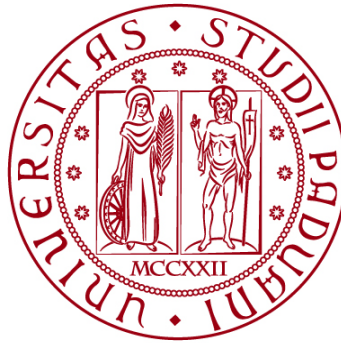


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**Studio *in vivo* dell'interazione tra le vie
Wnt/ β -catenina e Hippo-YAP/TAZ durante lo
sviluppo embrionale di *Danio rerio***

Tutor: Francesco Argenton

Dipartimento di Biologia

Laureanda: Anna Rossi

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

Sommario

Abstract.....	1
1. Stato dell'arte	3
1.1 Via di segnalazione Wnt/ β -catenina e sue alterazioni	3
1.2 Via di segnalazione Hippo-YAP/TAZ e sue alterazioni.....	4
1.3 Crosstalk tra le vie Wnt/ β -catenina e Hippo-YAP/TAZ.....	5
2. Materiali e metodi	7
2.1 Zebrafish.....	7
2.2 Linee transgeniche.....	8
2.3 Analisi di colocalizzazione spazio-temporale	9
2.4 Perturbazioni farmacologiche della via Wnt/ β -catenina.....	9
2.5 Strategie di modulazione genetica	10
3. Risultati	11
3.1 Espressione colocalizzata delle vie Wnt e YAP/TAZ	11
3.2 L'inibizione farmacologica della via Wnt riduce l'attività di YAP/TAZ.....	12
3.3 L'attivazione farmacologica della via Wnt aumenta l'attività di YAP/TAZ...	13
3.4 L'inibizione genetica della via Wnt riduce l'attività di YAP/TAZ	14
3.5 L'attivazione genetica della via Wnt aumenta l'attività di YAP/TAZ	15
4. Discussione	17
4.1 Modelli alternativi	17
4.2 Peculiarità del paper e rilevanza dello studio <i>in vivo</i>	19
4.3 Vantaggi dello zebrafish come modello sperimentale.....	20
5. Conclusioni.....	23
Bibliografia	25
Appendice	27
Allegato dell'elaborato.....	29

Abstract

Le vie di segnalazione Hippo-YAP/TAZ e Wnt/ β -catenina sono fondamentali per lo sviluppo embrionale e l'omeostasi tissutale. Sebbene il loro crosstalk sia ampiamente documentato nei modelli murini in relazione a processi oncologici quali il carcinoma del colon-retto, l'epatocarcinoma e i tumori mammari, i meccanismi molecolari *in vivo* rimangono parzialmente elusi. Il presente lavoro analizza lo studio di Astone et al. (2024), il quale investiga tale interazione nell'embrione di zebrafish (*Danio rerio*) attraverso approcci farmacologici e genetici. I risultati confermano profili di espressione spazio-temporale condivisi e supportano il modello secondo cui la via canonica di Wnt/ β -catenina influenza direttamente la traslocazione nucleare di YAP/TAZ, contrariamente alle teorie basate sulla via non canonica.

Rispetto ai modelli mammiferi, l'impiego di zebrafish offre sostanziali vantaggi metodologici, consentendo la visualizzazione *in vivo* dei biosensori in organismi trasparenti.

Chiarire queste interazioni nei vertebrati permette non solo di comprendere le dinamiche molecolari della morfogenesi, ma fornisce anche un solido modello *in vivo* per lo screening farmacologico e l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici per le neoplasie umane legate alla disregolazione di questi pathway.

1. Stato dell'arte

1.1 Via di segnalazione Wnt/ β -catenina e sue alterazioni

La via di segnalazione guidata dai morfogeni Wnt (dalla fusione di *wingless* in *Drosophila* e *Int-1* nei mammiferi) costituisce un sistema di trasduzione del segnale fondamentale sia durante l'embriogenesi – in cui coordina la specificazione degli assi corporei, l'induzione dei foglietti embrionali e l'organogenesi – sia nel controllo dell'omeostasi dei tessuti adulti, regolando la proliferazione e il differenziamento cellulare. La via di segnalazione Wnt agisce secondo due modalità: attraverso una via non canonica, indipendente dalla proteina β -catenina, e attraverso una via canonica, dipendente dalla traslocazione nucleare della β -catenina. Ai fini del presente lavoro di tesi verrà presa in considerazione esclusivamente la via canonica.

In assenza di ligandi Wnt, la β -catenina citosolica viene sequenzialmente fosforilata da CK1 α (Casein Kinase 1 α) e GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β) all'interno del complesso di distruzione, costituito anche dalle proteine scaffold APC (Adenomatous Polyposis Coli) e Axin. La fosforilazione promuove il riconoscimento della β -catenina da parte del sistema ubiquitin-proteasoma, avviandola alla degradazione.

L'attivazione della via canonica è innescata dal legame di Wnt al proprio complesso recettoriale transmembrana. Ciò innesca una cascata di eventi molecolari che porta all'accumulo di β -catenina nel citosol, alla sua successiva traslocazione nel nucleo e all'interazione con i fattori di trascrizione della famiglia TCF/LEF (T-cell factor/Lymphoid enhancer factor), promuovendo la trascrizione di geni target coinvolti nella crescita, nella proliferazione e nel metabolismo cellulare.

La disregolazione di questo pathway - come nel caso di mutazioni a carico di β -catenina che ne impediscono la degradazione - altera l'omeostasi cellulare ed è riconosciuta come una delle cause primarie di tumorigenesi [1].

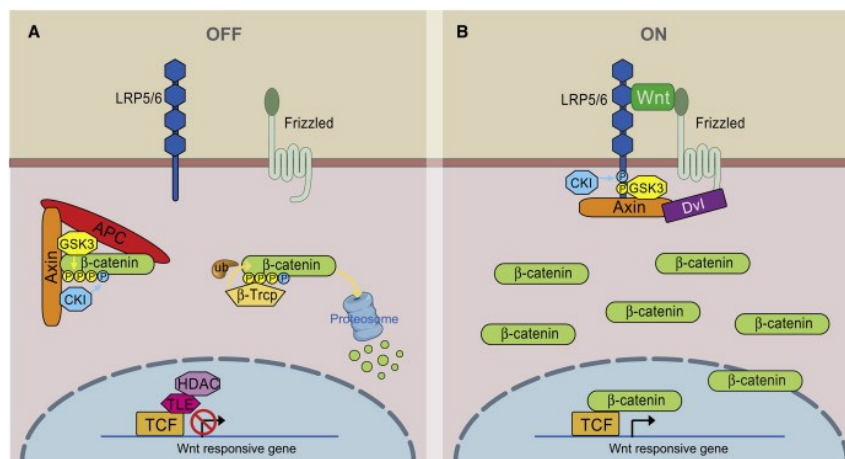


Figura 1.1 – Via di segnalazione Wnt/β-catenina (Tratto da MacDonald et al., 2009).

1.2 Via di segnalazione Hippo-YAP/TAZ e sue alterazioni

YAP1 (Yes-Associated Protein 1) e TAZ (Transcriptional Coactivator with PDZ-binding Motif) sono co-attivatori trascrizionali della via di segnalazione Hippo, una cascata molecolare altamente conservata dal punto di vista evolutivo. Questa via svolge un ruolo fondamentale nel controllo delle dimensioni degli organi durante lo sviluppo embrionale, nel mantenimento dell'omeostasi tissutale, nella meccano-trasduzione e nella regolazione del differenziamento delle cellule staminali.

In presenza di stimoli inibitori della crescita - come un'elevata densità cellulare o sollecitazioni meccaniche adeguate - la cascata chinastica della via Hippo viene attivata: le chinasi MST1/2 fosforilano e attivano LATS1/2, le quali a loro volta fosforilano YAP1 e TAZ. La fosforilazione ne promuove il sequestro citosolico o l'avvio alla degradazione mediante il sistema ubiquitin-proteasoma, impedendone l'ingresso nel nucleo.

Al contrario, in presenza di stimoli attivatori (o in assenza del segnale inibitorio Hippo) la cascata chinastica rimane inattiva. YAP1 e TAZ, non fosforilati, possono traslocare nel nucleo dove interagiscono con i fattori di trascrizione della famiglia TEAD (TEA Domain transcription factors), promuovendo l'espressione di geni target coinvolti nella proliferazione cellulare, nella sopravvivenza e nella transizione epitelio-mesenchimale.

L'iperattivazione di YAP/TAZ (o una perdita di funzione dei soppressori tumorali della via Hippo) guida una proliferazione cellulare incontrollata, favorisce la transizione epitelio-mesenchimale, la metastatizzazione e l'eterogeneità

intratumorale. Diversamente, la loro sottoattivazione o ipofunzione è causa di difetti nello sviluppo embrionale, ridotta capacità rigenerativa, atrofia e degenerazione tissutale indotta da apoptosi [2].

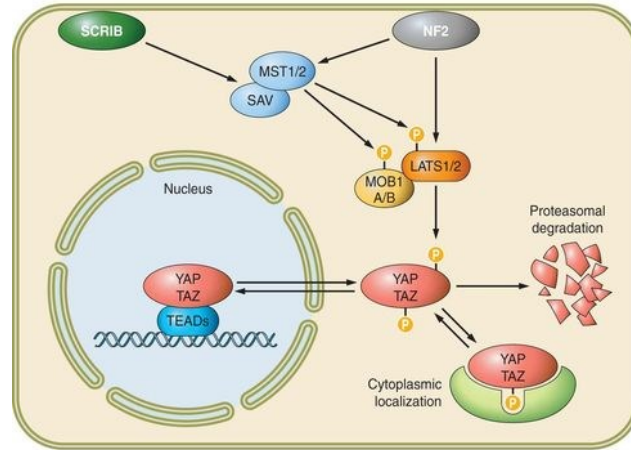


Figura 1.2 – Via di segnalazione di Hippo-YAP/TAZ (Tratto da Piccolo et al., 2014).

1.3 Crosstalk tra le vie Wnt/ β -catenina e Hippo-YAP/TAZ

Le vie di segnalazione Wnt e Hippo non agiscono come cascate isolate, bensì mostrano un'intensa e complessa interconnessione molecolare. Una frazione significativa dell'output trascrizionale guidate da Wnt/ β -catenina si è dimostrata essere strettamente YAP/TAZ-dipendente.

La base meccanicistica di questa integrazione risiede nell'incorporazione fisica di YAP1 e TAZ direttamente all'interno del complesso di distruzione della β -catenina (costituita da Axin, APC, GSK-3 e CK1).

In assenza di ligandi Wnt il complesso di distruzione si trova assemblato e funzionale. Al suo interno la β -catenina funge da scaffold per reclutare l'E3 ubiquitin ligasi β -TrCP, promuovendo la simultanea ubiquitinazione e degradazione proteasomiale sia della β -catenina stessa sia di YAP/TAZ. In questo modo, YAP1 e TAZ vengono sequestrati nel citosol e degradati.

In presenza di ligandi Wnt l'attivazione del recettore Frizzled e del co-recettore LRP5/6 inibisce la capacità del complesso di distruzione di reclutare β -TrCP. Di conseguenza, la mancata degradazione di β -catenina ne determina l'accumulo citosolico e libera contemporaneamente YAP1 e TAZ dal complesso. Tutte e tre le

molecole possono così traslocare nel nucleo e coordinare un programma genico integrato per la proliferazione e il mantenimento della staminalità [3].

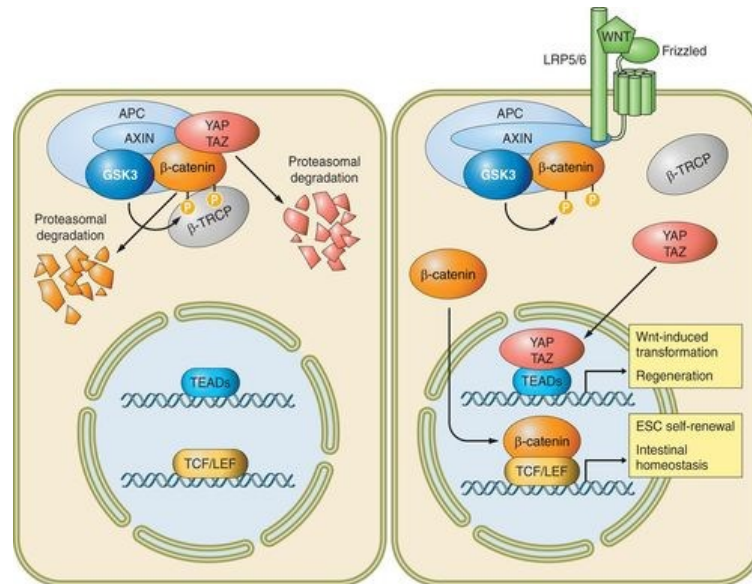


Figura 1.3 – Crosstalk tra le vie Wnt/β-catenina e Hippo-YAP/TAZ (Tratto da Piccolo et al., 2014).

2. Materiali e metodi

2.1 Zebrafish

Per lo studio *in vivo* dell'interazione molecolare tra le vie di segnalazione Wnt/ β -catenina e Hippo-YAP/TAZ è stato impiegato come modello sperimentale *Danio rerio*, comunemente noto come zebrafish. *Danio rerio* è un teleosteo d'acqua dolce appartenente alla famiglia dei Ciprinidi, ampiamente utilizzato in biologia dello sviluppo e genetica funzionale per le sue caratteristiche biologiche favorevoli.

La specie è caratterizzata da un'elevata fecondità e da uno sviluppo embrionale rapido ed esterno: le uova, di tipo macrolecitico, vanno incontro ad una segmentazione di tipo meroblastico discoidale che inizia entro 30-60 minuti dalla fecondazione. Entro 24 ore post-fecondazione (hours post-fertilization, hpf) l'embrione raggiunge lo stadio filotipico, mentre l'organogenesi primaria si completa entro le 72 hpf.

Nella maggior parte delle analisi di microscopia condotte in questo studio, gli embrioni sono stati osservati e analizzati a 48 hpf. A questo stadio lo sviluppo anatomico è sufficientemente avanzato: il sistema cardiovascolare e la circolazione funzionale sono già instaurati e gli organi sensoriali, unitamente al sistema nervoso centrale, permettono i primi riflessi tattili e di fuga. La scelta di questa fase risponde a due esigenze sperimentali fondamentali: la prima è l'espressione dei reporter fluorescenti, che richiedono tempi tecnici di trascrizione e traduzione, la seconda è che la visualizzazione deve avvenire in una fase di organogenesi attiva.

A partire da circa 24-30 hpf, i melanociti embrionali iniziano a sintetizzare melanina, formando le prime strisce pigmentate lungo il tronco e le creste dorsale e ventrale. Per preservare l'ottica e la completa trasparenza dei tessuti – requisito indispensabile per le acquisizioni al microscopio confocale a fluorescenza – gli embrioni sono stati incubati continuamente in una soluzione di 1-fenil-2-tiourea (PTU 0.003%), un inibitore della tirosinasi (l'enzima chiave della melanogenesi).

Per consentire la penetrazione ottimale dei composti farmacologici nei tessuti embrionali, gli embrioni sono stati decorionati a 24 hpf prima della somministrazione delle molecole. In condizioni fisiologiche, la schiusa spontanea e la perdita del corion avvengono tra le 48 e le 72 hpf.

2.2 Linee transgeniche

Per indagare *in vivo* l'interazione funzionale tra le vie di segnalazione Wnt/ β -catenina e Hippo-YAP/TAZ durante lo sviluppo di zebrafish, sono stati condotti esperimenti volti a valutare sia la co-localizzazione spazio-temporale dei segnali, sia la risposta coordinata a perturbazioni farmacologiche e genetiche.

Per avere un riscontro qualitativo, e in qualche caso quantitativo, degli esperimenti effettuati, sono state utilizzate linee transgeniche in grado di esprimere dei reporter fluorescenti visualizzabili al microscopio confocale a fluorescenza.

Le linee transgeniche utilizzate sono riportate di seguito:

- *Tg(7xTCF-Xla.Siam:GFP)^{ia4}*
Linea reporter per la via Wnt/ β -catenina canonica.
Il costrutto contiene elementi di risposta TCF legati al promotore del gene *Siamois* di *Xenopus laevis* (target diretto di Wnt), che guida l'espressione della Green Fluorescence Protein (GFP; eccitazione 488 nm, emissione 505 nm) [4].
- *Tg(Hsa.CTGF:nlsmCherry)^{ia49}*
Linea reporter per la via Hippo-YAP/TAZ.
Il promotore del gene umano *CTGF* (*Connective Tissue Growth Factor*) guida l'espressione della proteina fluorescente mCherry (eccitazione 587 nm, emissione 610 nm) coniugata a un segnale di localizzazione nucleare (nls). Ciò consente di confinare il segnale nei nuclei cellulari e quantificare con precisione la risoluzione a singola cellula [5].

Per modificare geneticamente le vie di segnalazione e osservarne gli effetti sono state utilizzate altre due linee transgeniche:

- *Tg(hsp70:dkk1-GFP)^{w32}*
Linea per l'inibizione genetica della via Wnt.
Sotto il controllo del promotore inducibile da shock termico (*hsp70*), sovraesprime l'antagonista Dkk1 coniugato a GFP al raggiungimento di 37-40°C per 60 minuti [6].
- *apc^{hu745}*
Linea mutante recante una transizione puntiforme C $\rightarrow$ T nel gene *apc*. La mutazione introduce un codone di stop prematuro che produce una proteina

APC troncata, priva del dominio C-terminale necessario all'interazione con Axin. Ciò impedisce l'assemblaggio del complesso di distruzione, causando l'accumulo citosolico e la traslocazione nucleare della β -catenina [7].

2.3 Analisi di colocalizzazione spazio-temporale

L'espressione sovrapposta delle due vie è stata valutata a 48 hpf mediante microscopia confocale a fluorescenza sulle linee reporter *Tg(7xTCF-Xla.Siam:GFP)^{ia4}* e *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}*.

Il grado di colocalizzazione cellulare nei canali verde (GFP) e rosso (mCherry) è stato quantificato calcolando il Coefficiente di sovrapposizione di Mander (Mander's Overlap Coefficient, MOC) tramite il plugin JACoP di ImageJ/Fiji. Il coefficiente assume un valore tra 1, nel caso di totale sovrapposizione, e 0, se i segnali sono completamente separati.

2.4 Perturbazioni farmacologiche della via Wnt/ β -catenina

I trattamenti farmacologici sono stati somministrati *in vivo* in fish water su embrioni precedentemente decorionati, nell'intervallo temporale compreso tra 24 e 48 hpf.

Per inibire la via Wnt sono stati somministrati IWR-1 e XAV939 in concentrazione di 10 μ M e 5 μ M rispettivamente. Le due molecole inibiscono le tankyrasi 1 e 2 (TNKS1 e TNKS2), stabilizzando la proteina Axina, favorendo l'assemblaggio del complesso di distruzione con conseguente degradazione di β -catenina e spegnimento dei geni target. L'effetto sulla via Hippo è stato quantificato misurando l'intensità di fluorescenza mCherry della linea *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* e mediante qPCR sui geni target *ccn2a* e *ccn2b*.

Come controllo è stato utilizzato dimetilsolfossido (DMSO), con cui sono stati solubilizzati anche i farmaci.

Per l'attivazione della via Wnt è stato effettuato un trattamento 6-bromoindirubina-3'-ossima (BIO), un inibitore di GSK3 α , in concentrazione di 5 μ M. Poiché la molecola BIO presenta un'autofluorescenza nello spettro del rosso che interferisce con il canale di mCherry, l'attività del reporter è stata analizzata

tramite Ibridazione In Situ Whole-Mount (WISH) impiegando una sonda a RNA antisense marcata con digossigenina per il trascritto mCherry.

L'analisi del segnale WISH è stata condotta secondo due approcci paralleli:

1. Quantitativo o categorico: classificazione degli embrioni in tre categorie d'intensità di segnale (debole, medio, forte) presentata tramite istogrammi di distribuzione percentuale
2. Semiquantitativo: conversioni delle acquisizioni ottiche delle regioni di interesse (ROI = 100 µm x 100 µm) in scala di grigi e immagini in negativo, analizzate mediante il software Volocity 6.0.

I dati, normalizzati al controllo, sono stati sottoposti a test statistico non parametrico di Mann-Whitney. I risultati sono stati integrati da analisi qPCR per *ccn2a* e *ccn2b*.

Tutti i controlli sono stati trattati con DMSO alla medesima concentrazione.

2.5 Strategie di modulazione genetica

Per confermare i dati farmacologici tramite approcci genetici *in vivo*, sono stati allestiti due diversi incroci.

Nel primo caso è stato effettuato un incrocio tra le linee transgeniche *Tg(Hsa.CTGF:nlsmCherry)^{ia49}* e *Tg(hsp70:dkk1-GFP)^{w32}*, che ha permesso l'inibizione temporale tramite Dkk1.

La sovraespressione dell'antagonista di Wnt, Dkk1-GFP, è stata indotta applicando cicli di shock termico (37°C per 1 ora) ogni 12 ore da 12 hpf fino a 72 hpf. Le variazioni trascrizionali di YAP/TAZ sono state poi confermate via WISH per il gene *mCherry*.

Nel secondo caso è stato effettuato un incrocio tra la linea reporter *Tg(Hsa.CTGF:nlsmCherry)^{ia49}* e il mutante *apc^{hu745}*. Nei mutanti omozigoti, l'assenza della proteina APC funzionale blocca il complesso di distruzione, stabilizzando la β-catenina. L'effetto sull'espressione di YAP/TAZ è stato mappato sia a livello morfologico sia mediante WISH per il reporter nucleare.

3. Risultati

3.1 Espressione colocalizzata delle vie Wnt e YAP/TAZ

L'analisi della coespressione delle due linee reporter ha evidenziato pattern dinamici spaziotemporali ampiamente condivisi. In diversi contesti tissutali, infatti, le due vie di segnalazione mostrano domini di espressione spazialmente sovrapposti. Tale co-localizzazione dei segnali trova conferma quantitativa nell'analisi d'immagine: come riportato in basso nella Figura 3.1-B, i valori del coefficiente di sovrapposizione di Manders (MOC) superano nettamente la soglia di 0.8 in regioni anatomiche specifiche. In particolare, una marcata sovrapposizione è visibile a livello del tubo neurale (nt), della notocorda (n), della piastra basale (fp), dell'otocisti (ov) e del muscolo (m).

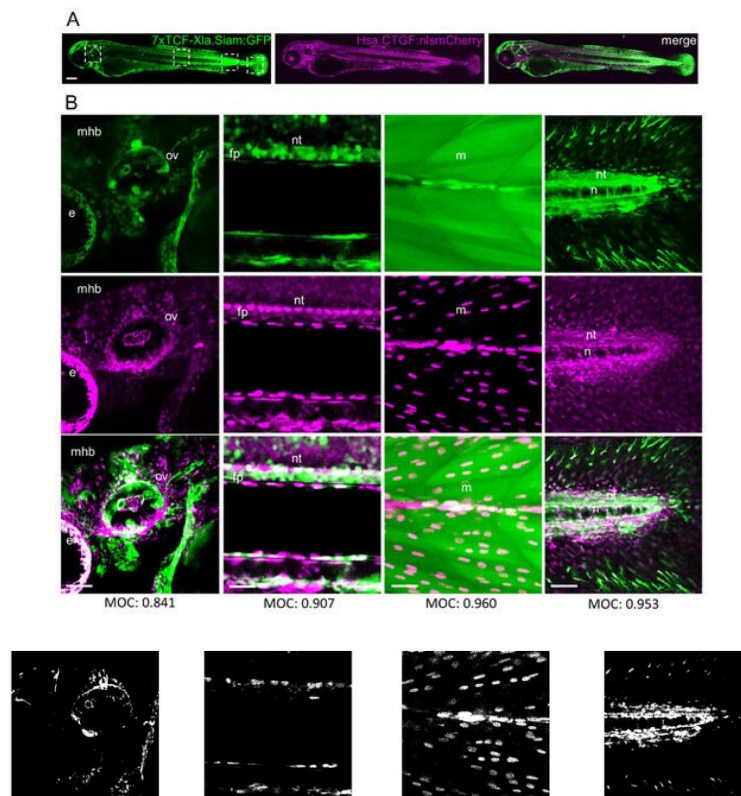


Figura 3.1 – (A) Rappresentazioni dell'espressione di *Tg(7xTCF-Xla.Siam:GFP)ia4* (verde) e di *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)ia49* (rosso) e sovrapposizione delle immagini (bianco). (B) Ingrandimento di testa, tronco, muscoli e regione caudale. In bianco e nero: intersezione dei due segnali per evidenziare le regioni sovrapposte ottenuto con un operatore di tipo “AND” (Rielaborazione di Figura 1 e Figura S1 tratte da Astone et al., 2024).

3.2 L'inibizione farmacologica della via Wnt riduce l'attività di YAP/TAZ

In seguito ad entrambi i trattamenti farmacologici (IWR-1 e XAV939), si è osservata una significativa riduzione dell'intensità del segnale fluorescente della linea reporter rispetto al controllo trattato con DMSO. A tale decremento corrisponde una contestuale sotto-regolazione dell'espressione dei geni bersaglio *ccn2a* e *ccn2b*, analizzata tramite WISH. Tali risultati evidenziano come l'inibizione della via di segnalazione Wnt/ β -catenina comporti una riduzione dell'attività nucleare di YAP/TAZ *in vivo*.

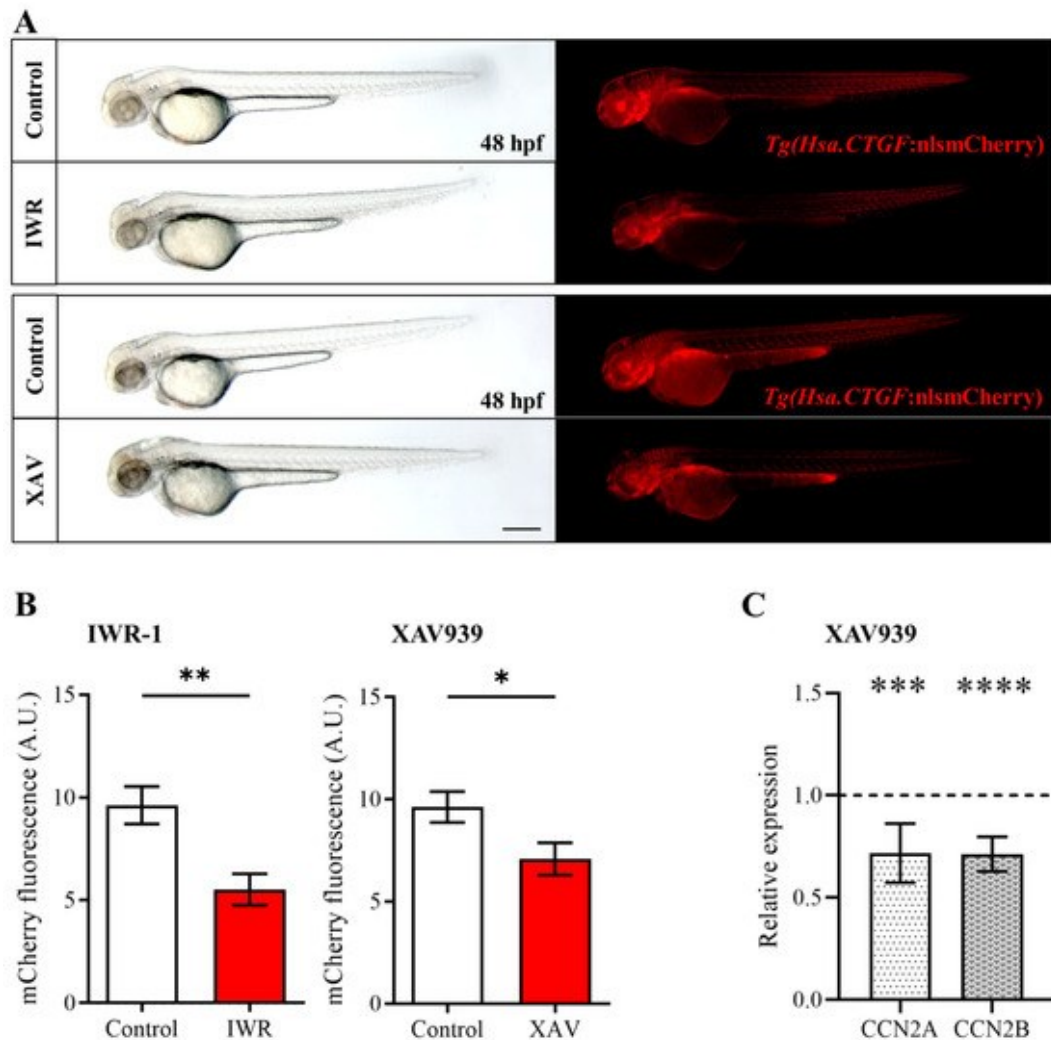


Figura 3.2 – (A, B) Riduzione del segnale dopo il trattamento. (C) Espressione relativa dei geni *ccn2a* e *ccn2b* dopo il trattamento (Tratto da Astone et al., 2024).

3.3 L'attivazione farmacologica della via Wnt aumenta l'attività di YAP/TAZ

L'attivazione della via Wnt/ β -catenina mediante trattamento con BIO – un inibitore della chinasi GSK3 α – ha determinato un aumento significativo dell'espressione dell'mRNA di mCherry. Questo risultato suggerisce che l'inibizione della fosforilazione della β -catenina (e la sua conseguente stabilizzazione) influenzi positivamente l'attività trascrizionale di YAP/TAZ.

Inoltre, l'incremento trascrizionale di *ccn2b* è risultato più marcato rispetto a quello di *ccn2a*.

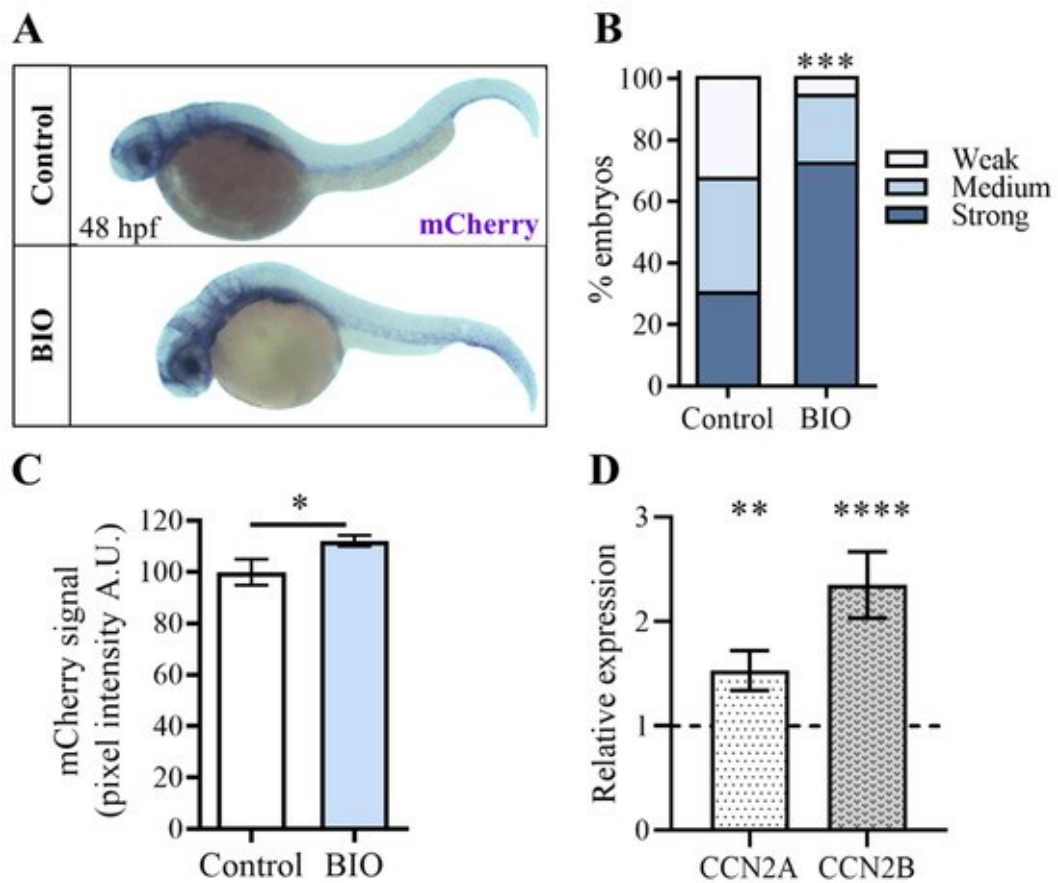


Figura 3.3 – (A) Immagini rappresentative al microscopio a fluorescenza di embrioni a 48 hpf (Controllo vs BIO). (B) Distribuzione percentuale del segnale (Debole, Medio, Forte). (C) Quantificazione del segnale mCherry ottenuto tramite WISH. (D) Analisi di espressione genica relativa di *ccn2a* e *ccn2b* tramite qPCR (Tratto da Astone et al., 2024).

3.4 L'inibizione genetica della via Wnt riduce l'attività di YAP/TAZ

In seguito all'induzione dell'espressione di Dkk1, è stata osservata una riduzione significativa della fluorescenza di mCherry (Figura 3.4-A, B), sebbene di entità inferiore rispetto a quella ottenuta con il trattamento farmacologico.

Al contrario, l'analisi dei livelli di mRNA tramite WISH ha evidenziato un calo più marcato dell'espressione tra gli embrioni trattati e i controlli (Figura 3.4-C, E). Tale discrepanza è riconducibile al più rapido turnover dell'mRNA rispetto a quello della proteina reporter, rendendo l'analisi trascrizionale maggiormente sensibile alle modulazioni a breve termine.

Coerentemente con questi dati, la distribuzione fenotipica mostra un netto aumento della percentuale di embrioni con segnale di intensità “debole” nei campioni Dkk1 OE rispetto ai controlli (Figura 3.4-D).

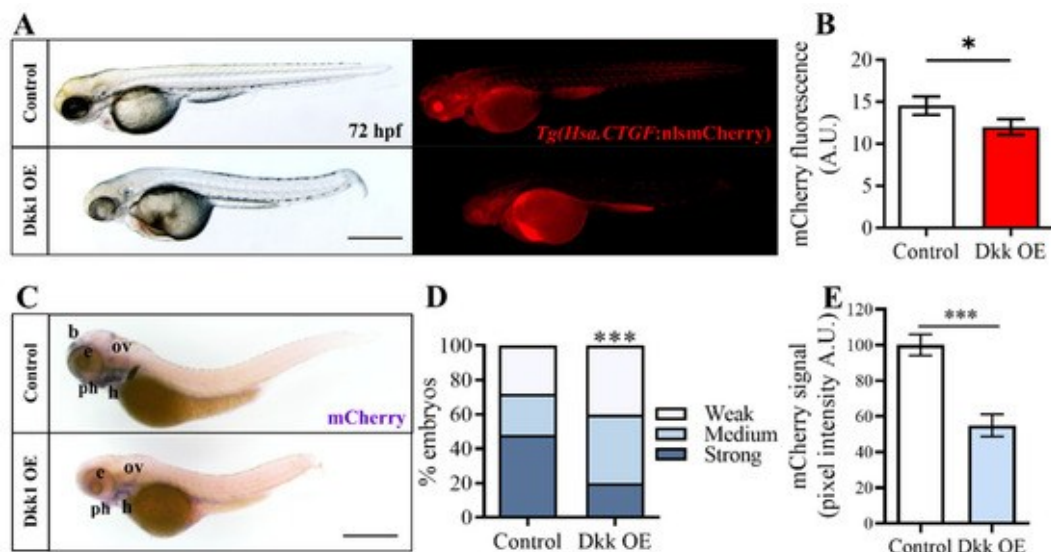


Figura 3.4 – (A, B) Analisi di microscopia a fluorescenza e relativa quantificazione del segnale mCherry in embrioni Control e Dkk1 OE a 72 hpf. (C) Analisi dell'espressione dell'mRNA di mCherry tramite WISH. (D) Distribuzione percentuale degli embrioni in base all'intensità del segnale WISH (Debole, Medio, Forte). (E) Quantificazione dell'intensità i segnale pixel del WISH (Tratto da Astone et al., 2024).

3.5 L'attivazione genetica della via Wnt aumenta l'attività di YAP/TAZ

La colorazione con Alcian Blue evidenzia un alterato sviluppo degli archi faringei a 72 hpf nei mutanti omozigoti per il gene *apc* (Figura 3.5-A). A livello di tali strutture, si osserva un'apparente riduzione del segnale mCherry (Figura 3.5-B); tuttavia, tale calo non è riconducibile ad una regolazione negativa di Wnt su YAP/TAZ, bensì all'assenza del distretto anatomico stesso.

Al contrario, nei distretti anatomici correttamente conformati, l'attivazione costitutiva della via Wnt indotta dalla mutazione di *apc* determina un incremento significativo del segnale del reporter mCherry (Figura 3.5-C, E) e un aumento della percentuale di embrioni con segnale forte/medio (Figura 3.5-D). Questo dato conferma l'esistenza di una cooperazione positiva tra le due vie di segnale, in linea con i risultati precedentemente ottenuti.

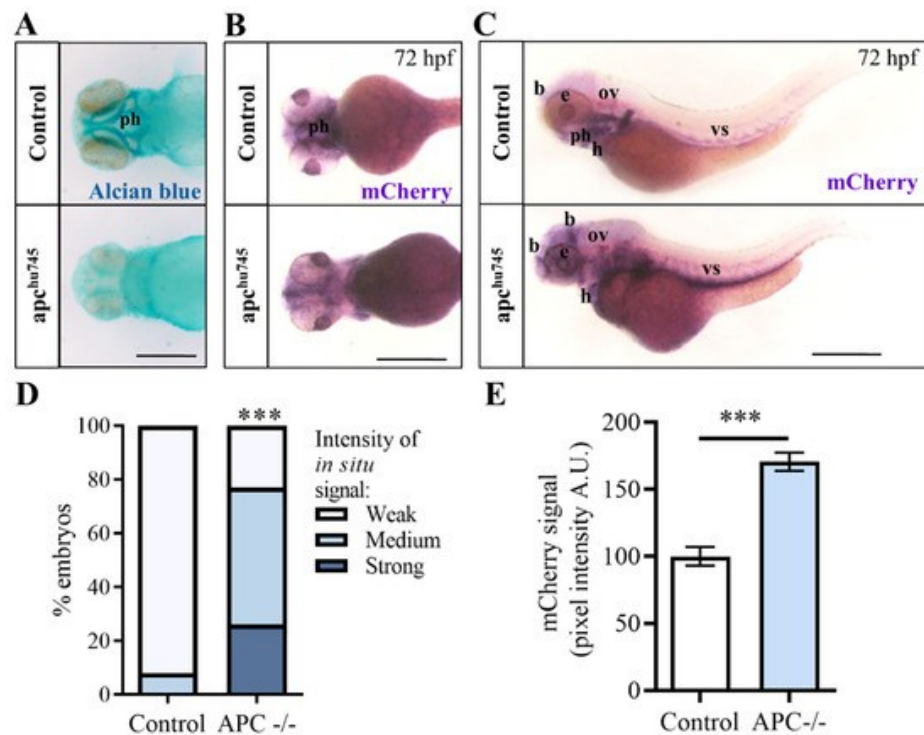


Figura 3.5 – (A) Colorazione con Alcian Blue a 72 hpf per la valutazione dello sviluppo cartilagineo degli archi faringei (ph) in embrioni controllo e mutanti. (B, C) Analisi dell'espressione dell'mRNA di mCherry tramite WISH. (D) Distribuzione percentuale degli embrioni in base all'intensità del segnale WISH nei controlli e nei mutanti (Tratto da Astone et al., 2024).

5. Discussione

5.1 Modelli alternativi

Il modello di regolazione diretta di YAP/TAZ da parte della via Wnt canonica descritto da Astone et al. (2024) si inserisce in un dibattito scientifico complesso e articolato. Un'evidenza apparentemente contrastante è rappresentata dal lavoro di Park et al. (2015) [8], pubblicato su *Cell*. Gli autori propongono un meccanismo denominato "*alternative Wnt-YAP/TAZ signaling axis*", secondo cui i ligandi Wnt (sia canonici come Wnt3a che non canonici come Wnt5a/b) sono in grado di attivare YAP/TAZ in modo del tutto indipendente dalla β -catenina e dal complesso di distruzione. Dal punto di vista biochimico, i ligandi Wnt legano i recettori transmembrana Frizzled (FZD) in associazione con i co-recettori ROR1 e ROR2 (Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 1/2). Questa interazione attiva la subunità α delle proteine G eterotrimeriche $G_{\alpha_{12/13}}$, le quali stimolano direttamente l'attività delle GTPasi monomeriche della famiglia Rho (RhoA).

L'attivazione di RhoA promuove la riorganizzazione del citoscheletro cellulare attraverso la polimerizzazione dei filamenti di F-actina e la formazione di fibre da stress. Questa sollecitazione meccanica citoscheletrica inibisce la chinasi LATS1/2, prevenendo la fosforilazione di YAP1. Di conseguenza, YAP1 e TAZ sfuggono al sequestro citosolico e traslocano nel nucleo per guidare la trascrizione dei geni bersaglio TEAD-dipendenti.

A supporto dell'indipendenza dalla via canonica, Park et al. hanno evidenziato che l'aggiunta dell'antagonista extracellulare DKK1 — che blocca selettivamente l'interazione tra Wnt e LRP5/6 — impedisce l'accumulo di β -catenina ma non blocca la defosforilazione e la traslocazione nucleare di YAP/TAZ indotta da Wnt, e che il silenziamento genico mediante shRNA o il knockout genetico della β -catenina non altera la capacità del segnale Wnt di attivare l'output trascrizionale di YAP/TAZ.

Le marcate divergenze tra i risultati ottenuti da Park et al. e le osservazioni condotte da Astone et al. possono essere analizzate attraverso tre fattori chiave: l'ambiente sperimentale, l'effetto degli inibitori e la complementarità e specificità di contesto dei due meccanismi.

Nello studio condotto da Park et al. la maggior parte dei dati è stata ottenuta su colture cellulari bidimensionali di mammifero piastrate su supporti plastici rigidi. I supporti sintetici esercitano una rigidità meccanica elevata, la quale pre-attiva le fibre da stress citoscheletriche e ipersensibilizza l'asse RhoA-F-actina-LATS1/2 [9]. In queste condizioni *in vitro* la risposta citoscheletrica guidata dalle proteine G può facilmente mascherare o predominare sulla modulazione condotta dal complesso di distruzione. Al contrario, le analisi condotte da Astone et al. avvengono nel contesto tridimensionale e fisiologico dell'embrione vivo, che rispecchia una complessità organogenetica in cui la regolazione coordinata da parte del complesso di distruzione (Axin/APC/GSK3 α) costituisce il meccanismo fisiologico primario.

Mentre Park et al. mostrano l'inefficacia di DKK1 nell'impedire l'attivazione di YAP/TAZ, la sovraespressione genetica di *Dkk1* indotta da shock termico (*hsp70:dkk1-GFP*) nell'embrione di zebrafish determina una riduzione statisticamente significativa sia della fluorescenza del reporter *Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)* sia dell'espressione dell'mRNA dei geni bersaglio *ccn2a* e *ccn2b* (rilevata tramite WISH e qPCR). Questo dato conferma che, nel contesto morfogenetico di *Danio rerio*, l'attività di YAP/TAZ richiede l'integrità del segnale canonico LRP5/6-dipendente.

Invece di considerare i due modelli come mutuamente esclusivi, è plausibile ipotizzare l'esistenza di un doppio livello di regolazione, la cui prevalenza dipende dal tipo cellulare, dallo stadio evolutivo e dalle caratteristiche del microambiente. La via non canonica (β -catenina-indipendente) può essere utilizzata in contesti di elevata dinamica cellulare o migrazione in cui ligandi come Wnt5a attivano rapidamente YAP/TAZ via $G_{12/13}$ e RhoA. La via canonica (β -catenina-dipendente) può essere prevalente durante la specificazione dei tessuti embrionali e l'organizzazione spaziale, dove il gradiente di Wnt/ β -catenina regola in modo coordinato la stabilità del complesso di distruzione e l'output trascrizionale.

In conclusione, sebbene il lavoro di Park et al. dimostri l'esistenza di un modulo di segnalazione Wnt non-canonico in grado di bypassare la β -catenina *in vitro*, i dati ottenuti da Astone et al. confermano che, durante l'embriogenesi *in vivo* di *Danio rerio*, la via canonica β -catenina-dipendente rappresenta il determinante primario nel controllo dell'attività di YAP/TAZ.

5.2 Peculiarità del paper e rilevanza dello studio *in vivo*

La principale peculiarità e il valore di novità scientifica del lavoro condotto da Astone et al. (2024) risiedono nell'analisi e nella caratterizzazione *in vivo* del crosstalk tra la via di segnalazione Wnt/ β -catenina e la via Hippo-YAP/TAZ nell'embrione di *Danio rerio*. Prima di questo studio, la conoscenza delle interazioni molecolari tra i due pathway derivava prevalentemente da evidenze *in vitro* ottenute su colture cellulari di mammifero oppure da indagini *in vivo* circoscritte a singoli contesti patologici o rigenerativi. La maggior parte dei meccanismi di regolazione incrociata — inclusa la descrizione del modello cardine di incorporazione fisica di YAP1 e TAZ all'interno del complesso di distruzione della β -catenina proposto da Azzolin et al. (2014) — era stata infatti definita su modelli cellulari bidimensionali, come linee tumorali umane o cellule staminali embrionali murine. Sebbene tali approcci siano stati fondamentali per chiarire le interazioni proteiche primarie, le colture cellulari 2D risultano inevitabilmente prive della complessità architetturale tridimensionale, dei gradienti morfogenetici e delle sollecitazioni meccaniche fisiologiche che caratterizzano un organismo in via di sviluppo. D'altra parte, nei casi in cui lo zebrafish era già stato impiegato come modello *in vivo*, i due pathway venivano analizzati in modo isolato oppure all'interno di specifici processi fisiopatologici ad alta plasticità, quali la rigenerazione cardiaca, la formazione del confine mesencefalo-rombencefalo o le risposte fibrotiche. Mancava tuttavia una dimostrazione sistemica condotta sull'intero organismo embrionale che chiarisse se e come la via canonica β -catenina-dipendente regolasse direttamente la traslocazione nucleare e l'output trascrizionale di YAP/TAZ durante la morfogenesi fisiologica dei vertebrati.

L'adozione di un approccio *in vivo* rispetto ai classici saggi *in vitro* ed *ex vivo* offre vantaggi di fondamentale importanza, specialmente quando si studiano vie di trasduzione del segnale deputate al controllo dello sviluppo embrionale. Trattandosi di cascate molecolari finemente regolate dal microambiente, le dinamiche di attivazione non dipendono esclusivamente dalla presenza dei ligandi extracellulari, ma sono costantemente modellate dalla matrice tridimensionale, dalla polarità cellulare e dalle forze di tensione meccanica. Nei saggi *in vitro* condotti su piastre rigide di plastica, la rete citoscheletrica viene alterata e ipersensibilizzata artificialmente, distorcendo lo stato basale di YAP/TAZ; al contrario, lo studio condotto su un embrione vivo e integro permette di preservare l'architettura tissutale

e le tensioni fisiologiche. Rispetto ai modelli *ex vivo*, come gli espianti di tessuto o gli organoidi, che pur garantiscono una strutturazione tridimensionale ma rimangono isolati dalle influenze sistemiche, l'analisi su embrioni trasparenti di zebrafish consente il tracciamento spazio-temporale continuo e in tempo reale dei biosensori fluorescenti, permettendo di seguire la coordinazione dinamica dei pathway nei vari distretti anatomici lungo le diverse fasi dell'embriogenesi.

5.3 Vantaggi dello zebrafish come modello sperimentale

La peculiarità metodologica centrale e il principale elemento di novità del lavoro di Astone et al. (2024) risiedono nell'impiego di *Danio rerio* come modello animale *in vivo*, una scelta che supera i rilevanti limiti tecnici ed etici legati all'uso esclusivo di modelli mammiferi come il topo (*Mus musculus*). Essendo lo zebrafish un piccolo teleosteo d'acqua dolce, è vantaggioso per l'allevamento e la stabulazione in laboratorio: in vasca necessita di spazi contenuti, riducendo i costi di gestione rispetto agli stabulari per roditori, i quali richiedono manutenzioni complesse, alimentazioni specifiche e ingenti spese per la cura di patologie e l'anestesia. Una caratteristica fisiologica di fondamentale importanza risiede nella temperatura dell'acqua di accrescimento, mantenuta idealmente tra 28 °C e 30 °C; a questi valori, la cinetica enzimatica e le vie metaboliche di *Danio rerio* lavorano a regimi estremamente vicini a quelli della fisiologia umana, garantendo un elevato valore traslazionale negli studi di biologia molecolare e farmaceutica.

La fecondazione esterna di *Danio rerio* offre alcuni vantaggi rispetto alla fecondazione interna dei mammiferi. La naturale trasparenza delle uova e degli embrioni — privi di pigmentazione profonda nei primi giorni di sviluppo e mantenuti privi di melanina mediante trattamenti non invasivi con inibitori della tirosinasi — permette una completa accessibilità ottica diretta, permettendo la facile microiniezione nelle prime fasi di segmentazione, che permettono di condurre screening genetici mutazionali e pre-screening farmacologici ad alto rendimento su centinaia di migliaia di molecole. Lo screening *in vivo* in *Danio rerio* permette di selezionare precocemente i soli composti promettenti da testare successivamente nei mammiferi, ottimizzando drasticamente il numero complessivo di animali impiegati. Negli embrioni di topo, la mancanza di trasparenza e la fecondazione interna impongono un maggiore spreco di animali e problematiche etiche. Al

contrario, lo zebrafish consente di condurre analisi di microscopia confocale *in vivo* e in tempo reale sull'animale integro e in toto, osservando la dinamica cellulare e la traslocazione dei biosensori fluorescenti (tramite linee transgeniche, immunoistochimica e ibridazione *in situ*) senza dover sezionare i tessuti. Sebbene il topo rimanga il modello d'elezione per la fase avanzata delle sperimentazioni oncologiche e cliniche — poiché le sue caratteristiche di mammifero riflettono fedelmente la complessità sistemica, le risposte immunitarie organiche e gli effetti collaterali farmacologici umani —, lo zebrafish si conferma superiore per lo studio dei meccanismi molecolari di base durante l'embriogenesi. L'impiego di *Danio rerio* risponde infatti appieno ai principi etici internazionali delle 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*), garantendo una ricerca altamente riproducibile, economicamente sostenibile e con un impatto etico drasticamente ridotto. In questo quadro, il lavoro di Astone et al. (2024) dimostra come l'uso di uno studio *in vivo* su un organismo trasparente e integro permetta di validare e confermare sul piano fisiologico dinamiche di crosstalk molecolare che in precedenza erano state unicamente ipotizzate su piastre di coltura o dedotte da modelli mammiferi complessi e meno accessibili dall'osservazione diretta [10] [11].

6. Conclusioni

Il presente lavoro ha esaminato il contributo dello studio condotto da Astone et al. (2024), focalizzato sull'analisi *in vivo* dell'interazione tra la via di segnalazione Wnt/beta-catenina e la via di segnalazione Hippo-YAP/TAZ nell'embrione di *Danio rerio*. Grazie all'impiego sinergico di approcci farmacologici e genetici su linee transgeniche reporter, i risultati confermano l'esistenza di una fitta sovrapposizione spazio-temporale tra i due segnali e dimostrano che la via canonica di Wnt/beta-catenina influenza positivamente la traslocazione nucleare e l'attività trascrizionale di YAP/TAZ durante la morfogenesi dei vertebrati. L'utilizzo di un modello animale integro e trasparente come lo zebrafish ha permesso di superare i limiti intrinseci dei saggi *in vitro* su colture bidimensionali, preservando l'architettura tissutale tridimensionale e le tensioni meccaniche fisiologiche. Tale approccio non solo chiarisce le dinamiche molecolari che legano questi due assi di segnalazione al di fuori dei contesti tumorali, ma convalida l'affidabilità di *Danio rerio* come piattaforma d'elezione per futuri studi di biologia dello sviluppo. In prospettiva, l'approfondimento di questi meccanismi in un organismo modello apre nuove strade per l'identificazione di bersagli terapeutici innovativi. Considerando il ruolo chiave della disregolazione congiunta di Wnt e Hippo in diverse neoplasie umane, la possibilità di condurre screening farmacologici e analisi *in vivo* ad alto rendimento su zebrafish rappresenta una risorsa di grande valore.

Bibliografia

1. MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell*, 17(1), 9–26.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
2. Piccolo, S., Dupont, S., & Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiological reviews*, 94(4), 1287–1312.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014>
3. Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., Fassina, A., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2014). YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell*, 158(1), 157–170. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.013>
4. Moro, E., Ozhan-Kizil, G., Mongera, A., Beis, D., Wierzbicki, C., Young, R. M., Bournele, D., Domenichini, A., Valdivia, L. E., Lum, L., Chen, C., Amatruda, J. F., Tiso, N., Weidinger, G., & Argenton, F. (2012). In vivo Wnt signaling tracing through a transgenic biosensor fish reveals novel activity domains. *Developmental biology*, 366(2), 327–340.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.03.023>
5. Astone, M., Lai, J. K. H., Dupont, S., Stainier, D. Y. R., Argenton, F., & Vettori, A. (2018). Zebrafish mutants and TEAD reporters reveal essential functions for Yap and Taz in posterior cardinal vein development. *Scientific reports*, 8(1), 10189.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27657-x>
6. Stoick-Cooper, C. L., Weidinger, G., Riehle, K. J., Hubbert, C., Major, M. B., Fausto, N., & Moon, R. T. (2007). Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 134(3), 479–489. <https://doi.org/10.1242/dev.001123>
7. Hurlstone, A. F., Haramis, A. P., Wienholds, E., Begthel, H., Korving, J., Van Eeden, F., Cuppen, E., Zivkovic, D., Plasterk, R. H., & Clevers, H. (2003). The Wnt/beta-catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature*, 425(6958), 633–637.
<https://doi.org/10.1038/nature02028>
8. Park, H. W., Kim, Y. C., Yu, B., Moroishi, T., Mo, J. S., Plouffe, S. W., Meng, Z., Lin, K. C., Yu, F. X., Alexander, C. M., Wang, C. Y., & Guan, K. L. (2015). Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell*, 162(4), 780–794.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.013>

9. Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., & Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), 179–183.
<https://doi.org/10.1038/nature10137>
10. MacRae, C. A., & Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 14(10), 721–731.
<https://doi.org/10.1038/nrd4627>
11. Beliaeva, N. F., Kashirtseva, V. N., Medvedeva, N. V., Khudoklinova, I. u. I., Ipatova, O. M., & Archakov, A. I. (2010). *Biomeditsinskaiia khimiia*, 56(1), 120–131.
<https://doi.org/10.18097/pbmc20105601120>

Appendice

Astone, M., Tesoriero, C., Schiavone, M., Facchinello, N., Tiso, N., Argenton, F., & Vettori, A. (2024). Wnt/ β -Catenin Signaling Regulates Yap/Taz Activity during Embryonic Development in Zebrafish. *International journal of molecular sciences*, 25(18), 10005.

<https://doi.org/10.3390/ijms251810005>

Allegato dell'elaborato



Article

Wnt/ β -Catenin Signaling Regulates Yap/Taz Activity during Embryonic Development in Zebrafish

Matteo Astone ^{1,†} , Chiara Tesoriero ^{2,†} , Marco Schiavone ³ , Nicola Facchinello ⁴ , Natascia Tiso ¹ ,
Francesco Argenton ^{1,*} and Andrea Vettori ^{2,*}

¹ Department of Biology, University of Padua, 35131 Padua, Italy; matteo.asto@gmail.com (M.A.); natascia.tiso@unipd.it (N.T.)

² Department of Biotechnology, University of Verona, 37134 Verona, Italy; chiara.tesoriero@univr.it

³ Department of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, 25123 Brescia, Italy; marco.schiavone@unibs.it

⁴ Neuroscience Institute, Italian National Research Council (CNR), 35131 Padua, Italy; nicola.facchinello@cnr.it

* Correspondence: francesco.argenton@unipd.it (F.A.); andrea.vettori@univr.it (A.V.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Hippo-YAP/TAZ and Wnt/ β -catenin signaling pathways, by controlling proliferation, migration, cell fate, stemness, and apoptosis, are crucial regulators of development and tissue homeostasis. We employed zebrafish embryos as a model system to elucidate in living reporter organisms the crosstalk between the two signaling pathways. Co-expression analysis between the Wnt/ β -catenin *Tg(7xTCF-Xla.Siam:GFP)^{ia4}* and the Hippo-Yap/Taz *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* zebrafish reporter lines revealed shared spatiotemporal expression profiles. These patterns were particularly evident in key developmental regions such as the midbrain–hindbrain boundary (MHB), epidermis, muscles, neural tube, notochord, floorplate, and otic vesicle. To investigate the relationship between the Wnt/ β -catenin pathway and Hippo-Yap/Taz signaling in vivo, we conducted a series of experiments employing both pharmacological and genetic strategies. Modulation of the Wnt/ β -catenin pathway with IWR-1, XAV939, or BIO resulted in a significant regulation of the Yap/Taz reporter signal, highlighting a clear correlation between β -catenin and Yap/Taz activities. Furthermore, genetic perturbation of the Wnt/ β -catenin pathway, by APC inhibition or DKK1 upregulation, elicited evident and robust alteration of Yap/Taz activity. These findings revealed the intricate regulatory mechanisms underlying the crosstalk between the Wnt/ β -catenin and Hippo-Yap/Taz signaling, shedding light on their roles in orchestrating developmental processes in vivo.

Keywords: Wnt/ β -catenin; Yap/Taz; Hippo; zebrafish; crosstalk; embryonic development



Citation: Astone, M.; Tesoriero, C.; Schiavone, M.; Facchinello, N.; Tiso, N.; Argenton, F.; Vettori, A. Wnt/ β -Catenin Signaling Regulates Yap/Taz Activity during Embryonic Development in Zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 10005. <https://doi.org/10.3390/ijms251810005>

Academic Editor: M. A. Karim Rumi

Received: 31 May 2024

Revised: 11 September 2024

Accepted: 14 September 2024

Published: 17 September 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Unveiling the complex network of relationships and interactions between different signaling pathways in the complexity of a tissue, organ, or entire organism is fundamental to clarify how critical biological processes are orchestrated at the cellular and molecular level.

Hippo-YAP/TAZ and Wnt/ β -catenin signaling pathways are crucial in maintaining tissue homeostasis and organ size by regulating proliferation, migration, cell fate, stemness, and apoptosis [1,2]. Dysregulation of these pathways alters critical biological processes such as development and regeneration and is also a leading cause of tumorigenesis [1,3].

Hippo-YAP/TAZ signaling is a central regulator of tissue growth, and several upstream signals coordinate its activation, including cell density, cell-cell contact, mechanical force, growth factors, and GPCR signaling [4]. As downstream effectors of MST1/2, (the mammalian orthologs of Hippo), YAP1 (Yes Associated Protein 1), and TAZ (or WWTR1-WW Domain Containing Transcription Regulator 1) act as transcriptional regulators whose function is controlled by their phosphorylation status within the Hippo-Yap/Taz signaling cascade. When Hippo (or MST1/2 in mammals) is inactive, non-phosphorylated YAP1 and

TAZ can translocate into the nucleus to drive the transcription of a set of target genes as co-transcription factors of TEADs [5,6]. When Hippo (MST1/2) is active, the sterile 20-like kinases MST1/STK4 and MST2/STK3 phosphorylate and activate LATS1/2 kinases, which in turn phosphorylate YAP1 and TAZ, blocking their nuclear translocation [6–13].

Canonical Wnt signaling relies on the regulation of the transcriptional co-activator β -catenin by a cytoplasmic destruction complex, composed of the central scaffold protein AXIN, the adenomatous polyposis coli (APC), and the two kinases casein kinase 1 (CK1) and glycogen synthase kinase-3 (GSK3). When canonical Wnt signaling is off, CK1 and GSK3 phosphorylate β -catenin, driving it to β -TrCP-mediated ubiquitylation and consequent proteasomal degradation. Wnt ligands bind to Frizzled (Fz) transmembrane receptors and lipoprotein receptor-related protein 5 or 6 (LRP5/6). Conversely, direct binding to LRP5/6 by the secreted Dkkopf (DKK) proteins antagonizes Wnt signaling. The Wnt/Fz/LRP5/6 complex formation enables Fz-mediated interaction with the cytoplasmic protein Dishevelled (Dvl). Dvl and LRP5/6 cytoplasmic tails are phosphorylated by CK1 and GSK3, leading to the recruitment of AXIN from the destruction complex to the plasma membrane. This is the key event causing the functional inactivation of the destruction complex, β -catenin accumulation, and its relative nuclear translocation. Within the nucleus, β -catenin binds TCF/Lef transcription factors, controlling the transcription of Wnt/ β -catenin target genes [14].

Wnt signaling emerged as a potent regulator of YAP/TAZ nuclear activity. A significant fraction of Wnt target genes and Wnt-induced biological responses are YAP/TAZ-dependent [15]. Mechanistically, YAP1 and TAZ are integral components of the β -catenin destruction complex, which also serves as a cytoplasmic sink for YAP/TAZ. YAP/TAZ association to the destruction complex is mediated by AXIN. Thus, by promoting LRP5/6-mediated AXIN recruitment at the plasma membrane, Wnt signaling physically dislodges YAP/TAZ from the destruction complex. Consequently, YAP/TAZ can enter the nucleus and activate transcription [16]. Within the destruction complex, phosphorylated β -catenin bridges TAZ to its ubiquitin ligase β -TrCP, leading to TAZ degradation [17].

YAP/TAZ also act as antagonists of Wnt/ β -catenin signaling in the cytoplasm since YAP/TAZ associated with AXIN within the destruction complex are essential for β -TrCP recruitment to the complex. Therefore, YAP/TAZ are required for β -catenin degradation in the absence of Wnt signals, while depletion of YAP/TAZ can lead to the activation of β -catenin without the need for a Wnt upstream signal [16]. Moreover, TAZ was shown to inhibit the CK1-mediated phosphorylation of Dvl, thus blocking Wnt signal transduction from the plasma membrane to the destruction complex [18]. Hippo-YAP/TAZ and Wnt/ β -catenin pathways are even more transcriptionally intertwined, as YAP1 has been shown to interact with β -catenin. YAP1-TEAD and YAP1- β -catenin complexes influence and modulate each other's activity, playing roles of different relevance depending on the cell type and context. In some cases, they may even form a complex with TCF (TCF- β -catenin-YAP1-TEAD), which then translocates to the nucleus to regulate the expression of common target genes of TEAD and TCF. This intricate interplay between Hippo-YAP/TAZ and Wnt/ β -catenin pathways adds another layer of complexity to their regulatory mechanisms and underscores their importance in various biological processes [19–21]. A growing body of evidence suggests that the Wnt pathway interacts with Hippo-YAP/TAZ at the level of rhombomeres boundaries by regulating cell proliferation, cell fate, and tissue homeostasis, thus inducing a proper hindbrain segmentation [16,17,22,23]. Crosstalk between Hippo-YAP/TAZ and Wnt/ β -catenin pathways is also evident in the development of other organs, including intestine, where they regulate the cellular turnover in the intestinal crypts [24], heart, where they control cardiomyocytes proliferation and organ size [25,26], kidney, where they have a key role in epithelial tubulogenesis [27], and bones, where they regulate osteoblasts proliferation and differentiation [20].

Active cooperation between the two signaling pathways is observed not only in organ development during embryogenesis but also during disease development, such as

gastrointestinal cancers [21], breast cancer [28], kidney cancer and kidney cystic fibrosis [29], and neurodegenerative disorders [30].

Here, we undertake an *in vivo* analysis of the crosstalk between Hippo-Yap/Taz and Wnt/ β -catenin signaling pathways to observe the ability of the Wnt/ β -catenin pathway to regulate YAP/TAZ activity during development at the whole organism level. We take advantage of the zebrafish transgenic reporter line *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* reporting in a living organism Yap/Taz bona fide transcriptional activity YAP/TAZ [31].

2. Results

2.1. Wnt/ β -Catenin and Hippo-Yap/Taz Pathways Are Characterized by an Overlapping Spatial Expression during Zebrafish Development

A growing body of evidence suggests that the Wnt pathway can interact with Yap/Taz signaling. Several recent *in vitro* studies showed that Yap/Taz activity can be regulated by the Wnt/ β -catenin pathway through sequestration of Yap/Taz in different cell types [16,17,32,33]. However, to date, no data are available to demonstrate the occurrence of this interaction during embryonic development. For this reason, we evaluated whether the Wnt and Hippo-Yap/Taz pathways exhibit an overlapping spatial organization during development in zebrafish embryos. We examined, through confocal microscopy, zebrafish embryos of the *Tg(7xTCF-Xla.Siam:GFP)^{ia4}* and *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* transgenic lines, reporting *in vivo* Wnt/ β -catenin and Hippo-Yap/Taz activity, respectively. The co-expression analysis revealed shared dynamic spatiotemporal patterns. In fact, the Wnt/ β -catenin and Hippo-Yap/Taz pathways exhibit areas of overlapping spatial expression during zebrafish development, although this overlap is not uniform across all tissues. The expression profiles of both transgenes in 48 h post-fertilization (hpf) embryos clearly demonstrated the presence of partial signal colocalization in the midbrain–hindbrain boundary (MHB), muscles, neural tube, notochord, floorplate, and otic vesicle (Figure 1). We used Mander's Overlap Coefficient (MOC) to quantify the degree of colocalization between fluorophores. The coefficients in different regions consistently exceeded 0.8, with 0 indicating no overlap and values closer to 1 reflecting partial colocalization between the two reporter lines (Figure 1 and Figure S1).

2.2. Pharmacological Inhibition of the Wnt/ β -Catenin Pathway Reduces Yap/Taz Activity during Zebrafish Embryonic Development

Given the expression of Yap/Taz and Wnt signaling components in different tissues, we aimed to explore the potential synergies between these two pathways. To assess Wnt/ β -catenin-mediated regulation of Yap/Taz activity during development, we employed the Yap/Taz zebrafish reporter *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* [31] as an indicator of Yap/Taz modulation upon perturbation of the Wnt pathway through a combination of pharmacological and genetic interventions.

To test whether the modulation of Wnt/ β -catenin may interfere with the activity of Yap/Taz, we performed different experiments using chemical inhibitors able to target specific components of the Wnt pathway. Specifically, Wnt/ β -catenin inhibition was achieved using IWR-1 and XAV939, which increase AXIN levels by inhibiting tankyrases 1 and 2 (TNKS1 and TNKS2) [34]. TNKS1/2 binds directly to AXIN proteins and regulates AXIN levels through poly-ADP-ribosylation and ubiquitylation [35–38]. Under physiological conditions, AXIN represents the limiting factor in the β -catenin destruction complex [1]. Therefore, AXIN upregulation by IWR-1 or XAV939 increases β -catenin cytoplasmic retention and degradation, negatively impacting Wnt signaling.

We treated the *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* Yap/Taz zebrafish reporter line with IWR-1 and XAV939 and then assessed Yap/Taz activity by evaluating the modulation of mCherry fluorescence levels in whole embryos. In embryos exposed to IWR-1 or XAV939 for 24 h, a general and significant decrease in mCherry signal was observed, compared to age-matched control embryos treated with DMSO (Figures 2A,B and S2). This downregulation suggests that inhibition of the β -catenin destruction complex can indeed reduce Yap/Taz nuclear activity *in vivo*. To independently validate the results

obtained with the *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* Yap/Taz reporter line, we also assessed by qPCR analysis the expression levels of two Yap/Taz responsive genes (*ccn2a* and *ccn2b*) in embryos treated with XAV939. Consistently, we found that the inhibition of Wnt/ β -catenin effectively downregulates the expression of *ccn2a* and *ccn2b*, as a consequence of reduced Yap/Taz activity (Figure 2C).

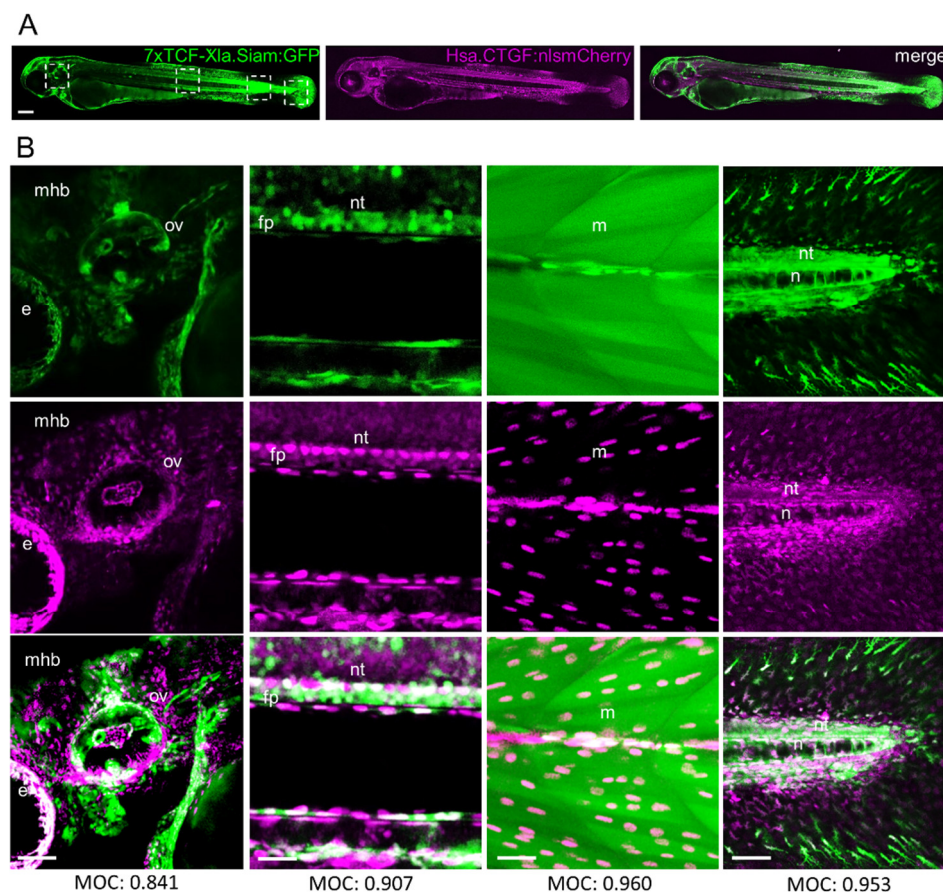


Figure 1. (A,B) Transgene co-expression pattern of *Tg(7xTCF-Xla.Siam:GFP)^{ia4}* and *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* reporter lines in 48 hpf embryos. (A). Representative *Tg(7xTCF-Xla.Siam:GFP)^{ia4}*, *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}*, and merged images showing Wnt (green) and Yap/Taz (magenta) responsive areas. Regions selected by white dashed squares have been zoomed in (B). (B) Magnification of head, trunk, muscles and caudal region views of the maximal projection from three stacks. Abbreviation: mhb (midbrain–hindbrain boundary), ov (otic vesicle), nt (neural tube), n (notochord), fp (floorplate), m (muscle), e (eye). Mander's overlap coefficient (MOC), Scale bar in (A) = 200 μ m; Scale bar in (B) = 25 μ m.

2.3. Genetic Inhibition of the Wnt/ β -Catenin Pathway Reduces Yap/Taz Activity during Zebrafish Embryonic Development

To validate the existence of potential interactions between the Wnt/ β -catenin and Hippo-Yap/Taz signaling pathways, we also employed a genetic approach to inhibit Wnt/ β -catenin signaling. We utilized the transgenic zebrafish line *Tg(hsp70:dkk1-GFP)^{w32}* [39], which is a valuable tool for modulating Wnt/ β -catenin activity in zebrafish larvae. This transgenic line expresses Dkk1, an antagonist of the Wnt pathway, fused with Green Fluorescent Protein (GFP), under the control of a heat shock-inducible promoter (*hsp70*). Heat shock induction triggers the expression of Dkk1-GFP, effectively inhibiting Wnt/ β -catenin signaling in a temporally controlled manner. This genetic manipulation allowed us to investigate the consequences of Wnt/ β -catenin pathway inhibition on downstream signaling events and its potential influence on Yap/Taz activity.

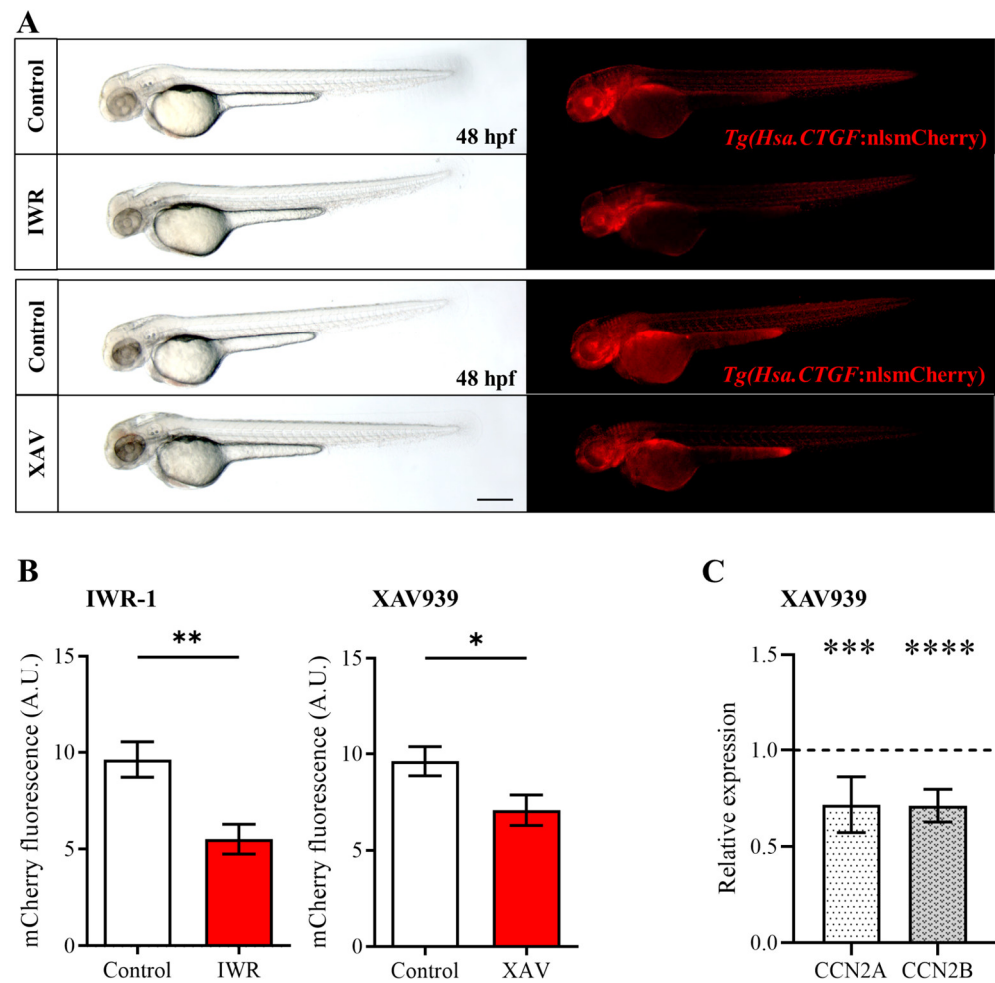


Figure 2. IWR-1 and XAV939-mediated β -catenin pathway inhibition reduces $Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)^{ia49}$ reporter signal. **(A,B)** $Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)^{ia49}$ embryos were exposed to IWR-1 or XAV939 for 24 h, and the fluorescent reporter expression was documented **(A)** and quantified at the level of the whole embryo **(B)** at 48 hpf. mCherry fluorescence levels **(B)** were analyzed by measuring the integrated density with FIJI software Control IWR (n = 27), IWR treated embryos (n = 28); Control XAV (n = 31), XAV treated embryos (n = 34). **(C)** Relative expression of *ccn2a* and *ccn2b* genes in zebrafish embryos after treatment with XAV939 from 24 to 48 hpf. mRNA levels were normalized to the DMSO-treated controls (dashed line). Scale bar 250 μ m Data are presented as mean $\pm$ SEM (Mann–Whitney test **(B)**, Student *t*-test **(C)**; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

With this purpose, we outcrossed the $Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)^{ia49}$ reporter fish with the $Tg(hsp70:dkk1-GFP)^{w32}$ line and subjected the offspring to three rounds of heat shock treatment from 12 to 72 hpf. After the ubiquitous induction of Dkk1, we observed a significant reduction in mCherry fluorescence (Figure 3A,B), albeit somewhat less pronounced compared to the results obtained from the pharmacological inhibition experiments. We therefore decided to examine changes in mCherry also at the mRNA level in $Tg(hsp70:dkk1-GFP)^{w32} / Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)^{ia49}$ embryos. This approach allowed us to better appreciate subtle variations of Yap/Taz activity after heat shock treatment because the mRNA turnover is generally faster and thus more responsive compared to the corresponding protein modulation. The whole mount in situ hybridization conducted to detect the mCherry transcripts revealed a pronounced and general reduction in the mCherry mRNA levels in embryos overexpressing Dkk1 compared to the control siblings (Figure 3C–E).

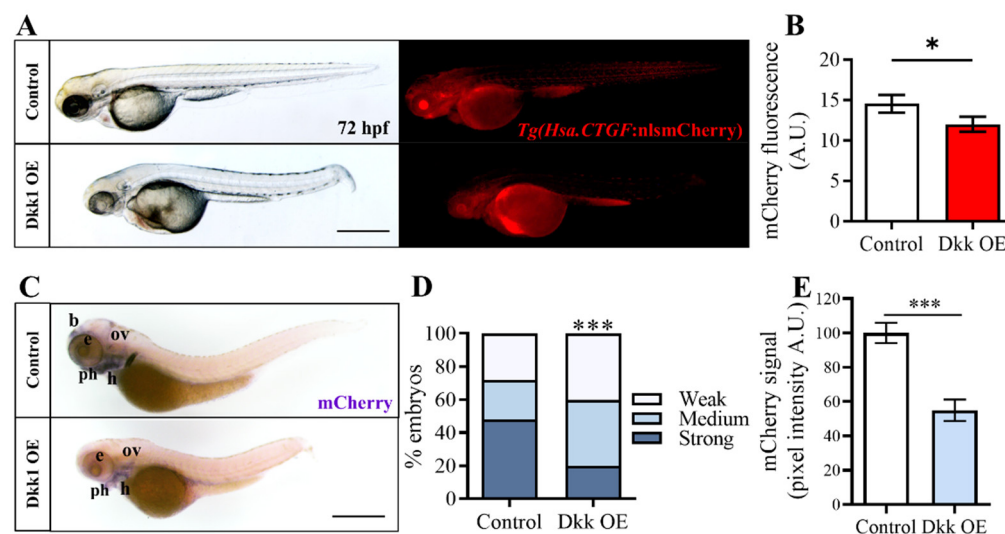


Figure 3. Wnt/ β -catenin pathway inhibition through Dkk1 overexpression reduces *Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)^{ia49}* transgene expression. (A) *Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)^{ia49}* fish were out-crossed with the *Tg(hsp70:dkk1-GFP)^{w32}* line, and the offspring was heat shocked to induce the overexpression of the Wnt antagonist Dkk1 (Dkk1 OE). Representative images of a double transgenic embryo (Dkk1 OE) at 72 hpf after Dkk1 overexpression compared to WT control siblings (control). (B) mCherry quantification on the entire embryo showed only a modest but significant decrease of fluorescence intensity in *Tg(hsp70:dkk1-GFP)^{w32}* larvae after Dkk1 activation; Control (n = 84), Dkk OE (n = 87). (C) In-situ hybridization performed with an antisense probe against mCherry transcript revealed a significant reduction of mCherry mRNA levels after Dkk1 overexpression, compared to the control siblings. The decrease in mCherry mRNA levels is evident in the brain (b), eyes (e), otic vesicle (ov), heart (h), and pharyngeal arches (ph). (D,E) The variation in the in situ hybridization signal intensity was quantified using two independent systems. In (D), the analysis was performed by manually categorizing the embryos of the control and experimental samples (Dkk1 OE) into distinct groups based on the observed signal strength (strong, medium, and weak) at the whole embryo level. In (E), the mCherry signals in each sample (head region) were quantified using the Volocity 6.0 software. Control (n = 321), Dkk OE (n = 288). Scale bar 500 μ m. In (B,E), data are presented as mean $\pm$ SEM (Mann–Whitney test); * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

In addition to our findings with the pharmacological inhibition approach, these data reinforce the notion that inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway—whether at the level of the β -catenin destruction complex (using IWR-1 and XAV939) or at the level of Wnt/receptor interaction (using DKK1)—results in a decrease in Yap/Taz activity in vivo. This convergence of evidence strengthens our understanding of the intricate interplay between Wnt/ β -catenin and Hippo-Yap/Taz signaling pathways in developmental processes and tissue homeostasis [5,40].

2.4. Pharmacological Inhibition of β -Catenin Kinase GSK3 during Zebrafish Embryonic Development Increases Yap/Taz Activity

Building upon the findings of the Wnt-inhibiting experiments, we investigated whether the Wnt/ β -catenin signaling pathway could also positively regulate Yap/Taz activity. For this purpose, we tested on *Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)^{ia49}* embryos the chemical agonist of the Wnt pathway, 6-Bromindirubin-3'-oxime (BIO), which inhibits the activity of GSK3, the kinase that promotes the β -catenin phosphorylation and its consequent degradation. *Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)^{ia49}* Yap/Taz reporter embryos were treated with BIO from 24 to 48 hpf, and the mCherry expression levels were measured and compared with the transgene expression of the untreated control offsprings. Unfortunately, it was impossible to observe the effect of the Wnt agonist on mCherry expression levels of *Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)^{ia49}* embryos, as the BIO compound itself emits red fluorescence.

To overcome this problem, we employed in situ hybridization, which allowed us to analyze the transgene expression in *Tg(Hsa.CTGF:nlsmCherry)^{ia49}* embryos using an antisense probe targeting the mCherry transcript. Interestingly, our experiments revealed a significant increase in mCherry mRNA levels in embryos treated with the drug compared to DMSO-treated controls (Figure 4A–C). This finding suggests that β -catenin phosphorylation negatively influences Yap/Taz transcriptional activity in vivo during development, supporting the idea of the existence of a direct interplay between Wnt/ β -catenin and Hippo-Yap/Taz signaling pathways.

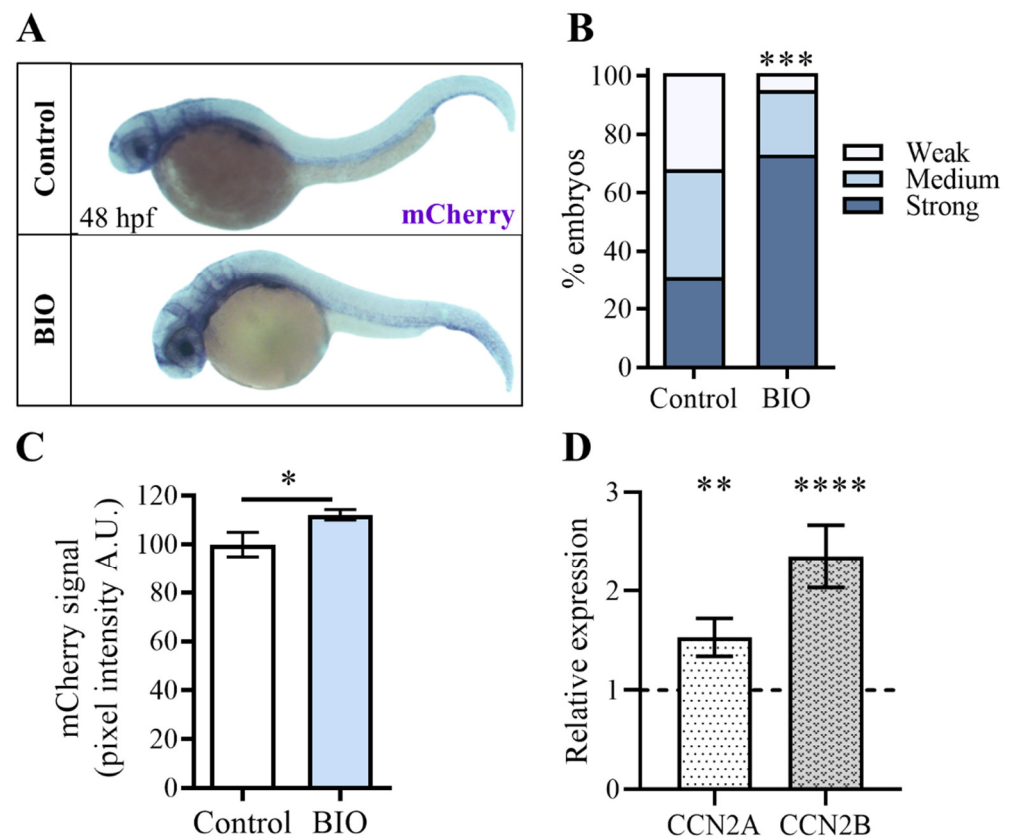


Figure 4. Pharmacological inhibition of β -catenin kinase GSK3 increases *Tg(Hsa.CTGF:nlsmCherry)^{ia49}* reporter signal. (A) *Tg(Hsa.CTGF:nlsmCherry)^{ia49}* embryos were exposed to BIO from 24 to 48 hpf, and after fixation, the mCherry transgene expression was assessed by in situ hybridization. (B,C) The embryos treated with BIO showed higher levels of mRNA mCherry transgene expression compared to their untreated control siblings. In the in situ hybridization experiments, the signal intensity variation was assessed using two different methods. In (B), the analysis was performed by grouping the embryos into three distinct classes based on the observed signal strength at the whole embryo level. In (C), the mCherry signals were quantified by measuring the pixel intensity in the head region, using Volocity 6.0 software. Control (n = 52), BIO (n = 51). (D) In 48 hpf zebrafish embryos, the expression of *ccn2a* and *ccn2b* genes was strongly up-regulated after treatment with BIO for 24 h. mRNA levels were normalized to the DMSO-treated controls (dashed line). Scale bar: 250 μ m. In (C,D), data are presented as mean $\pm$ SEM (Mann–Whitney test in (C) and Student *t*-test in (D); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Wnt-mediated up-regulation of Yap/Taz activity observed in the *Tg(Hsa.CTGF:nlsmCherry)^{ia49}* reporter line was validated by qPCR analysis of *ccn2a* and *ccn2b* expression levels in embryos treated with BIO. Remarkably, results from this independent experiment corroborated our previous findings, as we observed a significant increase in the expression of *ccn2a* and *ccn2b* upon activation of Wnt/ β -catenin signaling, indicative of a Yap/Taz activity upregulation (Figure 4D).

2.5. Activation of the Wnt/ β -Catenin Pathway through Apc Depletion Increases Yap/Taz Activity during Zebrafish Development

To independently confirm the interaction between the Wnt/ β -catenin and Hippo-Yap/Taz signaling pathways, we decided to use an alternative strategy, exploiting the genetic repression of the destruction complex induced by the depletion of the APC gene. For this analysis, we crossed the *Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)^{ia49}* transgenic strain with the *apc^{hu745}* zebrafish mutant line, which harbors a loss of function mutation in the *apc* gene [41]. The loss of the Apc protein causes the destabilization of the β -catenin destruction complex, with the subsequent release of its components (including β -catenin), which in turn promotes the Wnt activation.

Ap^{hu745} homozygous mutants display an altered phenotype during early development, characterized by the absence of pharyngeal arches at 72 hpf, as demonstrated by alcian blue staining in Figure 5A. Typically, the *Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)^{ia49}* embryos present a robust transgene expression in the pharyngeal arches under physiological conditions. However, in the *apc^{hu745}* mutant background, the mCherry signal is absent due to the lack of these anatomical structures, as shown in Figure 5B.

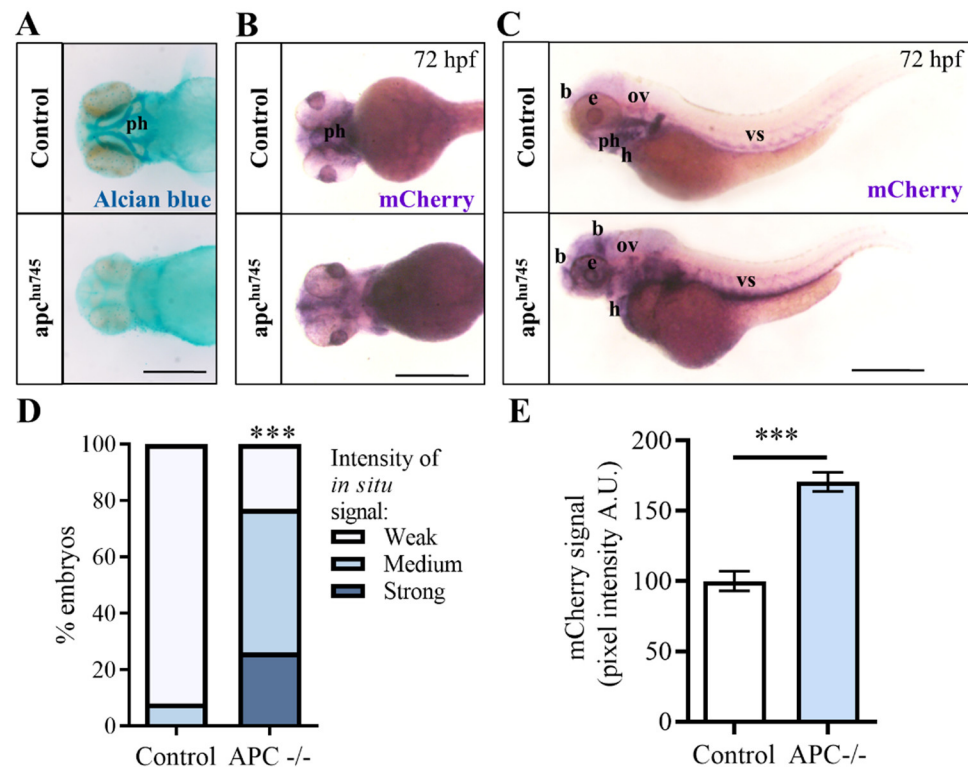


Figure 5. *Tg(Hsa.CTGF:nlsMCherry)^{ia49}* reporter activity is increased in *apc* mutant background at 72 hpf. (A) *apc^{hu745}* mutants fail to develop the cartilage structure, as evidenced by the alcian blue staining. (B) The reporter signal, labeling the pharyngeal arches (ph), disappears in *apc^{hu745}* mutant background due to the lack of these structures, as shown by the in situ hybridization against mCherry mRNA as well. (C) In situ hybridization for mCherry displaying the general upregulation of Yap/Taz reporter activity in *apc^{hu745}* mutant background. The increase in mCherry mRNA levels is evident in the brain (b), eyes (e), otic vesicle (ov), heart (h), and vascular system (vs) along the yolk extension. (D,E) Quantification of the in-situ hybridization experiments was performed (D) by grouping the embryos into three distinct classes according to the observed signal strength at the whole-embryo level, or (E) by measuring the pixel intensity in the head region of each sample using Volocity 6.0 software. Control (n = 48), APC^{-/-} (n = 39). In (E), data are presented as mean +/− SEM (Mann–Whitney test). Scale bar: 500 μ m; *** *p* < 0.001.

For this reason, our analysis was redirected toward other anatomical districts in which the reporter is typically active. Through in situ hybridization, we observed a strong up-regulation of the mCherry transgene expression in the midbrain–hindbrain boundary, eyes, otic vesicle, heart and vascular system in *Tg(Hsa.CTGF:nls-mCherry)^{ia49} apc^{hu745}* embryos, as a consequence of the β -catenin stabilization (Figure 5C–E). In summary, these results confirmed once again in vivo that during development Yap/Taz activity is positively regulated by the activation of Wnt signaling pathway mediated by the β -catenin. This consistency across experiments underscores the robustness of the observed relationship between Wnt/ β -catenin and Hippo-Yap/Taz signaling pathways, highlighting their interconnected roles during developmental processes.

3. Discussion

The Hippo-Yap/Taz pathway is considered an integrator of information from environmental and cell-type-specific signals, local extracellular matrix (ECM) components, and mechanical forces. These factors modulate the subcellular localization of Yap/Taz and alter cell behavior, but the regulation mechanisms of Yap/Taz nucleocytoplasmic shuttling and their implications for cellular homeostasis are still under investigation [42–45]. In this context, our findings provide in vivo evidence that supports a model where Wnt/ β -catenin signaling can indeed modulate YAP/TAZ cellular localization, offering insights into how these pathways can co-regulate important developmental processes in zebrafish embryos.

Interestingly, two previous studies that have evaluated the direct relationship between Wnt and Hippo-YAP/TAZ signaling pathways reported contrasting outcomes. Park and collaborators provided evidence supporting the role of non-canonical Wnt signaling in regulating YAP/TAZ activity. Through a series of in vitro experiments, the authors demonstrated that non-canonical Wnt ligands activate YAP/TAZ through pathways independent of β -catenin. This model suggests that the non-canonical Wnt pathway can activate Rho GTPases, which in turn influence the phosphorylation state of YAP/TAZ, consequently affecting their nuclear localization and transcriptional activity [32].

These findings contrast with a previously proposed model, in which the canonical Wnt signaling directly affects TAZ and YAP activity through the β -catenin destruction complex. In their work, Azzolin and colleagues elegantly demonstrated that components of the destruction complex sequestered upon Wnt activation can prevent the phosphorylation and subsequent degradation of YAP/TAZ. This model places YAP and TAZ as integral components within the canonical Wnt signaling cascade, directly linking Wnt activation to YAP/TAZ-mediated transcriptional activity [16,17].

Interestingly, our in vivo analysis supports the model proposed by Azzolin, as we observed significant alterations in YAP/TAZ activity upon modulation of the canonical Wnt pathway in zebrafish embryos. Our study used the *Tg(Hsa.CTGF:nls-mCherry)^{ia49}* zebrafish transgenic reporter as a readout of Yap/Taz activation in vivo during development.

Even though the well-documented genetic redundancy in zebrafish could theoretically impact the interpretation of pathway-specific signaling activities, the use of specific signaling pathway transgenic reporter lines in our study provided significant advantages over other in vitro approaches. The *Tg(Hsa.CTGF:nls-mCherry)^{ia49}* line is designed to specifically report the nuclear transcriptional activity of Yap and Taz, the final transducers of the Hippo/Yap/Taz pathway. This design minimizes potential interference from upstream signal redundancies, ensuring that the observed mCherry signals accurately reflect Yap/Taz activity [31]. Similarly, the Wnt/ β -catenin reporter line *Tg(7xTCF-Xla.Siam:GFP)^{ia4}* utilizes well-characterized β -catenin responsive elements, making it a robust and reliable tool for monitoring Wnt pathway activity in vivo.

Through genetic and pharmacological modulation of the β -catenin destruction complex activity, we observed Yap/Taz reporter signal variations, mirroring changes in β -catenin activity. Increased stability of the destruction complex, induced by IWR-1, XAV939, or Dkk overexpression, led to inhibition of Yap/Taz transcriptional activity. As Yap1 and Taz are integral components of the β -catenin destruction complex, any factor that enhances

the stability of this structure increases the concomitant sequestration of both β -catenin and Yap/Taz in the cytoplasm and counteracts the nuclear translocation of these transcriptional regulators. Conversely, we observed that destabilization of the destruction complex increased *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* reporter signal, reflecting the enhanced Yap/Taz transcriptional activity.

Under physiological conditions, the Apc protein is part of a destruction complex that helps to regulate the levels of β -catenin by promoting its degradation. However, this destruction complex becomes destabilized when the Apc protein is mutated, as in the *apc^{hu745}* knockout embryos. As a result, β -catenin is no longer targeted for degradation and is instead released into the cytoplasm, promoting the activation of the Wnt signaling pathway. Therefore, the transgene up-regulation observed in *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}/apc^{hu745}* embryos supports the notion that Yap1 and Taz are integral components of the β -catenin destruction complex, and alterations of the complex stability impact the nuclear translocation and transcriptional activity of these regulators of the Hippo pathway. Furthermore, the *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* Yap/Taz reporter system was also fundamental to investigating the role of β -catenin phosphorylation in driving TAZ degradation during embryonic development. By blocking β -catenin phosphorylation with BIO, we observed an enhanced nuclear translocation of β -catenin, consistent with its escape from the destruction complex. In line with previous research demonstrating that phosphorylated β -catenin facilitates TAZ ubiquitination and degradation (17), our findings in the *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* reporter line clearly showed that treatment with BIO promoted the release of TAZ from the complex, enhancing Yap/Taz activity. These results validate the Wnt/ β -catenin-mediated regulation of Yap/Taz nuclear activity observed in vitro by Azzolin and colleagues [16], now demonstrated in a living vertebrate model.

Additionally, it is worth noting that the partial overlap observed in certain regions may indicate complex regulatory interactions between these pathways, potentially in a tissue-specific manner. This complexity aligns with findings from other studies, which suggest dynamic and context-dependent crosstalk between these signaling pathways.

The insights gained from our study regarding the Wnt/ β -catenin pathway have broader implications, indicating the feasibility of analyzing the interactions between Yap/Taz and other signaling pathways implicated in vertebrate development and cancer. Taking advantage of living biosensor fish, such as the *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* Yap/Taz reporter line along with the various zebrafish models of human diseases, the presence of putative crosstalk can be investigated in vivo also in specific pathological contexts. This approach offers valuable insights into the pathophysiology of various disorders, including cancer. In conclusion, our study unveils an intricate and sophisticated interplay between the Wnt/ β -catenin and Hippo-Yap/Taz signaling pathways, shedding light on their roles in embryonic development and disease. Collectively, our findings contribute to a deeper understanding of the molecular mechanisms governing tissue homeostasis and organ development, paving the way for further investigations into the intricate regulatory mechanisms of cellular signaling networks and their implications for human health and disease.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

All live animal procedures were approved by the institutional ethics committee for animal testing of the University of Padua as well as in accordance with the relevant guidelines and regulations of Italy and European Union. To inhibit pigment formation, embryos and larvae were incubated in 0.003% 1-phenyl-2-thiourea (PTU). The following fish lines were used and outcrossed with the *Tg(Hsa.CTGF:nlsCherry)^{ia49}* Yap/Taz reporter line: *Tg(7xTCF-Xla.Siam:GFP)^{ia4}* Wnt/ β -catenin reporter [46], *Tg(hsp70:dkk1-GFP)^{w32}* heat shock inducible Dkk overexpressing line [39], *apc^{hu745}* mutant line [41]. The *apc^{hu745}* mutant carriers were genotyped by PCR amplification followed by sequencing. The genotyping primer pair was 5'-CTACCCAACCTTTACCTATATCAG-3' and 5'-GACTCTCAAACTGTCAAGGG-3'. The PCR product was sequenced using the forward primer, and the sequence obtained was analyzed at

position 33 downstream of the sequencing primer. Homozygous *apc*^{hu745} mutant embryos were identified and selected through their phenotype using a dissecting microscope.

4.2. Chemical Treatments

The following chemical compounds were used: IWR-1 (I0161, Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, USA), XAV939 (X3004, Sigma-Aldrich, S. Louis, USA), 6-Bromindirubin-3'-oxime (BIO) (B1686, Sigma-Aldrich, S. Louis, USA). The embryos were dechorionated and exposed to the drugs from 24 to 48 hpf in fish water with PTU.

Different concentrations of Wnt inhibitors were tested on Yap/Taz *Tg(Hsa.CTGF:nlsmCherry)*^{ia49} (Figure S2) and Wnt *Tg(7xTCF-Xla.Siam:GFP)*^{ia4} embryos (Figure S3).

Specifically, a preliminary test on a subset of embryos using different concentrations of the Wnt inhibitors IWR-1 (5, 10, and 15 μ M) and XAV939 (2.5, 5, and 7.5 μ M) (Figures S2C and S3C) was conducted. After 24 h of treatment, Yap/Taz and Wnt pathway activities were assessed by measuring the changes in fluorescence levels in transgenic embryos (Figures S2A,B and S3A,B). Based on the inhibitors' efficacy and the absence of significant toxicity, the concentrations of 10 μ M for IWR-1 and 5 μ M for XAV939 were selected for subsequent experiments in a larger sample of embryos (Figure 2A–C). A concentration of 5 μ M was used for BIO, and the corresponding volume of DMSO, in which all three chemicals were solubilized, was applied in all control treatments.

4.3. Fluorescence Image Acquisition and Analysis

The fluorescence was visualized using the conventional fluorescence dissecting microscope Leica (Wetzlar, Germany) M165FC with a 488 nm (for GFP) and 561 nm (for mCherry) filter, equipped with a DFC7000T digital camera (Leica, Wetzlar, Germany).

Fluorescence quantification of the acquired images was performed using Fiji software (2.9.0 version) by measuring the fluorescent signal in the whole embryo as integrated density, as described elsewhere [47]. To perform subcellular colocalization analysis, we used a plugin under ImageJ named JACoP [48].

4.4. Whole-Mount In Situ Hybridization (WISH) and Quantification

Whole-mount in situ hybridization was performed on embryos pre-fixed in 4% PFA in PBS overnight at 4 °C and stored in pure methanol at –20 °C as previously described [49]. mCherry probe was synthesized from the pME-nlsmCherry supplied by the Tol2 kit (Invitrogen), which was linearized and transcribed with the T7 RNA polymerase using DIG-labeled ribonucleotides.

The intensity of the in situ hybridization signal was quantified using two different methods. The first was carried out by categorizing the embryos into distinct groups based on the strength of the signal observed under the dissecting microscope. These groups were defined as exhibiting strong, medium, or weak signal intensity, allowing for a systematic assessment of the variation in signal strength between the control and experimental groups. The embryos in each subgroup were counted, and the data were plotted in a histogram. For each type of experiment, an additional quantification of mCherry signals was performed as follows: WISH acquisitions were converted to grayscale profiles and inverted to negative images. The WISH-related bright signals were quantified using the Measurement tool of the Volocity 6.0 software (Perkin Elmer, Milan, Italy) on 100 μ m $\times$ 100 μ m regions of interest (ROIs). Signal values were normalized to the control average value (set as 100 arbitrary units). Comparisons between control and treated populations were made using a Mann–Whitney test.

4.5. Alcian Blue Staining

For cartilage staining, larvae were fixed overnight in 4% PFA in PBS at 4 °C, washed in PBS, and stained overnight at room temperature in Alcian blue solution (70% EtOH, 1% HCl, and 0.1% Alcian blue). Larvae were then cleared in 3% hydrogen peroxide and 1% KOH, rinsed in 70% EtOH, and whole mounted in 85% glycerol.

4.6. Heat-Shock Treatments

Dkk overexpression in Yap/Taz reporter embryos was obtained by outcrossing the *Tg(Hsa.CTGF:nlsmCherry)^{ia49}* reporter line to the *Tg(hsp70:dkk1-GFP)^{w32}* heat shock inducible Dkk overexpressing line. The offspring was heat-shocked every 12 h, from 12 to 72 hpf, by replacing the fish water with water preheated to 40 °C and incubating the embryos in an air incubator at 37 °C for 1 h. The embryos were then sorted by GFP fluorescence, and GFP-negative siblings were used as controls.

4.7. Statistical Analyses

Data are presented as mean $\pm$ SEM. The distribution of the data was assessed using Shapiro–Wilk. Statistical comparisons between groups were performed using a two-tailed Student's *t*-test or the non-parametric Mann–Whitney test for the quantification of the fluorescence intensity and contingency analysis for the quantification of the in situ hybridization signal. Statistical analyses were carried out with Prism 10 software version 10.3.1 (GraphPad).

All data were derived at least from three independent experiments, and the exact sample size (n) is reported in the figure legends.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms251810005/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.A., F.A., A.V. and N.T.; investigation, M.A., A.V., C.T., M.S. and N.F.; data curation, M.A., C.T. and A.V.; writing—original draft preparation, M.A., C.T., A.V., M.S., N.T. and F.A.; writing—review and editing, F.A., A.V., C.T. and N.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research leading to these results has received funding from the European Union—NextGenerationEU through the Italian Ministry of University and Research under PNRR—M4C2-I1.3 Project PE_00000019 “HEAL ITALIA” to Andrea Vettori, CUP (B33C22001030006). The views and opinions expressed are those of the authors only and do not necessarily reflect those of the European Union or the European Commission. Neither the European Union nor the European Commission can be held responsible for them.

Institutional Review Board Statement: All animal experiments were performed in accordance with the European and Italian Legislation (Directive 2010/63/EU). The animal study protocol was examined and approved by the Ethics Committee of the University of Padua and the Italian Ministry of Health (Authorization number 407/2015-PR).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the article and in the Supplementary Materials.

Acknowledgments: The authors thank the Zebrafish Facilities of the University of Padova and Verona. They are deeply in debt to all Argenton/Tiso/Vettori laboratory members.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- MacDonald, B.T.; Tamai, K.; He, X. Wnt/beta-catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* **2009**, *17*, 9–26. [PubMed]
- Pan, D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* **2010**, *19*, 491–505. [PubMed]
- Mo, J.S.; Park, H.W.; Guan, K.L. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep.* **2014**, *15*, 642–656. [PubMed]
- Santion, G.; Pocaterra, A.; Dupont, S. Control of YAP/TAZ Activity by Metabolic and Nutrient-Sensing Pathways. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 289–299. [PubMed]
- Piccolo, S.; Dupont, S.; Cordenonsi, M. The biology of YAP/TAZ: Hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 1287–1312. [PubMed]
- Moroishi, T.; Park, H.W.; Qin, B.; Chen, Q.; Meng, Z.; Plouffe, S.W.; Taniguchi, K.; Yu, F.X.; Karin, M.; Pan, D.; et al. A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes Dev.* **2015**, *29*, 1271–1284.

7. Chan, E.H.; Nousiainen, M.; Chalamalasetty, R.B.; Schafer, A.; Nigg, E.A.; Sillje, H.H. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* **2005**, *24*, 2076–2086.
8. Dong, J.; Feldmann, G.; Huang, J.; Wu, S.; Zhang, N.; Comerford, S.A.; Gayyed, M.F.; Anders, R.A.; Maitra, A.; Pan, D. Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell* **2007**, *130*, 1120–1133.
9. Dupont, S.; Morsut, L.; Aragona, M.; Enzo, E.; Giulitti, S.; Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Le Digabel, J.; Forcato, M.; Bicciato, S.; et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **2011**, *474*, 179–183.
10. Lei, Q.Y.; Zhang, H.; Zhao, B.; Zha, Z.Y.; Bai, F.; Pei, X.H.; Zhao, S.; Xiong, Y.; Guan, K.L. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol. Cell Biol.* **2008**, *28*, 2426–2436.
11. Praskova, M.; Xia, F.; Avruch, J. MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 311–321. [PubMed]
12. Yu, F.X.; Guan, K.L. The Hippo pathway: Regulators and regulations. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 355–371. [PubMed]
13. Zhao, B.; Wei, X.; Li, W.; Udan, R.S.; Yang, Q.; Kim, J.; Xie, J.; Ikenoue, T.; Yu, J.; Li, L.; et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 2747–2761. [PubMed]
14. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **2006**, *127*, 469–480. [PubMed]
15. Karsavage, W.M., Jr.; Yochum, G.S. Intersection of Hippo/YAP and Wnt/beta-catenin signaling pathways. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2013**, *45*, 71–79.
16. Azzolin, L.; Panciera, T.; Soligo, S.; Enzo, E.; Bicciato, S.; Dupont, S.; Bresolin, S.; Frasson, C.; Basso, G.; Guzzardo, V.; et al. YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **2014**, *158*, 157–170.
17. Azzolin, L.; Zanconato, F.; Bresolin, S.; Forcato, M.; Basso, G.; Bicciato, S.; Cordenonsi, M.; Piccolo, S. Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell* **2012**, *151*, 1443–1456.
18. Varelas, X.; Miller, B.W.; Sopko, R.; Song, S.; Gregorieff, A.; Fellouse, F.A.; Sakuma, R.; Pawson, T.; Hunziker, W.; McNeill, H.; et al. The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Dev. Cell* **2010**, *18*, 579–591.
19. Imajo, M.; Miyatake, K.; Iimura, A.; Miyamoto, A.; Nishida, E. A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/beta-catenin signalling. *EMBO J.* **2012**, *31*, 1109–1122.
20. Jiang, L.; Li, J.; Zhang, C.; Shang, Y.; Lin, J. YAP-mediated crosstalk between the Wnt and Hippo signaling pathways (Review). *Mol. Med. Rep.* **2020**, *22*, 4101–4106.
21. Li, N.; Lu, N.; Xie, C. The Hippo and Wnt signalling pathways: Crosstalk during neoplastic progression in gastrointestinal tissue. *FEBS J.* **2019**, *286*, 3745–3756. [PubMed]
22. Cayuso, J.; Xu, Q.; Addison, M.; Wilkinson, D.G. Actomyosin regulation by Eph receptor signaling couples boundary cell formation to border sharpness. *Elife* **2019**, *8*, e49696.
23. Voltes, A.; Hevia, C.F.; Engel-Pizcueta, C.; Dingare, C.; Calzolari, S.; Terriente, J.; Norden, C.; Lecaudey, V.; Pujades, C. Yap/Taz-TEAD activity links mechanical cues to progenitor cell behavior during zebrafish hindbrain segmentation. *Development* **2019**, *146*, dev176735. [PubMed]
24. Ward, D.; Montes Olivas, S.; Fletcher, A.; Homer, M.; Marucci, L. Cross-talk between Hippo and Wnt signalling pathways in intestinal crypts: Insights from an agent-based model. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *18*, 230–240.
25. Chen, X.; Yuan, W.; Li, Y.; Luo, J.; Hou, N. Role of Hippo-YAP1/TAZ pathway and its crosstalk in cardiac biology. *Int. J. Biol. Sci.* **2020**, *16*, 2454–2463.
26. Heallen, T.; Morikawa, Y.; Leach, J.; Tao, G.; Willerson, J.T.; Johnson, R.L.; Martin, J.F. Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development* **2013**, *140*, 4683–4690. [PubMed]
27. Bernascone, I.; Martin-Belmonte, F. Crossroads of Wnt and Hippo in epithelial tissues. *Trends Cell Biol.* **2013**, *23*, 380–389.
28. Doloi, R.; Gupta, S.M. MicroRNAs: The key players regulating the crosstalk between Hippo and Wnt/beta-catenin pathways in breast cancer. *Life Sci.* **2023**, *329*, 121980.
29. Sun, Y.; Jin, D.; Zhang, Z.; Jin, D.; Xue, J.; Duan, L.; Zhang, Y.; Kang, X.; Lian, F. The critical role of the Hippo signaling pathway in kidney diseases. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 988175.
30. Sileo, P.; Simonin, C.; Melnyk, P.; Chartier-Harlin, M.C.; Cotellet, P. Crosstalk between the Hippo Pathway and the Wnt Pathway in Huntington’s Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Cells* **2022**, *11*, 3631. [CrossRef]
31. Astone, M.; Lai, J.K.H.; Dupont, S.; Stainier, D.Y.R.; Argenton, F.; Vettori, A. Zebrafish mutants and TEAD reporters reveal essential functions for Yap and Taz in posterior cardinal vein development. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10189.
32. Park, H.W.; Kim, Y.C.; Yu, B.; Moroishi, T.; Mo, J.S.; Plouffe, S.W.; Meng, Z.; Lin, K.C.; Yu, F.X.; Alexander, C.M.; et al. Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell* **2015**, *162*, 780–794. [PubMed]
33. Dicipulo, R.; Selland, L.G.; Carpenter, R.G.A.J.W. Functional Role for Taz during Hindbrain Ventricle Morphogenesis. Available online: <https://ssrn.com/abstract=4039852> (accessed on 23 March 2022).
34. Bao, R.; Christova, T.; Song, S.; Angers, S.; Yan, X.; Attisano, L. Inhibition of tankyrases induces Axin stabilization and blocks Wnt signalling in breast cancer cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48670.
35. Chen, B.; Dodge, M.E.; Tang, W.; Lu, J.; Ma, Z.; Fan, C.W.; Wei, S.; Hao, W.; Kilgore, J.; Williams, N.S.; et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 100–107. [PubMed]
36. Fearon, E.R. PARsing the phrase “all in for Axin”- Wnt pathway targets in cancer. *Cancer Cell* **2009**, *16*, 366–368. [PubMed]
37. Hsiao, S.J.; Smith, S. Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie* **2008**, *90*, 83–92. [PubMed]

38. Huang, S.M.; Mishina, Y.M.; Liu, S.; Cheung, A.; Stegmeier, F.; Michaud, G.A.; Charlat, O.; Wietzel, E.; Zhang, Y.; Wiessner, S.; et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* **2009**, *461*, 614–620.
39. Stoick-Cooper, C.L.; Weidinger, G.; Riehle, K.J.; Hubbert, C.; Major, M.B.; Fausto, N.; Moon, R.T. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* **2007**, *134*, 479–489.
40. Halder, G.; Dupont, S.; Piccolo, S. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 591–600.
41. Hurlstone, A.F.; Haramis, A.P.; Wienholds, E.; Begthel, H.; Korving, J.; Van Eeden, F.; Cuppen, E.; Zivkovic, D.; Plasterk, R.H.; Clevers, H. The Wnt/beta-catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature* **2003**, *425*, 633–637.
42. Panciera, T.; Azzolin, L.; Cordenonsi, M.; Piccolo, S. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 758–770. [[PubMed](#)]
43. Totaro, A.; Panciera, T.; Piccolo, S. YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *20*, 888–899. [[PubMed](#)]
44. Van Soldt, B.J.; Cardoso, W.V. Hippo-Yap/Taz signaling: Complex network interactions and impact in epithelial cell behavior. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2020**, *9*, e371.
45. Vogel, V. Mechanotransduction involving multimodular proteins: Converting force into biochemical signals. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 459–488. [[PubMed](#)]
46. Moro, E.; Ozhan-Kizil, G.; Mongera, A.; Beis, D.; Wierzbicki, C.; Young, R.M.; Bournele, D.; Domenichini, A.; Valdivia, L.E.; Lum, L.; et al. In vivo Wnt signaling tracing through a transgenic biosensor fish reveals novel activity domains. *Dev. Biol.* **2012**, *366*, 327–340. [[PubMed](#)]
47. Facchinello, N.; Schiavone, M.; Vettori, A.; Argenton, F.; Tiso, N. Monitoring Wnt Signaling in Zebrafish Using Fluorescent Biosensors. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1481*, 81–94.
48. Bolte, S.; Cordelières, F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **2006**, *224*, 213–232.
49. Thisse, C.; Thisse, B.; Schilling, T.F.; Postlethwait, J.H. Structure of the zebrafish *snail1* gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos. *Development* **1993**, *119*, 1203–1215.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

