December 2008, Utrecht



Georgi Nadibaidze

Expressie van

Protein tyrosine fosfatase in de zebravis embryo

**Afstudeer opdracht**

Naam: Georgi Nadibaidze

Datum: 12 december 2008

Studie: Life Sciences

Studie richting: Moleculaire Bilogie

School: Hogeschool Utrecht

Onderzoeksplaats: Hubrecht Institute

Termijn: mei 2008 – januari 2009

Begeleiders: Mark van Eekelen & Vincent Runtuwene

Groepsleider: Jeroen den Hertog

Project: protein tyrosine fosfatase in ontwikkeling

School begeleider: Nelleke Barendsen

Uppsalalaan 8

3584 CT Utrecht

FNT Life Sciences

F.C. Donderstraat 65

3572 JE Utrecht

**Voorwoord**

Ik wil hierbij volgende mensen van Den Hertog groep bedankten voor hun hulp. Ten eerste wil ik Jeroen Den Hertog bedanken voor dat ik dit interessante project mocht doen. Ik wil Mark van Eekelen en Vincent Runtuwene bedanken voor goede begeleiding. Zonder goede uitleg zou moeilijk zijn geweest om dit verslag te schrijven en goede resultaten te krijkegn. Ik kwam ieder dag met veel plezier naar Hubrecht laboratorium. Ik heb tijdens mijn 7 maande stage periode veel geleerd. Hopelijk kom ik in de toekomst weer terug.

Ik wil ook mijn begeleidster van uit school Nelleke Barendsen bedanken voor haar begeleiding afgelopen jaren.

**Samenvatting**

In celsignaal transductie speelt fosforylatie en defosforylatie van tyrosine een belangrijke rol. Dit proces wordt gecontroleerd door gecombineerde samenwerking van enzymen, protein tyrosine kinases (PTK`s) en protein tyrosine fosfatases (PTP`s). Wij zijn geïnteresseerd in de rol van PTP`s tijdens de embryonale ontwikkeling van de zebravis. Het Humane genoom bevat 107 fosfatase genen, daarvan zijn 37 klassieke PTP`s de grootste familie. De snelle embryonale ontwikkeling en het feit dat er 34 klassieke PTP`s werden gevonden in het zebravisgenoom, maken dit organisme geschikt voor dit onderzoek. PTP`s spelen onder andere een belangrijke rol in de celmigratie tijdens de embryonale ontwikkeling. Goed gecoördineerde celmigratie tijdens gastrulatie leidt tot normale ontwikkeling van het embryo. De Non-canonicale Wnt signaal cascade activeert eiwitten Rok2 en Jnk. daardoor wordt celmigratie tot stand gebracht. Uit studies is bekend dat PTP`s daarbij een rol spelen.

Tot nu toe zijn niet veel bekend over PTP`s en waar ze tot expressie komen. Om de functie van PTP`s te bestuderen wordt morpholino-knockdown in zebravis embryos gebruikt en vervolgens worden de resulterende fenotypes bestudeerd. Met In Situ Hybridisatie (ISH) techniek is de lokalisatie van PTP`s vastgelegd.

We kunnen aannemen dat PTP screen is goed verlopen. Uit de (ISH) resultaten zagen we veel specifieke expressie en daardoor zijn we meer te weten gekomen waar de bepaalde PTP tot expressie komt. Uit morpholino-knockdown screen zien we fenotype van morphante embryo`s. bij sommige PTP`s kunnen we vermoeden dat ze rol spelen bij celmigratie tijdens embryonale ontwikkeling, maar er moet nog veel gebeuren om te onderzoeken.

Summery

In cell signaling mechanism phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine plays an important role. This process is controlled by combined cooperation of enzymes, protein tyrosine kinases (PTKs) and protein tyrosine phosphatases (PTPs). We are interested in the role of PTPs during the embryonic development of the zebra fish. Human genome contains 107 PTP genes, of it 37 classical PTPs are the largest family.

The fast embryonic development and the fact that 34 classical PTPs were found in zebra fish genome, makes this organism ideal model for this research. PTP `s play among other things an important role in cell migration during the embryonic development. Well coordinated cell migration during gastrulation leads to normal development of the embryo. The Non-canonical Wnt signaling pathway activates proteins such as Rok2 and Jnk as a result of this cell migration occurs. The studies has been proven that PTPs plays a role by cell migration. Till now is not much known about PTP`s en where they are expressed. To study the function of PTPs, morpholino knockdown in zebra fish embryos are used and then resulting phenotypes are studied. With In Situ Hybridization (ISH) technique we can found out the localization of PTPs in zebra fish embryos.

from the results we can conclude that screen of PTPs went successfully. We could see different kinds of specifically expressions on the embryos. With this screen it was possible to see where the classical PTP are expressed and later studies have to be done to study a role of each PTP.

Afkortingen lijst

CE Convergentie Extensie

DNA Desoxyribonucleïnezuur

ISH In Situ Hybridisatie

mRNA messenger ribonucleïnezuur

PTK`s Protein tyrosine kynases

pTyr fosfotyrosine

PFA paraformaldehyde

PTP protein tyrosine fosfatse

RNA ribonucleïnezuur

RPTP`s receptor protein tyrosine fosfatse

RT Reverse transcriptase

Inhoudsopgave

Voorwoord ……………………………………………………………………………………… 3

Samenvating ………………………………………………………………………………………4

Summary…………………………………………………………………………………………..5

Afkortinge6n lijst………………………………………………………………………………….6

In houdsopgave……………………………………………………………………………………7

Inleiding…………………………………………………………………………………………. 8

Teorie

* 1. Protein tyrosine fosfatase ………………………………………………………………..9
  2. Zebravis als modelsysteem ……………………………………………………………..10
  3. Gastrulatie in zebravis ………………………………………………………………….11
  4. Non-canonical Wnt signaling cascade…………………………………………………..11
  5. Morpholino……………………………………………………………………………...12
  6. PTP gerelateerde aandoening het ``Noonan Syndroom``……………………………….13
  7. Doel van het project……………………………………………………………………..13

Materiaal en methode

* 1. Zebravisembryo`s en micro-injectie…………………………………………………….14
  2. RNA isolatie uit embryo`s ……………………………………………………………...14
  3. RT reactive voor cDNA…………………………………………………………………14
  4. PTP genen isoleren uit zebravis genoom met PCR reactie……………………………..14
  5. Synthese van 30PTP digoxigenin RNA probes…………………………………………14
  6. Precipitatie van RNA …………………………………………………………………...15
  7. In Situ Hybridisatie ……………………………………………………………………..15

Resultaten

3.1 RNA probes……………………………………………………………………………..16

3.2 In situ Hybrodisatie……………………………………………………………………..16

3.3 Morphant embryos………………………………………………………………………21

Conclusie…………………………………………………………………………………………27

Referentie………………………………………………………………………………………...28

**Inleiding**

In dit verslag wordt beschreven de rol van Protein tyrosine fosfatase (PTP) tijdens embryonale otwikkeling van zebravis en lokalisatie van dit eiwit.

Dit onderzoeks team onderzoekt klasieke humane PTP`s, omdat er nog weinig over bekend is en welke PTP in welk celtype voorkomt. Alle *in vivo* experimenten worden in zebravis gedaan, omdat in zebravis 34 humane PTP genen zijn gevonden. Een PTP gerelateerde humane aandoening is beter bekend als Noonan Syndroom.

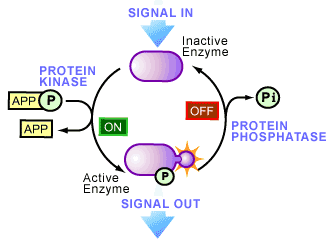
Fosforilatie en defosforilatie van tyrosine is een belangrijke celsignaling mechanisme. PTP`s spelen een belangrijk rol onder andere in celmigratie tijdens embryonale ontwikkeling door defosforileren van tyrosine. Er is tot nu bekend dat bij celmigratie Wnt signaling cascade is betrokken. Studies wijzen er op dat morfolino knockdown embryos wel invloed hebben op Wnt cascade.

Het is nog niet bekend waar komen alle 34 klassieke PTP`s voor en in welke celsignaal stransductie rol spelen. Om de werking en de rol van PTP`s te begrijpen worden bepaalde technieken toegepast. Zo wordt de zebravis embryos gebruikt om knockdown zebravis te maken en de fenotypes te bestuderen. M.b.v. In Situ Hybridisatie (ISH) wordt de expressie van de PTP`s bestudeert.

**1.1 Protein tyrosine fosfatase**

Fosforylatie van Tyrosines is een belangrijke signaaltransductie mechanisme, dit proces wordt gecontroleerd door gecombineerde samenwerking van enzymen, protein tyrosine kinases (PTK`s) en protein tyrosine fosfatases (PTPs). *Zie figuur 1.* PTK`s fosforyleren tyrosine-residu op doel eiwit door een fosfaat groep aan te brengen. PTP`s daarentegen verwijderen fosfaat groep van gefosforyleerde tyrosines. [3] De Katalytische activiteit van PTP`s is drie maal hoger dan van PTK`s, zonder goede regulatie van PTP`s kan fosforilatie van Tyrosine niet plaats vinden. De katalytische werking van PTP`s is te danken aan specifiek CX5R motief, die vormt een fosfaat bindende lus in de actieve site, bekend als PTP-lus. Desondanks de verschillende variatie in X5 wordt P-lus behouden in alle soorten PTP`s. Deze structuur zorgt ervoor dat nucleofiele katalytische Cysteine en Arginine aan fosfaat kunnen binden voor katalytische reactie. [1]

Het Humane genoom bevat 107 fosfatase genen die coderen voor katalytische fosfatases, daarvan zijn 81 actieve PTP`s die capaciteit hebben om fosfotyrosine te defosforileren. Fosfatases worden geclassificeerd in 4 familie groepen door hun substraat specificiteit. Klasse 1 fosfatases zijn de grootste familie en bevat 37 PTP genen, beter bekend als klassieke PTP`s (Alonso *et al*, 2004). [11] Wij focussen ons op het regulatie mechanisme van klassieke PTP`s, die cysteine bevatten en fosfotyrosine (pTyr) defosforileren. Klassieke PTP`s worden verdeeld in twee groepen: cytoplasmatische en transmembraan PTP`s. Transmembraan PTP`s worden aangeduid als RPTP`s.

*Figuur 1: Samenwerking van PTK en PTP in signaal transductie.*

*Protein Tyrosine Kinase fosforileert een protein. Daardoor wordt een enzym geactiveerd. Protein Tyrosine Fosfatase defosforileert en deactiveerd het enzym. Dit proces is essentiel voor signaal transductie.*

Expressie van PTP`s verschillen per orgaan, type weefsel, celtype en cellulaire lokalisatie. In de endotheliale cellen komen vooral 37 klassieke PTP genen voor.

**1.2 Zebravis als modelsysteem**

Dier modellen zijn onmisbaar voor onderzoek naar de pathologie van humane ziekten op moleculair en celniveau. Tot nu toe zijn de meste experimenten gedaan op muizen. Vooral embryonale ontwikkeling wordt in de muizen bestudeerd.

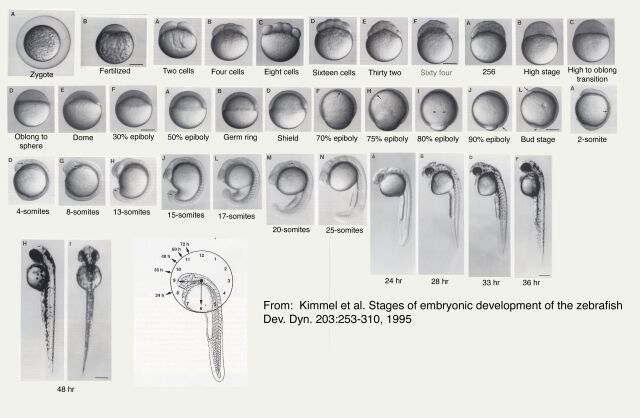
Uit de recente jaren blijkt dat de zebravis (*danio rerio*) een droom van een *in vivo* model is voor genoom onderzoek. Deze fotogenieke vis is de eerste gewervelde die voor grootschalige genetische screen wordt gebruikt. Daarvoor werden een genetische screens op fruitvliegen (*Drosophila melanogaster*) en op wormen (*Caenorhabditis elegans*) gedaan. Mutaties veroorzaakt door chemicaliën, radiatie of virale insertie die voor zichtbare veranderingen (fenotype) verantwoordelijk zijn, worden in de zebravis waargenomen. Het zebravismodel voor genetische screens is het ideale model in vergelijking met het muismodel, want fenotypes in deze vis kunnen worden waargenomen op individueel celniveau. [9]

Tijdens de embryonale ontwikkeling is gecoördineerde signaal transductie essentieel voor normale ontwikkeling, en ook in volwassenen. Biologische processen zoals celgroei, celcyclus, cel differentiatie, migratie, metabolisme en ontwikkeling signalering zijn gecontroleerd door reversibele fosforilatie van doeleiwitten door Protein Tyrosine Kinases (PTK`s) en zijn cruciaal voor normale embryonale ontwikkeling. Mutaties in PTP`s of in PTK`s veroorzaken deregulatie van de cel en kunnen leiden tot humane ziekte.

In zebravis zijn 34 humane PTP genen gevonden waarvan er 13 gedupliceerd zijn en dat maakt in totaal 47 PTP`s in zebravis genoom. *Zie figuur 2.*

*Figuur 2: Humane genoom PTP`s gevonden in zebravisgenoom. Met rood aangegeven PTP`s komen niet in zebravis voor. 13 genen van zebravis zijn gedupliceerd en ze zijn aangegeven met a/b*

**1.3 Gastrulatie in zebravis**

Tijdens vertebrale gastrulatie, bewegen populaties van cellen specifiek en gecoördineerd om drie kiemlagen (ectoderm, mesoderm en endoderm) te vormen en de basis van embryo te creëren. De zebravis blastula cellen spreiden eerst over de yolk heen, tot dat de yolk is helemaal bedekt met dunne laag cellen, dit proces wordt epiboly genoemd. Op 50 % epiboly beginnen de convergentie en extensie (CE) bewegingen. Primaire kiemlaag en embryonal as onstaat door epiboly en emboly. In (CE) celmigratie, migreren de cellen richting de middellijn van het embryo en extensie gebeurt door anterieure-posterieure migratie op de as. *Zie figuur 3.* Non-canonicale Wnt signaling cascade speelt belangrijke rol bij cel migratie. [7]

*Figuur 3: embryonale ontwikkeling van de zebravis.*

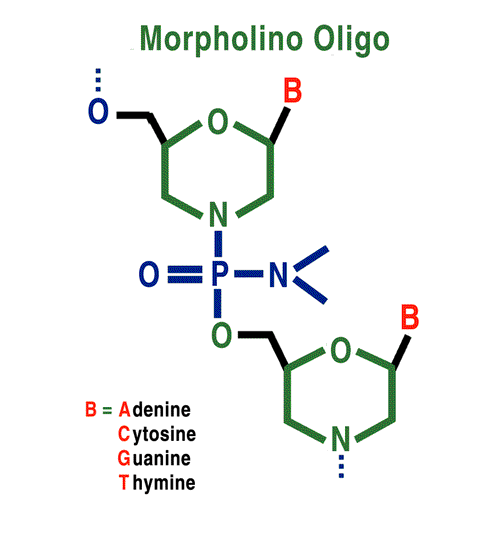
**1.4 Non-canonical Wnt signaling cascade**

Wnt eiwitten zijn betrokken bij embryonale onwikkeling via canonicale Wnt beta-catenine cascade of via Non-canonicale Wnt signaling. In beide gevallen bindt Wnt eiwit op de membraan receptor Frizzled. In canonicale Wnt signaling cascade wordt beta-catenine geactiveerd en gaat de nucleus in waar hij als transcriptie coactivator functioneert. Bij non-canonicale Wnt signaling cascade wordt Disheveld (Dvl) geactiveerd en vormt een complex met Daam, RhoA en Rac. Dit complex resulteerd in activatie van effectoren Rok2 en Jnk. Rok2 reguleert actine cytoskeleton van de cel en Jnk reguleert stranscriptie van genen. *Zie figuur 4.* Deze cascade reguleert migratie van de cellen. Er is bekend dat Non-canonicale signaaltransductie is betrokken bij celmigratie in gastrulatie. [17]

Wnt 11 morpholino knockdown in de zebravis leidt tot een kortere vis met cyclopia. Door injecties met Morpholinos zijn veel studies verricht en tonen aan dat PTP`s spelen rol in dit proces.

*Figuur 4: Non-canonical Wnt signaling cascade. In deze voorbeeld is Wnt 11 cascade afgebeeld.*

**1.5 Morpholino**



Morpholino oligonucleotiden zijn nonionic DNA analoog. Morpholino bestaat uit Morpholine ring en morpholino oligonucleotiden hebben andere soort backbone dan DNA. *Zie figuur 5.* Desondanks het verschil in de backbone, kunnen morpholinos aan de complementaire DNA of RNA strengen binden. Morpholinos zijn 25bp lange moleculen die specifiek genen kunnen inhiberen en knockdown organisme maken. Dankzij de structuur van de morpholino`s backbone kunnen ze niet door nucleases afgebroken worden, omdat de backbone geen negatieve lading heeft. [8]

Morpholinos kunnen op twee verschillende manieren knockdown induceren, door splicing van mRNA of door translatie van mRNA te blokkeren. Om splicing van mRNA te blokkeren wordt er specifiek sequentie ontworpen die op de grens van intron kan binden, waardoor spliceosooms intronen niet kunnen uitknippen, daardoor wordt geen juist eiwit afgeschreven. Dit proces vindt plaats in de nucleus. Bij tweede variant wordt in de cytoplasma de start codon van de RNA op 5` cap geblokeerd, waardoor ribosomen deze RNA niet kunnen vertalen naar eiwit.

*Figuur 5: Structuur van morpholino*

Werking van morpholino is tijdelijk, na paar dagen is de concentratie verlaagd door celdeling en heeft daarna ook weinig effect op gen regulatie. [8]

**1.6 PTP gerelateerde aandoening het ``Noonan Syndroom``**

Het Noonan syndroom is een autosomaal-dominant overdraagbare aandoening die wordt veroorzaakt door mutatie in het gen PTPN11. Dit gen codeert voor intracellulair PTP SHP2. en speelt een belangrijke rol in verschillende embryologische ontwikkelingsprocessen, onder andere die van de cardiale semilunaire valvulogenese. [10]

De belangrijkste kenmerken van het syndroom zijn een hartaandoening, een korte gestalte en bepaalde kenmerkende gelaatstrekken zoals, korte [hals](http://nl.wikipedia.org/wiki/Hals_(anatomie)) en brede nek ('webbed neck'), Hypertelorisme (ver uiteenstaande ogen), grote ogen, [ptosis](http://nl.wikipedia.org/wiki/Ptosis) (hangende bovenste [oogleden](http://nl.wikipedia.org/wiki/Ooglid))

De symptomen kunnen van persoon tot persoon wel verschillen.

De helft van de patiënten met het Noonansyndroom heeft de aandoening gekregen via de ouders. De aangedane ouder is driemaal vaker de moeder dan de vader. Meestal is er maar een beperkt aantal familieleden met het Noonansyndroom. Grote families met veel patiënten zijn zeldzaam. De reden daarvoor is tot heden niet opgehelderd. De andere helft van de kinderen met het Noonansyndroom zijn ‘sporadische patiënten’: zij zijn de enigen in hun familie die het Noonansyndroom hebben. Doorgaans is er bij hen sprake van een nieuwe dominante mutatie. Hun kinderen hebben later een kans van 50% op het Noonansyndroom. [6]

**1.7 Doel van het project**

Het doel van het project is om 30 klasieke PTP`s te screenen. Voor PTP screen wordt gekeken naar fenotype van knockdown zebravis embryo`s en lokalisatie van PTP gen. Door knockdown maken van embryos met morpholinos wordt onderzocht wat voor invloed heeft bepaalde PTP op embryonale ontwikkeling van zebravis. Bij korte fenotypen kunnen we vermoeden dat bepaalde PTP`s mogelijk een rol spelen bij (CE) celmigratie. M.b.v In Situ Hybridisatie wordt gekeken waar de bepaalde PTP`s tot expressie komen en in welke stadia van embryo. Eerste moet RNA probes gemaakt worden voor In Situ Hybridisatie.

**Materiaal en methode**

**2.1 Zebravisembryo`s en micro-injectie**

Zebra vis embryo`s werden verzameld een paar minuten na dat de vissen hadden gelegd en werden meteen geïnjecteerd met morpholinos om knockdown visjes te maken. Injectie moet gebeuren binnen 20 minuten na bevruchting van embryo, omdat de embryo nog steeds in een cel stadium is. Dat is belangrijk voor injectie, omdat die een cel is yolk. Yolk bevat voedsel voor embryo en in de yolk geinjecteerde morpholino komt in alle cellen terecht. Morpholino`s worden in de concentraties geinjecteerd: 1ng, 2,5ng en 5ng. Per concentratie wordt 50 embryos geinjecteerd. 24uur, 48uur en 72uur na bevruchting worden foto`s van embryos genomen met Leica Stereomicroscoop en fenotypes gescreend.

**2.2 RNA isolatie uit embryo`s:**

Twee dagen oude embryos werden gelyseerd met GIT: (4M Guanidine thiocyanate, 0.1% Antifoam A, 25mM 1M NaCitrate pH 7.0, 0.5% Saukosyl 30% w/v, 0.1M β-mercapto ethanol) GIT toevoegen 2ml/ml embryo`s. 10-15 keer homogeniseren. Homogenaat bewaren bij -20°C. vervolgens RNA werd geisoleerd met RNA isolatie stappen. *Zie protocol: ``RNA isolation from cells or zebrafish embryo`s``*.

**2.3 RT reactive voor cDNA:**

Reverse transcriptase (RT) reactive werd ingezet om DNA te maken. In RT reactie zit: 1µl oligo d(T) 0.5mg/ml, 4µl 5xreaction buffer, 1µl dTNP-mix, 2µl DTT (100mM), 0.1µl Rnasin 1U/µl, 0.9µl H2O, 1µl M-MLV-RT.

**2.4 PTP genen isoleren uit zebravis genoom met PCR reactie:**

PCR reactie wordt 2 keer ingezet om specifiek gen amplificeren. Eerst wordt een groter fragment geamplificeerd om de specificiteit te vergroten en daarna worden specifieke nested primers gebruikt om een gedeelte van het PTP gen te amplificeren. In de PCR reactie van 50µl zit: 2µl (2.5pmol/µl) forward primer, 2µl (2.5pmol/µl) reverse primer, 5µl 10xPCR buffer, 1.5µl (50mM) MgCl2, 1µl (10mM) dNTP, 2µl (10%) DMSO, 0.05µl (5U/µl) silvestar Polymerase, 35.5µl H2O.Voor nested PCR zit zelfde stoffen in, maar primers zijn specifiek.

**2.5 Synthese van 30PTP digoxigenin RNA probes:**

In een reactive om RNA probe te maken zit: 4.5µl demi water, 4µl 5xtranscriptie buffer, 2µl (0.1M) dithiothreitol, 2µl nucleotide mix, 6µl linearized plasmid, 0.5µl ribonuclease inhibitor, 1µl RNA polymerase.

**2.6 Precipitatie van RNA:**

RNA te zuiveren wordt volgende gedaan: 260µl dH2O (RNase vrij), 100µl ammonium acetaat, 800µl ethanol (100%). Supernatant afnemen. Pellet oplossen in 20µl dH2O. 1µl op gel brengen. Als er goede banden zijn 20µl Hyb+ Mix toevoegen.

**2.7 In Situ Hybridisatie:**

Om te achterhalen welk PTP gen waar tot expressie komt, wordt In Situ Hybridisatie techniek gebruikt. Daarbij wordt gebruikt gemaakt van albino embryos, omdat albino embryos geen pigmenten hebben en kleuring is gemakelijk te zien. 1 dag oude, 2 dagen oude en 3 dagen oude albino embryo`s worden gefixeerd met 4% PFA.

Sequnties zijn bekend van PTP genen en primers zijn besteld om RNA probes te maken. Eerste moet RNA geisoleerd worden uit embryos en vervolgens met RT reactie wordt cDNA gemaakt. Specifieke RNA probes worden gehybridiseerd en gekleurd. Foto`s van embryo`s worden genomen met ``Zeiss Axioplan Microscoop``

Embryo`s worden stap voor stap overgebracht van 100% methanol naar 100% PBT. Embryos behandelen met Proteinase K (5µm/ml) op kamer temperatuur, incubatie tijd verschilt. 1 dag oude embryo`s 5 minuten incuberen met Proteinase K, 2 dagen ouden embryo`s 30 minuten en 3 dagen oude embryo’s 60 minuten incuberen. Door incubatie worden cellen permeabel gemaakt voor hybridisatie mix. 2 x5 minuten wassen met PBT en fixeren 20 minuten lang met 4% PFA-PBS. 5 x 5 minuten wassen met PBT en minimaal 2 uur incuberen met Hybridisatie Mix (HM+) op 70°C graden. Na deze stap embryo`s overnacht incuberen met RNA probe (1µl/0,5ml) op 70°C graden. Op tweede dag volgt was stappen om aspecifieke gebonden RNA weg te wassen. Dit gebuerd door wassen met HM- mix, SSC buffer. Na deze wasstappen worden embryos paar uur geincubeerd in Blocking Buffer (2mg/ml BSA, 2%lamb serum, 8ml PBT). Na minimaal 2 uur incubatie wordt overnacht met anti-DIG antiserum geincubeerd in het donker bij 4°C.

Op 3e dag volgt wasstappen met PBT en AP- buffer. Embryos worden gekleurd met Staining solution (3.4µl NBT/ml, 3.5µl BCIP/ml in AP+) in het donker. Na 1 uur wordt gekeken of er kleuring is. Daarna wordt kleuring gestopt met BPT en fotos genomen.

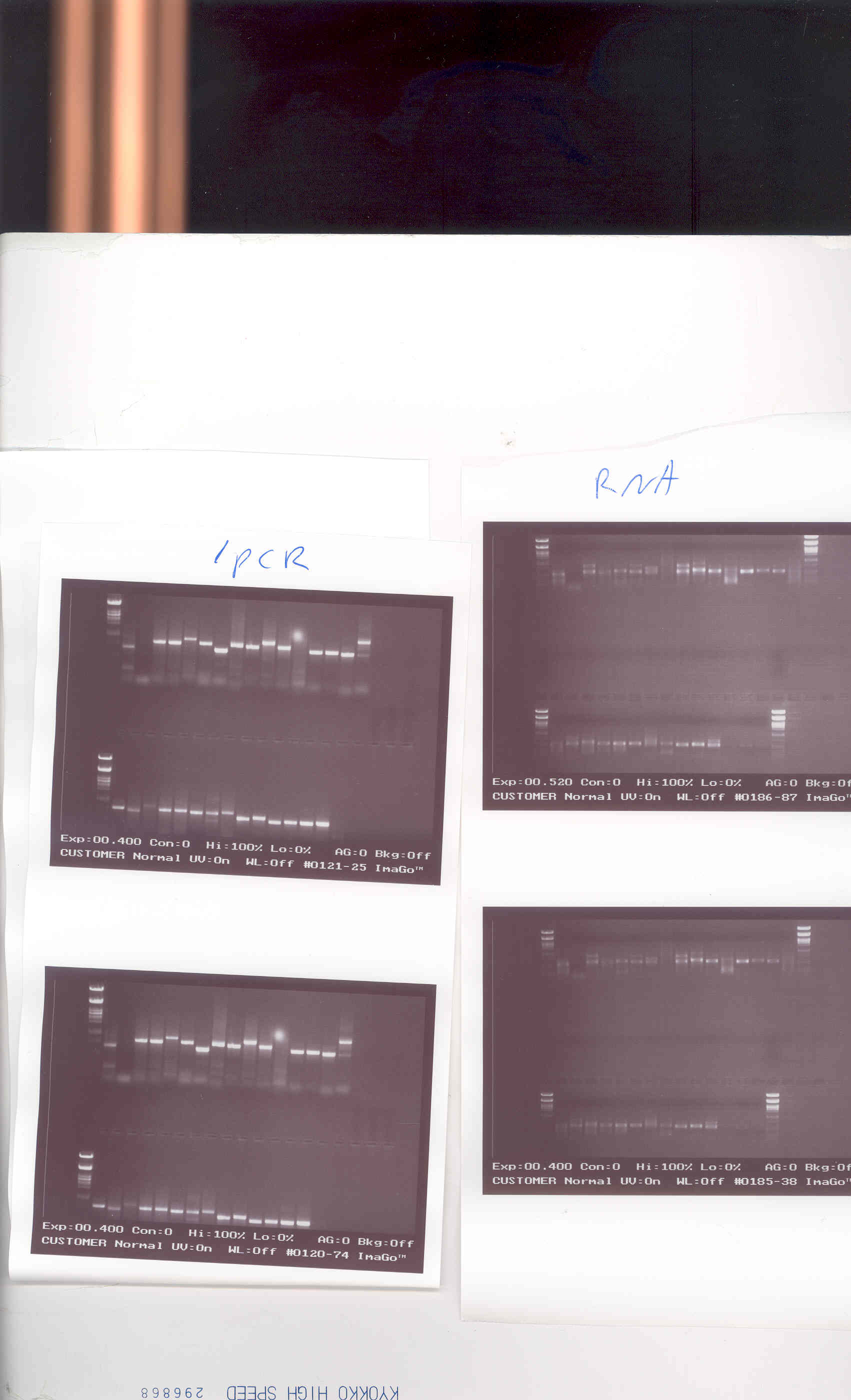
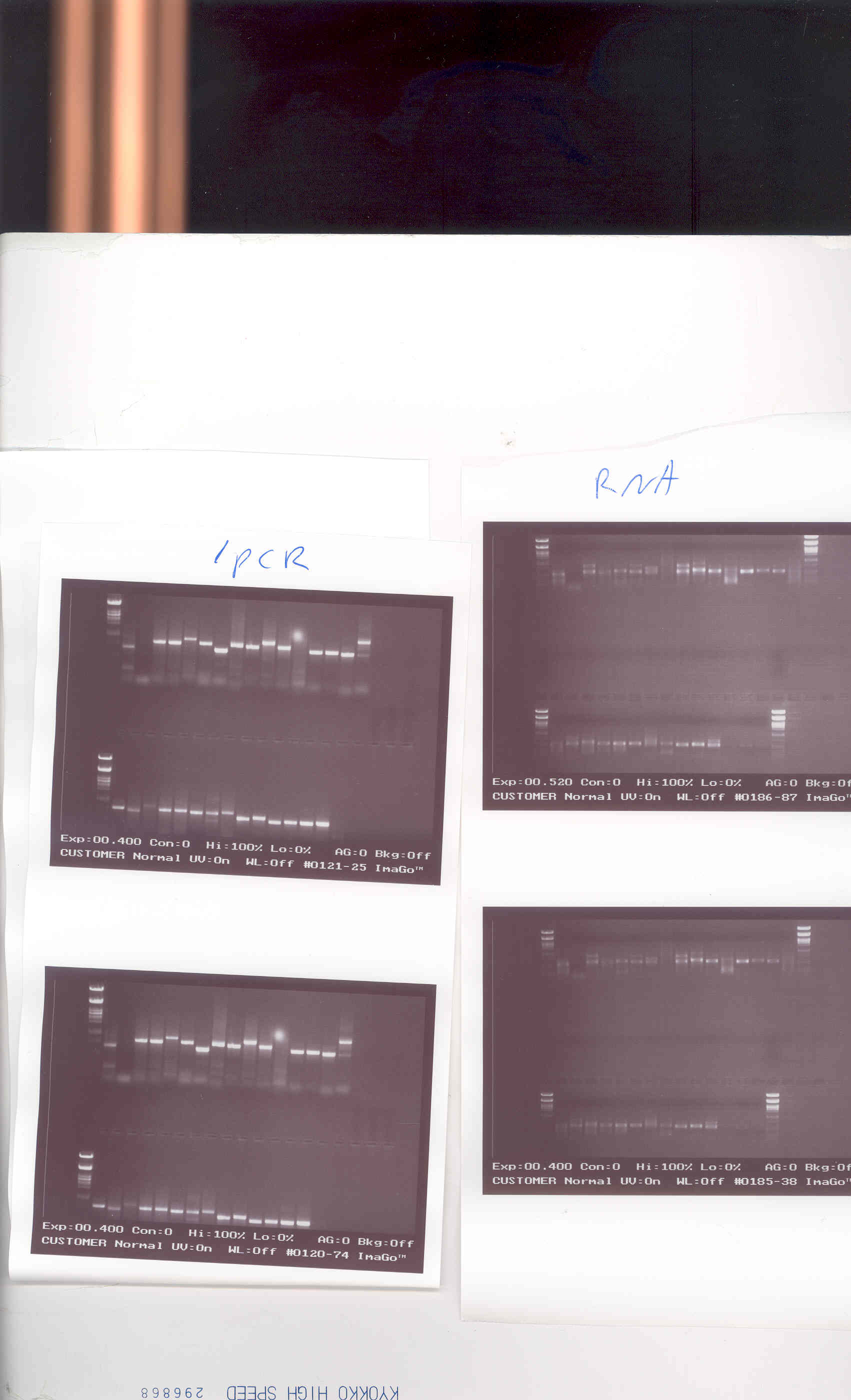
**Resultaten**

**3.1 RNA probes**

30 RNA probes zijn gesynthetiseerd volgens protocol. RNA is op de gel gebracht om te kijken of er juiste fragmenten zijn gemaakt. Op de gel waren banden te zien van RNA probes. *Zie figuur 6.* Somige banden waren duidelijk zichtbaar, sommige niet. Uit dit verkregen resultaat is aannemelijk dat 29 probes van 30 is goed gelukt en kan In Situ Hybridisatie gedaan worden om expressie van dit genen achterhalen.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



*Figuur 6: RNA probes op de gel elektrofoese. Somige banden zijn goed zichtbaar, somige niet. Dat komt door mogelijk weinig expressie van RNA. Elke nummer weergeeft de bepaalde PTP.*

**3.2 In situ Hybrodisatie**

30 probes zijn gemaakt en embryos zijn gefixeerd voor In situ Hybridisatie om expressie van tot nu toe PTP genen te achterhalen. In situ hybridisatie werd gedaan volgens protocool. 15 embryos zijn gebruikt per stadia. Dat maakt verkregen resultaat betrouwbaarder. Kleuring (staining) van embryos is goed gegaan. Bijn alle embryos hadden minstens 2 uur nodig om te kleuren. Voor somige was iets langer nodig. Fotos werden genomen met ``Zeiss Axioplan Microscoop``. Per embryo werd twee posities vastgesteld, zij aanzicht en boven aanzicht.

Expressie van PTP gen verschilt per probe. Uit de foto`s duidelijk geworden dat PTP`s overal kunnen voorkomen. Meeste expressie werd gezien in het hoofd, maar op verschillende delen van het hoofd zoals, ventrikels, olfactory, optic lobe.

Expressie verschile van PTP gen werd gezien in stadias van embryo`s. Bepaalde PTP gen expressie in 1 dag oude embryos was intenser dan in 2 dag of 3 dagen oude embryos of andersom. er werd heel interesante sxpressies gezien die heel spesifiek zijn, zoals in het hart, in de nier. In de *tabel 1* staan alle embryos en expressie is zichtbaar. In de *tabel 2* staan beschrijvingen van expressies.

*Tabel 1: fotos van embryos na in situ hybridisatie*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | Expressie in 1 dag oud embryo | Expressie in 2 dag oud embryo | Expressie in 3 dag oud embryo |
| 1 | ptprm | ptprm,dag1,boven.jpg | ptprm,dag2,boven.jpg | ptprm,dag3,zijligging.jpg |
| 2 | ptpru | Geen expressie | Geen expressie | Geen expressie |
| 3 | ptprfa | ptpfa,dag1,zij1.jpg | ptpfa,dag2,zij1.jpg | ptpfa,dag3,zij4.jpg |
| 4 | ptprfb | ptpfb,dag1,zij.jpg | ptpfb,dag2,zij.jpg | ptpfb,dag3,zij2.jpg |
| 5 | ptprsa | ptprsa,dag1,zij.jpg | ptprsa,dag2,zij.jpg | ptprsa,dag3,boven.jpg |
| 6 | ptprsb | ptpsb,dag1,boven2.jpg | ptpsb,dag2,boven2.jpg | ptpsb,dag3,boven2.jpg |
| 7 | ptprda | ptpda,dag1,boven3.jpg | ptpda,dag2,boven3.jpg | ptpda,dag3,boven3.jpg |
| 8 | ptprdb | ptprdb,dag1,boven2.jpg | ptprdb,dag2,boven4.jpg | ptprdb,dag3,zij.jpg |
| 9 | ptprga | ptpga,dag1,zij4.jpg | ptpga,dag2,boven2.jpg | ptpga,dag3,boven.jpg |
| 10 | ptprgb | ptpgb,dag1,boven2.jpg | ptpgb,dag2,boven2.jpg | ptpgb,dag3,boven.jpg |
| 11 | ptprza | ptprza,dag1,boven1.jpg | ptprza,dag2,boven.jpg | ptprza,dag3,boven.jpg |
| 12 | ptprzb | ptprzb,dag1,zij.jpg | ptprzb,dag2,boven.jpg | ptprzb,dag3,zij2.jpg |
| 13 | ptprb | Picture1.jpg | ptprb,dag2,boven.jpg | ptprb,dag3,boven.jpg |
| 14 | ptprja | ptprja, dag1, boven1.jpg | ptprja, dag2, zij1.jpg | ptprja, dag3, boven.jpg |
| 15 | ptprjb | ptprjb, dag1, zij.jpg | ptprjb,dag2,boven1.jpg | ptprjb, dag3, zij.jpg |
| 16 | ptprh | ptprh, dag 1, boven1.jpg | ptprh, dag 2, zij2.jpg | ptprh, dag3, zij4.jpg |
| 17 | ptprq | ptprq,dag1.boven.jpg | ptprq,dag2,zij1.jpg | ptprq,dag3,boven.jpg |
| 18 | ptpro | ptpro,dag1,2,zij.jpg | ptpro,dsg2,zij.jpg | ptpro,dsg3,zij1.jpg |
| 19 | ptprr | Picture2.jpg | ptprR,dag2,boven3.jpg | ptprR,dag3,zij1.jpg |
| 20 | ptprnb | ptprnb,dag1,zij2.jpg | ptprnb,dag2,zij2.jpg | ptprnb,dag3.jpg |
| 21 | ptpn1 | ptpn1,dag1,zij.jpg | ptpn1,.jpg | ptpn1,dag3,boven.jpg |
| 22 | ptpn2 | ptpn2,dag1,boven1.jpg | ptpn2,dag2,boven4.jpg | ptpn2,dag3,boven1.jpg |
| 23 | ptpn3 | ptpn3,dag1,zij.jpg | ptpn3,dag2,zij1.jpg | ptpn3,dag3,boven1.jpg |
| 24 | ptpn9a | ptpn9a1,dag1,zij2.jpg | ptpn9a1,dag2,boven1.jpg | ptpn9a1,dag3,boven2.jpg |
| 25 | ptpn23a | ptpn23a,dag1,boven1.jpg | ptpn23a,dag2,zij1.jpg | ptpn23a,dag3,zij1.jpg |
| 26 | ptpn23b | ptpn23b,dag1,zij1.jpg | ptpn23b,dag2,zij.jpg | ptpn23b,dag3,boven1.jpg |
| 27 | ptpn12 | ptpn12,dag1,boven.jpg | ptpn12,dag2,zij.jpg | ptpn12,dag3,zij.jpg |
| 28 | ptpn18 | ptpn18,dag1,boven.jpg | ptpn18,dag2,boven.jpg | ptpn18,dag3,boven1.jpg |
| 29 | ptpn20 | ptpn20,dag1,zij.jpg | ptpn20,dag2,zij1.jpg | ptpn20,dag3,zij1.jpg |
| 30 | ptpn11a | ptpn11a,dag1,boven.jpg | ptpn11a,dag2,boven1.jpg | ptpn11a,dag3,zij2.jpg |

*Tabel 2: opsimingen van expressie per PTP*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | Expressie in 1 dag oud embryo | Expressie in 2 dag oud embryo | Expressie in 3 dag oud embryo |
| 1 | ptprm | In hele ruggenmerg | Vooral in het hoofd | Beetje in cerebrum en optic lobe |
| 2 | ptpru | Geen expressie | Geen expressie | Geen expressie |
| 3 | ptprfa | Ruggenmerg, zenuwstelsel, op de yolk beide kanten. | In de hersenen, zenuwstelsel | Hersenen, kieuwen, mogelijk hart |
| 4 | ptprfb | Ruggenmerg, zenuwstelsel, | Zenuwstelsel, hersenen | Hersenen, kiewen |
| 5 | ptprsa | Veel expressie in hele ruggenmerg | Lichter expressie in hele ruggenmerg | Nog lichter expressie in hele ruggenmerg |
| 6 | ptprsb | Olfactory, cerebrum, medula oblongata, zenuwstelsel | Meer expressie Olfactory, cerebrum, medula oblongata | In hele hersenen, beetje in de ogen |
| 7 | ptprda | Olfactory, cerebrale hemisfeer, optisch lobe | Olfactory, cerebrale hemisfere, optic lobe | Olfactory, cerebrale hemisfere, optic lobe |
| 8 | ptprdb | Hersenen, zenuwstelsel | Hersenen, 2 puntje op de rug | Meer expressie in de hersenen |
| 9 | ptprga | zenuwstelsel | Pineal gland, ventrikel, diencepalon | In de hersenen, beetje in ogen en olfactory tract |
| 10 | ptprgb | Hersenen, zenuwstelsel | In de hersenen | In het hoofd |
| 11 | ptprza | Ruggenmerg, zenuwstelsel | In de ventrikels | In de ventrikels |
| 12 | ptprzb | In het hoofd | In de ventrikels | In de ventrikels |
| 13 | ptprb | In de specifieke zenuwen | In de specifieke zenuwen | In de specifieke zenuwen |
| 14 | ptprja | Ruggenmerg, in het hoofd | hoofd, vooral diencephalon, cerebrum | Expressie lichter hoofd, diencephalon, cerebrum |
| 15 | ptprjb | Ruggenmerg | Ruggenmerg | Hoofd, hart? Lever? |
| 16 | ptprh | In het hoofd, in de nier | In het hoofd, in de nier | Licht expressie in het hoofd, in de nier |
| 17 | ptprq | In het zenuwstelsel, in de lever | In de lever | In het hoofd en in de lever |
| 18 | ptpro | In de hersenen, zenuwstelsel | In het hoofd, in de ogen | In de boven hersenen |
| 19 | ptprr | zenuwstelsel | In de hemisfeer | In de hemisfeer |
| 20 | ptprnb | In het hoofd | Olfactory, hemisfeer | Olfactory, hemisfeer |
| 21 | ptpn1 | zenuwstelsel | Ventrikels, zenuwstelsel | Ventrikels, in een orgaan aan de linker kant |
| 22 | ptpn2 | In het hoofd, zenuwstelsel | In het hoofd | In het hoofd |
| 23 | ptpn3 | In het hoofd, ruggenmerg | In het hoofd, paar organen? | Ventrikels, medula oblongata, organen? |
| 24 | ptpn9a | In het hoofd, zenuwstelsel | In het hoofd, op de yolk bij de rug | Weinig expressie in het hoofd, vooral zichtbaar in de ventrikels. |
| 25 | ptpn23a | Zenuwstelsel, in het hoofd | In het hoofd, in de zwemblaas | Expressie in minder in het hoofd en in de zwemblaas. |
| 26 | ptpn23b | In het hoofd, ruggenmerg | In het hoofd, zwemblaas | Beetje in het hoofd |
| 27 | ptpn12 | zenuwstelsel | In het hoofd | Beetje in het hoofd |
| 28 | ptpn18 | In het hoofd, ruggenmerg | In het hoofd, ruggenmerg | Exptressie afname in het hoofd en in ruggenmerg |
| 29 | ptpn20 | In de hersenen. ruggenmerg | In het hoofd | Meer expressie in het hoofd |
| 30 | ptpn11a | Veel expressie in het hoofd, ruggenmerg | Minder expressie in het hoofd, ruggenmerg | Expressie afname in het hoofd |

**3.3 Morphant embryo`s**

Embryos werden geïnjecteerd met verschillende concentratie morpohlinos. 50 embryo`s per concentratie. Na 24 uur werd foto`s genomen van embryo`s en gekeken naar hun fenotype. Elke dag werd embryo`s gescreend tot 3e dag. Hieronder in de *tabel 3* staan foto`s van embryo`s.

*Tabel 3: foto`s van Morphant embryo`s*

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ptprda** | | | | | | |
| Dag 1, (2.5ng) | Dag 1, (5ng) | WT dag1 | Dag 2, (2.5ng) | Dag 2, (5ng) | | WT dag2 |
| ptpDa,2,5ng. dag1.jpg | ptpDa,5ng. dag1.jpg | ptpDb,5ng. dag1.jpg | ptpda2.5ng,dag2.jpg | ptpda5ng,dag2.jpg | | ptpDab,5ng. dag2.jpg |
| Fenotype: iets korter dan WT | Nog korter |  | Embryo is kort, heeft grote yolk | Staart is kort en heeft dikker yolk | |  |
| Uit de fotos kunnen we zien dat embryos is kort en 2 dag oude embryo heeft korter staart. Dat zou betekenen dat dit ptp mogelijk later in de stadia tot expressie komt. | | | | | | |
| **ptprdb** | | | | | | |
| Dag 1, (2.5ng) | Dag 1, (5ng) | WT dag1 | Dag 2, (2.5ng) | Dag 2 (5ng) | WT dag 2 | |
| ptpDb,5ng. dag1.jpg | ptpDb,2,5ng. dag1.jpg | ptpDb,5ng. dag1.jpg | ptpDb,5ng. dag2.jpg | ptpDb,2,5ng. dag2.jpg | ptpDab,5ng. dag2.jpg | |
| Kromme staart, hoogte van het hoofd is kleiner | Kleine staart, hoogte van het hoofd is kleiner |  | Yolk is groot, staart is klein | Embryo os krom, heeft kleine staart, hoofd is klein |  | |
| Dit PTP heeft mogelijk invloed in ontwikkeling van hersenen en van staart | | | | | | |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ptprdab** | | | | | |
| Dag 1, (2.5ng) | Dag 1, (5ng) | WT dag1 | Dag 2 (2.5ng) | Dag 2, (5ng) | WT dag 2 |
| ptpDab,2,5ng. dag1.jpg | ptpDab,5ng. dag1.jpg | ptpDb,5ng. dag1.jpg | ptpDab,2,5ng. dag2.jpg | ptpDab,5ng. dag2.jpg | ptpDab,5ng. dag2.jpg |
| Embryo is niet volledig ontwikkeld | Geen ontwikkeling van embryo |  | Embryo is heel kort | Embryo heeft grote yolk en is niet ontwikkeld |  |
| Combinatie van 2 gedubliceerde genen heeft abnormale fenotype van zebravis. Hier is te zien embryos is niet ontwikkeld, of ontwikkeld zich heel langzaam. Dat zou betekenen dat ptprdab rol bij cel migratie. | | | | | |
| **ptprsa** | | | | | |
| Dag 1 (2.5ng) | Dag 1 (5ng) | WT dag1 | Dag 2 (2.5ng) | Dag 2 (5ng) | WT dag2 |
| ptprsa2.5ng,dag1.jpg | ptprsa5ng,dag1.jpg | ptpDb,5ng. dag1.jpg |  |  |  |
| Ogen ijn niet zichtbaar | Heeft geen hoofd |  |  |  |  |
| Op deze blijkt dat bij lage concentratie van morpholino kunnen we geen ogen zien van embryo en bij hogere concentratie van morpholino zien we geen expressive van het hoofd. Er sijn geen foto`s van 2 dag oude embryo`s | | | | | |

*Vervolg van tabel 3:*

*Tabel vervolg van tabel 3*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ptprsb** | | | | | |
| Dag 1 (2.5ng) | Dag 1 (5ng | WT dag1 | Dag 2 (2.5ng) | Dag 2 (5ng) | WT dag2 |
| ptpsb5ng.jpg | ptpsb2.5ng.jpg | ptpDb,5ng. dag1.jpg | ptpsb5ng,dag2.jpg | ptpsb2.5ng.dag2.jpg | NICptpsb1ng, ddag 2.jpg |
| Embryo is kort, start is krom | Nog kortere embryo, kleine hoofd |  | Embryo is duidelijk korte en dik, heeft grote yolk | Nog korter en dikker, grotere yolk |  |
| Hier is duidelijk te zien concentratie een rol speelt. Hoe hoger de concentratie hoe kleiner en dikker embryo. Dit gen speelt ook mogelijk een rol bij cel migratie. En komt duidelijk later tot expressie. | | | | | |
| **ptprb** | | | | | |
| Dag 1 (2.5ng) | Dag 1 (5ng | WT dag1 | Dag 2 (2.5ng) | Dag 2 (5ng) | WT dag2 |
| ptpRB,dag1,2,5ng.jpg | ptpRB,dag1,5ng.jpg | ptpDb,5ng. dag1.jpg | ptpRB,dag2,2,5ng.jpg | ptpRB,dag2,5ng.jpg | NICptpsb1ng, ddag 2.jpg |
| Staart is wat korter, ogen zijn niet duidelijk zichtbaar | Hoofd is niet helemaal ontwikkeld |  | Embryo is wat krom en kort dan normaal | Embryo is wat krom en kort dan normaal |  |
| Staart van embryos is duidelijk kort en bij 1 dag oude embryo zien we geen oog expressie | | | | | |

*Vervolg van tabel 3*

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ptprfa** | | | | | | |
| Dag 1 (2.5ng) | Dag 1 (5ng | WT dag1 | Dag 2 (2.5ng) | Dag 2 (5ng) | WT dag2 | |
| ptprfa5ng.jpg | ptprfa2.5ng.jpg | ptpDb,5ng. dag1.jpg | ptprfa5ng,dag3.jpg | ptprfa2.5ng,dag3.jpg | NICptpsb1ng, ddag 2.jpg | |
| Geen zichtbaar afwijking | Geen zichtbaar afwijking |  | Geen zichtbaar afwijking | Geen zichtbaar afwijking |  | |
| Hier zien we geen abnormal fenotype | | | | | | |
| **ptprfb** | | | | | | |
| Dag 1 (2.5ng) | Dag 1 (5ng | WT dag1 | Dag 2 (2.5ng) | Dag 2 (5ng) | | WT dag2 |
| ptprfb2.5ng.jpg | ptprfb5ng.jpg | ptpDb,5ng. dag1.jpg | ptprfb2.5ng,dag2.jpg | ptprfb5ng,dag2.jpg | | NICptpsb1ng, ddag 2.jpg |
| Embryo is geboogen | Embryo is dik, heeft kromme staart |  | Embryo heeft kromme staart | Hoofd is niet goed ontwikkels, heeft kleine staart, dikke yolk | |  |
| Embryos hebben duidelijke krome staart, embryos zijn niet ontwikkeld. | | | | | | |

*Vervolg van tabel 3*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ptprgb** | | | | | |
| Dag 1 (2.5ng) | Dag 1 (5ng | WT dag1 | Dag 2 (2.5ng) | Dag 2 (5ng) | WT dag2 |
| ptpR6b,2.5ng,dag1.jpg | ptpR6b,5ng,dag1.jpg | ptpDb,5ng. dag1.jpg | ptpr6b,5ng,dag3.jpg | ptpr6b,2.5ng,dag3.jpg | NICptpsb1ng, ddag 2.jpg |
| Lichaam en start is klein | Hoofd is niet goed ontwikkeld |  | Korte embryo, afwijking in yolk | Heel korte embryo, afwijkende yolk |  |
| Hoofd is duidelijk niet ontwikkeld en lichaam van embryo`s is heel kort. Of dat door celmigratie komt is onduidelijk. | | | | | |
| **ptprh** | | | | | |
| Dag 1 (2.5ng) | Dag 1(5ng | WT dag1 | Dag 2 (2.5ng) | Dag 2 (5ng) | WT dag2 |
| ptprh,2.5ng,dag2.jpg | ptprh,5ng,dag2.jpg | ptpDb,5ng. dag1.jpg | ptprh,2.5ng,dag5.jpg | ptprh,5ng,dag5.jpg | NICptpsb1ng, ddag 2.jpg |
| Embryo is gebogen | Heeft geen start, grote yolk |  | Afwijkende yolk | Gebgen embryo |  |
| Deze ptp heeft interesante fenotype, embryos is heel krom. | | | | | |

*Vervolg van tabel 3*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ptprq** | | | | | |
| Dag 2 (2.5ng) | Dag 2 (5ng | WT dag2 | Dag 3 (2.5ng) | Dag 3 (5ng) | WT dag3 |
| ptpRQ,2,5ng,dag3.jpg | ptpRQ,5ng,dag4.jpg | NICptpsb1ng, ddag 2.jpg | ptpRQ,5ng,dag3.jpg | ptpRQ,2,5ng,dag4.jpg | ptpRQ,5ng,dag3.jpg |
| Afwijking in yolk | Embryo os dik en heeft afwijking in yolk |  | Afwijking in de embryo | Heeft kromme staart en afwijking in de embryo |  |
| Het is niet duidelijk waarom is yolk abnormaal. | | | | | |
| **ptprzb** | | | | | |
| Dag 1 (2.5ng) | Dag 1 (5ng | WT dag1 | Dag 3 (2.5ng) | Dag 3 (5ng) | WT dag3 |
| ptpR2b,5ng,dag1.jpg | ptpR2b,2.5ng,dag1.jpg | ptpDb,5ng. dag1.jpg | ptpR2b,2.5ng,dag2.jpg | ptpR2b,5ng,dag2.jpg | ptpR2b,5ng,dag2.jpg |
| Staart is gebogen | Hoofd is niet zichtbaar |  | Yolk is dik, start is klein | Embryo s kort, heeft korte staart |  |
| Hoofd is duidelijk abnormaal en staart is krom | | | | | |

**Conclusie**

Maken van probes is goed gelukt, op de gelelektroforese waren 29 van 30 banden te zien. Kleuring van In situ hybridisatie is ook goed gegaan.

Deze screen maakt mogelijk om meer begrijpen van functie van PTP`s. we zagen veel interessante expressies dis heel specifiek waren. Dat geeft aanleiding om in de toekomst verder te onderzoeken de rol van dit gen in de aangegeven plaats.

Uit de verkregen resultaten van In Situ Hybridisatie was te zien dat PTP genen overal tot expressie komen in de zebravis embryo`s. Bijna alle PTP`s komen in het hoofd tot expressie, maar op andere gedeelte van het hoofd. Expressie van het gen is ook afhankelijk van stadia van embryos. In een dag oude embryo`s zagen we meer expressie van bepaalde PTP`s, maar expressie afname of zelfs geen expressie in die specifiek plaats bij oudere embryos.Dat betekent dat embryo’s op latere leeftijd tot expressie komen. We zagen ook dat PTP`s op jonge leeftijd tot expressie kwamen en later heel weinig. Uit dit screen is mogelijk geworden dat wij meer weten over onbekende PTP`s. Heel specifieke expressie zagen we bij *ptprh, ptprq, ptprza, ptprzb*.

Embryo’s werden knockdown gemaakt met morpholinos. Daardoor was mogelijk om fenotype te screenen en kijken welke rol speelt dit gen in de embryonale ontwikkeling. Na een dag was bij meeste embryo’s te zien dat e afwijkende vorm hadden, eer duidelijk beeld en ontwikkeling was na 2 of dagen beter zichtbaar. Bij dit screen zagen we verschillende afwijkingen van bepaalde PTP`s. sommige embryo’s hadden korte staart, gebogen staart, vorm was klein. PTP` als: *ptprgb, ptprh* en *ptprzb* gaven heel abnormale fenotype. Dat geeft aan dat die bepaalde PTP mogelijk rol speelt in celmigratie. Dat is op dit moment niet vast te stellen of er daadwerkelijk zo is. In de toekomt moet door verdere experimenten aangetoond worden.

Fenotype van *ptprgb* knockdown embryos en In Situ Hybridisatie screen was heel interessant. We konden zien dit gen inderdaad in het een rol speelt. Knockdown embryos had geen ontwikkelde hoofd. Op deIn Situ Hyridisatie foto`s zien de expressie in het ventrikels.

Door PTP te screenen is een belangrijke stap gezet om meer weten te komen over tot nu toe onbekende werking dit klasieke PTP. Er moet nog veel gebeuren om te onderoeken.

**Referenties**

1. **Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships.** *Lydia Tabernero, A. Radu Aricescu, E. Yvonne Jones, Stefan E. Szedlacsek. (2007)*
2. **Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrating development**. *David R Corey, ohn M Abrams.(2001)*
3. **Protein-tyrosine phosphatases in development.** *Jeroen den Hertog (1999)*
4. **Morphant: a new systematic vertebrate functional genomics approach**. *Stephen C.ekker (2000)*
5. **Stages of Embryonic Development of the Zebrafish**. *Charles B. Kimmel, William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie ullmann, Thomas F. Schilling (1995)*
6. **Klinische genetic: het Noonansyndroom**. *I. van der Burgt, C.Noordam, G.Thoonen, C.T.R.M. Schrander-Stumpel (2004)*
7. **Gastrulation in zebrafish – all just about adhesion**? *Llianna Solnica-Krezel (2006)*
8. **Protein tyrosine phosphatases: regulatory mechanisms**. *Jeroen den Hertog, Arne Östman, Frank-D. Böhmer.*
9. **Zebrafish--The Canonical vertebrate.** *Mark C.Fishman (2001)*
10. **Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome**. *Marco Tartaglia, Ernest L.Mehler, Rosalie Goldberg, Giuseppe Zampino, Han G. Brunner, Hannie Kremer, Ineke van der Burgt, Andrew H. Crosby, Andra Ion, Steve Jeffery, Kamini Kalidas, Michael A. Patton, Raju S. Kucherlapati, Bruce D. Gelb (2001)*
11. **Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome.** *Andres Alonso, Joanna Sasin, Nunzio Bottini, Ian Friedberg, Iddo Friedberg, Andrei Osterman, Adam Godzik, Tony Hunter, Jack Dixon, Tomas Mustelin (2004)*
12. **Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome.** *Suzanne Schubbert, Martin Zenker, Sara L Rowe, Silke Boll, Cornelia Klein, Gideon Bollag, Ineke van der Burgt, Luciana Musante, Vera Kalscheuer, Lars-Erik Wehner, Hoa Nguyen, Brian West, Kam Y J Zhang, Erik Sistermans, Anita Rauch, Charlotte M Niemeyer, Kevin Shannon, Christian P Kratz (2006)*
13. **Stops along the RAS pathway in human genetic disease***. Mohamed Bentires-alj, Maria I Kontaridis, Benjamin G Neel (2006)*
14. **Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome**. *Amy E Roberts, Toshiyuki Araki, Kenneth D Swanson, Kate T Montgomery1, Taryn A Schiripo1, Victoria A Joshi1, Li Li1, Yosuf Yassin1, Alex M Tamburino1, Benjamin G Neel, Raju S Kucherlapati (2007)*
15. **Activating Mutations of the Noonan Syndrome-Associated *SHP2/PTPN11* Gene in Human Solid Tumors and Adult Acute Myelogenous Leukemia.** *Mohamed Bentires-Alj, J. Guillermo Paez, Frank S. David, Heike Keilhack, Balazs Halmos, Katsuhiko Naoki, John M. Maris, Andrea Richardson, Alberto Bardelli, David J. Sugarbaker, William G. Richards, Jinyan Du, Luc Girard, John D. Minna, Mignon L. Loh, David E. Fisher, Victor E. Velculescu, Bert Vogelstein, Matthew Meyerson, William R. Sellers, and Benjamin G. Neel (2004)*
16. **Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis**. *Dieter-Chichung Lie, Sophia A. Colamarino, Hong-Jun Song, Laurent De´sire´, Helena Mira, Antonella Consiglio, Edward S. Lein, Sebastian Jessberger, Heather Lansford, Alejandro R. Dearie, Fred H. Gage (2005)*
17. **Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation.** *Enrique M. Toledo, Marcela Colombres, Nibaldo C. Inestrosa (2007)*
18. **Protein tyrosine phosphatases: dual-specificity phosphatases in health and disease.** *Rafael Pulido, Rob Hooft van Huijsduijnen (2007)*
19. **Phosphotyrosine (p-Tyr)-Dependent and -Independent Mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP Interaction: Tyr 1105 of p190, a Substrate for c-Src, Is the Sole p-Tyr Mediator of Complex Formation.** *Richard W. Roof, Michelle D. Haskell, bernard D. DukesS, Nicholas Sherman, Michael Kinter, Sarah J. Parsons (1998)*
20. **Oncogenic kinase signaling.** *Peter Blume-Jensen, Tony Hunter*
21. **Protein tyrosine phosphatases and signaling.** *Andrew W Stoker*
22. **Kinetic and structural analysis of a bacterial protein tyrosine phosphatase-like myo-inositol polyphosphatase.** *Aaron A. Puhl, Robert J. Gruninger, Ralf Greiner, Timothy W. Janzen, Steven C. Mosimann and L. Brent Selinger*
23. **Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation**. *Robert Roskoski Jr.*