., *et al.* (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-Associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245-248.
- Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G., and McKerracher, L. (1999). Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *Journal of Neuroscience* 19, 7537-7547.
- Liu, M. L., and Horowitz, A. (2006). A PDZ-binding motif as a critical determinant of Rho guanine exchange factor function and cell phenotype. *Molecular Biology of the Cell* 17, 1880-1887.

- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999). Signaling from rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-898.
- Makagiansar, I. T., Williams, S., Dahlin-Huppe, K., Fukushi, J., Mustelin, T., and Stallcup, W. B. (2004). Phosphorylation of NG2 proteoglycan by protein kinase C-alpha regulates polarized membrane distribution and cell motility. *Journal of Biological Chemistry* 279, 55262-55270.
- Makagiansar, I. T., Williams, S., Mustelin, T., and Stallcup, W. B. (2007). Differential phosphorylation of NG2 proteoglycan by ERK and PKC alpha helps balance cell proliferation and migration. *Journal of Cell Biology* 178, 155-165.
- Meerschaert, K., Bruyneel, E., De Weuer, O., Vanloo, B., Boucherie, C., Bracke, M., Vandekerckhove, J., and Gettemans, J. (2007). The tandem PDZ domains of syntenin promote cell invasion. *Experimental Cell Research* 313, 1790-1804.
- Mehta, D., Rahman, A., and Malik, A. B. (2001). Protein kinase C-alpha signals Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and Rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *Journal of Biological Chemistry* 276, 22614-22620.
- Monnier, P. P., Sierra, A., Schwab, J. M., Henke-Fahle, S., and Mueller, B. K. (2003). The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Molecular and Cellular Neuroscience* 22, 319-330.
- Mueller, B. K. (1999). Growth cone guidance: First steps towards a deeper understanding. *Annual Review of Neuroscience* 22, 351-388.
- Nakayama, M., Amano, M., Katsumi, A., Kaneko, T., Kawabata, S., Takefuji, M., and Kaibuchi, K. (2005). Rho-kinase and myosin II activities are required for cell type and environment specific migration. *Genes to Cells* 10, 107-117.
- Nishiyama, A., Dahlin, K. J., Prince, J. T., Johnston, S. R., and Stallcup, W. B. (1991a). The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan. *Journal of Cell Biology* 114, 359-371.
- Nishiyama, A., Dahlin, K. J., and Stallcup, W. B. (1991b). The expression of NG2 proteoglycan in the developing rat limb. *Development* 111, 933-944.
- Nishiyama, A., Lin, X. H., Giese, N., Heldin, C. H., and Stallcup, W. B. (1996). Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. *Journal of Neuroscience Research* 43, 315-330.
- Nishiyama, A., Lin, X. H., and Stallcup, W. B. (1995). generation of truncated forms of the NG2 proteoglycan by cell-surface proteolysis. *Molecular Biology of the Cell* 6, 1819-1832.
- Pankova, K., Rosel, D., Novotny, M., and Brabek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 63-71.

- Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology* 265, 23-32.
- Riento, K., and Ridley, A. J. (2003). Rocks: Multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 446-456.
- Rosel, D., Brabek, J., Tolde, O., Mierke, C. T., Zitterbart, D. P., Raupach, C., Bicanova, K., Kollmannsberger, P., Pankova, D., Vesely, P., *et al.* (2008). Up-regulation of Rho/ROCK signaling in sarcoma cells drives invasion and increased generation of protrusive forces. *Molecular Cancer Research* 6, 1410-1420.
- Rossman, K. L., Der, C. J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: Turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 167-180.
- Sahai, E., and Marshall, C. J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nature Cell Biology* 5, 711-719.
- Sarkar, D., Boukerche, H., Su, Z. Z., and Fisher, P. B. (2004). mda-9/syntenin: recent insights into a novel cell signaling and metastasis-associated gene. *Pharmacology & Therapeutics* 104, 101-115.
- Smith, F. O., Rauch, C., Williams, D. E., March, C. J., Arthur, D., Hilden, J., Lampkin, B. C., Buckley, J. D., Buckley, C. V., Woods, W. G., *et al.* (1996). The human homologue of rat NG2, a chondroitin sulfate proteoglycan, is not expressed on the cell surface of normal hematopoietic cells but is expressed by acute myeloid leukemia blasts from poor-prognosis patients with abnormalities of chromosome band 11q23. *Blood* 87, 1123-1133.
- Snyder, J. T., Rossman, K. L., Baumeister, M. A., Pruitt, W. M., Siderovski, D. P., Der, C. J., Lemmon, M. A., and Sondek, J. (2001). Quantitative analysis of the effect of phosphoinositide interactions on the function of Dbl family proteins. *Journal of Biological Chemistry* 276, 45868-45875.
- Stallcup, W. B. (1981). The NG2 antigen, a putative lineage marker - immunofluorescent localization in primary cultures of rat-brain. *Developmental Biology* 83, 154-165.
- Stallcup, W. B. (2002). The NG2 proteoglycan: Past insights and future prospects. *Journal of Neurocytology* 31, 423-435.
- Stallcup, W. B., Beasley, L., and Levine, J. (1983). cell-surface molecules that characterize different stages in the development of cerebellar interneurons. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 48, 761-774.
- Stallcup, W. B., and Dahlin-Huppe, K. (2001). Chondroitin sulfate and cytoplasmic domain-dependent membrane targeting of the NG2 proteoglycan promotes retraction fiber formation and cell polarization. *Journal of Cell Science* 114, 2315-2325.
- Stallcup, W. B., and Huang, F. J. (2008). A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. *Cell Adh Migr* 2, 192-201.

- Stegmuller, J., Werner, H., Nave, K. A., and Trotter, J. (2003). The proteoglycan NG2 is complexed with alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by the PDZ glutamate receptor interaction protein (GRIP) in glial progenitor cells - Implications for glial-neuronal signaling. *Journal of Biological Chemistry* 278, 3590-3598.
- Tang, B. L. (2003). Inhibitors of neuronal regeneration: mediators and signaling mechanisms. *Neurochemistry International* 42, 189-203.
- Tillet, E., Gential, B., Garrone, R., and Stallcup, W. B. (2002). NG2 proteoglycan mediates beta(1) integrin-independent cell adhesion and spreading on collagen VI. *Journal of Cellular Biochemistry* 86, 726-736.
- Tillet, E., Ruggiero, F., Nishiyama, A., and Stallcup, W. B. (1997). The membrane-spanning proteoglycan NG2 binds to collagens V and VI through the central nonglobular domain of its core protein. *Journal of Biological Chemistry* 272, 10769-10776.
- Trotter, J., Karram, K., and Nishiyama, A. (2010). NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Research Reviews* 63, 72-82.
- Ullmer, C., Schmuck, K., Figge, A., and Lubbert, H. (1998). Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *Febs Letters* 424, 63-68.
- Wahl, S., Barth, H., Ciossek, T., Aktories, K., and Mueller, B. K. (2000). Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *Journal of Cell Biology* 149, 263-270.
- Wang, W. G., Wyckoff, J. B., Frohlich, V. C., Oleynikov, Y., Huttelmaier, S., Zavadil, J., Cermak, L., Bottinger, E. P., Singer, R. H., White, J. G., *et al.* (2002). Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Research* 62, 6278-6288.
- Wen, Y. F., Makagiansar, I. T., Fukushi, J., Liu, F. T., Fukuda, M. N., and Stallcup, W. B. (2006). Molecular basis of interaction between NG2 proteoglycan and galectin-3. *Journal of Cellular Biochemistry* 98, 115-127.
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., Deryugina, E. I., Strongin, A. Y., Bocker, E. B., and Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *Journal of Cell Biology* 160, 267-277.
- Wyckoff, J. B., Pinner, S. E., Gschmeissner, S., Condeelis, J. S., and Sahai, E. (2006). ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Current Biology* 16, 1515-1523.
- Zimmermann, P., Tomatis, D., Rosas, M., Grootjans, J., Leenaerts, I., Degeest, G., Reekmans, G., Coomans, C., and David, G. (2001). Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments. *Molecular Biology of the Cell* 12, 339-350.