

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Andrea Sára Šulcová

Úloha proteinů rodiny NAV v progresi nádorů
The role of NAV proteins in cancer progression

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Jan Brábek, Ph.D

Praha, 2024

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Janu Brábkovi, Ph.D za odborné vedení, velikou trpělivost, ochotu a cenné rady, které mi při zpracování bakalářské práce pomohly. Také bych ráda poděkovala mé rodině a přátelům za jejich neustálou podporu.

Abstrakt:

Tato bakalářská práce se zabývá shrnutím dosavadních poznatků o neuron navigátorových proteinech (NAV) v migraci nádorových buněk. Neuron navigátorové proteiny jsou proteiny asociované s cytoskeletem. Interagují s mikrotubuly i aktinovými vlákny. Obsahují několik konzervovaných domén, které se mezi isoformami rodin neuron navigátorových proteinů moc neliší. Dále obsahují různé další motivy, které se často překrývají a nejsou proto konzervované. Nejlépe prostudovaná je úloha neuron navigátorových proteinů v růstu a vedení axonů. Recentní studie ovšem ukazují na jejich důležitou roli v regulaci migrace, invazivity a metastázování. Neuron navigátorové proteiny ovlivňují různé signální dráhy, které regulují zejména cytoskelet, migraci a epithelo-mesenchymální tranzici. Změny exprese neuron navigátorových proteinů jsou pozorovány v různých onkologických onemocněních, zejména u metastazujících buněk. Tyto změny často korelují s prognózou onkologických pacientů.

Klíčová slova: NAV1, NAV2, NAV3, progresse nádorů, migrace, cytoskelet

Abstract:

This bachelor thesis focuses on the summary of the current knowledge of neuron navigator proteins (NAVs) in migration of tumor cells. Neuron navigator proteins are cytoskeleton-associated proteins. They interact with microtubules and actin filaments. Neuron navigator proteins contain several conserved domains that do not differ much between isoforms of neuron navigator protein families. They also contain different motifs that often overlap and are therefore not conserved. Neuron navigator proteins are most known as a proteins participating in axon guidance and growth. However, recent studies point to their important role in regulation of migration, invasiveness and metastasis. Neuron navigator proteins are affecting several signaling pathways. Mainly signaling pathways, that are regulating cytoskeleton, migration and epithelial-to-mesenchymal transition. Alternations in the expression of neuron navigator proteins are observed in various cancers, especially in metastatic cells. These changes often correlate with prognosis of cancer patients.

Key words: NAV1, NAV2, NAV3, cancer progression, migration, cytoskeleton

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci 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, 25. 04. 2024

Andrea Sára Šulcová

podpis studenta

Seznam zkratek:

| | |
|---------------|--|
| (+)TIPs | plus-end tracking proteins |
| ABI-1 | abelson kinase interactor |
| ADF | Aktin depolymerizující faktor |
| APC | Adenomatous polyposis coli |
| Arp | actin related proteins/aktin příbuzné proteiny |
| CC | coiled coil doména |
| Cdc42 | Cell division control protein 42 homolog |
| Cga gen | glycoprotein hormones |
| CLASPs | CLIP-associating proteins |
| CLIP-170 | cytoplasmic linker protein of 170 kDa |
| EB-1 | end-binding 1 |
| ECM | extracelulární matrix |
| EGF | Epidermal growth factor |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| E-kadherin | Epiteliální kadherin |
| EMT | epithelo mesenchymální transice |
| Fsh | Follicle-stimulating hormone |
| FZD | Frizzled |
| GEF | Guanine nucleotide exchange factor |
| GnRH | Gonadotropin releasing hormon |
| GnRHR | Gonadotropin releasing hormon receptor |
| GSK-3 β | Glycogen synthase kinase-3 beta |
| GTPáza | GTP-binding proteins |
| HB-EGF | Heparin Binding EGF Like Growth Factor |
| HGF | hepatocyte growth factor |
| hNAV | human neuron navigator proteins |
| HSPC300 | Haematopoietic stem/progenitor cell protein 300 |
| CH | Kalponinová doména |
| IL23 | interleukin 23 |
| IL23R | interleukin 23 receptor |
| Lhb gen | luteinizing hormone subunit beta |
| LRP5/6 | low-density lipoprotein receptor-related protein |
| MAPs | microtubule-associated protein |
| MMP | metalloproteinase |
| NAP-1 | nucleosome assembly protein |
| N-kadherin | Neurální kadherin |
| NPF | nucleation promoting factors |
| PAK | The p21-activated kinases |
| PIR121/SRA-1 | Steroid receptor RNA activator 1 |
| Rac1 | Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 |
| RhoA | Ras homolog gene family, member A |
| ROCK | Rho-associated protein kinase |
| SF1 | Splicing factor 1 |
| SSH1 | Slingshot Protein Phosphatase 1 |
| SSH2 | Slingshot Protein Phosphatase 2 |
| TGF- β | Transforming growth factor beta |
| TSS | transcription start site |

| | |
|------------|---|
| twist1 | Twist-related protein 1 |
| twist2 | Twist-related protein 2 |
| WASP | Wiskott-Aldrich syndrome protein |
| WAVE | Wiskott–Aldrich syndrome protein family member 1 the WASP homology-2 domain, acidic domain, connecting |
| WCA doména | domain |
| zeb1 | Zinc finger E-box-binding homeobox 1 |
| zeb2 | Zinc finger E-box-binding homeobox 2 |

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Úvod | 7 |
| 2. Neuron navigátorové proteiny | 7 |
| 2.1 Název a Historie..... | 8 |
| 2.2 Struktura..... | 8 |
| 3. Cytoskelet | 10 |
| 3.1 Aktinový cytoskelet | 10 |
| 3.1.1 Migrace buněk a aktinový cytoskelet..... | 11 |
| 3.1.2 NAV proteiny a aktinový cytoskelet | 13 |
| 3.2 Mikrotubulový cytoskelet..... | 14 |
| 3.2.1 +TIPs | 14 |
| 3.2.2 Růstový kužel..... | 15 |
| 4. Neuron navigátorové proteiny a onkologická onemocnění..... | 19 |
| 4.1 NAV2..... | 19 |
| 4.2 NAV3..... | 19 |
| 5. NEURON NAVIGÁTOROVÉ PROTEINY V SIGNÁLNÍCH DRAHÁCH | 20 |
| 5.1 p73..... | 20 |
| 5.2 Wnt signální dráha..... | 21 |
| 5.3 SSH1L/Kofilinová dráha | 24 |
| 5.4 Metaloproteinázy | 24 |
| 6. Závěr | 26 |
| 7. Literatura: | 28 |

1. Úvod

Migrace buněk je jedním z nejdůležitějších procesů v živých organismech. Vyskytuje se od bakterií až po mnohobuněčné organismy. Uplatňuje se ve vývoji, imunitě nebo například v procesu hojení. Poruchy v regulaci mohou vést k různým patologickým stavům zahrnujícím metastázování nádorů, chronické záněty, nebo autoimunitní onemocnění. Na deregulaci migrace se podílejí různé faktory, například genetické mutace, změny v signálních drahách a změny mikroprostředí, včetně extracelulární matrix.

Metastázování nádorů patří mezi nejzávažnější komplikace nádorových onemocnění. Je to i nejčastější příčina úmrtí onkologických pacientů. V procesu metastázování se některé buňky primárního nádoru oddělí a šíří do jiných částí těla. Klíčovým krokem procesu metastázování je právě schopnost buněk migrovat a invadovat do okolí.

Neuron navigátorové proteiny (NAV) jsou proteiny asociované s cytoskeletem, které byly popsány jako regulátory pro vedení a růst axonů ve vyvíjejícím se nervovém systému. Recentní studie ale ukazují, že hrají důležitou roli i v jiných buněčných procesech zahrnujících migraci a invazivitu buněk. V lidském organismu se vyskytují tři zástupci rodiny NAV proteinů (NAV1, NAV2 a NAV3). NAV proteiny obsahují několik konzervovaných úseků se specifickými doménami. Patří mezi ně doména kalponinová (CH), AAA+ (ATPases Associated with diverse cellular Activities) a coiled-coil.

V posledních letech se proteiny rodiny NAV zkoumají i v souvislosti s jejich úlohou v nádorových buňkách. NAV proteiny se vyskytují v mnoha typech nádorů. V nádorech je exprese NAV proteinů často zvýšena nebo snížena. Exprese NAV3 proteinů často koreluje s proliferací, migrací a invasivitou nádorových buněk a z klinického hlediska i s prognózou pacientů. Pochopení mechanismů, jakými se NAV proteiny podílejí na regulaci migrace a invasivity by mohlo pomoci ve vývoji nových způsobů protinádorové léčby a samotné NAV proteiny by potencionálně mohly sloužit jako cíle pro nádorovou terapii.

Cílem této bakalářské práce je představení neuron navigátorových proteinů a shrnutí jejich úlohy v migraci, invazivitě a metastázování nádorových buněk.

2. Neuron navigátorové proteiny

Neuron navigátorové proteiny jsou proteiny asociované s cytoskeletem. Interagují jak s aktinovými vlákny, tak s mikrotubuly. Vyskytují se pravděpodobně u všech bilaterálních živočichů. Role NAV proteinů v organismu zahrnuje směrování a růst axonu, buněčnou migraci a invazi. Obratlovci mají tři

zástupce rodiny neuron navigátorových proteinů. Neuron navigátorové proteiny 1 (NAV1), neuron navigátorové proteiny 2 (NAV2) a neuron navigátorové proteiny 3 (NAV3). Jejich nejnámějšími homology jsou proteiny Unc-53 z *Caenorhabditis elegans* a proteiny Sickie z *Drosophila melanogaster*. Proteiny Unc-53 se podílejí na vývoji nervového systému (Hekimil & Kershaw, 1993) a proteiny Sickie regulují aktinový cytoskelet při vývoji houbového tělíska (mushroombody) v mozku (Abe et al., 2015). Jejich nejbližšími sekvenčními homology jsou proteiny NAV2 (Maes et al., 2002). V této práci budou neuron navigátorové proteiny nadále označovány jako proteiny NAV.

Expres NAV proteinů je nejvyšší v embryonálním vývoji. NAV proteiny se vyskytují v mnoha buněčných typech a jsou i tkáňově specifické. Všechny tři rodiny NAV proteinů se exprimují při vývoji mozku. Nejvyšší exprese NAV1 proteinů je v srdci, dále v placentě, mozku a nervové soustavě. Po narození se exprese NAV1 výrazně snižuje. U NAV2 proteinů byla nejvyšší exprese pozorována v ledvinách a játrech, poté nižší hladiny v mozku, srdci, placentě a plicích (Maes et al., 2002). NAV3 proteiny se exprimují převážně v mozku.

Na buněčné úrovni jsou NAV proteiny lokalizovány v cytoplazmě a také jsou součástí centrozómů (Martínez-López et al., 2005; Merrill et al., 2002). Geny pro NAV proteiny jsou lokalizované na různých chromozomech. Lokalizace genu pro NAV1 je v pozici 1q32.1, pro NAV2 v 11p15.1 a pro NAV3 v pozici 12q21.1 (Maes et al., 2002).

2.1 Název a Historie

Lidské NAV proteiny byly objeveny roku 2002 nezávisle na sobě v několika laboratořích. V nejstarších publikacích jsou proto označovány pod různými názvy, jako POMFIL1 (NAV3), POMFIL3 (NAV1) a POMFIL2, RAINBI1, HELAD1 (NAV2). NAV3 byl objeven jako protein v jaderných pórech neuronů (pore membrane and filament interacting like protein 1) (Coy et al., 2002). NAV2 byl identifikován jako gen odpovídající na all-trans retinovou kyselinu (retinoic acid inducible in neuroblastoma cells) (Muley et al., 2008).

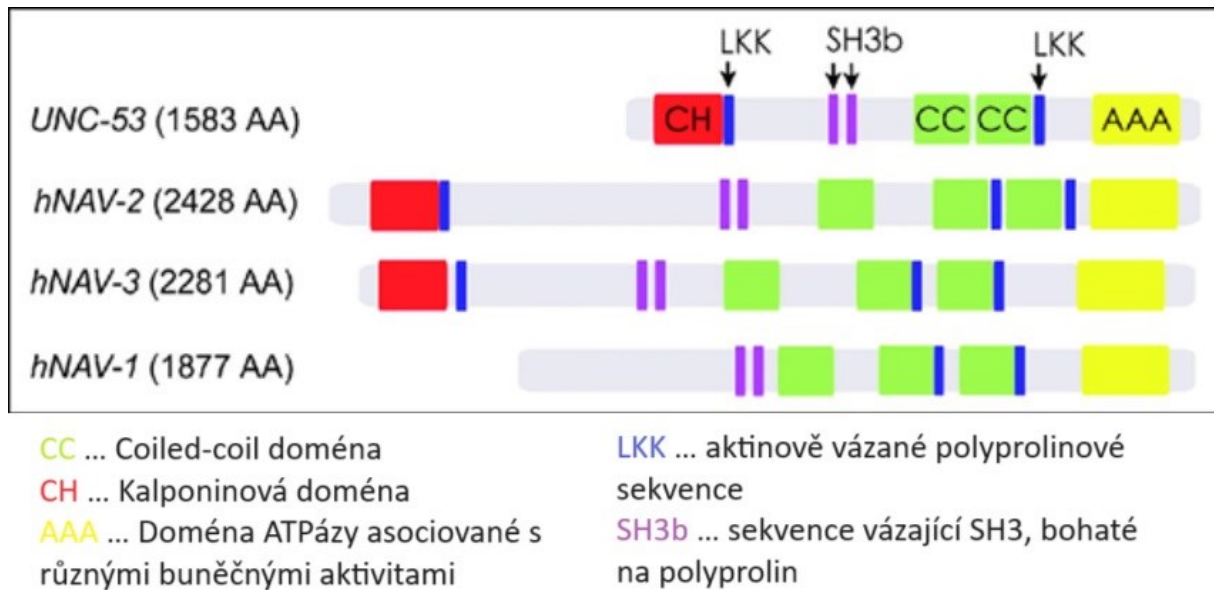
2.2 Struktura

NAV proteiny a jejich homology jsou relativně velké proteiny (>200 kDa) a vyskytují se v několika isoformách. Jednotlivé isoformy se liší především v oblastech mimo konzervované domény. To ukazuje na důležitost jak konzervovaných domén, tak i sousedících oblastí. Oblasti, sousedící s konzervovanými doménami, mohou být důležité pro tkáňovou specifitu, naopak konzervované sekvence zajišťují

základní funkce NAV proteinů. NAV1 proteinu ovšem chybí jedna ze základních domén, a to doména kalponinová (Maes et al., 2002).

Konzervované oblasti zahrnují domény kalponinovou (CH), AAA+ (ATPázy asociované s různými buněčnými aktivitami) a coiled-coil (CC) (Maes et al., 2002). CH doména se vyskytuje na N konci. Zahrnuje asi 110 aminokyselin (shrnutí v: Powers et al., 2023) a obsahuje několik sekvencí, které jsou schopné se vázat na aktin a/nebo tubulin. Mechanismus regulace vazby však dosud nebyl objasněn. AAA+ doména je zachovaná u všech isoform napříč všemi organismy a považuje se za základní poznávací motiv NAV proteinů. V centru je ATPázový core region zahrnující asi 116 – 155 aminokyselin. Kolem ATPázového centra je několik menších motivů s celkovou délkou 401 – 452 aminokyselin důležitých pro vazbu ATP a jeho hydrolýzu, které jsou kupodivu také velice konzervované (shrnutí v: Powers et al., 2023). Tyto motivy zahrnují Walker A (P-loop) a Walker B motiv (Van Haren et al., 2009). ATPázové core je lemováno vysoce konzervovanou sekvencí (shrnutí v: Powers et al., 2023). Na C konci se vyskytují coiled-coil (CC) domény. CC domény se často účastní protein-proteinových interakcí. Každý NAV protein obsahuje tyto domény dvě. CC domény se vždy vyskytují v definované vzdálenosti od AAA+ domény (Maes et al., 2002; shrnutí v: Powers et al., 2023). Další nalezené motivy zahrnují sekvence s nízkou komplexitou (low complexity sequences, LCSs): regiony bohaté na serin (serine-rich regions, SRRs), SxIPs motivy a několik vnitřně neuspořádaných regionů (intrinsically disordered regions, IDRs). Tyto sekvence se často překrývají a nejsou tudíž už tolik konzervované (shrnutí v: Powers et al., 2023). SxIPs ([ST]-X-[IL]-P) patří mezi motivy, které se často vyskytují u +TIPs proteinů (proteinů vázajících + konec mikrotubulů) a vázajících EB1 (end-binding) proteiny (Honnappa et al., 2009). V NAV proteinech se vyskytují v různém počtu a většinou na N-konci (hNAV2 (human NAV2) má jeden motiv navíc na C konci proteinu) (shrnutí v: Powers et al., 2023).

Obrázek 1: Obecná organizace domén rodin NAV proteinů



(Stringham & Schmidt, 2009)

3. Cytoskelet

Cytoskelet je dynamická proteinová síť tubulů a filament, která se vyskytuje po celé buňce. Skládá se ze tří základních typů vláken a to mikrotubulů, aktinových filament a intermediálních filament. Cytoskelet se vyskytuje jak v cytoplazmě, tak v organelách. Vytváří i samostatné organely, například bičíky, nebo cílie. Cytoskelet v buňce zajišťuje mnoho funkcí. Umožňuje pohyb a dělení buněk, mechanickou stabilitu, podílí se na tvorbě adhezí mezi buňkami a mezi buňkou a ECM, pomáhá pohybu organel a zajišťuje jejich lokalizaci. Důležitou vlastností cytoskeletu je schopnost polymerizace a depolymerizace cytoskeletárních vláken. De/polymerizace probíhá na základě specifických signálů, které přicházejí z vnějšího i vnitřního prostředí. Díky dynamické polymerizaci je cytoskeletální síť schopna neustálé remodelace, a to jí umožňuje zastávat výše uvedené funkce (shrnuto v: Fletcher & Mullins, 2010).

3.1 Aktinový cytoskelet

Aktinový cytoskelet vytváří nejtenčí cytoskeletální vlákna s průměrem 4-7 nm. Aktinová vlákna existují ve dvou formách, které jsou v buňce zastoupeny půl na půl, a to v monomerní (G-aktin), anebo v polymerní (F-aktin) formě. Monomery aktinu se v cytoplazmě nevyskytují samostatně, ale jsou vázány monomer-vázajícími faktory. K polymeraci aktinových monomerů je potřeba ATP,

které se po zabudování aktinových monomerů do vlákna rozkládá na ADP a fosfát. Polymerní vlákna jsou polární. Jedna jejich strana polymerizuje rychleji. Tato strana se nazývá +/barbed/rostoucí konec. Druhá strana polymerizuje pomaleji. Ta se nazývá –/pointed konec. Polymerace neprobíhá samovolně. Je zapotřebí mít nukleační centrum tvořené z aktinových trimerů/tetramerů neboli nukleátorů. Nukleátory jsou proteinové komplexy, které pomáhají iniciaci polymerizace tím, že vytvářejí místa, kam monomery mohou nasedat a spojovat se ve vlákna. Mezi nejznámější nukleátory patří forminy a komplex Arp2/3. Komplex Arp2/3 se skládá z aktin-příbuzných proteinů (Arp) 2 a 3 (shrnutí v: Schaks et al., 2019a). Arp2/3 proteiny jsou monomernímu aktinu velmi podobné. Spolu s monomery aktinu se navazují ze stran již vzniklých aktinových vláken a vytvářejí na nich nová nukleační centra. Aktinová vlákna ale pouze větví. Nová vlákna vytvářet nedokážou. Nové polymery vyrůstají v úhlu 70°. Aby Arp2/3 komplex fungoval, je potřebná jeho aktivace. K jeho aktivaci slouží faktory NPF (nucleation promoting factors) (shrnutí v: May, 2001; Schaks et al., 2019b)

3.1.1 Migrace buněk a aktinový cytoskelet

Proces migrace buněk je jedním ze základních projevů živých organismů. Proces je to velice konzervovaný. Umožňuje buňkám pohyb, měnit pozice a vytvářet a udržovat tkáně a orgány. Uplatňuje se v embryonálním vývoji, homeostázi a regeneraci.

Migrace využívají i nádorové buňky při metastázování. Proces metastázování zahrnuje několik kroků. V prvním kroku se buňky musejí odpojit od primárního nádoru (přerušují se mezibuněčné spoje a některé spoje mezi buňkou a ECM). Následuje invaze okolní tkáně a intravazace do krevního/lymfatického systému. Krevním/lymfatickým řečištěm se buňky šíří až na místo, kde se mohou usadit. K tomu jim napomáhají různé signální molekuly, mezi které patří chemokiny a růstové faktory. Po usazení buněk na sekundárním místě dochází rovnou nebo po období dormance k proliferaci a tvorbě metastáz (shrnutí v: Fares et al., 2020).

Aby buňky byly schopné migrace, procházejí procesem zvaným epithelo-mesenchymální tranzice (EMT). V tomto procesu dochází k několika zásadním změnám na morfologické, signální i genetické úrovni. Z epiteliálních, nepohyblivých, polarizovaných buněk s buněčnými adhezemi se stávají buňky mesenchymální, nepolarizované a schopné pohybu. Tato tranzice jim napomáhá k adaptaci v jiném prostředí (shrnutí v: Voulgari & Pintzas, 2009). EMT je často definována ztrátou epiteliálního markeru E-kadherinu a zvýšenou expresí mesenchymálních markerů vimetinu a N-kadherinu. Celá EMT je indukovaná různými faktory a signálními drahami. Signály zahrnují růstové faktory TGF- β (Transforming Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), transkripční faktory, komponenty ECM, onkogeny a záněty. Mezi transkripční faktory, které reprimují

epiteliální geny (geny pro E-kadherin...), patří snail1, snail2, TWIST1 (Twist-related protein 1), TWIST2 (Twist-related protein 2), ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1) a ZEB2 (Zinc finger E-box-binding homeobox 2). Kromě repressie epitheliálních genů také buď přímo nebo nepřímo aktivují geny asociované s mesenchymálním fenotypem (fibronektin, vimetin, N-kadherin) (shrnutí v: Pastushenko & Blanpain, 2019).

Jedním z důležitých dějů, které migraci umožňují, je polymerace aktinových vláken. Polymerace aktinových vláken vede k tvorbě výběžků plazmatické membrány. Výběžků existuje několik typů. Ploché výběžky se označují za lamelipodia. Lamelipodia mají na bázi nerozvětvený aktin, který se postupně směrem k vedoucímu konci větví za pomoci Arp2/3 komplexu. Jak vlákna polymerují, tak tlačí na membránu a vytváří tlak, který pohání pohyb vpřed. Tento mechanismus se uplatňuje hlavně u mesenchymální migrace. Filopodia jsou výběžky úzkého, protáhlého tvaru. Obsahují úzce svázaná aktinová vlákna. Slouží jako senzorké struktury, které detekují signály, například chemoatraktanty. Pro pohyb v 3D matrix je potřeba i schopnost přestavovat extracelulární matrix (ECM). K tomu slouží invadopodia a podosomy. Invadopodia jsou rovněž výběžky bohaté na aktin, ale navíc mají schopnost proteolytické aktivity. Podosomy a invadopodia jsou velmi podobné struktury. Rozdíl mezi nimi je hlavně ve velikosti, počtu a funkci. Podosomy se vyskytují například u makrofágů, dendritických buněk a osteoklastů. Podosomy jsou menší a je jich větší počet, jsou stabilní pouze několik minut a degradují ECM v mnohem menší míře. Na druhé straně invadopodia jsou větší, vyskytují se v menším počtu, ECM degradují silně a jsou stabilní až hodiny. Invadopodia jsou spojovaná se schopností invazivity nádorových buněk. Důležitými proteiny v oblasti invadopodií jsou matrixové metaloproteinázy, které slouží k degradaci ECM (shrnutí v: Svitkina, 2018; Yilmaz & Christofori, 2009)

V iniciaci polymerace aktinu a udržování polarity buněk hrají důležitou roli malé GTPázy. Malé GTPázy jsou schopné přenášet signály od chemokinů, růstových faktorů a adhezivních receptorů na efektorové proteiny remodelující aktin. Malé GTPázy se aktivují vazbou GTP, jejichž navázání zprostředkovávají GEF faktory (faktory vyměňující guaninové nukleotidy). Častými efektorů GTPáz jsou kinázy (Rac1 a Cdc42 aktivují kinázy rodiny PAK, RhoA aktivují kinázy ROCK) (shrnutí v: Mosaddeghzadeh & Ahmadian, 2021), nebo faktory podporující nukleaci (NPFs). NPFs jsou velká rodina proteinů, zahrnující proteiny WAVE (WASP-family verprolin homologous) a WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein). Tyto proteiny mají doménu A, přes kterou se váží jak k Arp2/3 komplexu, tak k monomerům aktinu (shrnutí v: Rottner et al., 2021). Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) indukuje formování lamelipodií, Cdc42 (Cell Division Cycle 42) tvorbu filopodií a RhoA (Ras homolog family member A) reguluje kontraktilitu a mezibuněčnou adhezi. WAVE proteiny se vyskytují v několika proteinovém komplexu označujícím se jako WAVE regulatory complex (WRC, SCAR complex). WAVE proteiny

se podílí na tvorbě aktinových sítí v lamelipodiích a jsou regulovány Rac GTPázou a proteiny ABI (shrnutu v: Rottner et al., 2021).

3.1.2 NAV proteiny a aktinový cytoskelet

Kalponinová doména (CH), kterou NAV proteiny obsahují, se často vyskytuje u proteinů vázajících aktin, ale i u mnoha dalších proteinů účastnících se signální transdukce. CH domény jsou rozděleny do tří tříd. První třída (CH1) má schopnost vázat F-aktin. Druhá třída (CH2) se váže tandemově s CH1 a je potřebná pro zvýšení afinity CH domén k F-aktinu. Třetí třída (CH3), kterou obsahují i NAV proteiny, funguje zcela odlišně. Na rozdíl od CH1 a CH2 se nejčastěji vyskytuje samostatně a je schopna vázat několik jiných proteinů (například transgelin-1, Irch4 (Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 4) a kalponin-1), díky čemuž má zcela jiné funkce než domény CH1 a CH2 (Stradal et al., 1998; Sytnyk et al., 2020). NAV proteiny přes CH3 doménu přímo interagují s proteinem ABI-1 (Stringham & Schmidt, 2009). ABI-1 (abelson kinase interactor) je protein z rodiny ABI proteinů, které jsou nejčastěji lokalizované na koncích míst bohatých na aktin v lamelipodiích a filopodiích. ABI-1 je součástí WAVE komplexu spolu s NAP-1 (Nucleosome Assembly Protein 1), SRA-1 (Steroid Receptor RNA Activator 1), HSPC300 (Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Protein 300) a WAVE proteiny (Rottner et al., 2021). WAVE komplex se účastní regulace formování aktinového cytoskeletu přes interakce s Arp2/3 komplexem. ABI-1 se k WAVE proteinu váže N-koncovou doménou a zároveň se přes SH3 doménu váže k N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein). N-WASP stimuluje na aktinu závislý vezikulární transport a endocytózu (Innocenti et al., 2005). Nejdůležitější GTPázou v uvedených procesech je Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1). Rac-1 se účastní buněčného růstu a reorganizace cytoskeletu. Rac1 se váže na SRA-1 protein, a tím WAVE komplex aktivuje. Další GTPázy (například Cdc42 a Rho G) pravděpodobně pomáhají optimalizovat aktivitu celého WAVE komplexu. WAVE komplex stimuluje Arp2/3 komplex k polymeraci aktinu (Rottner et al., 2021).

Ztráta exprese ABI-1 proteinů vede ke podobným defektům buněčné migrace jako ztráta exprese NAV proteinů, proteinů WAVE, nebo Arp2/3 komplexu. Právě interakce NAV proteinů s ABI-1 proteiny mohou kontrolovat buněčný růst tím, že regulují Arp2/3 komplex a tím polymerizaci aktinových vláken. Jednou z možností vysvětlení významu interakce NAV proteinů a ABI-1 proteinů je, že NAV proteiny se chovají jako scaffold proteiny. Scaffold proteiny jsou proteiny, které jsou schopné vázat 2 a více proteinů najednou a napomáhají tak jejich interakci. NAV proteiny by tedy mohly přinášet ABI-1 proteiny do míst, kde polymerizují aktinová vlákna a napomáhat tak interakci ABI-1 proteinů s dalšími regulátory aktinové polymerizace a s aktinovými vlákny (Stringham & Schmidt, 2009).

3.2 Mikrotubulový cytoskelet

Mikrotubuly jsou poměrně silná cytoskeletární vlákna s průměrem okolo 25 nm. Pomáhají buňkám udržovat tvar a jsou součástí různých dynamických procesů, zahrnujících polarizaci, dělení a migraci buněk. Mikrotubuly jsou potřebné i pro intracelulární transport, kde slouží jako tratě pro molekulární motory. Základní jednotkou mikrotubulů je monomer tubulin. Tubulin je GTPáza. Mikrotubuly jsou vlákna složená z protofilament. Protofilamenta jsou tvořena z dimerů stavěných na sebe. Každý dimer je složen z monomerů tubulinu α a β , které spolu interagují v pozici hlava-ocas. α – tubulin váže GTP. Naproti tomu β -tubulin je schopen vázat jak GTP, tak GDP s fosfátem i pouze GDP. Další formou tubulinu je tubulin γ . Tubulin γ se vyskytuje pouze na začátku mikrotubulů a vytváří tak základ pro jejich vznik. Je asociován s MTOC (microtubule-organizing center), které je zodpovědné za organizování a nukleaci mikrotubulů. Primárním MTOC je centrozom, který je hlavní strukturou podílející se rovněž na buněčném dělení (shrnutí v: Galjart, 2010; Goodson & Jonasson, 2018).

Polymerace mikrotubulů probíhá spíše z jedné (+, rostoucí) strany. Jelikož jsou mikrotubuly dynamické struktury, které neustále polymerizují nebo depolymerizují, může nastat situace zvaná mikrotubulová katastrofa. Při mikrotubulové katastrofě převažuje depolymerizace nad polymerizací. Depolymerizace je tak rychlá, že se mikrotubuly nevratně rozpadnou. Opačný děj se nazývá záchrana (rescue). Dynamika mikrotubulů zajišťovaná řízenou polymerací a depolymerací aktinových vláken umožňuje fungování komplexních dějů, jako je pohyb buněk nebo dělení chromozomů (shrnutí v: Galjart, 2010).

3.2.1 +TIPs

+TIPs neboli plus-end tracking proteiny je rodina proteinů lokalizovaných na konci rostoucích mikrotubulů spadající do rodiny MAPs proteinů (Microtubule-associated protein). Nejčastěji se vyskytují na vedoucím konci mikrotubulů. +TIPs regulují dynamiku mikrotubulů a umožňují interakce mezi buněčnými komponenty a mikrotubuly. Podílejí se tak na buněčném dělení, migraci a intracelulárním transportu. Na konce mikrotubulů se +TIPs dostávají pomocí molekulárních motorů nebo difúzí. Většina +TIPs jsou stabilizátory (APC (Adenomatous Polyposis Coli), CLASPs (cytoplasmic linker-associated proteins), CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Protein 170), EB-1...). Kromě toho, že jsou +TIPs asociované s mikrotubuly, tak asociují i s aktinovým cytoskeletem. S aktinovým cytoskeletem mohou asociovat přímo i nepřímo. EB-1 (end-binding) protein je jedním z hlavních regulátorů mikrotubulové dynamiky. Autonomně se váže na tubulinové struktury a rekrutuje další +TIPs. Ostatní +TIPs se na EB-1 proteiny váží buď přes CAP-Gly nebo SxIP motivy. Touto vazbou se stimuluje prodlužování mikrotubulů (Akhmanova & Hoogenraad, 2005; Galjart, 2010).

Mezi + TIPS patří i NAV proteiny. Na + koncích mikrotubulů se objevují zástupci všech rodin NAV proteinů a všechny tyto proteiny jsou schopné vázat α -tubulin. NAV proteiny asociují i s EB-1 proteiny (Van Haren et al., 2009). Stejně jako většina +TIPS proteinů se NAV proteiny na EB-1 váží přes SxIP motiv. V NAV1 proteinech se motiv vyskytuje dvakrát. Při mutaci pouze v jednom z motivů k vazbě stále dochází. Vazba je ovšem slabší. Pokud se mutace vyskytuje v obou motivech, NAV1 proteiny už vazby nejsou schopné (Sánchez-Huertas et al., 2020). Propojení mikrotubulů a aktinových vláken probíhá pouze v přítomnosti proteinů EB-1. Většina + TIPS proteinů se na koncích mikrotubulů nedokáže udržet bez proteinu EB-1. NAV1 je výjimkou a po rozpadnutí EB-1 komplexu s mikrotubuly nadále interaguje a pomáhá tím mikrotubuly stabilizovat (Sánchez-Huertas et al., 2020). Mezi +TIPS proteiny probíhá kompetice. Bylo zjištěno, že proteiny NAV1 soutěží s proteinem CLIP-170. Jejich domény, přes které se na EB-1 protein vážou, se překrývají (Van Haren et al., 2009).

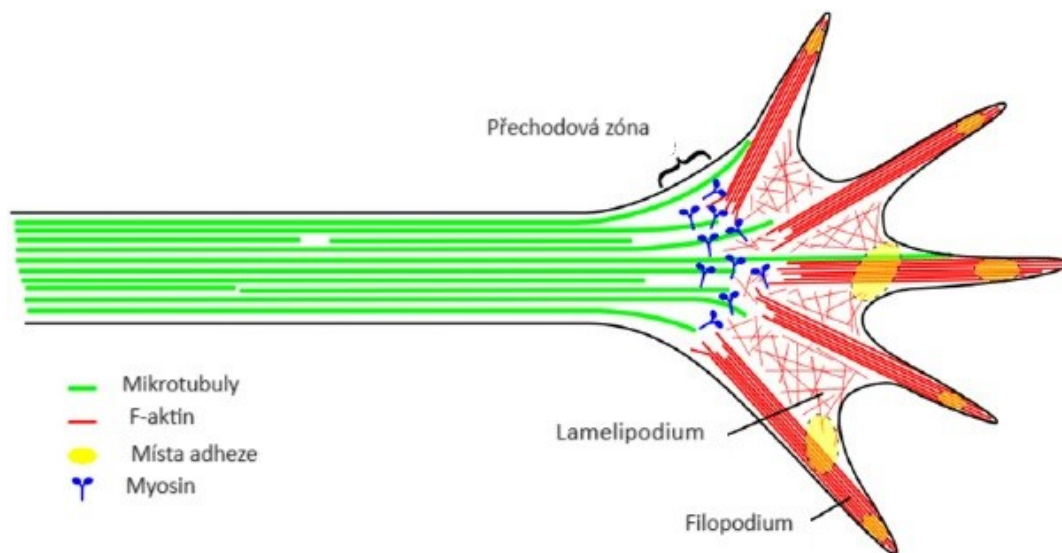
Životnost mikrotubulů je ovlivněna také kovalentními modifikacemi. Modifikace se objevují pouze na mikrotubulech s dlouhou délkou života. Pomáhají k lepší stabilitě a flexibilitě mikrotubulů a zvyšují afinitu k molekulárním motorům. Jednou z nejčastějších modifikací je acetylace. Acetylace zvyšuje motilitu a afinitu k molekulárnímu motoru kinesinu-1 (Reed et al., 2006). Buňky se sníženou expresí NAV3 proteinů mají sníženou acetylaci mikrotubulů. Po následném obnovení exprese NAV3 proteinů se acetylace mikrotubulů znovu objevuje. To naznačuje úlohu NAV3 proteinů v napomáhání při procesu stabilizace mikrotubulů (Cohen-Dvashi et al., 2015). Deacetylované mikrotubuly rovněž inhibují endocytózu růstového faktoru EGFR (epidermal growth factor receptor). Endocytóza EGFR začíná vazbou ligandu na EGFR. Vazba spouští formování klatrinového obalu, který způsobuje invaginaci membrány a vznik váčku. V buňkách se sníženou expresí NAV3 bylo pozorováno, že EGFR se na povrchu membrány kumuluje a zůstává delší čas. Také internalizované váčky v buňce přetrvávají déle. Při zvýšení koncentrace receptorů pro EGFR na povrchu buněk se zpomaluje aktivace „downstream“ signálních drah (hlavně ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase signaling pathway) a AKT (Protein Kinase B signaling pathway)) (Cohen-Dvashi et al., 2015). Tyto signální dráhy se podílejí na procesech migrace, buněčného růstu a diferenciaci. Deregulace těchto signálních drah se vyskytuje v různých onemocněních, včetně onkologických. NAV3 proteiny se tedy můžou podílet na regulaci těchto drah i nepřímo přes internalizaci receptoru pro EGFR.

3.2.2 Růstový kužel

Růstový kužel (growth cone, GC) je struktura, která vede axony při jejich růstu. Pomocí receptorů reaguje na vnější signály a následně vytváří nové neurity. Růstový kužel se nachází na koncích neuritů. Morfologie růstového kužele je velmi variabilní, je závislá na typu nervových buněk. Obecně

se ale růstový kužel skládá ze tří hlavních domén, a to z domény centrální (C), periferní (P) a přechodové (T). Periferní doména se nachází na periférii neuritu. Vytváří se v ní membránové výběžky filopodia a lamelipodia, které mají hustou síť aktinových vláken. Rostoucí konec P domény je orientován k plazmatické membráně. Centrální doména je naopak vyztužena převážně mikrotubuly, které se podílejí na stabilitě růstového kužele a také umožňují spolu s molekulárními motory transport proteinů potřebných pro růst neuritů. Mikrotubuly jsou zde z větší části orientovány + koncem k periférii. Přechodová doména se nachází mezi centrální a periferní doménou. Obsahuje svazky F-aktinu i mikrotubulů. Přechodová doména umožňuje rozdělení a napojení periferních a centrálních domén (Dent & Gertler, 2003). Při růstu růstového kužele se nejdříve vytvářejí membránové výčnělky (filopodia, lamelipodia) na rostoucím konci. Po vytvoření výčnělků (nebo-li po prodloužení rostoucího konce) dochází ke zvětšení objemu, a to pomocí invazí mikrotubulů a transportem potřebných váčků a organel. Cyklus se zakončuje vytvořením pevných spojů, které umožní stabilizaci celé struktury a celá struktury. Pro funkci růstového kužele je důležitá i přítomnost +TIPs proteinů (Dent & Gertler, 2003; Hur & Zhou, 2011; Mortimer et al., 2008).

Obrázek 2: Růstový kužel neuronu



(Franze & Guck, 2010)

NAV proteiny se v růstovém kuželu vyskytují také. Nejvyšší hustota NAV proteinů je v místech, kde se vytvářejí membránové výběžky a v koncích neuritů. Jednou z úloh NAV1 proteinů je propojování

nepolymerizujících mikrotubulových vláken s vlákny aktinovými. Nejvyšší výskyt NAV1 proteinů byl zjištěn v F-aktin bohatých oblastech P domény (Sánchez-Huertas et al., 2020). NAV1 proteiny se podílí jak na vedení axonu, tak na směřování růstu růstového kužele. Pokud je snížena exprese NAV1 proteinů, tak axony vykazují vyšší hustotu filopodií a růstový kužel je více dynamický. To ovšem vede k vyšší frekvenci spontánních ohybů axonu (Sánchez-Huertas et al., 2020).

Po vystavení chemoatraktantu netrinu-1 u buněk se sníženou expresí NAV1 proteinů, na netrin-1 axony nereagovaly. Netrin-1 je chemoatraktant důležitý pro vedení axonu a migraci buněk hlavně při vývoji organismu. Za normálních okolností je růst a ohyb axonu směřován k netrinu-1 (Martínez-López et al., 2005; Sánchez-Huertas et al., 2020). Zvýšená exprese NAV1 proteinů naopak dynamiku růstového kuželu snižuje a zmenšuje velikost filopodií (Sánchez-Huertas et al., 2020). NAV proteiny neinterferují s polymerací mikrotubulů. Pouze podporují jejich stabilitu a zabraňují vzniku katastrof.

NAV proteiny mohou mít i propojovací funkci. Propojování aktinových a mikrotubulových vláken je důležité jak pro udržování tvaru buňky a organizaci cytoskeletu, tak pro buněčnou migraci. Podílí se na tom různé proteiny, zahrnující například spektriny, katastrofiny a také protein EB-1. NAV proteiny jsou v přímé interakci jak s aktinem (přes N-koncovou doménu), tak s mikrotubuly. V růstovém kuželu je propojení aktinových a mikrotubulových vláken důležité z několika důvodů. Propojení pomáhá mikrotubuly stabilizovat a zabraňuje tak jejich kolapsu a vytváření nechtěných ohybů axonu. Dále propojení koordinuje dynamiku růstu axonů, umožňuje správné vedení axonu a udržuje celkový tvar buněk. Mikrotubuly rovněž slouží jako základ pro výběžky, zatímco aktin pomáhá pohyb řídit (Dent & Gertler, 2003; Lowery & Van Vactor, 2009).

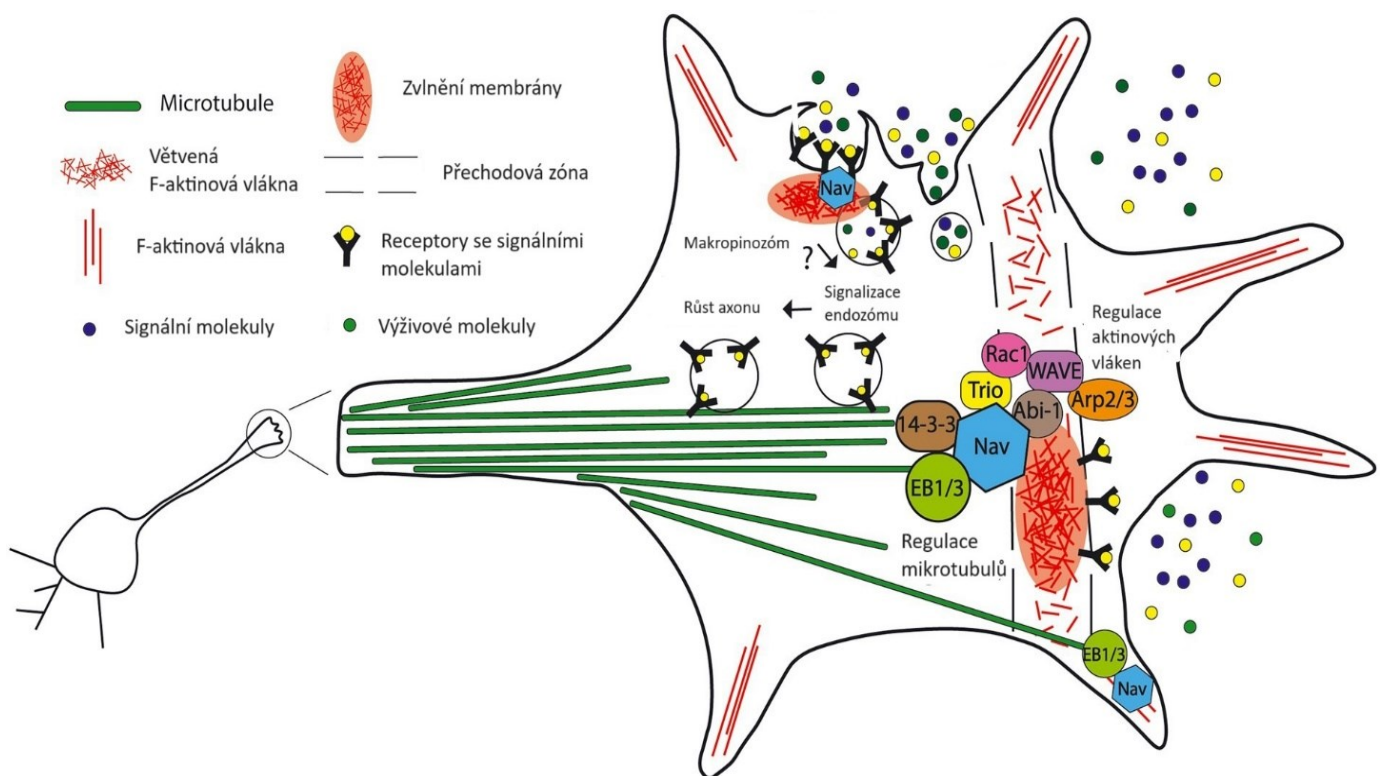
Dalšími důležitými +TIP proteiny, které se na NAV proteiny váží, je skupina proteinů TRIO. Proteiny TRIO jsou rodina guanin nukleotid výměnných faktorů (GEFs), které regulují malé GTPázy (například Rac1 a RhoG). TRIO proteiny aktivují GTPázy katalýzou výměny GDP za GTP. TRIO proteiny se účastní řady buněčných procesů zahrnujících např. remodelaci aktinového cytoskeletu, migraci buněk a růst neuritů (Bateman & Van Vactor, 2001).

V hipokampálních neuronech je exprese NAV1 proteinů nejvyšší. Nacházejí se zejména v blízkosti domén bohatých na aktin, na + koncích mikrotubulů a v membránových výběžcích. Snížením exprese NAV1 proteinů byly axony, oproti neuronům s nezměněnou expresí, zkrácené. TRIO proteiny se vyskytují spolu s NAV1 proteiny na + koncích mikrotubulů (i spolu s EB-1 proteinem), ve váčcích v cytoplazmě a v růstovém kuželu. Při snížení exprese proteinů NAV1 byly TRIO proteiny rozptýlené v cytoplazmě. To poukazuje na pravděpodobnou závislost lokalizace TRIO proteinů na NAV1 proteinech (Van Haren et al., 2014). Váčky obsahující NAV-TRIO proteiny se spíše vyskytovaly v periférii buněk. Při expresi proteinů TRIO došlo k aktivaci Rac1 GTPázy. Pokud se exprese NAV1 proteinů

v buňkách snížila, aktivace Rac1 GTPázy byla rovněž snížena. Při snížení exprese NAV1 proteinů nastávaly i problémy v aktinové síti. Vazba TRIO proteinů k NAV1 proteinům může tedy zvyšovat afinitu pro Rac1 a RhoG GTPázy. Další možností je, že TRIO proteiny GTPázy stabilizují (Van Haren et al., 2014).

Kromě NAV proteinů potřebují TRIO proteiny pro fungování a lokalizaci i další +TIPs proteiny. Jedním z nich jsou EB-1. TRIO proteiny se vážou k EB-1 a NAV1 proteinům přes separátní domény. NAV1 proteiny vazbu TRIO proteinů k EB-1 proteinům posilují. Interakce všech tří komponent (NAV, EB-1 a TRIO proteinů) jsou důležité hlavně pro růst neuritů. Navíc je pravděpodobné, že spolu všechny tři komponenty vytvářejí komplex (Van Haren et al., 2014).

Obrázek 3: Navrhovaný model funkcí a proteinových interakcí NAV proteinů v růstovém kužlu neuronu



(Powers et al., 2023)

4. Neuron navigátorové proteiny a onkologická onemocnění

Výskyt neuron navigátorových proteinů v nádorových onemocněních je velmi častý. Expres NAV proteinů je ve specifických nádorových buňkách často zvýšená nebo naopak snižena. NAV proteiny pravděpodobně mohou podle kontextu působit jako tumor supresory nebo naopak podporovat progresi nádorů. Přes různé signální dráhy, které regulují cytoskelet, transkripci genů a přetvářejí okolí, se NAV proteiny podílejí na regulaci invazivity, migrace, proliferace a metastázování. Expres NAV proteinů často koreluje s horší prognózou onkologických pacientů.

4.1 NAV2

Zvýšená expres NAV2 proteinů byla objevena v několika typech nádorů. Například v buňkách maligního melanomu, kolorektálního karcinomu a v buňkách sarkomu dělohy. Ve všech případech zvýšená expres korelovala s větší schopností migrace a invazivity buněk a s metastázováním. V buňkách maligního melanomu byla objevena hladina NAV2 vyšší než ve zdravé kožní tkáni. Metastázy melanomů měly hladiny NAV2 proteinů ještě vyšší, než byly hladiny v nádorech primárních. Kromě špatné klinické prognózy a kratší doby přežití u onkologických pacientů, nádorové buňky rychleji migrovaly, měly větší schopnost invazivity a exprimovaly EMT markery (např. N-kadherin, vitemin, snail) (Hu et al., 2019). V buňkách sarkomu dělohy byla zvýšená expres NAV2 proteinu asociována s agresivnějším chováním nádorů a také s nižší mírou přežití (Davidson et al., 2017). V buňkách lidského kolorektálního karcinomu byla také zjištěna zvýšená expres NAV2 korelující s negativní klinickou prognózou pacientů a větší schopností buněk migrovat a metastázovat (Tan et al., 2012). Nezávislá studie rovněž prokázala vysokou expresi NAV2 (HELAD1) proteinů také v kolorektálním karcinomu. Expres genu pro NAV2 byla snižena při zvýšené expresi proteinu APC (adenomatous polyposis coli). Při snížení expres NAV2 proteinů byl inhibován růst buněk a byla indukovaná jejich smrt (Ishiguro et al., 2002).

4.2 NAV3

Pacienti s horšími klinickými prognózami a s nádory s větší schopností migrace mají expresi proteinů NAV3 většinou sniženu. V buňkách kolorektálního karcinomu byly objeveny časté delece v genu pro NAV3 protein. Tyto delece souvisely se sníženou expresí NAV3 proteinů, která vedla ke zvýšení aktivity signálních drah Jak/STAT a GnRHR (Gonadotropin-releasing hormone receptor) (Carlsson et al., 2012). Obdobné výsledky přinesla i další studie na modelu kolorektálního karcinomu, kdy snížení expres NAV3 podporovalo migraci, invazivitu buněk a EMT. Naopak v nádorech neschopných metastázovat byla expres NAV3 zvýšená. Ve výsledku byl NAV3 označen za nádorový supresor

(Uboveja et al., 2020). Podle výsledků jiné studie ale pacienti se sníženou expresí NAV3 proteinů v kolorektálních nádorech vykazují naopak lepší klinické prognózy a nádorové buňky proliferují méně (Li et al., 2022), což naznačuje, že vliv NAV3 může být závislý na signálním nastavení buněk.

U bazocelulárních a dlaždicobuněčných karcinomů byla zjištěna ztráta alel v NAV3 genu u 20 – 25 % vzorků a snížením exprese NAV3 proteinů byla zvýšená transkripce genů souvisejících s nádorovým růstem primárních keratinocytů. V buňkách bazocelulárních agresivních karcinomů byly ovšem objeveny i některé populace buněk s NAV3 amplifikací. Amplifikace NAV3 proteinů se nejvíce objevovaly ve špatně diferenciovaných nádorech. Snížená exprese NAV3 proteinů vedla k větší agresivitě nádorů. Tyto informace naznačují heterogenitu nádorové buněčné populace (Maliniemi et al., 2011). V leiomyeomech dělohy byla exprese NAV3 proteinů také snížena. Snížením exprese NAV3 proteinů se zvyšovala aktivita dráhy GnRHR. Zvýšená signalizace přes GnRHR dráhy měla za následek větší objem nádorů (Aly et al., 2019).

5. NEURON NAVIGÁTOROVÉ PROTEINY V SIGNÁLNÍCH DRAHÁCH

Kromě přímých interakcí s cytoskeletem a jeho proteiny, jsou NAV proteiny součástí různých signálních drah. Signální dráha je proces, při kterém se kaskádovitě přenáší signál z jednoho místa v buňce na druhé. Vyústěním tohoto procesu je aktivace/regulace buněčných procesů a odpovědí zahrnující buněčné dělení, růst, genovou expresi a apoptózu. NAV proteiny se vyskytují hlavně v drahách, které se podílejí na remodelaci cytoskeletu, migraci a invazivitě buněk. Přesné mechanismy, jakými NAV proteiny tyto dráhy regulují, ovšem ještě nejsou objasněné.

5.1 p73

Protein p73 je členem rodiny p53 a homologem tumor supresoru p53. Rodina proteinů p53 jsou důležité proteiny, které se účastní kontrolních mechanismů apoptózy a buněčného cyklu. P53 je gen nejfrekventovaněji mutovaný v lidských nádorových onemocněních. P53 a p73 mají několik strukturně homologních oblastí, mezi které patří i DNA-vazebná doména. Pomocí této domény se p53 a p73 váží na některá stejná místa na DNA. P73 je tedy schopný díky této doméně regulovat buněčný cyklus a apoptózu stejným způsobem jako p53. K dokončení je ale p53 neustále potřeba (reguluje jiné potřebné geny) (Davis and Dowdy, 2001). P73 indukuje apoptózu, kontroluje buněčnou migraci, metastázování a epitel-mesenchymální tranzici (Davis and Dowdy, 2001; shrnuto v: Ramos, Raimundo and Saraiva, 2020). Na promotoru NAV3 genu se vyskytují dvě místa (pozice od TSS (transcription start

site) jsou - 1175 až - 1143 a + 2433 až + 2466), na které se p73 váže a podílí se tím na jeho regulaci (Uboveja et al., 2020).

Buňky s vypnutou expresí NAV3 a p73 proteinů projevují vyšší schopnost migrace a invazivity v buňkách kolorektálních nádorů. Po zvýšení exprese NAV3 proteinu se migrace naopak snižuje. To naznačuje, že opětovné spuštění exprese NAV3 proteinů je dostatečné pro potlačení migrace. Apoptotická aktivita se ukázala pouze v buňkách s expresí proteinů p73. NAV3 tedy tuto aktivitu nemá. Výsledky naznačují, že kontrola migrace a invazivity p73 probíhá přes zvýšení genové exprese genu NAV3 (Uboveja et al., 2020). NAV3 také zabraňuje EMT. V buňkách s vypnutou expresí NAV3 proteinů byla exprese E-kadherinu výrazně snižena, a naopak se zvýšila exprese N-kadherinu, snailu, vimentinu a fibronectinu. V buňkách s vypnutou expresí p73 proteinů došlo k podobnému efektu (Uboveja et al., 2020).

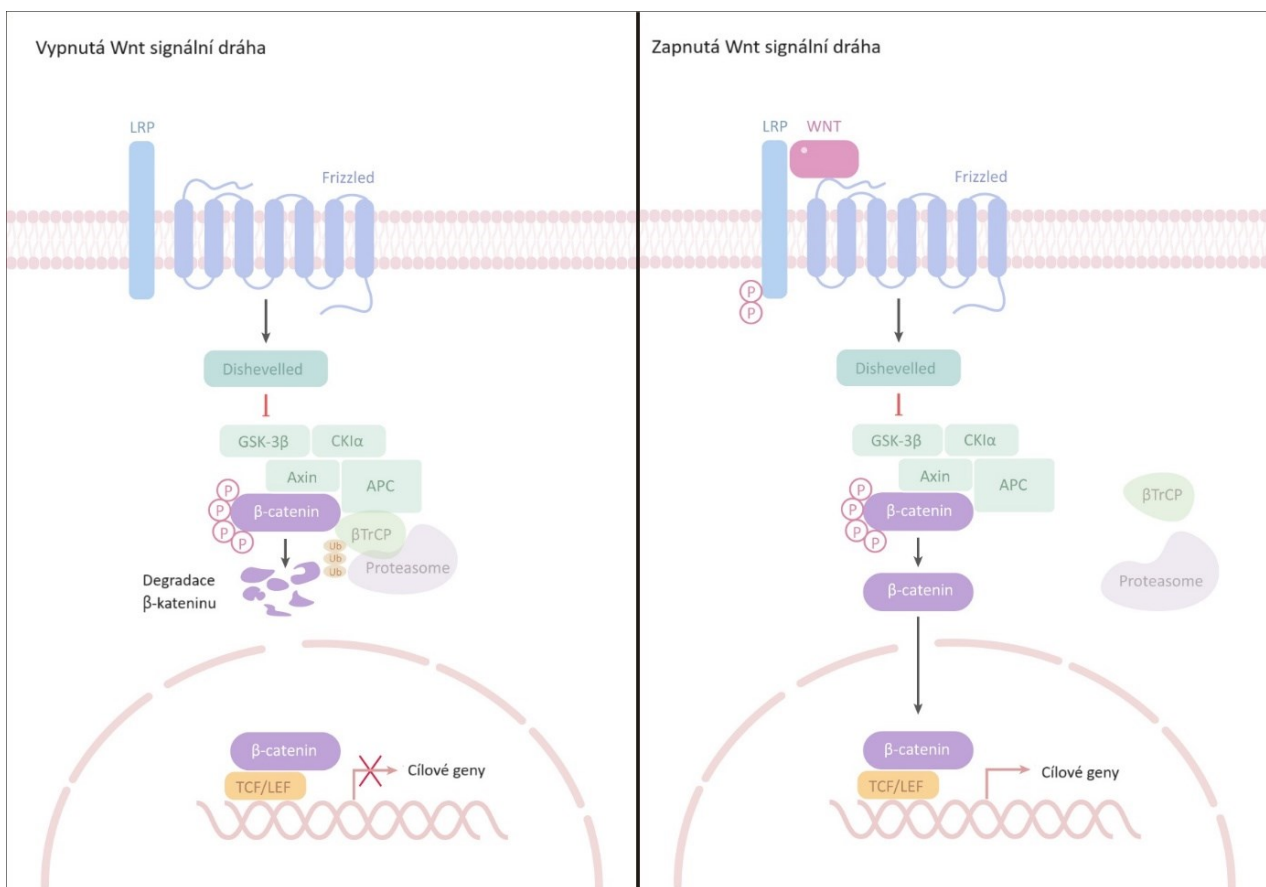
E-kadherin je transmembránový protein, který vytváří buněčné adheze a udržuje buněčnou epiteliální integritu. Extracelulární část se propojuje s E-kadheriny buněk vedlejších. Cytoplazmatickou částí se propojuje pomocí kateninů k aktinovému cytoskeletu (shrnutí v: Collinet and Lecuit, 2013). Jeho ztráta je charakteristickým znakem EMT a často se vyskytuje v tumorové progresi většiny epiteliálních nádorů. Regulace E-kadherinu je důležitá jak na transkripční, tak posttranskripční úrovni. Na transkripční úrovni je regulován represory. Mezi represory patří i snail1 a snail2 (Nieto, 2002). Expresy těchto represorů indukují různé faktory, zahrnující TGF (transforming growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) a Wnt. Postranskripční regulace probíhá i přes β -katenin. Kromě schopnosti migrace a invazivity, se p73 spolu s NAV3 podílí tedy i na EMT a remodelaci cytoskeletu (Uboveja et al., 2020).

5.2 Wnt signální dráha

Wnt signální dráha je jednou z nejdůležitějších drah podílejících se na buněčné proliferaci, tumorigenezi a diferenciaci buněk. Její deregulace je velmi častá v nádorových buňkách. Centrální molekulou Wnt signální dráhy je β -katenin. β -katenin je protein, který propojuje kadheriny s cytoskeletem a umožňuje tím buněčné adheze. Určitá část β -kateninu se vyskytuje volně v cytoplazmě. Pokud je β -katenin fosforylován serin/threonin kinásou GSK-3 β (glykogen syntháza kináza 3 β), tak je Wnt dráha vypnutá (Willert & Nusse, 1998). GSK-3 β vytváří s dalšími proteiny (například kinásou 1 α , AXINem a APC proteinem) komplex. Tento komplex napomáhá β -katenin fosforylovat. Po fosforylaci je β -katenin ubiquitován a určen k degradaci v proteazomu. Jakmile se Wnt signální molekula naváže na koreceptory (FZD (frizzled receptors) a LRP5/6 (low density lipoprotein receptor-related proteins)), spustí se signalizační kaskáda a dráha se aktivuje. Aktivace dráhy vede k inhibici GSK-3 β kinázy,

a tím neschopnosti fosforylace β -kateninu. β -katenin je díky tomu hromaděn v cytoplasmě. Jakmile je hladina β -kateninu dostatečně vysoká, tak se přemísťuje do jádra. V jádře interaguje s transkripčními faktory Tcf (T-cell factor)/Lef (lymphoid enhancer-binding factor) a spouští transkripci různých genů Wnt signální dráhy (Kikuchi, 2000; Nieto, 2002; Rim et al., 2022).

Obrázek 4: Wnt/ β -kateninová signální dráha



(Liu et al., 2022)

Při výzkumu melanomů se ukázalo, že exprese NAV2 proteinů je mnohem vyšší u melanomů než ve zdravých kožních buňkách. Zvýšená exprese NAV2 zvyšovala jak motilitu, tak schopnost invazivity. Vypnutí exprese NAV2 proteinů v kožních melanomech zvýšilo expresi E-kadherinu a naopak snížilo expresi N-kadherinu a vimetinu. To naznačuje, že invazivita a proliferace by mohla být regulována navozením EMT pomocí NAV2 proteinů. Transkripční regulátor Snail2, který podporuje EMT, byl nalezen v korelaci exprese s NAV2 proteiny. V buňkách se sníženou expresí Snail2 proteinů

se exprese E-kadherinu zvýšila, N-kadherinu a vimetinu snížila a buňky ztratily schopnost migrace. β -katenin je jedním z regulátorů, který reguluje expresi Snail2 proteinů (stabilizace β -kateninu vede k transkripční aktivaci snail2 genů). Ve spuštěné Wnt dráze se zvyšuje exprese snail2 proteinů (shrnuto v: Valenta et al., 2012). V buňkách s vypnutou expresí NAV2 proteinů se kromě snížené exprese Snail2 objevuje i snížená exprese β -kateninu a fosforylované GSK-3 β . Při obnovení exprese NAV2 proteinů se naopak exprese β -kateninu a GSK-3 β zvyšuje. Také se zjistilo, že při snížení exprese Snail2 proteinů se exprese GSK-3 β a β -kateninu nesnížila. Z těchto poznatků se dá usoudit, že NAV2 proteiny mohou expresi Snail2 proteinů regulovat prostřednictvím GSK-3 β / β -kateninové dráhy a tím podporovat zrychlení progresu nádorů podporou EMT (Hu et al., 2019).

β -katenin se podílí i na regulaci GnRHR/GnRH (gonadotropin-releasing hormone) dráhy. GnRH dráha reguluje transkripci svých speciálních čtyř genů, a to Cga, Lhb, Fsh a Gnhr. V jedné z hlavních rolí je protein SF1 (steroidogenic faktor 1), který se váže na promotor těchto genů a reguluje tím jejich transkripci. β -katenin reguluje GnRHR dráhu právě přes SF1. β -katenin je v interakci s SF1 a funguje jako jeho koaktivátor (Salisbury et al., 2008).

Zvýšená signalizace GnRHR dráhy se při snížení exprese NAV3 proteinů vyskytovala u gliomů (Carlsson et al., 2013), basocelulárních a dlaždicobuněčných karcinomů (Maliniemi et al., 2011), kolorektálních karcinomů (Carlsson et al., 2012) a v leiomyomech (Aly et al., 2019). V gliomech se při snížení exprese NAV3 proteinů kromě GnRHR upreguloval i membránový protein IL23R. Také buňky kolorektálních nádorů s delecemi pro NAV3 gen (snížená hladina NAV3 mRNA) vykazovaly zvýšenou hladinu proteinů IL23R (interleukin-23 receptor) a GnRHR. Receptory GnRHR a IL23R aktivují signální dráhy jako GnRHR a Jak-STAT, které jsou důležité pro karcinogenezi (Carlsson et al., 2013, Carlsson et al., 2012a).

β -katenin se v gliových buňkách vždy vyskytoval jako membránový protein. Naopak v nádorových buňkách se v deseti případech z čtyřiceti tří vyskytoval i v jádře. Jaderná lokalizace β -kateninu korelovala s metastázemi v lymfatických uzlinách (Carlsson et al., 2012a). Z těchto poznatků se usuzuje možnost, že GnRHR dráha by mohla být regulována právě přes β -katenin. Přesné mechanismy působení zatím nejsou známy. Jeden z návrhů je, že NAV3 proteiny jsou součástí kadherin-katenin-aktinového komplexu a ovlivňují tak množství cytosolického β -kateninu (Carlsson et al., 2013).

Regulace IL23R také ještě nebyla objasněna. IL-23 je prozánětlivý cytokin, který produkují buňky imunitního systému (například mikroglie). Ukázalo se, že IL-23 podněcuje růst nádorů a angiogenesi. Zvýšené hladiny IL-23 cytokinů v nádorových buňkách korelují s horší prognózou pacientů a vyšší schopností buněk metastázovat. IL-23 cytokiny také pomáhají vytvářet, mikroprostředí výhodnější pro nádory (Carlsson et al., 2013; Parham et al., 2002).

Leiomyomy mají často zvýšenou aktivitu GnRHR dráhy a její nadměrná aktivita zvětšuje objem těchto nádorů. Zároveň mají většinou sníženou expresi NAV3 proteinů. Při použití antagonistů/agonistů GnRHR dráhy (cetorelix, leuprolide acetate) v nádorových buňkách se sníženou hladinou NAV3 proteinů, se hladiny NAV3 proteinů zvýšily. Je tedy možné, že se jedná o regulaci zpětnou vazbou. Neví se ale, jestli NAV3 proteiny fungují jako mediátory této dráhy, anebo jako její vedlejší produkt. Navýšení NAV3 proteinů by mohlo ve výsledku vést ke snížení růstu nádoru, zprostředkovaného GnRHR. Další možností je, že regulace by mohla probíhat přes ne-kanonickou dráhu, která je hormonálně nezávislá (Aly et al., 2019).

5.3 SSH1L/Kofilinová dráha

Další dráha, kterou NAV proteiny ovlivňují, je dráha SSH1L/Kofilinová. Kofilin je členem rodiny aktin depolymerizujících faktorů (ADF). Stimuluje rozpadání aktinových filament na – konci. Tím se podílí na přestavování cytoskeletu a dodávání aktinových monomerů (shrnutí v: Ono, 2003). Fosforylovaný kofilin je jeho neaktivní formou. Negativním regulátorem kofilinu je LIM kináza, která kofilin fosforyluje. Fosforylovaný kofilin zabraňuje formování lamelipodií a polarizované migraci buněk. Naopak, fosfatázy kofilin aktivují (Niwa et al., 2002). Nejdůležitější fosfatázou je fosfatáza SSH1L z rodiny slingshot (SSH). SSH1L má aktin vázající doménu. Je kolokalizovaná na F-aktinu a její aktivita koreluje s hladinami kofilinu (shrnutí v: Ghosh et al., 2004).

V nádorových buňkách tlustého střeva korelovali hladiny NAV2 proteinů s fosforylací jak SSH1L, tak kofilinu. Tyto nádorové buňky měly exprese NAV2 proteinů zvýšenou. Zvýšené hladiny korelovaly se špatnou prognózou pacientů. Také se vyskytoval rozdíl mezi nádory metastazujícími a nemetastazujícími. Metastazující nádory měly hladiny NAV2 proteinů, oproti nádorům nemetastazujícím, vyšší. Naopak inhibice NAV2 proteinů migraci, invazivitu a schopnost metastázování snižovala. Při vypnutí exprese NAV2 proteinů v buňkách se objevila snížená hladina fosforylované SSH1L fosfatázy a zvýšená hladina fosforylovaného kofilinu. Ztráta exprese NAV2 by tedy mohla regulovat depolymerizaci F-aktinu (Tan et al., 2012). Mechanismy regulace nejsou zatím objasněné, ale důležitá role NAV2 proteinů v kolorektálních nádorech v podněcování aktinové polymerizace přes SSH1L/kofilinovou dráhu je pravděpodobná.

5.4 Metaloproteinázy

Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou endopeptidázy, které se podílejí na remodelaci ECM. Jsou schopné degradovat a remodelovat ECM a štěpit povrchové receptory, růstové faktory a další MMPs.

Zvýšená exprese MMP se v nádorových buňkách objevuje často. Nejčastějšími metaloproteinázami v invadopodiích jsou metaloproteinázy MMP-14, MMP-2 a MMP-9. MMP-14 (MT1-MMP, membrane type 1-matrix metalloproteinase) je membránově vázaná proteináza, která se kromě proteolytické aktivity vyznačuje i funkcí neproteolytickou. MMP-14 je exprimována v různých buněčných typech. Například ve fibroblastech, epiteliálních a endoteliálních buňkách, adipocytech a T a B lymfocytech. MMP-14 je schopna degradovat různé složky ECM zahrnující kolageny typu I, II a III, fibronektin, laminin a fibrin. Také umí aktivovat metaloproteinázy MMP-2 a MMP-13. MMP-2 je solubilní proteáza degradující kolagen typu IV. Kolagen typu IV je hlavní komponentou basální membrány. Aktivace MMP-2 je tedy důležitá pro invazivitu nádorových buněk (Gifford & Itoh, 2019; Lee et al., 2013, 2022).

V lidských melanomech se objevila možná vzájemná regulace proteinu NAV3 a MMP14. NAV3 proteiny jsou v lidských melanomech exprimovány na koncích invadopodií. Podněcují invazivní růst v 3D kolagenu, prodlouženou morfologii buněk a pomáhají určovat směr migrace. Buňky melanomu se sníženou expresí NAV3 proteinů migrovaly mnohem méně jak ve 2D, tak ve 3D kolagenu. V 70 % melanomů se našla vysoká korelace NAV3 proteinů a MMP14. V raných stádiích nádorů se exprimovaly vždy oba druhy proteinů. Naopak v pozdních stádiích se exprese MMP14 a NAV3 proteinů zeslabila. Z toho vyplývá možnost společné regulace a také to, že v pozdějších stádiích jsou MMP i NAV3 proteiny méně potřebné (Bugaeva et al., 2023). Mechanismus společné regulace ještě není objeven. Jednou z možností regulace by mohla být schopnost NAV3 proteinů lokalizovat MMP-14 do invadopodií díky interakci s mikrotubuly, které jsou nezbytné pro transport. Další možností je ovlivnění přes regulaci endocytózy EGFR (epidermal growth factor receptor), na které se NAV3 proteiny podílejí. EGF (epidermal growth factor) je jedním z důležitých faktorů indukujících expresi MMP-14. Zároveň MMP-14 podněcuje uvolňování heparin-vázajícího EGF-like faktoru (HB-EGF), který indukuje NAV3 proteiny (Bugaeva et al., 2023).

V nádorových buňkách tlustého střeva s vypnutou expresí NAV3 proteinů se pozorovala zvýšená exprese MMP2 a MMP9. Buňky s vypnutou expresí NAV3 proteinů vykazovaly zvýšenou schopnost migrace a invazivity (Uboveja et al., 2020). Kromě MMP2 a MMP9, vykazovaly nádorové buňky zvýšenou expresi proteinu kortaktinu. Kortaktin je protein vázající aktinová filamenta a reguluje aktivitu Arp2/3 komplexu. Aktinová vlákna stabilizuje a reguluje jejich uskupení v invadopodiích. Také je schopen vázat různé růstové faktory, proteiny jako N-WASP, dynamin2 a chemokiny. Je součástí mechanických adhezí a funguje jako signální molekula. K aktinu se kortaktin váže přes integrin linked kinázu (ILK) (shrnutí v: Jeannot & Besson, 2020; Jun et al., 2020). Hladiny MMP-2 a MMP-9 závisí na kortaktinu (Clark et al., 2007). Je tedy možné hypotetizovat, že NAV3 proteiny regulují kortaktin a kortaktin následně MMP-2 a MMP-9 (Uboveja et al., 2020).

6. Závěr

Účelem této práce bylo shrnutí dosud známých informací o neuron navigátorových proteinech. Neuron navigátorové proteiny (NAV) jsou proteiny asociované s cytoskeletem. Váží se a interagují jak s aktinovými vlákny, tak s mikrotubuly. Podílejí se na důležitých procesech v organismu, například na směřování a růstu axonu. Také se podílejí regulaci invazivity, migrace, proliferace a metastázování buněk. V nádorových onemocněních byly prokázány změny exprese NAV proteinů.

Metastázování nádorových buněk je nejčastější příčinou úmrtí lidí s nádorovým onemocněním. V procesu metastázování jsou nádorové buňky schopny migrace a invaze do okolních tkání. Aby toho buňky byly schopné, prochází epiteliální nádorové buňky procesem zvaným epithelo-mezenchymální tranzice (EMT). V tomto procesu se epiteliální buňky stávají buňkami mesenchymálními.

NAV proteiny jsou důležitou součástí signálních drah. Tyto signální dráhy nejčastěji ovlivňují cytoskelet, transkripci genů a epithelo-mezenchymální transici. Protein p73, který je homologem známého proteinu p53, je důležitým proteinem regulujícím buněčný cyklus. NAV3 proteiny pravděpodobně ovlivňují právě expresi proteinů p73. Díky tomu se podílejí na regulaci kontroly migrace buněk a EMT.

Další drahou, kterou NAV proteiny ovlivňují, je signální dráha Wnt. V nádorových buňkách exprese NAV proteinů často koreluje s expresí Snail2 proteinů. Snail2 proteiny jsou transkripčními faktory, ovlivňující transkripci genů důležitých pro EMT (a to aktivací genů pro mesenchymální tranzici a naopak represí epiteliálních genů). Potlačují expresi proteinů zprostředkávajících adhezi jako E-kadheriny a umožňují tak migraci buněk. Jedním z regulátorů proteinu snail2 je β -katenin, který se po stabilizaci se přemísťuje do jádra a spouští expresi snail2. Je možné, že NAV proteiny jsou součástí kadherin-katenin-aktinových komplexů, přes které regulují stabilitu β -kateninu a tím ovlivňují expresi proteinu snail2 a regulují EMT.

NAV proteiny také ovlivňují membránové receptory jako GnRHR a IL23R. Tyto receptory spouští důležité dráhy (jako JAK-STAT a GnRHR), které podporují karcinogenezi.

Důležitou úlohu v regulaci aktinového cytoskeletu má kofilinová dráha. Kofilin je protein schopný depolymerizovat aktinová vlákna. Exprese NAV2 proteinů koreluje s hladinou fosforylovaného kofilinu a SSH1L. Nefosforylovaný podporuje přestavbou cytoskeletu a tím i migrativitu buněk. Při vypnutí exprese NAV proteinů, se zvýšila exprese fosforylovaného kofilinu. To naznačuje, že NAV proteiny by mohly ovlivňovat schopnost buněk migrovat právě přes kofilin.

NAV proteiny také hrají důležitou roli v přestavbě ECM, kde kooperují s matrixovými metaloproteinázami (MMP). Hlavní úloha MMPs je degradace a remodelace ECM. Exprese NAV3

proteinů a MMP14 je v nádorových buňkách často pozitivně korelována. Zvýšená exprese v počátečních stádiích migraci napomáhá a v pozdějších stádiích jí naopak spíše omezuje. Je možné, že NAV3 proteiny pomáhají lokalizovat MMP14 do invapodií. NAV3 mohou regulovat metaloproteinázy pomocí ovlivnění EGFR.

Úloha proteinů NAV v buněčných procesech je neustále velmi málo objasněná. Pro lepší pochopení mechanismů a úlohy NAV proteinů v buňkách jsou potřebné další studie, které mohou pomoci jak k pochopení úlohy NAV proteinů v buněčných procesech, tak i k možnosti jejich využití v léčbě nádorových onemocnění.

7. Literatura:

- Abe, T., Yamazaki, D., Murakami, S., Hiroi, M., Nitta, Y., Maeyama, Y., & Tabata, T. (2015). *The NAV2 homolog Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth in Drosophila mushroom body neurons via the non-canonical Rac-Cofilin pathway*. *142*, 1021. <https://doi.org/10.1242/dev.122713>
- Akhmanova, A., & Hoogenraad, C. C. (2005). Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Current Opinion in Cell Biology*, *17*(1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2004.11.001>
- Aly, J. M., Lewis, T. D., Parikh, T., Britten, J., Malik, M., & Catherino, W. H. (2019). *NAV3, a Tumor Suppressor Gene, Is Decreased in Uterine Leiomyoma Tissue and Cells*. <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00096-3>
- Bateman, J., & Van Vactor, D. (2001). *The Trio family of guanine-nucleotide-exchange factors: regulators of axon guidance*.
- Bugaeva, O., Maliniemi, P., Prestvik, W. S., Leivo, E., Kluger, N., Salava, A., Virtanen, S., Jääntti, K., Saksela, O., Lehti, K., Kujala, P., Krohn, K., & Ranki, A. (2023). Tumour Suppressor Neuron Navigator 3 and Matrix Metalloproteinase 14 are Co-expressed in Most Melanomas but Downregulated in Thick Tumours. *Acta Dermato-Venereologica*, *103*, adv00883. <https://doi.org/10.2340/actadv.v103.298>
- Carlsson, E., Krohn, K., Ovaska, K., Lindberg, P., Häyry, V., Maliniemi, P., Lintulahti, A., Korja, M., Kivisaari, R., Hussein, S., Sarna, S., Niiranen, K., Hautaniemi, S., Haapasalo, H., & Ranki, A. (2013). Neuron navigator 3 alterations in nervous system tumors associate with tumor malignancy grade and prognosis. *Genes Chromosomes and Cancer*, *52*(2), 191–201. <https://doi.org/10.1002/gcc.22019>
- Carlsson, E., Ranki, A., Sipilä, L., Karenko, L., Abdel-Rahman, W. M., Ovaska, K., Siggberg, L., Aapola, U., Ssämäki, R. A., Häyry, V., Niiranen, K., Helle, M., Knuutila, S., Hautaniemi, S., Peltomäki, P., & Krohn, K. (2012). Potential role of a navigator gene NAV3 in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, *106*, 517–524. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.553>
- Clark, E. S., Whigham, A. S., Yarbrough, W. G., & Weaver, A. M. (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Research*, *67*(9), 4227–4235. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3928>
- Cohen-Dvashi, H., Ben-Chetrit, N., Russell, R., Carvalho, S., Lauriola, M., Nisani, S., Mancini, M., Nataraj, N., Kedmi, M., Roth, L., Köstler, W., Zeisel, A., Yitzhaky, A., Zylberg, J., Tarcic, G., Eilam, R., Wigelman, Y., Will, R., Lavi, S., ... Yarden, Y. (2015). Navigator-3, a modulator of cell migration, may act as a suppressor of breast cancer progression. *EMBO Molecular Medicine*, *7*(3). <https://doi.org/10.15252/emmm.201404134>
- Collinet, C., & Lecuit, T. (2013). Stability and Dynamics of Cell–Cell Junctions. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *116*, 25–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00002-9>
- Coy, J. F., Wiemann, S., Bechmann, I., Bächner, D., Nitsch, R., Kretz, O., Christiansen, H., & Poustka, A. (2002). *Pore membrane and/or filament interacting like protein 1 (POMFIL1) is predominantly*

expressed in the nervous system and encodes different protein isoforms q.
www.elsevier.com/locate/gene

- Davidson, B., Hellesylt, E., Holth, A., Danielsen, H. E., Skeie-Jensen, T., & Katz, B. (2017). *Neuron navigator-2 and cyclin D2 are new candidate prognostic markers in uterine sarcoma*. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2172-5>
- Davis, P. K., & Dowdy, S. F. (2001). p73. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(10), 935–939. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00073-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00073-5)
- Dent, E. W., & Gertler, F. B. (2003). Review Cytoskeletal Dynamics and Transport in Growth Cone Motility and Axon Guidance ganism, by isolating neurons in a relatively simple, easily manipulated, two-dimensional environment, we have learned much about the cytoskeleton and its role in motility and guidance. Our focus in this review will be on the final common target of signaling cascades in the. In *Neuron* (Vol. 40).
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). *Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited*. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Fletcher, D. A., & Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280), 485–492. <https://doi.org/10.1038/nature08908>
- Franze, K., & Guck, J. (2010). The biophysics of neuronal growth. *Reports on Progress in Physics*, 73(9). <https://doi.org/10.1088/0034-4885/73/9/094601>
- Galjart, N. (2010). Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. In *Current Biology* (Vol. 20, Issue 12). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.022>
- Ghosh, M., Song, X., Mouneimne, G., Sidani, M., Lawrence, D. S., & Condeelis, J. S. (2004). *Cofilin Promotes Actin Polymerization and Defines the Direction of Cell Motility*. www.sciencemag.org
- Gifford, V., & Itoh, Y. (2019). *MT1-MMP-dependent cell migration: proteolytic and non-proteolytic mechanisms*. <https://doi.org/10.1042/BST20180363>
- Goodson, H. V., & Jonasson, E. M. (2018). *Microtubules and Microtubule-Associated Proteins*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022608>
- Hekimil, S., & Kershaw, D. (1993). Axonal Guidance Defects in a *Caenorhabditis elegans* Mutant Reveal Cell-extrinsic Determinants of Neuronal Morphology. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 13, Issue 10).
- Honnappa, S., Gouveia, S. M., Weisbrich, A., Damberger, F. F., Bhavesh, N. S., Jawhari, H., Grigoriev, I., van Rijssel, F. J. A., Buey, R. M., Lawera, A., Jelesarov, I., Winkler, F. K., Wüthrich, K., Akhmanova, A., & Steinmetz, M. O. (2009). An EB1-Binding Motif Acts as a Microtubule Tip Localization Signal. *Cell*, 138(2), 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.065>
- Hu, W., Li, X., Cheng, R., Ke, J., Liu, Y., Ma, M., Cao, Y., & Liu, D. (2019). NAV2 facilitates invasion of cutaneous melanoma cells by targeting SNAI2 through the GSK-3 β / β -catenin pathway. *Archives of Dermatological Research*, 311(5), 399–410. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-01909-w>
- Hur, E.-M., & Zhou, F.-Q. (2011). *Growing the growth cone: remodeling the cytoskeleton to promote axon regeneration*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.002>
- Innocenti, M., Gerboth, S., Rottner, K., Lai, F. P. L., Hertzog, M., Stradal, T. E. B., Frittoli, E., Didry, D., Polo, S., Disanza, A., Benesch, S., Fiore, P. Di, Carlier, M.-F., & Scita, G. (2005). Abi1 regulates the

- activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *NATURE CELL BIOLOGY*, 7(10).
<https://doi.org/10.1038/ncb1304>
- Ishiguro, H., Shimokawa, T., Tsunoda, T., Tanaka, T., Fujii, Y., Nakamura, Y., & Furukawa, Y. (n.d.).
Isolation of HELAD1, a novel human helicase gene up-regulated in colorectal carcinomas.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc>
- Jeannot, P., & Besson, A. (2020). Cortactin function in invadopodia. In *Small GTPases* (Vol. 11, Issue 4, pp. 256–270). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1405773>
- Jun, C.-D., Ruan, S., Ji, R., Huang, L.-Q., Zhu, X.-J., & Wang, Z.-R. (2020). *Cortactin in Epithelial-Mesenchymal Transition*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.585619>
- Kikuchi, A. (2000). Regulation of β -catenin signaling in the Wnt pathway. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 268, Issue 2, pp. 243–248). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1860>
- Lee, H., Chang, K. W., Yang, H. Y., Lin, P. W., Chen, S. U., & Huang, Y. L. (2013). MT1-MMP regulates MMP-2 expression and angiogenesis-related functions in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(2), 232–238.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.046>
- Lee, H., Maybee, D. V., Ink, N. L., & Ali, M. A. M. (2022). *Novel Roles of MT1-MMP and MMP-2: Beyond the Extracellular Milieu*. <https://doi.org/10.3390/ijms23179513>
- Li, M., Wang, Z., Dong, S., & Xu, Y. (2022). *Research Article NAV3*.
<https://doi.org/10.1155/2022/8337048>
- Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G., & Yin, G. (2022). *Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities*.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>
- Lowery, L. A., & Van Vactor, D. (2009). *The trip of the tip: understanding the growth cone machinery*.
<https://doi.org/10.1038/nrm2679>
- Maes, T., Barceló, A., & Buesa, C. (2002). Neuron navigator: A human gene family with homology to UNC-53, a cell guidance gene from *Caenorhabditis elegans*. *Genomics*, 80(1), 21–30.
<https://doi.org/10.1006/geno.2002.6799>
- Maliniemi, P., Carlsson, E., Kaukola, A., Ovaska, K., Niiranen, K., Saksela, O., Jeskanen, L., Hautaniemi, S., & Ranki, A. (2011). NAV3 copy number changes and target genes in basal and squamous cell cancers. *Experimental Dermatology*, 20(11), 926–931. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01358.x>
- Martínez-López, M. J., Alcántara, S., Mascaró, C., Pérez-Brangulí, F., Ruiz-Lozano, P., Maes, T., Soriano, E., & Buesa, C. (2005). Mouse Neuron navigator 1, a novel microtubule-associated protein involved in neuronal migration. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 28(4), 599–612.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.09.016>
- May, R. C. (2001). The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton. In *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* (Vol. 58).

- Merrill, R. A., Plum, L. A., Kaiser, M. E., & Clagett-Dame, M. (2002). *A mammalian homolog of unc-53 is regulated by all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells and embryos*.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.052017399
- Mortimer, D., Fothergill, T., Pujic, Z., Richards, L. J., & Goodhill, G. J. (2008). Growth cone chemotaxis. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 31, Issue 2, pp. 90–98).
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.11.008>
- Mosaddeghzadeh, N., & Ahmadian, M. R. (2021). *cells The RHO Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling*. <https://doi.org/10.3390/cells10071831>
- Muley, P. D., McNeill, E. M., Marzinke, M. A., Knobel, K. M., Barr, M. M., & Clagett-Dame, M. (2008). The atRA-responsive gene neuron navigator 2 functions in neurite outgrowth and axonal elongation. *Developmental Neurobiology*, *68*(13), 1441–1453.
<https://doi.org/10.1002/dneu.20670>
- Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 3, Issue 3, pp. 155–166). <https://doi.org/10.1038/nrm757>
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., & Uemura, T. (2002). namics (Moon and Drubin. In *Cell* (Vol. 108). Amano.
- Ono, S. (2003). Regulation of Actin Filament Dynamics by Actin Depolymerizing Factor/Cofilin and Actin-Interacting Protein 1: New Blades for Twisted Filaments. In *Biochemistry* (Vol. 42, Issue 46, pp. 13363–13370). <https://doi.org/10.1021/bi034600x>
- Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, P. K., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A.-M., McClanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Rennick, D. M., Kastelein, R. A., ... Moore, K. W. (2002). *A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5699>
- Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 29, Issue 3, pp. 212–226). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>
- Powers, R. M., Hevner, R. F., & Halpain, S. (2023). The Neuron Navigators: Structure, function, and evolutionary history. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *15*.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1099554>
- Ramos, H., Raimundo, L., & Saraiva, L. (2020). p73: From the p53 shadow to a major pharmacological target in anticancer therapy. *Pharmacological Research*, *162*, 105245.
<https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.105245>
- Reed, N. A., Cai, D., Blasius, T. L., Jih, G. T., Meyhofer, E., Gaertig, J., & Verhey, K. J. (2006). Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Current Biology*, *16*(21), 2166–2172. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.014>
- Rim, E. Y., Clevers, H., & Nusse, R. (2022). *The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-040320>
- Rottner, K., Stradal, T. E. B., & Chen, B. (2021). *WAVE regulatory complex*.

- Sánchez-Huertas, C., Bonhomme, M., Falco, A., Fagotto-Kaufmann, C., Van Haren, J., Jeanneteau, F., Galjart, N., Debant, A., & Boudeau, J. (2020). The +TIP Navigator-1 is an actin-microtubule crosslinker that regulates axonal growth cone motility. *Journal of Cell Biology*, 219(9). <https://doi.org/10.1083/JCB.201905199>
- Schaks, M., Gr' , G., Giannone, G., & Rottner, K. (2019a). Actin dynamics in cell migration. *Essays in Biochemistry*, 63, 483–495. <https://doi.org/10.1042/EBC20190015>
- Schaks, M., Gr' , G., Giannone, G., & Rottner, K. (2019b). Actin dynamics in cell migration. *Essays in Biochemistry*, 63, 483–495. <https://doi.org/10.1042/EBC20190015>
- Stradal, T., Kranewitter, W., Winder, S. J., & Gimona, M. (1998). *CH domains revisited*. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00751-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00751-0)
- Stringham, E. G., & Schmidt, K. L. (2009). *Cell Adhesion & Migration Navigating the cell UNC-53 and the navigators, a family of cytoskeletal regulators with multiple roles in cell migration, outgrowth and trafficking*. <https://doi.org/10.4161/cam.3.4.9451>
- Svitkina, T. (2018). *The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018267>
- Sytnyk, V., Pfuhl, M., William Blaschuk, O., Yin, L.-M., Schnoor, M., & Jun, C.-D. (2020). *Structural Characteristics, Binding Partners and Related Diseases of the Calponin Homology (CH) Domain*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00342>
- Tan, F., Zhu, H., Tao, Y., Yu, N., Pei, Q., Liu, H., Zhou, Y., Xu, H., Song, X., Li, Y., Zhou, Z., He, X., Zhang, X., & Pei, H. (2012). *Neuron navigator 2 overexpression indicates poor prognosis of colorectal cancer and promotes invasion through the SSH1L/cofilin-1 pathway*. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0237-3>
- Uboveja, A., Satija, Y. K., Siraj, F., Sharma, I., & Saluja, D. (2020). p73 – NAV3 axis plays a critical role in suppression of colon cancer metastasis. *Oncogenesis*, 9(2). <https://doi.org/10.1038/s41389-020-0193-4>
- Valenta, T., Hausmann, G., & Basler, K. (2012). Focus Review The many faces and functions of b-catenin. *The EMBO Journal*, 31, 2714–2736. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.150>
- Van Haren, J., Boudeau, J., Schmidt, S., Basu, S., Liu, Z., Lammers, D., Demmers, J., Benhari, J., Grosveld, F., Debant, A., & Galjart, N. (2014). Dynamic microtubules catalyze formation of navigator-TRIO complexes to regulate neurite extension. *Current Biology*, 24(15), 1778–1785. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.037>
- Van Haren, J., Draegestein, K., Keijzer, N., Abrahams, J. P., Grosveld, F., Peeters, P. J., Moechars, D., & Galjart, N. (2009). Mammalian navigators are microtubule plus-end tracking proteins that can reorganize the cytoskeleton to induce neurite-like extensions. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(10), 824–838. <https://doi.org/10.1002/cm.20370>
- Voulgari, A., & Pintzas, A. (2009). Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1796, Issue 2, pp. 75–90). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.03.002>
- Willert, K., & Nusse, R. (1998). β -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(1), 95–102. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(98\)80068-3](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(98)80068-3)

Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*.
<https://doi.org/10.1007/s10555-008-9169-0>