



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Noonan and LEOPARD syndrome in zebrafish : molecular mechanisms and cardiac development

Bonetti, M.

### Citation

Bonetti, M. (2014, October 15). *Noonan and LEOPARD syndrome in zebrafish : molecular mechanisms and cardiac development*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/29157>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/29157>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29157> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Authors:** Paardekooper Overman, Jeroen ; Bonetti, Monica

**Title:** Noonan and LEOPARD syndrome in zebrafish : molecular mechanisms and cardiac development

**Issue Date:** 2014-10-15

## Nederlandse Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft het gebruik van de zebravis bij de studie van Noonan- (NS) en LEOPARD syndromen (LS). In de eerste drie hoofdstukken wordt achtergrondinformatie gegeven voor de zes hoofdstukken die daarop volgen. In **Hoofdstuk 1** worden gastrulatie en de betrokken signaal-transductie mechanismen in de vis besproken. Het gebruik van zebravissen om proteïne tyrosine fosfatasen (PTP) te bestuderen wordt besproken in **Hoofdstuk 2**. Er wordt een kort overzicht gegeven van eerdere studies naar PTPs die gebruik hebben gemaakt van de zebravis en de genetische instrumenten die beschikbaar zijn in de vis worden besproken. Bovendien wordt fosfoproteomica besproken als één van de methodes om PTPs *in vivo* te bestuderen. **Hoofdstuk 3** beschrijft de rol van *PTPN11* (proteïne tyrosine fosfatase, non-receptor type 11), het gen coderend voor SHP2, een cytoplasmatische PTP dat essentieel is voor de ontwikkeling van vertebraten. Mutaties in *PTPN11* worden geassocieerd met NS en LS, twee autosomale syndromen met overlappende symptomen. Verassend is dat NS mutaties leiden tot een 'actieve' vorm van SHP2 terwijl LS mutaties leiden tot een PTP-defecte vorm van SHP2. NS en LS patiënten vertonen verscheidene symptomen waaronder een kort postuur, craniofaciale defecten en hartafwijkingen. Het hart phenotype van NS en LS patiënten is vrij verschillend; terwijl NS patiënten vooral pulmonaire stenose (PS) vertonen, is hypertrofische cardiomyopathie (HCM) het meest voorkomende defect in LS patiënten.

In **Hoofdstuk 4** hebben wij de zebravis als model gebruikt om de rol van Shp2 tijdens de embryonale ontwikkeling te bestuderen. We hebben in detail de rol van de twee *ptpn11* isovormen (*ptpn11a* en *ptpn11b*) gekarakteriseerd. We laten zien dat *ptpn11a* constitutief tot expressie komt en dat *ptpn11b* sterk wordt opgereguleerd tijdens de ontwikkeling. Bovendien zijn de producten van beide *ptpn11* genen, Shp2a en Shp2b, functioneel. Gerichte inactivatie van *ptpn11a* en *ptpn11b* laat zien dat homozygote mutanten lethaal zijn op dag 5-6 na fertilisatie (dpf). *Ptpn11a*<sup>-/-</sup> *ptpn11b*<sup>-/-</sup> embryo's vertoonden verscheidene defecten vanaf 4dpf, waaronder een kortere lichaamsas en craniofaciale defecten, wat samen ging met verlaagde hoeveelheden gefosforyleerd Erk op 5dpf. Defecten in de homozygote *ptpn11a*<sup>-/-</sup> mutanten waren vergelijkbaar, hoewel milder, met defecten in de dubbel mutanten, terwijl de *ptpn11b*<sup>-/-</sup> homozygote mutanten geen zichtbare ontwikkelingsdefecten vertoonden, levensvatbaar waren en vruchtbaar waren. *Ptpn11a*<sup>-/-</sup> *ptpn11b*<sup>-/-</sup> mutanten konden gered worden door expressie van exogeen *ptpn11a* en/of *ptpn11b*, wat impliceert dat Shp2a en Shp2b functioneel gelijk zijn.

In **Hoofdstuk 5** beschrijven wij, met behulp van fosfoproteomica, de identificatie van Fer kinase als een stroomafwaarts eiwit dat betrokken is in de etiologie van NS en LS. Fosfotyrosine immunoprecipitatie van lysaten van zebravissen die geïnjecteerd zijn met wild type-, NS- of LS-Shp2, gevolgd door massa spectrometrie toonde een vermindering aan in NS en LS van een fosfopeptide wat correspondeert met de tyrosine kinase Fer. Wij hebben laten zien dat Fer tot expressie komt in vroege embryo's en dat verlies van Fer zorgt voor ontwikkelingsdefecten, waaronder convergentie en extensie defecten. Gedeeltelijk verlies van Fer samen met lage expressie van NS en LS varianten van Shp2, maar niet met wild type Shp2 zorgde ook voor ontwikkelingsdefecten. In conclusie, het verlies van Fer draagt bij aan de NS en LS fenotypes in zebravissen.

In **Hoofdstuk 6** wordt een vergelijkbare aanpak gebruikt met muizenharten waarbij Protein Zero Related (PZR) als het meest gefosforyleerde eiwit in NS wordt geïdentificeerd. Verlies van PZR leidt tot gastrulatie defecten in zebravissen en fenotypes die vergelijkbaar zijn met verlies van Shp2 en met NS en LS. PZR is meer gefosforyleerd in diens immuunreceptor tyrosine remmende motieven (ITIMs) in verschillende weefsels en wij laten zien dat dit afhankelijk is van Src activering. Co-immunoprecip-

itatie studies laten zien dat NS en LS Shp2 meer binden aan Src en PZR, waarmee een complex wordt gevormd. Bovendien laten wij zien dat de ITIMs, wat bindingsplaatsen zijn voor Shp2, essentieel zijn voor de inductie van het convergentie en extensie phenotype in de zebravis. In conclusie, NS en LS vormen een complex met Src en PZR wat leidt tot ontwikkelingsdefecten in de zebravis.

In **Hoofdstuk 7** hebben wij de rol van de meest voorkomende NS en LS mutaties onderzocht tijdens de hartontwikkeling in de zebravis. Foutieve hartontwikkeling is een prominent symptoom van NS en LS, echter hoe de Shp2 varianten hartontwikkeling beïnvloeden is nog onduidelijk. Wij laten zien dat de hart functie van embryo's die NS en LS varianten van Shp2 tot expressie brengen, aangetast is. De hartafwijkingen bestonden uit verminderde cardiomyocyte migratie, gekoppeld aan verminderde linkswaartse hart verplaatsing. Expressie van lateraliteitsmarkeringen was gerandomiseerd in embryo's die NS en LS varianten van Shp2 tot expressie brachten. Ciliogenese en cilia functie in Kupffer's vesicle was verminderd, wat waarschijnlijk de oorzaak was van de links/rechts asymmetrie defecten. Mitogeen geactiveerd eiwit kinase (Mapk) signalering was geactiveerd in embryo's die NS en LS Shp2 varianten tot expressie brachten. Remming van Mapk signalering voor de aanvang van gastrulatie verminderde de cilia lengte- en hart lateraliteits defecten, wat suggereert dat NS en LS Shp2 varianten zorgen voor hyperactivatie van Mapk wat leidt tot verminderde cilia functie in Kupffer's vesicle wat zorgt voor hartdefecten op latere stadia.

Als laatste hebben wij de rol van Alpha-2-Macroglobulin-Like-1 (A2ML1) in een NS-gerelateerd syndroom bestudeerd in **Hoofdstuk 8**. Tot op heden zijn alle bekende mutaties die NS veroorzaken dominant en activeren de RAS/MAPK signaaltransductie route. Echter, in 25% van de gevallen blijft het genetische defect onbekend, wat suggereert dat andere factoren dan de standaard RAS/MAPK route ook een rol kunnen spelen. In onze studie hebben wij gebruik gemaakt van familie- gebaseerd exoom sequencing van een casus-ouder trio en hebben wij een *de novo* mutatie p.(Arg802His), gevonden in *A2ML1* wat codeert voor de uitgescheiden protease remmer Alpha-2-Macroglobulin-Like-1. Het vervolgens uitlezen van A2ML1 in 155 gevallen met een klinische diagnose van NS leidde tot de identificatie van verdere mutaties in twee families, p.(Arg802Leu) and p.(Arg592Leu). Functionele karakterisatie van deze mutaties in zebravissen toonde NS-achtige ontwikkelingsdefecten aan, waaronder craniofaciale defecten en hartafwijkingen. De kristalstructuur van A2M, wat zeer homolog is aan A2ML1, leidde ons tot de identificatie van de intramoleculaire interactiepartner van p.Arg802. Het muteren van dit residu, p.Glu906, induceerde vergelijkbare ontwikkelingsdefecten in zebravissen wat onze conclusie bevestigt dat mutaties in A2ML1 een stoornis veroorzaakt die klinisch vergelijkbaar is met NS. Wij laten voor de eerste keer de betrokkenheid van een extracellulaire factor zien in een aandoening die klinisch gerelateerd is aan de RASopathies. Hierbij dragen wij potentiële nieuwe aanwijzingen aan voor een beter begrip van de moleculaire basis van deze familie van ontwikkelingsstoornissen.

In **Hoofdstuk 9** bediscussiëren wij elk vorig hoofdstuk apart en geven wij een overkoepelende blik op basis van de bevindingen van dit proefschrift.