



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

Riassunto in Italiano

Questa tesi descrive l'uso di *Danio Rerio* nello studio della sindrome di Noonan-(NS) e di Leopard (LS). Nei primi tre capitoli, mettiamo a disposizione un background per i seguenti sei capitoli. Nel capitolo 1, discuteremo brevemente e in maniera concisa il processo di gastrulazione in zebrafish e i meccanismi di trasduzione del segnale ad essa associati. L'uso di zebrafish per studiare le proteine tirosina-fosfatasi "protein tyrosine fosfatase" (PTP) sarà discussa nel capitolo 2. In questo capitolo viene fornita una rassegna sulla letteratura esistente riguardo alla definizione del ruolo delle PTP in zebrafish e saranno discusse le diverse metodologie genetiche utilizzate a questo scopo. Inoltre, descriveremo in dettaglio l'analisi fosfoproteomica come metodo per studiare PTP *in vivo*. Nel capitolo 3 descriveremo il ruolo del gene *PTPN11* (proteina tirosina fosfatasi, non-ricettore tipo 11), che codifica SHP2, una PTP citoplasmatica essenziale per lo sviluppo dei vertebrati. Le mutazioni in *PTPN11* sono associate con NS e LS, due patologie autosomiche dominanti con sintomi clinici comuni. Le mutazioni NS comportano uno stato più 'attivo' di Shp2, mentre mutazioni LS danno origine a una proteina con un dominio catalitico difettoso. Pazienti NS e LS presentano vari sintomi, tra cui difetti cranio-facciali e anomalie cardiache. È interessante notare che il fenotipo cardiaco dei pazienti NS e LS è differente; infatti i pazienti NS sono affetti da stenosi polmonare (PS), mentre la cardiomiopatia ipertrofica (HCM) è il difetto cardiaco più comune in LS.

Nel **Capitolo 4** descriveremo l'uso di zebrafish come modello per studiare il ruolo di Shp2 nello sviluppo embrionale. Abbiamo caratterizzato in dettaglio il ruolo delle due isoforme *PTPN11* presenti in zebrafish (*ptpn11a* e *ptpn11b*) dimostrando (concludendo?) che *ptpn11a* è espresso costitutivamente e che l'espressione *ptpn11b* è più abbondante negli ultimi stadi di sviluppo embrionale. Inoltre, i prodotti di entrambi i geni *PTPN11*, Shp2a e Shp2b, sono funzionanti. L'inattivazione di *ptpn11a* e *ptpn11b* comporta la morte dei doppi mutanti *ptpn11a*^{-/-}*ptpn11b*^{-/-} entro 5-6 giorni dopo la fecondazione (dpf). Gli embrioni di questi doppi mutanti mostrano difetti pleiotropici da 4 dpf in poi, tra cui ridotta estensione dell'asse corporeo e difetti cranio-facciali, accompagnata da bassi livelli di fosforilazione di Erk a 5 dpf. È interessante notare che i difetti degli omozigoti *ptpn11a*^{-/-} si sovrappongono ai difetti dei doppi mutanti anche se questi difetti sono più lievi, mentre i singoli mutanti *ptpn11b*^{-/-} non mostrano difetti di sviluppo e sono fertili e vitali. L'espressione esogena di *ptpn11a* e *ptpn11b*, riduce la severità del fenotipo dei doppi mutanti, indicando ridondanza funzionale tra Shp2a e Shp2b.

Utilizzando approcci di fosfoproteomica, abbiamo identificato la chinasi ? Fer come proteina potenzialmente coinvolta a valle del signalling di shp2 e nell'eziologia di entrambe le sindromi NS e LS (**capitolo 5**). Lisati proteici di embrioni di zebrafish iniettati con mRNA wild type, NS o LS Shp2, seguita da spettrometria di massa e arricchimento per proteine fosforilate, ha mostrato una riduzione nel picco di un fosopeptide corrispondente alla tirosina chinasi Fer sia nella NS che nella LS. Abbiamo dimostrato che Fer è espresso negli stadi iniziali dello sviluppo embrionale e che la perdita di Fer si traduce in difetti di sviluppo, inclusi difetti di convergenza e di estensione. La perdita parziale di Fer coopera con la bassa espressione delle varianti NS e LS di Shp2, ma non con l'espressione Shp2 wild-type. Quindi, la perdita di Fer contribuisce allo sviluppo dei fenotipi NS e LS in zebrafish.

Nel **capitolo 6** descriveremo l'uso di un approccio simile a quello poc'anzi descritto ma applicato su cuori di topi NS. L'uso di questa metodologia ci ha portato ad identificare la proteina PZR (protein zero related) come iper-fosforilata nella sindrome di Noonan (NS). Inoltre, la perdita di PZR comporta sia difetti gastrulazione in zebrafish che un fenotipo che ricorda quello risultante dalla mancanza delle proteine Shp2, NS e LS. PZR risulta essere iper-fosforilata sulle sequenze ITIMS in diversi tessuti

e la sua fosforilazione è dipendente dalla attivazione di Src. Studi di co-immunoprecipitazione mostrano che NS e LS Shp2 si legano a Src e PZR, costituendo un complesso. Inoltre abbiamo dimostrato che le ITIMs sono siti di legame per Shp2 e sono essenziali per l'induzione della convergenza zebrafish ed estensione fenotipo. Così, NS e LS Shp2 formano un complesso con Src e PZR per indurre difetti dello sviluppo in zebrafish.

Nel **capitolo 7** abbiamo studiato il ruolo delle mutazioni più comuni nella NS e nella LS in zebrafish, durante lo sviluppo cardiaco. I difetti cardiaci sono un sintomo importante di entrambe le patologie, ma ancora non è chiaro come le varianti Shp2 influenzino lo sviluppo cardiaco. Abbiamo dimostrato che la funzionalità del cuore è compromessa in embrioni che esprimono NS e LS. Le anomalie cardiache durante lo sviluppo di zebrafish consistono nella deregolazione della migrazione dei cardiomiociti, insieme al ridotto movimento del cuore verso sinistra. L'espressione di marcatori specifici di lateralità è randomizzata (casuale?) negli embrioni che esprimono NS e LS Shp2. La funzione delle *cilia* nelle vescicole di Kupffer è compromessa, causando probabilmente i difetti di asimmetria sinistra / destra. Inoltre il signaling delle Mapk risulta iper-attivato negli embrioni che esprimono NS e LS Shp2. È interessante notare che l'inibizione della cascata delle Mapk prima della gastrulazione ripristina la lunghezza delle *cilia* e annulla parzialmente il difetto cardiaco e di lateralità, suggerendo che NS e LS Shp2 possano mediare l'iperattivazione delle Mapk portando a un'alterata funzione ciliare nelle vescicole di Kupffer e al difetto cardiaco successivo.

Infine nel **Capitolo 8**, abbiamo studiato il ruolo di Alpha-2-Macroglobulina-Like-1 (A2ML1) nella NS. Fino ad oggi, tutte le mutazioni note che causano la NS sono dominanti e comportano un'iperattivazione della via di segnalazione RAS/ MAPK. Tuttavia nel 25% dei casi, la causa genetica di NS rimane sconosciuta, suggerendo che altri fattori, oltre quelli coinvolti nella canonica via RAS/MAPK, possano svolgere un ruolo. In questo capitolo, abbiamo utilizzato il sequenziamento dell'esoma (cos'è?) basandoci su un trio (??) familiare e abbiamo identificato una mutazione *de novo*, p. (Arg802His), in *A2ML1* che codifica per l'inibitore della proteasi alfa-2-Macroglobulina-Like-1. Il successivo sequenziamento di *A2ML1* in 155 casi con una diagnosi clinica di NS ha portato all'identificazione di mutazioni aggiuntive in due famiglie, p. (Arg802Leu) e p. (Arg592Leu). La caratterizzazione funzionale di queste mutazioni *A2ML1* umani in zebrafish ha mostrato difetti di sviluppo NS-like, tra cui difetti cranio-facciali e malformazioni cardiache. La struttura cristallografica di A2M, altamente omologa ad *A2ML1*, ci ha portato all'identificazione del partner di interazione intramolecolare p.Arg802. La mutazione di questo residuo, p.Glu906, induce difetti di sviluppo simili in zebrafish, rafforzando la nostra conclusione che le mutazioni in *A2ML1* causano una malattia clinicamente correlata alla NS. In questa tesi, abbiamo dimostrato per la prima volta, il coinvolgimento di un fattore extracellulare in un disturbo clinicamente correlato alle RASopatie, fornendo una migliore comprensione della base molecolare di questa famiglia di malattie.

Nel **capitolo 9**, discutiamo ogni capitolo precedente fornendo una visione integrata sui risultati di questa tesi.