



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**“PATRÓN DE EXPRESIÓN Y EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LOS GENES
mctp DEL PEZ CEBRA *Danio rerio*, QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS
TRANSMEMBRANALES CON MÚLTIPLES DOMINIOS C2”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

M. en C. Ángeles Edith Espino Saldaña

Dirigido por:

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Co-director:

Dr. Ataulfo Martínez Torres

Querétaro, Qro, a 11 de marzo de 2020



**Universidad autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas**

**“PATRÓN DE EXPRESIÓN Y EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE
LOS GENES *mctp* DEL PEZ CEBRA *Danio rerio*, QUE CODIFICAN
PARA PROTEÍNAS TRANSMEMBRANALES CON MÚLTIPLES
DOMINIOS C2”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

M. en C. Ángeles Edith Espino Saldaña

Dirigido por:

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Co-dirigido por:

Dr. Ataulfo Martínez Torres

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Presidente

Dr. Ataulfo Martínez Torres
Secretario

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Vocal

Dr. Rogelio Arellano Ostoa
Suplente

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Febrero 2020
México

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Dr. Fausto Arellano Carbajal y Dr. Ataulfo Martínez Torres, por darme la oportunidad de realizar este proyecto bajo su tutela. Por la paciencia y la confianza que me brindaron, así como por todos los conocimientos y experiencia que me han compartido y transmitido.

A mi comité tutor Dra. Angelina Rodríguez Torres, Dr. José Antonio Cervantes Chávez y Dr. Rogelio Arellano Ostoia, por su apoyo, por la confianza, y por sus sugerencias y comentarios muy atinados para la mejora de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y al Instituto de Neurobiología de la UNAM, por darme espacio y las facilidades para llevar a cabo mis estudios de Doctorado; a todos los maestros e investigadores que contribuyeron a mi formación; y al personal académico y administrativo por todo su apoyo.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Olga García Obregón, por ser una guía, por sus sabios consejos y atinadas sugerencias a lo largo de todo el camino del doctorado, durante el cual su ayuda fue fundamental; y por motivarme a escribir un artículo científico de revisión que ya se encuentra publicado; a la Dra. Karina Acevedo Whitehouse, por su ayuda y recomendaciones sobre el análisis de los datos y su excelente curso de inglés científico que me facilitaron la escritura de los artículos; a la Dra. Edith Garay, por motivarme a iniciar estudios de Doctorado y por todo su apoyo y consejos semestre a semestre.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández de la Unidad de Microscopía del INB; a la M. en C. Adriana González Gallardo y al Dr. Michael C. Jeziorski de la Unidad de Proteogenómica del INB, por el apoyo técnico en este trabajo.

A los miembros del Laboratorio de Genética Molecular de la UAQ y del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del INB, por su apoyo, por sus certeras sugerencias, críticas y comentarios a lo largo de la realización de este proyecto.

Al mis compañeros de generación del Doctorado en Ciencias Biológicas de la UAQ, quienes hicieron este camino más fácil y ameno, y por sus comentarios y sugerencias durante todas las sesiones y presentaciones.

A Pablo Ordaz, mi compañero de vida, por su apoyo incondicional, consejos, críticas, por motivarme a trabajar duro y a valorar mi trabajo, siempre con amor, alegría y paciencia.

Este proyecto fue financiado con fondos de los proyectos CONACyT No. A1-S-7659 y PAPIIT-Dgapa UNAM No. IN204520.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Dominios C2.....	2
2.2 Proteínas con dominios C2	3
2.2.1 Sinaptotagminas	4
2.2.2 Ferlinas	5
2.2.3 Sinaptotagminas extendidas	6
2.2.4 MCTP (Proteínas transmembranales con múltiples dominios C2).....	6
2.2.4.1 Mctp en el pez cebra.....	8
2.3 Pez cebra como modelo biológico	8
2.4 Sistema CRISPR/Cas	9
2.4.1 Sistema CRISPR/Cas en el pez cebra.....	10
III. HIPÓTESIS	15
IV. OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1 Modelo animal y condiciones de mantenimiento y manipulación	16
5.1.1 Tanques	16
5.1.2 Agua para los tanques	16
5.1.3 Medio E3 60 X (para mantenimiento de embriones de pez cebra)	17
5.1.4 Alimento	17
5.1.5 Anestésico MESAB (MS-222) para peces cebra.....	17
5.1.6 Apareamiento y obtención de embriones recién fertilizados	18
5.2 Criterios para la determinación de tamaño de muestra y análisis estadístico	18
5.3 Procedimiento para determinar el patrón de expresión de los cuatro genes mctp del pez cebra por RT-PCR	19
5.3.1 Colección de embriones.....	19
5.3.2 Extracción de RNA total	19
5.3.3 Amplificación por RT-PCR	20
5.4 Detección de mRNA de los genes mctp por hibridación <i>in situ</i>	21
5.4.1 Amplificación por RT-PCR	22

5.4.2 Clonación de los amplicones específicos de cada <i>mctp</i>	23
5.4.3 Síntesis de las sondas para hibridación marcadas con digoxigenina	24
5.4.4 Hibridación <i>in situ</i> en embriones de pez cebra.....	25
5.4.4.1 Paraformaldehído 4% en PBS	27
5.4.4.2 Paraformaldehído 4% en PBST	27
5.4.4.3 PBS 10X (buffer salino de fosfatos)	27
5.4.4.4 PBST.....	27
5.4.4.5 HYB-	27
5.4.4.6 HYB+.....	28
5.4.4.7 Solución de pre-coloración.....	28
5.4.4.8 Solución de coloración.....	28
5.5 Clonación de las secuencias codificantes completas de los genes <i>mctp</i> del pez cebra	28
5.6 Disrupción del gen <i>mctp2b</i> en embriones de pez cebra utilizando el sistema CRISPR/Cas9	29
5.6.1 Síntesis de mRNA de Cas9	29
5.6.2 Síntesis de las guías CRISPR.....	30
5.6.3 Mezcla de inyección.....	33
5.6.4 Genotipificación por ensayo de heterodúplex (HMA)	34
5.6.4.1 TBE stock 10X	34
5.6.4.2 TBE 5X.....	34
5.6.4.3 Buffer de lisis.....	34
5.6.4.4 Buffer de proteinasa K	34
5.6.4.5 Extracción de DNA.....	35
5.6.4.6 Amplificación por PCR	35
5.6.4.7 Gel de acrilamida	36
5.6.5 Genotipificación por secuenciación.....	37
VI. RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	38
6.1 Determinación del patrón de expresión de los genes <i>mctp</i> del pez cebra en periodo embrionario y larvario.....	38
6.1.1 Extracción de RNA total de pez cebra	38
6.1.2 Amplificación por RT-PCR	39
6.2 Caracterización molecular de la secuencia codificantes de los genes <i>mctp</i> del pez cebra	41

6.2.1 Determinación de la secuencia codificantes de los genes <i>mctp</i> del pez cebra	41
6.2.2 Análisis de las secuencias aminoacídicas de las proteínas <i>Mctp</i> del pez cebra	43
6.3 Patrón de distribución de la expresión de los genes <i>mctp</i>	46
6.4 Efecto de la interrupción del gen <i>mctp2b</i> por edición del genoma utilizando el sistema CRISPR/cas9.....	53
6.4.1 Genotipificación.....	57
6.5 Discusión general.....	60
VII. CONCLUSIONES	63
VIII. REFERENCIAS	64
IX. ANEXOS	76
Anexo 1. Secuencias de variantes de los cDNA de los genes <i>mctp</i> encontradas en el pez cebra.	76
Anexo 2. Secuencias aminoacídicas de las variantes de las proteínas <i>Mctp</i> encontradas en el pez cebra.	86
Anexo 3. Alineamiento de los cDNA de las variantes de cada gen <i>mctp</i> encontradas en el pez cebra.....	90
Anexo 4. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de cada una de las proteínas <i>Mctp</i> encontradas en el pez cebra.	92
Anexo 5. Mapa del plásmido pGEM-T Easy (Promega).....	94
Anexo 6. Mapa del plásmido pJET2.1/blunt (Fermentas)	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estructura general de las proteínas transmembranales que tienen dominios C2.	4
Figura 2. Resumen de las principales estrategias para la ingeniería del genoma del pez cebra utilizando el sistema CRISPR/Cas.	13
Figura 3. Estadios de desarrollo de embriones y larvas de pez cebra analizados. dpf, días post fertilización.	19
Figura 4. Mapa de los plásmidos con los fragmentos de cDNA correspondientes a cada <i>mctp</i> clonados en anti sentido para usarse como moldes en la síntesis de las sondas de hibridación.	24
Figura 5. Mapa de restricción del plásmido pT3TS-nCas9n.	30
Figura 6. A) Diagrama del gen <i>mctp2b</i> de pez cebra que muestra la ubicación de los sitios de unión de las guías CRISPR. B) Representación esquemática de la transcripción de Mctp2b.	31
Figura 7. Secuencia de los oligos 1 y 2 necesarios para sintetizar las guías CRISPR de RNA.	33
Figura 8. A) Esquema del principio de la genotipificación por ensayo de movilidad de heterodúplex. B) Esquema de un gel de poliacrilamida mostrando el patrón de corrida de los heterodúplex	37
Figura 9. Gel de agarosa con 1 µl de RNA total extraído de pez cebra por carril	39

Figura 10. Geles de agarosa al 1.5 %. A) Patrón de expresión de los genes <i>mctp</i> .	40
Figura 11. Geles de agarosa al 1.5 % con 1 µl del cDNA completo amplificado por RT-PCR.	41
Figura 12. Esquema de las isoformas encontradas de las proteínas Mctp del pez cebra.	42
Figura 13. Alineación de secuencias de aminoácidos de las proteínas Mctp de pez cebra con otras proteínas MCTP animales.	44
Figura 14. Árbol filogenético generado con MEGA-X utilizando el método de probabilidad máxima.	45
Figura 15. Modelo de la estructura de la proteína Mctp2b de pez cebra.	46
Figura 16. A, gel de agarosa al 1% con los fragmentos de DNA amplificados correspondientes a cada mRNA de los genes <i>mctp</i> .	47
Figura 17. Geles de agarosa al 0.7 % de: A, DNA plasmídico de las clonas con los fragmentos seleccionados para usar como templados para sintetizar las sondas para hibridación <i>in situ</i> .	48
Figura 18. Patrón de la distribución de la expresión de los genes <i>mctp</i> en embriones de pez cebra en etapa 1-célula (0.5 hpf) por ISH.	49
Figura 19. Patrón de la distribución de la expresión de los genes <i>mctp</i> en embriones de pez cebra en etapa gástrula (6.5 hpf) por ISH.	50
Figura 20. Patrón de la distribución de la expresión de los genes <i>mctp</i> en embriones de pez cebra en etapa 16-somita (16 hpf) por ISH.	51

Figura 21. Patrón de la distribución de la expresión de los genes <i>mctp</i> en embriones de pez cebra en etapa 20-somita (20 hpf) por ISH.	51
Figura 22. Patrón de la distribución de la expresión de los genes <i>mctp</i> en embriones de pez cebra en etapa prim-5 (24 hpf) por ISH.	52
Figura 23. Patrón de la distribución de la expresión de los genes <i>mctp1b</i> y <i>mctp2b</i> en el cerebro de embriones de pez cebra en etapa prim-5 (24 hpf).	53
Figura 24. A) gel de agarosa al 2% mostrando los oligonucleótidos ensamblados utilizados como molde para sintetizar las guías CRISPR. B) geles de agarosa al 1 % mostrando las guías CRISPR de RNA y el mRNA de Cas9.	54
Figura 25. Gráficas mostrando los porcentajes de A) mortalidad y B) efectos en el fenotipo en los embriones microinyectados con las guías CRISPR. P=0.001.	55
Figura 26. Fenotipo de los embriones editados con el sistema CRISPR	56
Figura 27. Fenotipo de los crispantes <i>mctp2b</i> comparados con el control albino en las etapas de desarrollo indicadas.	57
Figura 28. Gel de poliacrilamida mostrando los heterodúplex formados por el apareamiento de los DNAs con ediciones.	58
Figura 29. InDels encontrados en los embriones inyectados con las guías <i>mctp2b</i> indicadas.	59

RESUMEN

Las proteínas MCTP, llamadas así por su siglas en inglés “Multiple C2 and transmembrane domain containing protein” presentan tres dominios C2 y dos pases transmembranales que unen Ca^{2+} en ausencia de fosfolípidos, y esto hace que sus propiedades sean únicas; sin embargo, su papel funcional no está bien descrito. En vertebrados, MCTP se expresa principalmente en cerebro, corazón y músculo esquelético, aunque también en hígado, riñón, testículo y otros órganos. A nivel subcelular, en motoneuronas de *Drosophila melanogaster*, se ha reportado que se localiza en retículo endoplásmico; además, se ha detectado en endosomas y en vesículas secretorias de neuronas de rata en cultivo primario. A nivel funcional, también en *D. melanogaster*, se encontró que la delección del gen *Mctp* afecta la estabilidad homeostática de la neurotransmisión, sugiriendo que la proteína MCTP funciona como un sensor de Ca^{2+} . El pez cebra (*Danio rerio*) es un excelente modelo biológico para llevar a cabo estudios de biología molecular, desarrollo y función del sistema nervioso en vertebrados. Ofrece diversas ventajas y es relativamente fácil de manipularlo genéticamente utilizando sistemas tales como el CRISPR/Cas9. En este trabajo, determinamos el patrón de expresión de los genes *mctp* del pez cebra por RT-PCR, así como su localización espaciotemporal en embriones en varias etapas del desarrollo utilizando hibridación *in situ*. Clonamos y secuenciamos los cDNAs de los genes *mctp*, y finalmente evaluamos los efectos provocados por la disrupción del gen *mctp2b* utilizando el sistema CRISPR/Cas9. Determinamos que en el genoma del pez cebra se encuentran cuatro genes *mctp*: *mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a* y *mctp2b*. Los cuatro genes se expresan desde las primeras etapas del desarrollo, así como en todos los tejidos analizados en pez adulto, aunque presentan un patrón de expresión diferencial, siendo *mctp2b* el más abundante. Además, encontramos una alta frecuencia de cambios de nucleótido, y también que tres de los genes presentan eventos de empalme alternativo. Finalmente, hemos mostrado que la disrupción del gen *mctp2b* afecta el desarrollo normal del embrión, esto sugiere que hay una importante participación funcional durante las primeras etapas del desarrollo.

Palabras clave:

mctp, dominios C2, pez cebra, CRISPR

ABSTRACT

Multiple C2 and transmembrane domain containing proteins (MCTP) contain three C2 domains and two transmembrane domains that bind Ca^{2+} in the absence of phospholipids, and this makes their properties unique; However, its functional role is not well described. In vertebrates, MCTP is expressed primarily in the brain, heart and skeletal muscle, but also in the liver, kidney, testis and other organs. At the subcellular level, in *Drosophila melanogaster* motor neurons, it has been reported that it is located in the endoplasmic reticulum; in addition, it has been detected in endosomes and in secretory vesicles of rat neurons in primary culture. At a functional level, also in *D. melanogaster*, it was found that deletion of the *Mctp* gene affects the homeostatic stability of neurotransmission, suggesting that the MCTP protein functions as a Ca^{2+} sensor. The zebrafish (*Danio rerio*) is an excellent biological model for carrying out studies of molecular biology, development and function of the nervous system in vertebrates. It offers several advantages and is relatively easy to manipulate genetically using systems such as CRISPR/Cas9. In this work, we determined the expression pattern of zebrafish *mctp* genes by RT-PCR, as well as their spatial and temporal location in embryos at various stages of development using *in situ* hybridization. We cloned and sequenced the cDNAs of the *mctp* genes, and finally we evaluated the effects caused by the disruption of the *mctp2b* gene using the CRISPR/Cas9 system. We determined that four *mctp* genes are found in the zebrafish genome: *mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a* and *mctp2b*. The four genes are expressed from the early stages of development, as well as in all the analyzed tissues in the adult fish, although they have a differential expression pattern, with *mctp2b* being the most abundant. In addition, we found a high frequency of nucleotide changes, and also that three of the genes present alternative splicing events. Finally, we have shown that disruption of the *mctp2b* gene affects the normal development of the embryo, this suggests that there is an important functional participation during the early stages of development.

Key words:

MCTP, C2 domain, zebrafish, CRISPR

I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas transmembranales que contienen dominios C2, tales como las sinaptotagminas, ferlinas y sinaptotagminas extendidas, están involucradas en procesos como el del tráfico vesicular y la fusión de membrana. En estas proteínas, cuando el Ca^{2+} se une a los dominios C2, la afinidad de fosfolípidos aumenta promoviendo la fusión de las vesículas a la membrana (Cho and Stahelin 2006; Shupliakov and Brodin 2010). Las proteínas MCTP son proteínas con tres dominios C2 y dos pases transmembranales (TMRs) que tienen similitud a otras proteínas involucradas en transmisión sináptica (Shin *et al.*, 2005). Estas proteínas se han encontrado localizadas en el retículo endoplásmico (RE) y vesículas intracelulares en neuronas, las evidencias sugieren que están involucradas en la plasticidad homeostática presináptica en *Drosophila melanogaster* (Genç *et al.*, 2017). Además, estas proteínas se han relacionado con enfermedades neuropsiquiátricas, como desórdenes bipolares y esquizofrenia, (Djurovic *et al.*, 2009; Miklowitz and Scott 2009) y con malformaciones de la aorta (Lalani *et al.*, 2013). Sin embargo, hay pocos estudios que proporcionan evidencia sobre la función de las proteínas MCTP.

El pez cebra es un excelente modelo biológico para estudiar la función de proteínas debido a las ventajas que ofrece sobre otros vertebrados para estudios de biología celular *in vivo* (Mushtaq, Verpoorte, y Kim, 2013). Su genoma tiene un alto grado de conservación evolutiva en comparación con el humano, y además es susceptible de una amplia gama de manipulaciones genéticas (Howe *et al.*, 2013).

Para comprender mejor el papel de las proteínas MCTP, en este trabajo, establecimos el patrón de expresión temporal y espacial de los genes *mctp* de pez cebra y confirmamos la importancia funcional de las mismas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Dominios C2

Los dominios C2 están conformados por 120 a 140 residuos de aminoácidos que se unen específicamente a Ca^{2+} y/o fosfolípidos. Fueron originalmente identificados como los segundos dominios más conservados de proteínas quinasas C (PCK) dependiente de Ca^{2+} (Perin *et al.*, 1990).

El dominio C2 también se identificó en la porción citosólica de la sinaptotagmina, y funciona como un sensor de Ca^{2+} , además se encontró en la membrana de las vesículas sinápticas y los gránulos secretores de las células endocrinas, donde regula la fusión de las vesículas con neurotransmisores en la membrana presináptica (Perin *et al.*, 1990). Posteriormente, se encontró que existe una gran diversidad de proteínas con dominios C2, encontrándose en más de 200 proteínas codificadas en el genoma humano (Lander *et al.*, 2001).

Las proteínas con dominios C2 están implicadas en múltiples cascadas de vías de señalización intracelular relacionadas con proliferación, crecimiento, regulación de expresión de genes, liberación de vesículas exocíticas y apoptosis. Los dominios C2 regulan la función de la proteína formando un complejo al interactuar con Ca^{2+} , que es el segundo mensajero intracelular fundamental, este proceso de interacción se sabe es también dependiente de fosfolípidos (Cho y Stahelin 2006).

La señalización de Ca^{2+} , tanto en las neuronas como en otros tipos de células puede conducir a diversos cambios en la función celular. Los procesos de señalización neuronales de Ca^{2+} también se han adaptado para modular la función de vías específicas en una amplia variedad de dominios y estos pueden tener efectos, por ejemplo, sobre la extensión axonal, la supervivencia neuronal y los cambios en la fuerza sináptica. El Ca^{2+} juega también un papel esencial en las sinapsis desencadenando la liberación rápida de las vesículas sinápticas. Dada su importancia fisiológica, las anomalías en la señalización neuronal de Ca^{2+} están implicadas en muchas enfermedades neurológicas y neurodegenerativas (Burgoyne *et al.*, 2019).

La familia de dominios C2 se une a fosfolípidos de membrana en un proceso dependiente de Ca^{2+} a través de dos mecanismos (Corbalan-Garcia y Gómez-Fernández 2014):

I) A través de una serie de residuos de aspartato ubicados en la parte inferior de la región de unión a Ca^{2+} , que coordinan de 2 a 3 iones de Ca^{2+} neutralizando la hendidura electronegativa. Además, también sirven como un puente entre el dominio y la membrana, ya que los grupos de oxígeno del fosfolípido sirven para completar la esfera de coordinación de Ca^{2+} .

II) El dominio interactúa adicionalmente con la membrana mediante residuos ubicados en su extremo. La variabilidad observada en estos residuos indica que varias combinaciones de residuos cumplen los criterios para unirse a un fosfolípido específico y sugieren una adaptación más versátil del dominio a los lípidos disponibles en la membrana. Probablemente, estas diferencias podrían afectar la penetración y la orientación de la unión.

2.2 Proteínas con dominios C2

Sin excepción, todas las proteínas involucradas en transducción de señales tienen un solo dominio C2 y son proteínas solubles que se encuentran en el citosol. Por otro lado, la mayoría de las proteínas asociadas a tráfico de membrana tienen al menos 2 dominios C2 y son proteínas de membrana (Corbalan-Garcia y Gómez-Fernández 2014; Shin *et al.*, 2005). Evolutivamente se dividen en 4 grupos mostrados en la Figura 1.

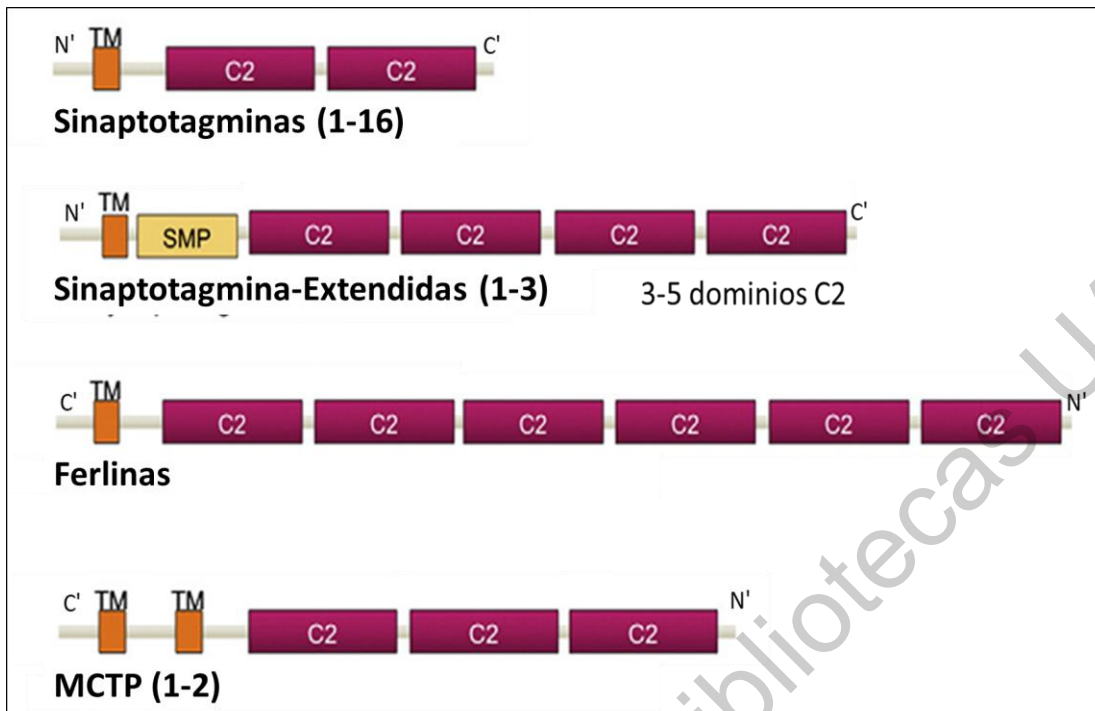


Figura 1. Estructura general de las proteínas transmembranales que tienen dominios C2 (Modificada de Corbalan-García y Gómez-Fernández, 2014). TM, región transmembranal; C2, dominio C2; SMP, dominio de unión a lípidos mitocondriales tipo sinaptotagmina.

2.2.1 Sinaptotagminas

Las sinaptotagminas (Syt) son proteínas con dos dominios C2 y con un TMR. Existen múltiples isoformas de Syt-1, de las cuales la Syt-1 ha sido más ampliamente estudiada (Bornschein y Schmidt 2019). La Syt-1 es un elemento clave para la neurotransmisión por estar embebida en las vesículas exocíticas que contienen neurotransmisores y detona el proceso de exocitosis en respuesta a los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Park y Ryu 2018). Investigaciones realizadas en esta familia de proteínas, han demostrado que el dominio C2A de estas proteínas fija tres iones Ca^{2+} (Shao *et al.*, 1998) y el dominio C2B fija dos iones de Ca^{2+} (Fernandez *et al.*, 2001). La afinidad para fijar Ca^{2+} por los dominios C2 es relativamente baja; sin embargo, se ha demostrado que la afinidad por el Ca^{2+} se incrementa considerablemente al unirse a los fosfolípidos de las membranas,

debido a que las cabezas de los fosfolípidos presentan cargas negativas que estabilizan la fijación del Ca^{2+} .

También se ha demostrado que los dominios C2 de la Syt-1 son sensores de las concentraciones de este catión y que son fundamentales para la exocitosis rápida de neurotransmisores, pero no para la fusión de la membrana de las vesículas con la membrana plasmática de la neurona. Se mostró que realizando mutaciones específicas en los dominios C2A de la Syt-1 se altera la afinidad para fijar Ca^{2+} , lo cual, resulta en el decremento de la tasa de exocitosis durante la neurotransmisión. Por otra parte, mutaciones generadas en el dominio C2 de la syn-1 afectan la función de esta proteína como sensor de Ca^{2+} en la liberación de neurotransmisores en el hipocampo (Bornschein y Schmidt 2019). Estos resultados demuestran la importancia de los dominios C2 para detectar las concentraciones de Ca^{2+} en la regulación de la neurotransmisión.

2.2.2 Ferlinas

Las ferlinas (Fer) están involucradas en la fusión y en la fisión de endomembranas, así como en la modulación de señales de Ca^{2+} (Lek et al., 2012). Dentro de esta familia se encuentran las disferlinas, las ortoferlinas y las mioferlinas, las cuales presentan de 6 a 7 dominios C2 en su estructura (Marty *et al.*, 2013). Varios estudios han reportado la importancia de esta familia de proteínas en diversos procesos biológicos tales como la regulación de fusión de vesículas para neurotransmisión en el sistema auditivo, en el tráfico de receptores y la reparación de membranas (Lek *et al.*, 2012; Redpath *et al.*, 2016). También se ha encontrado que están involucradas en la espermatogénesis y en el proceso de reparación muscular en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Washington y Ward 2006). Recientemente, se encontró que la deficiencia de otoberlinas en el pez cebra resulta en defectos en el equilibrio y la audición (Chatterjee *et al.*, 2015). También en pez cebra, se demostró que la Fer116 colocaliza con la sintaxina 4 y vinculina, y que los dominios C2 interactúan con membranas. Además, se demostró que las Fers

desempeñan un papel esencial en el desarrollo del músculo cardíaco y esquelético en el pez cebra (Bonventre *et al.*, 2018).

2.2.3 Sinaptotagminas extendidas

Las sinaptotagminas extendidas (E-Syt) tienen una topología que se asemeja a la de las sinaptotagminas y contienen una región transmembranal en el extremo amino terminal y múltiples dominios C2, además de un dominio SMP (por sus siglas en inglés “synaptotagmin-like mitochondrial-lipid binding protein”). Son proteínas residentes del RE, que lo unen a la membrana plasmática a través de los dominios C2, pero esta unión no induce la fusión de las dos membranas. Transportan glicero-lípidos entre las dos bicapas a través de sus dominios SMP que albergan lípidos y Ca^{2+} y esto regula su función de anclaje de membrana y transporte de lípidos (Herdman y Moss 2016; Saheki y De Camilli 2017). El dominio C2C de las E-syt2 y E-syt3 forman un contacto con la membrana en el fosfolípido PtdIns(4,5)P2, que es similar al mecanismo encontrado entre el RE y la membrana plasmática mediada por la proteína STIM1 (Pérez-Lara and Jahn 2015). Recientemente se demostró que los peroxisomas forman contactos de membrana con el RE a través de la interacción entre PI(4,5)P2 peroxisomal y las E-Syts 1, 2 y 3, y que la falta PI(4,5)P2 en los peroxisomas o de las proteínas E-Syts disminuye notablemente los contactos de la membrana peroxisoma-ER e induce la acumulación de colesterol en los lisosomas (Xiao *et al.*, 2019).

2.2.4 MCTP (Proteínas transmembranales con múltiples dominios C2)

En el 2005, Shin y colaboradores describieron una nueva familia de proteínas evolutivamente conservadas con dominios C2 con propiedades inusuales en cuanto a su dependencia de Ca^{2+} llamadas MCTPs. En este trabajo, describen los genes que codifican para dichas proteínas con tres dominios C2 y dos TMR las cuales se localizan en estructuras vesiculares intracelulares. Las MCTPs son diferentes a

otras proteínas que incluyen al dominio C2 ya que la unión de Ca^{2+} es independiente de fosfolípidos.

En el genoma de invertebrados como *C. elegans* y *D. melanogaster*, hay un solo gen *mctp*, mientras que en vertebrados hay 2 genes (*MCTP1* y *MCTP2*). Además, los transcritos primarios presentan empalme alternativo. Adicionalmente, se encontró que dichos genes se expresan en músculo esquelético y cardíaco y en el cerebro (Shin *et al.*, 2005).

Mediante análisis bioinformáticos de asociación génica en el genoma humano, se encontró asociación de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en *MCTP1* con trastorno bipolar (Ashbrook *et al.*, 2015; Scott *et al.*, 2009). Otro estudio relacionó un SNP en *MCTP2* con esquizofrenia (Djurovic *et al.*, 2009). Además, Lalani y colaboradores (2013) encontraron que en humanos las mutaciones en uno de los alelos de *MCPT2* están relacionadas con el estrechamiento de la aorta; en este trabajo, los autores encontraron que, tanto el silenciamiento de la expresión de *MCTP2* utilizando morfolinos, como la sobreexpresión de dicho gen en embriones de *Xenopus laevis*, resulta en problemas cardíacos, confirmando la importancia funcional de este gen en la cardiogénesis.

En un estudio en ratas, se encontró que el gen *MCTP1* se expresa principalmente en cerebro, corazón y en músculo esquelético, y en menor medida, en otros órganos tales como hígado, riñón y testículo. A nivel subcelular, se detectó la proteína MCTP1 de rata en vesículas de neuronas primarias cultivadas y en vesículas secretoras y endosomas en la línea celular PC12 (neuronal de rata) en cultivo (Qiu, Yu, and Liang 2015). Recientemente, se describió que la proteína MCTP de *D. melanogaster* parece estar ubicado en el RE (retículo endoplasmático) y en vesículas intracelulares en motoneuronas (Genç *et al.*, 2017).

Hay pocos estudios que proporcionan evidencia de las funciones de las proteínas MCTP. En *C. elegans*, un estudio de iRNA mostró que la supresión de la expresión de *mctp-1* es letal en el 25% de los gusanos durante el desarrollo embrionario (Maeda *et al.*, 2001). En *D. melanogaster*, se encontró que una línea knockout de *mctp* es letal en homocigosis y concluyó que esta proteína tiene una función esencial en el desarrollo de la mosca (Tunstall *et al.*, 2012). Por otro lado, en un estudio de genética reversa para detectar mutaciones que bloquean la

plasticidad homeostática presináptica en *D. melanogaster*, se encontró que la delección de *mctp* afecta la retroalimentación de la estabilización homeostática de la neurotransmisión, lo que sugiere un papel de MCTP como sensor de Ca^{2+} , pero a diferencia del estudio anterior, las moscas son viables en homocigosis (Genç *et al.*, 2017). En otro estudio, la sobreexpresión de MCTP1 de rata en cultivos celulares, inhibió significativamente la endocitosis de transferrina neuronal, la recuperación de vesículas secretoras y la migración celular. Esto sugiere que MCTP1 podría estar involucrado en la regulación del reciclado endocítico de neuronas y sinapsis específicas del SNC (Qiu *et al.*, 2015).

Se sabe poco sobre la función de las MCTP, además, los hallazgos son controvertidos. La mayor parte de estos estudios se han realizado *in vitro* y no han sido detallados. Por lo tanto, el papel y las funciones de los MCTP no son todavía claros ni están bien definidas.

2.2.4.1 Mctp en el pez cebra

A la fecha no se han descrito las proteínas Mctp en el pez cebra, sin embargo, de acuerdo con la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org>), en el genoma del pez cebra hay cuatro genes predichos, *mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a*, *mctp2b*, ubicados en los cromosomas 5, 10, 18 y 7, respectivamente. Las proteínas predichas, tienen tres dominios putativos C2 y dos TMR, al igual que las descritas en otros organismos.

2.3 Pez cebra como modelo biológico

El pez cebra, *D. rerio*, es un excelente modelo biológico. Una hembra puede liberar de 100 a 200 huevos que son fertilizados externamente. Los embriones se desarrollan rápidamente y la mayoría de los órganos son funcionales a los pocos días post-fertilización (Kimmel *et al.*, 1995). Debido a que los embriones son transparentes durante la embriogénesis temprana, las células y los procesos individuales se pueden visualizar *in vivo*, lo que facilita el monitoreo de la dinámica

de la expresión génica en diversos tejidos y órganos sin la necesidad de sacrificar a los sujetos experimentales. El tiempo de maduración del pez cebra toma solo 2 a 3 meses. Los órganos de esta especie han sido bien caracterizados, lo que permite abordar muchas preguntas fundamentales sobre la biología de los vertebrados (Varshney, Sood, y Burgess 2015). El cerebro del pez cebra y de los mamíferos comparten varias características anatómicas y funcionales, como la presencia y las funciones principales del cerebelo, telencefalo, diencefalo, amígdala y médula espinal (Cordero-maldonado *et al.*, 2018; Hildebrand *et al.*, 2017; Mueller, Wullimann, y Guo 2008; Perathoner, Cordero-Maldonado, y Crawford 2016). Además, la organogénesis en el pez cebra es notablemente similar a la de los humanos (Blader and Strähle 2000). Todas estas similitudes hacen que el pez cebra sea un excelente modelo para entender procesos y mecanismos biológicos y enfermedades humanas (Fontana *et al.*, 2018; Ota and Kawahara 2014; Stewart and Kalueff 2012).

El genoma del pez cebra (genoma de referencia GRCz11) tiene 25,592 genes codificantes y 6,599 genes no codificantes, lo que resulta en 59,876 transcritos ("ensamblaje del pez cebra y anotación de genes" tomado de http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Annotation, última actualización en abril de 2018). Una comparación con el genoma humano muestra que el 71.4% de los genes humanos tienen al menos un ortólogo de pez cebra (Howe *et al.*, 2013). Del total de genes humanos descritos en la "Online Mendelian Inheritance in Man database" (<https://www.omim.org/>) con morbilidad, el 82% puede estar relacionado con al menos un ortólogo de pez cebra.

2.4 Sistema CRISPR/Cas

El sistema CRISPR/Cas (Por sus siglas en inglés: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated protein) es una herramienta molecular utilizada para editar el genoma de cualquier organismo. Ha sido el desarrollo más revolucionario en Biología de los últimos tiempos (Komor *et al.*, 2017). Originalmente se describió como parte del sistema inmune adaptativo de

algunas bacterias para defenderse contra las infecciones por virus (Marraffini y Sontheimer 2010).

El sistema consiste en un RNA guía (gRNA) que incluye una secuencia corta homóloga al DNA blanco, seguido de una secuencia específica de unión a la enzima Cas9 (Jinek *et al.*, 2012). Esto es suficiente para que al unirse la enzima Cas9, que es una endonucleasa, introduzca cortes de doble cadena (DBS) en el DNA blanco. Estos cortes son reparados por recombinación no homóloga NHEJ (Por sus siglas en inglés “Non-homologous end joining) induciendo la inserción o eliminación de nucleótidos (InDels) en el sitio de blanco, lo que da como resultado cambios de marco de lectura abierto que tienen codones de paro prematuros. Idealmente, el resultado final es una mutación de pérdida de función dentro del gen editado. Hasta la fecha, existen varias versiones de la enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, la nucleasa más comúnmente utilizada (Di Donato *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013; Kleinstiver *et al.*, 2015). Cas9 se ha modificado para perder actividad de endonucleasa. Esta enzima modificada llamada dCas9 puede fusionarse con diversos dominios efectores, como activadores, represores o metilasas, que pueden usarse para modificar o controlar específicamente la expresión génica, o para marcar el sitio blanco con proteínas fluorescentes, proporcionando así una herramienta para visualizar su localización (Xu y Qi 2018). Además, otras nucleasas de diversos organismos con características diversas están siendo estudiadas para utilizarlas en múltiples aplicaciones (Cai *et al.*, 2019; Wu, Yang, y Lei 2018).

2.4.1 Sistema CRISPR/Cas en el pez cebra

El primer uso de CRISPR/Cas9 para editar el genoma del pez cebra se llevó a cabo hace algunos años (Hwang *et al.*, 2013). Desde entonces, se han publicado diversos trabajos que describen el uso de CRISPR/Cas9 en el pez cebra como una herramienta para estudiar procesos de desarrollo y modelos de enfermedades. Se demostró que el sistema CRISPR/Cas9 es seis veces más eficiente para generar mutaciones en células germinales en el pez cebra en comparación con otros sistemas de edición como ZFN (Por sus siglas en inglés “zinc-finger nucleases”) y TALEN (por sus siglas en inglés “Transcription activator-like effector nuclease”)

(Varshney, Pei, *et al.*, 2015). También, se generó un plásmido con una secuencia de nucleótidos con codones que codifican para Cas9 optimizados para pez cebra (Jao, Wente, and Chen 2013), lo que aumenta considerablemente la eficiencia de mutagénesis (Liu *et al.*, 2014).

El procedimiento general para editar de manera específica el genoma del pez cebra, usando el sistema CRISPR, se puede resumir como sigue (Rafferty y Quinn 2018; Vejnar *et al.*, 2016):

- Se diseñan las gRNA dirigidas al gen de interés o a cualquier otro sitio en el genoma que se desee editar. Hay múltiples opciones disponibles para el diseño de las gRNA, como la plataforma CHOPCHOP (Labun *et al.*, 2016) o CRISPRscan. Esta última se creó con base en un análisis a gran escala de la actividad de mutagénesis de gRNA específicamente en pez cebra (Moreno-Mateos *et al.*, 2015).
- Se sintetizan *in vitro* las gRNA y el mRNA que codifica la proteína Cas9 o de la endonucleasa que se requiera utilizar dependiendo del objetivo. Se puede utilizar proteína Cas sintetizada *in vitro* en lugar del mRNA (Gagnon *et al.*, 2014).
- Las gRNA y el mRNA de Cas se inyectan en embriones recién fertilizados, en etapa de una célula (Wuhong Pei y Shawn M. Burgess 2019; Zhao *et al.*, 2018).

Cada embrión inyectado crece como un pez fundador mosaico con varios InDels (inserciones y/o deleciones) en las células somáticas generados a medida que las nucleasas cortan los sitios blanco durante el transcurso de múltiples rondas de división celular en los embriones en desarrollo (Hwang *et al.*, 2013). El fenotipo y el genotipo se pueden analizar desde solo unas pocas horas después de la inyección hasta varios días después. Se pueden usar varias técnicas para la detección rápida de genotipos, como TIDE (seguimiento de InDels por descomposición), HMA (ensayo de movilidad heterodúplex) o digestión con endonucleasa T7 (Brinkman *et al.*, 2014; D'Agostino *et al.*, 2015; Foster *et al.*, 2019). La mutación se confirma posteriormente por PCR y secuenciación.

Para generar líneas transgénicas de pez cebra, se han establecido con éxito técnicas y protocolos para la integración de DNA exógeno en el genoma del pez cebra utilizando el sistema CRISPR (Hisano *et al.*, 2015; Jia Li, Baibing Zhang,

Jiwen Bu 2015; Albadri, Del Bene, y Revenu, 2017; Simone *et al.*, 2018). Esto permite la integración en fase del marco de lectura abierto de reporteros fluorescentes, como GFP (proteína verde fluorescente), con un gen específico; así como una integración precisa de casetes de expresión en el genoma. Esto evita la sobreexpresión debido a la integración de muchas copias en el genoma o la integración en una zona donde la cromatina podría tener un patrón diferente. En la Figura 2 se observa el procedimiento general de las principales estrategias para la ingeniería del genoma del pez cebra utilizando el sistema CRISPR (Espino-Saldaña *et al.*, 2019).

Los antecedentes indican la relevancia de las proteínas MCTP. Sin embargo, se sabe muy poco del patrón de expresión, de la ubicación intracelular y de su función. El obtener esta información nos permitirá sugerir cuál podría ser su función dentro de las células que lo expresan. El uso del pez cebra, podría permitir estudiar la función de estas proteínas, debido a las diversas ventajas que ofrece.

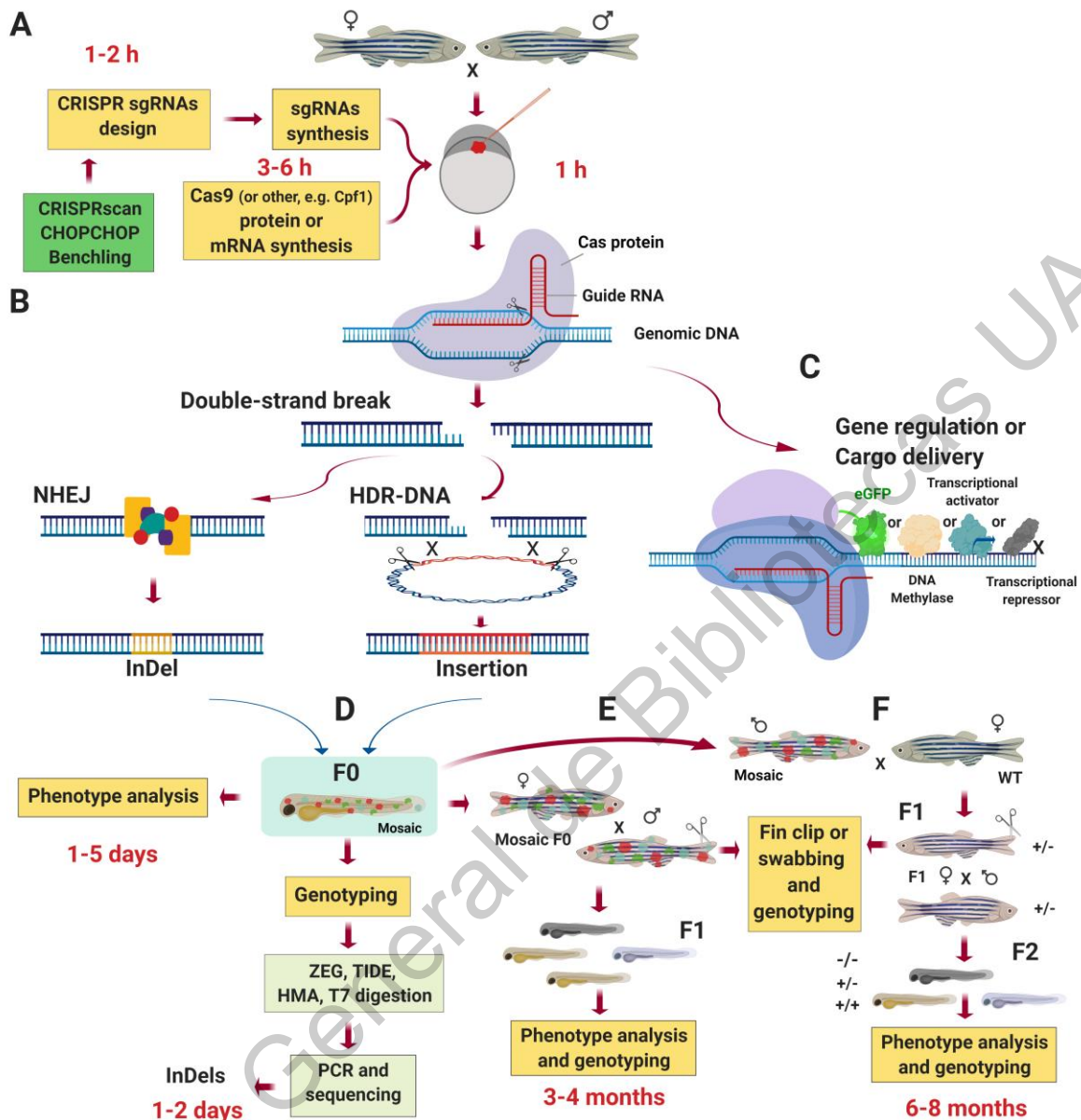


Figura 2. Resumen de las principales estrategias para la ingeniería del genoma del pez cebra utilizando el sistema CRISPR/Cas. El tiempo típico consumido en cada procedimiento se indica en rojo. A) diseño de sgRNAs utilizando cualquiera de las herramientas disponibles. Síntesis *in vitro* de los sgRNAs y mRNA (o proteína) de la elección de Cas. Microinyección de embriones recién fertilizados (1-célula) con una mezcla de sgRNA individuales o múltiples más los siguientes de acuerdo con el propósito: Para knockout, mRNA que codifica par la nucleasa más conveniente; para knockin, mRNA que codifica para la nucleasa (o proteína Cas) más DNA donante; para regulación de genes, Cas9 inactivo (dCas9) fusionado a un efector,

dentro de la célula, se forma un complejo entre la proteína Cas, el sgRNA y el DNA genómico. B) La endonucleasa genera una ruptura de doble cadena del DNA genómico, que es reparada por la maquinaria de reparación de DNA endógena mediante uniones finales no homólogas (NHEJ), que causan inserciones o deleciones (InDels) que podrían perturbar el marco de lectura abierto (knockout) o incorporar DNA del donante exógeno en un proceso independiente de homología en un locus genómico elegido (knockin). C) dCas9 se puede usar fusionado a un efector tal como represores transcripcionales, activadores, metilasas o proteínas fluorescentes. En este caso, el complejo, en lugar de romper el DNA genómico, permitirá la regulación génica o la visualización del sitio blanco. D) Se observan el fenotipo en los embriones inyectados después de 1 a 5 días. La detección del genotipo podría realizarse en la F0 mediante un procedimiento rápido como TIDE (Seguimiento de los InDels por descomposición), HMA (ensayo de movilidad de heterodúplex) o digestión con endonucleasa T7, y luego confirmarse mediante PCR y secuenciación. E) Para evitar el mosaicismo, el pez fundador (F0) se crece hasta la edad adulta, se entrecruzan y se genotifica la F1 como se describió anteriormente. Para producir una línea transgénica, los peces fundadores se cruzan con el tipo silvestre y luego se conservan en F1 hasta que se encuentran homocigotos. La genotificación se hace de una muestra de la aleta posterior (finclip). Si la homocigosis es letal, se puede mantener una línea heterocigótica (Espino-Saldaña *et al.*, 2019).

III. HIPÓTESIS

Los genes *mctp* se expresan en el sistema nervioso y en el sistema muscular del pez cebra y su expresión es esencial para el desarrollo.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el patrón temporal y espacial de expresión de los genes *mctp* y los efectos de su disrupción en embriones de pez cebra.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el patrón de expresión temporal de los genes *mctp* en los periodos embrionario y larvario del pez cebra.
- Definir el patrón de distribución de la expresión de los mRNA de los *mctp*, en los periodos embrionario y larvario del pez cebra.
- Evaluar el efecto de la disrupción del gen *mctp2b* durante el desarrollo del pez cebra.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Modelo animal y condiciones de mantenimiento y manipulación

Se utilizaron peces cebra cepa AB, del bioterio del laboratorio de Biología Molecular y Celular del Instituto de Neurobiología de la UNAM. La manipulación, apareamiento y microinyección se llevaron a cabo en dichas instalaciones.

Proyecto aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro con el número 26FCN2016; y aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM (Protocolo no. 067 para el uso de animales en la investigación científica).

Las condiciones de mantenimiento, cuidado y manipulación y eutanasia se llevaron a cabo de acuerdo a las normas del bioterio de pez cebra del laboratorio de Biología Molecular y Celular del Instituto de Neurobiología de la UNAM, siguiendo los procedimientos y protocolo del “Manual de usuario del bioterio” del INB, los “Lineamientos para el desempeño de las labores de investigación y la integridad científica en el Instituto de Neurobiología de la UNAM” y los procedimientos de “Guidelines for use of zebrafish in the National Institute of Health (NIH)”, tal como se indica en el protocolo aprobado por el comité de bioética del INB antes mencionado.

5.1.1 Tanques

- Para peces adultos, se utilizó un sistema de tanques de vidrio de 5 litros con sistema de filtración y control de temperatura a 28°C. A una densidad de máximo 5 adultos/litro (25 adultos por tanque).
- Para las larvas, se utilizaron tanques de vidrio de 250 ml mantenidos en una incubadora a 28°C, haciendo recambio del 50% de agua diariamente. A una densidad de máximo 100 larvas por 100 ml. A los 30 días post-fertilización (dpf) se cambiaron al sistema.

5.1.2 Agua para los tanques

pH 7.0-7.5

Conductividad 500-1000 μ S

Temperatura 25-28°C.

Cloro, nitritos y amonio no detectable.

5.1.3 Medio E3 60 X (para mantenimiento de embriones de pez cebra)

NaCl 34.8 g

KCl 1.6 g

CaCl₂·2H₂O 5.8 g

MgCl₂·6H₂O 9.78 g

Se disolvieron las sales en agua desionizada, se llevó a un volumen final de 2 litros.

Se ajustó el pH a 7.2 con NaOH. Se esterilizó en autoclave.

Para preparar E3 1 X, se diluyeron 16.5 ml del stock 60 X a 1 litro.

5.1.4 Alimento

2 veces al día (9 am y 6 pm)

Adultos: Adult Zebrafish Diet, cat. 388763912416 marca Zeigler™

Larvas: Larval Cat. AP100 Diet marca Zeigler™

5.1.5 Anestésico MESAB (MS-222) para peces cebra

Tricaina (3-amino benzoica acid ethyl ester) SIGMA cat. A5040 (0.4 % W/V)

Se mezcló:

400 mg de tricaina

800 mg Na₂HPO₄ anhidro

100 ml de agua destilada.

Se ajustó el pH a 7 con NaOH 1 N ó HCl 1N (solo en caso de ser necesario).

Se hicieron alícuotas de 25 ml y se guardaron a 4°C.

Uso en alevines: 10 gotas en una caja Petri 35 mm (40-50 ml de E3).

Se dejaron hasta que se anesthesiaban (1-2 min).

Para despertar, se sustituyó el E3 con anestésico por E3 sin anestésico.

Uso en adultos: 4.2 ml de 100 ml de agua en un vaso de precipitado (1-2 min).

5.1.6 Apareamiento y obtención de embriones recién fertilizados

- La noche anterior, se dejaban dos hembras y un macho separados por una división en una pecera de apareamiento.
- La mañana siguiente, se quitaba la separación para que los peces llevaran a cabo su proceso normal de apareamiento.
- Los peces se regresaron a su tanque utilizando una red, se colectaron los embriones y se colocaron en una caja Petri con medio E3.

5.2 Criterios para la determinación de tamaño de muestra y análisis estadístico

En cada experimento se utilizó la camada completa de embriones obtenida de un apareamiento (se obtenían aproximadamente 100 a 200 embriones por apareamiento de una pareja). Cada experimento se realizó por cuadruplicado. Esto permitió obtener al menos un duplicado para los análisis moleculares subsiguientes. Este criterio fue el que utiliza los estudios con corte semejante al previamente reportado (Ma y Liu, 2015), y que permite tener un poder estadístico aceptable (0.80) ante variaciones experimentales.

Los datos de los experimentos de interrupción génica se analizaron mediante la construcción de una tabla de contingencia con el número de embriones con los fenotipos obtenidos entre los embriones inyectados con las gRNA específicas de cada gen *mctp* y los embriones seleccionados como control positivo y aquellos seleccionados como control negativo. A estos datos se les aplicó una prueba de Chi-cuadrada con cálculo de significancia mediante una prueba exacta de Fisher con un alfa=5% (Crawley, 2012). Esto permitió determinar si la interrupción de los genes fue efectiva, y controlar así los efectos potenciales provocados por la inyección en sí misma. Los controles positivos fueron embriones inyectados con gRNAs específicas para el gen de la tirosinasa o para el gen albino, que son utilizado como controles positivos en trabajos similares con el fin de observar un fenotipo conocido (falta de pigmentación). Los controles negativos fueron embriones a los que no se les realizó ningún procedimiento.

5.3 Procedimiento para determinar el patrón de expresión de los cuatro genes mctp del pez cebra por RT-PCR

5.3.1 Colección de embriones

Se colectaron embriones y larvas en los estadios mostrados en la Figura 3 en tubos de 1.5 ml y se anestesiaron colocando los tubos con los embriones en hielo por 2 minutos.

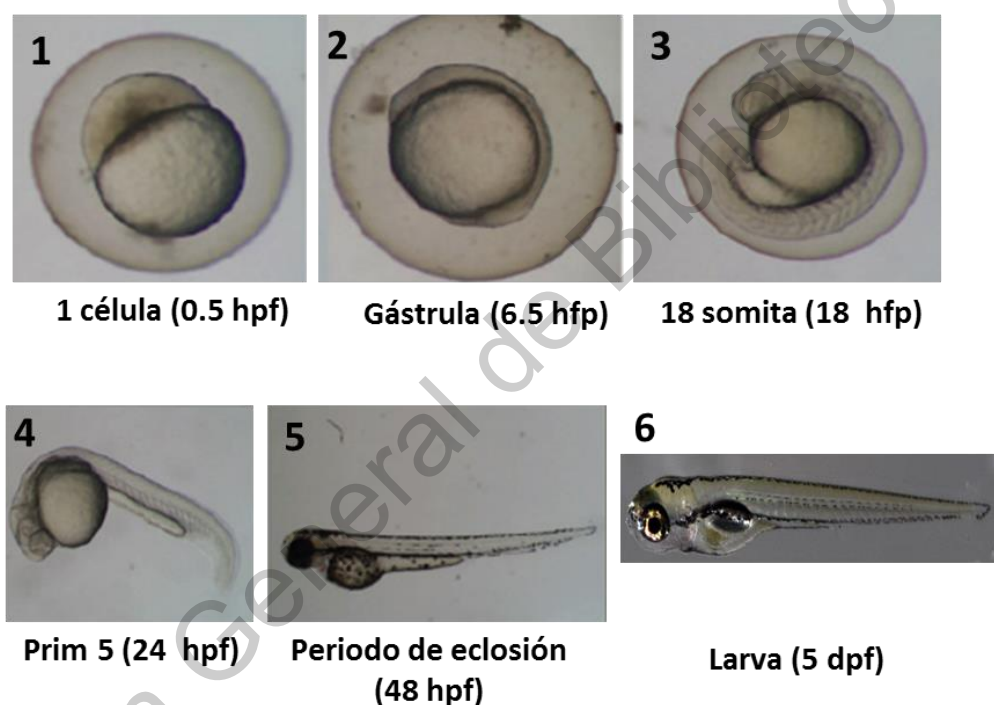


Figura 3. Estadios de desarrollo de embriones y larvas de pez cebra analizados. dpf, días post fertilización.

5.3.2 Extracción de RNA total

- Se colocaron 3 larvas o embriones por cada estadio, o 100 mg de tejido en un microtubo de 1.5 ml.
- Se adicionó 1 ml de trizol (invitrogen).
- Se disgregó utilizando un micro-homogenizador.
- Se incubó 5 min a temperatura ambiente.

- Se adicionaron 200 μ l de cloroformo y mezclar en vórtex por 20 seg.
- Se incubó 2 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 12000 rpm 10 minutos a 4°C.
- Se colectaron la fase acuosa en otro microtubo de 1.5 ml.
- Se precipitó con 0.8 volúmenes de isopropanol.
- Se centrifugó a 12000 rpm 15 minutos a 4°C.
- Se descartó el sobrenadante y se lavó con 500 μ l de etanol al 70% en agua libre de RNasas. Se mezcló en vórtex.
- Se centrifugó a 12000 rpm 1 minuto a 4°C.
- Se eliminó el sobrenadante y dejó secar la pastilla a temperatura ambiente.
- Se resuspendió en 25 μ l de agua libre de RNasas.
- Se corrió 1 μ l de cada RNA extraído en un gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio.
- Se cuantificó en un micro-espectrofotómetro (nanodrop).

5.3.3 Amplificación por RT-PCR

La reacción de retrotranscripción y amplificación por PCR, se llevó a cabo en un solo paso utilizando el kit One-Step RT-PCR (Invitrogen). Se utilizaron los RNAs totales extraídos de los diferentes estadios de desarrollo utilizando oligonucleótidos diseñados entre intrones para evitar amplificación por contaminación de DNA genómico. Se enlistan en la tabla 1.

Mezcla de reacción:

H ₂ O	7.5 μ l
Buffer 2X	10 μ l
Oligo directo 10 μ M	0.5 μ l
Oligo reverso 10 μ M	0.5 μ l
RNA total 50 ng/ μ l	1.0 μ l
Mix RT/Taq platinum	0.5 μ l
Volumen final	20 μ l

Condiciones de reacción:

1 ciclo: { 50°C 30 min
94°C 2 min

40 ciclos: { 94°C 15 seg Desnaturalización
55°C 30 seg Alineamiento de oligonucleótidos
72°C 40 seg Extensión

1 ciclo: { 72°C 5 min.

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para determinar el patrón de expresión de los genes *mctp* de pez cebra.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Amplificación (pb)
mctp1a-F mctp1a-R	GCATCAGTCTCATCGAGGCA CTCTCATGTGGGTCGTCCAG	400
mctp1b-F mctp1b-R	AGCCAGAAAGCCAGAAAGTGTG CTACGGAAAACCTCTTTACCGGC	501
mctp2a-F mctp2a-R	CCTTGAGCTGGGTAACAGCA TTGGGATTGTCCTCCGCAA	348
mctp2b-F mctp2b-R	TAACTGGTCATCAGAGACCGC ATTCAGCGGCAACTCAGACAAG	688
Zftub-F Zftub-R	CCTGCTGGGAACTGTATTGTC TCAATGAGCTCCTTGCCAATAG	292

5.4 Detección de mRNA de los genes *mctp* por hibridación *in situ*

El procedimiento fue el siguiente:

- Se amplificaron fragmentos específicos para cada uno de los mRNA de los genes *mctp* del pez cebra.
- Se clonaron en un plásmido de expresión pGEMT-Easy (Promega) que tiene el promotor de T7 RNA polimerasa.

- Cada plásmido se linealizó con la enzima de restricción correspondiente indicada en la Figura 4, se purificó y se cuantificó.
- Utilizando como molde el DNA linealizado, se sintetizaron *in vitro* las respectivas sondas de RNA marcadas con digoxigenina.
- Utilizando las sondas de RNA sintetizadas, se hicieron hibridaciones *in situ* en embriones y larvas de pez cebra en etapas 1-célula, gástrula, 18-somita, 21-somita y prim-5.

5.4.1 Amplificación por RT-PCR

Se extrajo RNA total de embriones 24 hpf y se amplificaron fragmentos de cada mRNA de los genes *mctp* por RT-PCR utilizaron las mismas condiciones descritas en los apartados 5.3.2 y 5.3.3, utilizando los oligonucleótidos de la tabla 2. Los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar fragmentos con que tuvieran baja homología entre los genes *mctp*, esto para evitar señal cruzada en las hibridaciones *in situ*.

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos utilizados para amplificar un fragmento de mRNA de cada *mctp* de pez cebra, que sirvieron como molde para sintetizar las sondas para hibridación *in situ*.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Amplión (pb)
MCTP1aISH-F MCTP1aISH-R	TCATCCCCAGAGCCCTGAATAAC GTGGATTGTCTTGCTGCGAAAAAC	497
MCTP1bISH-F MCTP1bISH-R	ATGGAAGCGAGTATGGACGTGG CTTTAAGGTTGTCCACTATTAGGCAA	694
MCTP2aISH-F MCTP2aISH-R	TAGGTGACATAGATGATACAGCTAGTG CAACTTTGCTCTTGTAGATGTGC	636
MCTP2bISH-F MCTP2bISH-R	ACTTGAAAAGACCACTGAGATGGTGC TGTGGGTCTGTAGCCGGCTG	623

5.4.2 Clonación de los amplicones específicos de cada *mctp*.

- Los amplicones, productos de RT-PCR, se corrieron en un gel de agarosa al 1 % a 100 V por 40 minutos.
- Cada banda se cortó y purificó utilizando el kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del kit.
- Los amplicones purificados se cuantificaron en un micro-espectrofotómetro nanodrop.
- Cada amplicón se clonó en el vector pGEM-T Easy en la siguiente mezcla de reacción:

Buffer 2X	5.0 μ l
pGEMT 50 ng/ μ l	1.0 μ l
DNA 100 ng/ μ l	1.0 μ l
Ligasa 5 U/ μ l	1.0 μ l
Volumen final:	10.0 μl

- Las mezclas de reacción se ligaron a 4°C por 18 horas.
- Se transformaron 100 μ l de células competentes XL-Blue con 2 μ l de ligación. Para esto, se incubaron en hielo por 30 min; se dio un choque térmico a 42°C por 90 seg y se regresó al hielo por 2 min; se adicionaron 500 μ l de medio LB a cada tubo y se incubaron con agitación a 37°C por 1 h; se sembraron 100 μ l en placas de LB agar con ampicilina a una concentración de 20 μ g/ml; las placas de agar se incubaron a 30°C por 18 h.
- Se crecieron 10 clones independientes de cada uno en 4 ml de medio líquido LB con ampicilina a una concentración de 20 μ g/ml.
- Se extrajo el de DNA plasmídico a partir de 2 ml de cultivo con el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) utilizando el protocolo recomendado en el manual del kit.
- Los DNAs plasmídicos se caracterizaron por restricción enzimática utilizando las enzimas correspondientes mostradas en la Figura 4.

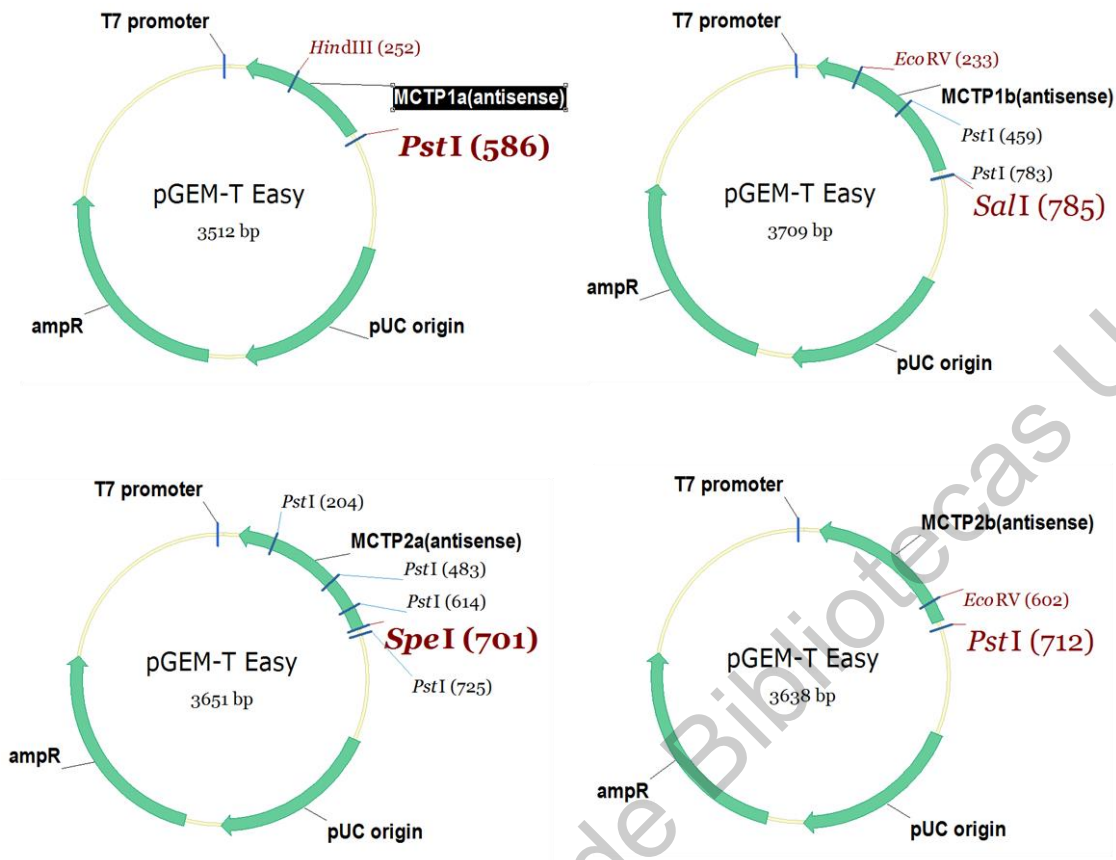


Figura 4. Mapa de los plásmidos con los fragmentos de cDNA correspondientes a cada *mctp* clonados en anti sentido para usarse como moldes en la síntesis de las sondas de hibridación. Se muestran en negro las enzimas de restricción usadas para la caracterización y en rojo las enzimas de restricción con que se linealizaron los plásmidos.

5.4.3 Síntesis de las sondas para hibridación marcadas con digoxigenina

- Se escogió una clona con el fragmento de cDNA correspondiente a cada *mctp* insertado en antisentido y otra en sentido.
- Cada plásmido se linealizó con la correspondiente enzima de restricción.
- El DNA linealizado se purificó utilizando el kit "QIAquick® Spin"(Qiagen) utilizando el protocolo del manual del kit.
- Para sintetizar cada una de las sondas, se llevó a cabo la siguiente reacción usando el kit DIG RNA Labeling SP6/T7 (Invitrogen) utilizando como templado los correspondientes plásmidos linealizados:

Agua	1.5 μ l
DNA 100 ng/ μ l	5.0 μ l
10X NTP labeling mix	1.0 μ l
10X buffer	1.0 μ l
Inhibidor de RNasa	0.5 μ l
T7 RNA polimerasa	1.0 μ l
Volumen final	10.0 μl

- Las mezclas de reacción se incubaron 2 horas a 37°C.
- Se adicionó 1 μ l de DNasa I a cada una.
- Se incubaron 15 minutos a 37°C.
- Parar la reacción se adicionaron 2 μ l de EDTA pH 8.0 0.2 M.
- Las sondas de RNA sintetizadas se purificaron utilizando el kit "Mini Quich Spin Colum" (Roché) de acuerdo con el protocolo del manual del kit.
- Se determinó la concentración de las sondas cuantificando en un micro-espectrofotómetro (nanodrop).

5.4.4 Hibridación *in situ* en embriones de pez cebra

- Los embriones en etapa prim-5, a las 24 hpf, se decorionaron antes de fijar con paraformaldehído (PFA).
- Los embriones se fijaron en PFA al 4% de 4 a 18 h.
- Se removió el PFA y se lavó 3 veces con PBST, incubando 10 minutos con agitación suave.
- Se agregó proteinasa K a una concentración final de 10 μ g/ml y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se removió la solución de proteinasa K y se re-fijó con PFA al 4% por 20 minutos a temperatura ambiente.
- Se removió el PFA y lavó 4 veces con PBST, 5 minutos por lavado con agitación suave.

- Se retiró la solución PBST y agregó HYB- a temperatura ambiente y agitó suavemente por 10 minutos.
- Se retiró la solución y agregó HYB- precalentado a 65°C, se incubó a 65°C por 10 minutos con agitación suave.
- Se retiró la solución y agregó HYB+ precalentado e incubó 4 horas a 65°C.
- Se retiró la solución y agregó la sonda marcada con digoxigenina precalentada e incubó toda la noche a 65°C.
- Se retiró la sonda y agregó las siguientes soluciones:
 - 75% HYB-/25% de SSC 2X a 65°C por 10 minutos.
 - 750% HYB-/50% de SSC 2X a 65°C por 10 minutos.
 - 25% HYB-/75% de SSC 2X a 65°C por 10 minutos.
 - SSC 2X a 65°C por 10 minutos.
 - SSC 0.2X a 65°C por 30 minutos.
- Se lavó con PBST por 10 minutos 2 veces a temperatura ambiente.
- Se agregó solución bloqueadora e incubó 4 horas a 4°C.
- Se agregó el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina y se incubó toda la noche a 4°C.
- Se retiró solución y se agregó 2 ml de PBST a temperatura ambiente y se mezcló por inversión.
- Se recambió el PBST y se dejó 10 min con agitación suave a temperatura ambiente.
- Se lavó 4 veces con PBST por 10 minutos con agitación suave a temperatura ambiente.
- Se retiró la solución y se pasó a un pozo excavado.
- Se agregó 0.8 ml de solución de coloración y se agitó suavemente protegidos de la luz.
- Se revisó cada 30 minutos hasta que apareciera la señal.
- Para detener la reacción de coloración, se eliminó la solución y se agregó 1 ml de PBST y se agitó suavemente por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Se aclaró con glicerol al 80% en PBST, se montó y fotografió en campo claro.

5.4.4.1 Paraformaldehído 4% en PBS

Se disolvieron 1.2 g de PFA (sigma cat. P6148) en 25 ml de agua desionizada. Se adicionaron 3 ml de PBS 10X y se disolvió en agitación. Se agregaron 90 µl de NaOH 5 M. Se hicieron alícuotas y se guardaron a -20°C.

5.4.4.2 Paraformaldehído 4% en PBST

A 50 ml de PFA 4% en PBS, se agregaron 250 µl de Tween20 al 20%.

5.4.4.3 PBS 10X (buffer salino de fosfatos)

1.37 M de NaCl

27 mM de KCl

100 mM de Na₂HPO₄

20 mM de KH₂PO₄

Se disolvieron en agua desionizada y se ajustó el PH a 7.4 con HCl. Se esterilizó en autoclave.

5.4.4.4 PBST

Para 50 ml, se adicionaron 5 ml de PBS 10X y 250 µl de Tween20 al 20% mas 44.75 ml de agua.

5.4.4.5 HYB-

Formamida 50%

SSC 5X

Tween20 0.1 %

5.4.4.6 HYB+

HYB- con 500 µg/ml de RNA de torula (roche cat. 109223), 50 µg/ml Heparina. Se guardó a -20°C.

5.4.4.7 Solución de pre-coloración

100 mM de tris pH 9.5

100 mM NaCl

0.1% Tween20

Se ajustó el pH a 9.5.

Se guardó a -20°C

5.4.4.8 Solución de coloración

Solución de pre-coloración con 50 mM de MgCl₂.

1mM de tetramizole (levamisole)

4.5 µl de stock de NBT y 3.5 µl de BCIP por cada ml.

5.5 Clonación de las secuencias codificantes completas de los genes *mctp* del pez cebra

Se extrajo RNA total de embriones 24 hpf y se amplificaron las secuencias codificantes completas de los genes *mctp* por RT-PCR. Se utilizaron las mismas condiciones descritas en los apartados 5.3.2 y 5.3.3. Se usaron los oligonucleótidos de la tabla 3, y con un tiempo de extensión de 3 min en lugar de 1 min.

Los cDNAs completos se clonaron y caracterizaron por restricción utilizando las mismas condiciones del apartado 5.4.2. Se secuenciaron 10 clonas completas del cDNA de cada *mctp*.

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos utilizados para amplificar el marco de lectura abierto completo de cada *mctp* de pez cebra.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)
mctp1aC-F mctp1aC-R	ACTGAACAGCGTGTGGACACTTC CCTAGGAGAGTGTCAGAGGAGGAC	2346
mctp1bC-F mctp1bC-R	AGGGTGACTTCTGACTGGAAAGAC ATTGCTGATTTAGACGGGTAATACG	2644
mctp2aC-F mctp2aC-R	ATTCATCTGAAGTGCAGTTTCATCC CTTTCATCCGACATGTCCGTC	2844
mctp2bC-F mctp2bC-R	TCTGCTTTATTTGGACTTAGTTTGTGG TCAGCAGCAGTTTCCCGTAGTG	2087

5.6 Disrupción del gen *mctp2b* en embriones de pez cebra utilizando el sistema CRISPR/Cas9

5.6.1 Síntesis de mRNA de Cas9

- El plásmido pT3TS-nCas9n (Figura 5) se linealizó con la enzima Xba I, incubando 16 h a 37°C.
- El plásmido linealizado se purificó con el kit QIAquick Gel Extraction, de acuerdo con las instrucciones del kit y se cuantificó en un nanodrop.
- Se llevó a cabo la reacción de transcripción *in vitro* con las siguientes haciendo la siguiente mezcla de reacción:

H ₂ O DEPC	7.0 µl
2x NTP/CAP	10.0 µl
10X buffer	2.0 µl
DNA lineal 1 µg/µl	1.0 µl
Enzima Mix	2.0 µl
Volumen final	20 µl

- Se incubó 2 horas a 37°C.
- Se adicionó 1 µl de DNAsa I.
- Se incubó 15 minutos a 37°C.

- Se adicionaron 30 μ l de agua y 30 μ l de LiCl. Se mezcló e incubó toda la noche a -20°C .
- Se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C por 15 minutos.
- Se lavó con etanol al 70 % en agua libre de RNasas (agua DEPC).
- Se dejó secar y se resuspendió en 20 μ l de agua DEPC.
- Para verificar la integridad del RNA sintetizado, se corrió en un gel de agarosa al 0.8 %.
- Se determinó la concentración en un nanodrop.

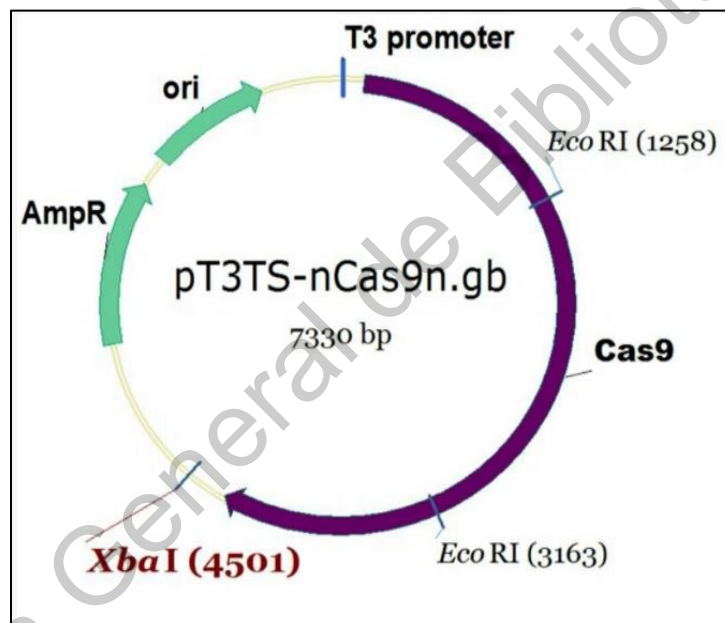


Figura 5. Mapa de restricción del plásmido pT3TS-nCas9n que contiene la secuencia del mRNA de Cas9 optimizado para expresión en pez cebra dirigido por el promotor para la T3 RNA polimerasa (Jao *et al.*, 2013). En negro se muestra la enzima Eco RI con la que se caracterizó por restricción; y en rojo la enzima utilizada para linealizar el plásmido.

5.6.2 Síntesis de las guías CRISPR

Se diseñaron tres guías CRISPR específicas para el gen *mctp2b* del pez cebra complementarias a secuencias correspondientes en los exones 2 ó 4 (Figura 6-A) que interrumpen el marco de lectura abierto, generando ya sea un péptido pequeño que carece de todos los dominios (guía 3) o un fragmento de la proteína que contiene solo el dominio C2A y parte del dominio C2B (guías 1 y 2) (Figura 6-B). Como control, se sintetizó una guía CRISPR específica para gen *slc45a2* que genera un fenotipo albino o una guía para el gen de la tirosinasa. La secuencia correspondiente a la secuencia blanco de los oligonucleótidos específicos para sintetizar cada una de las guías se muestra en la tabla 4 (Líneas azules en la Figura 7).

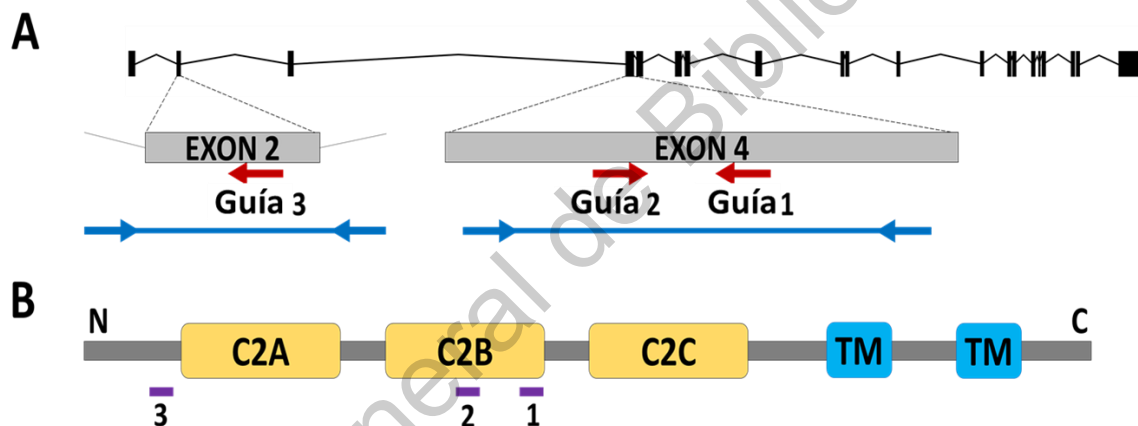


Figura 6. A) Diagrama del gen *mctp2b* de pez cebra que muestra la ubicación de los sitios de unión de las guías CRISPR. Las regiones amplificadas por PCR para genotificar las ediciones CRISPR se muestran en líneas azules. B) Representación esquemática de la transcripción de *Mctp2b* que indica la posición de los dominios funcionales relevantes y los sitios (líneas moradas) donde las ediciones CRISPR interrumpieron la expresión de la proteína.

Tabla 4. Secuencia blanco de unión de la enzima Cas9 utilizada en los oligos 1 de la Figura 7, para hacer las guías específicas indicadas en la Figura 6.

Guía	Secuencia (5'-3')	Exón blanco
GuíaMctp2b-1	GGGGCTCCGGTGCAGGCTTT	4
GuíaMctp2b-2	GGTGACCTGGAGCCGGGCCG	4
GuíaMctp2b-3	GGTTTGCTCGTTGTCTTGTA	2
slc45a2(albino)	GGGGAAGGTTGATTATGCAC	3
Tirosinasa	TGTCCAGTCTGGCCCCGGCGA	2

- Se mandó sintetizar el oligonucleótido 2 (oligo universal) que tiene la secuencia de unión a la enzima Cas9 que se utilizará junto con el oligo 1 (oligonucleótido específico de cada guía) para sintetizar la guía CRISPR de RNA que contiene el sitio de unión a la región blanco y el sitio de unión a la enzima Cas9 (Figura 7).
- Ensamble de los oligonucleótidos para cada guía CRISPR:

H ₂ O DEPC	19.75 µl
Buffer 10X	2.5 µl
dNTPs 10 mM	0.5 µl
Oligo1 10 µM	1.0 µl
Oligo2 10 µM	1.0 µl
Phusion polimerasa	0.25 µl
Volumen final	25.0 µl
- Condiciones de ensamble:

Desnaturalización	98°C	2 min
Alineamiento	50°C	10 min
Extensión	72°C	10 min
- Se verificó la integridad en un gel de agarosa al 2.5 % teñido con bromuro de etidio y se cuantificó en nanodrop.

- Para llevar a cabo la transcripción *in vitro* de cada guía CRISPR, se usó el kit HiScribe T7 Quick High Yield RNA synthesis (NEB):

H ₂ O DEPC	6.0 µl
NTP buffer mix	5.0 µl
DNA (oligos ensamblados)	3.0 µl
T7 RNA pol	1.0 µl
Volumen final	15 µl

- Se incubaron 16 h a 37°C.
- Se adicionaron 20 µl de agua DEPC y 1 µl de DNasa mix.
- Se incubaron 15 minutos a 37°C.
- Se verificó la integridad de los RNA en un gel de agarosa al 2.5 % teñido con bromuro de etidio y se cuantificó en nanodrop.

Oligo 1:

Promotor T7 **Secuencia blanco** **Secuencia de empalme**
 TAATACGACTCACTATAGGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGC TAGAATAGC

Oligo 2:

5- AAA AGC ACC GACTCG GTG CCA CTT TTT CAA GTT GAT AAC GGA CTAGCCTTATTT TAA CTT GCT ATT TCT AGCTCT AAA AC -3
Secuencia de empalme

Figura 7. Secuencia de los oligos 1 y 2 necesarios para sintetizar las guías CRISPR de RNA. El oligo 1 tiene la secuencia del promotor T7 (rojo), la secuencia blanco-específica (azul), y una secuencia complementaria a un parte del oligo 2 (verde). El oligo 2 (oligo universal) tiene la secuencia de unión a la enzima Cas9.

5.6.3 Mezcla de inyección

Se microinyectaron embriones recién fertilizados en estadio de 1-célula, usando un microcapilar y una bomba de inyección (Pneumatic PicoPump modelo SYS-V820, marca WPI).

Mezcla de reacción:

H ₂ O DEPC	5.0 µl
mRNA cas9 250 ng/µl	2.0 µl
Rojo de fenol 0.5 %	1.0 µl

RNA guía CRISPR 500 ng/ μ l 2.0 μ l

Volumen final **10 μ l**

Los embriones se incubaron por 6 horas, se revisaron en el estereoscopio y se eliminaron los embriones muertos. El resto se incubó hasta su análisis.

5.6.4 Genotipificación por ensayo de heterodúplex (HMA)

5.6.4.1 TBE stock 10X

Se pesaron:

108.0 g Tris base

55.0 g ácido bórico

7.44 g Na₂EDTA • 2H₂O

Se ajustó el volumen a 1 litro con agua desionizada.

Se filtró utilizando un filtro de 0.45 μ m.

5.6.4.2 TBE 5X

Tris-HCl pH 8 1.1 mM

H₃BO₃ 900 mM

EDTA pH 8 25 mM

5.6.4.3 Buffer de lisis

KCl 50 Mm

NaCl 200 Mm

Tris pH 8 10 mM

Gelatina 0.1 %

NP-40 0.45 %

Tween 20 0.45 %

Se ajustó el pH a 8 con EDTA

5.6.4.4 Buffer de proteinasa K

Glicerol 50%

CaCl₂ 1 mM

Se preparó en Tris pH 8

5.6.4.5 Extracción de DNA

- Se preparó el buffer de lisis completo:
980 ul buffer lisis
10 ul buffer proteinasa K.
10 ul proteinasa K 20 mg/ml.
- Se agregaron 20 µl del buffer completo a cada tubo.
- Se incubaron a 56°C por 4 h.
- Se inactivó la proteinasa K incubando las muestras a 95°C por 10 min.
- Se enfrió en hielo.
- Se agregaron a cada tubo 180 µl de agua desionizada.

5.6.4.6 Amplificación por PCR

Se amplificó un fragmento de DNA genómico utilizando el DNA extraído con el protocolo del apartado 5.6.5.4, con los oligos de la tabla 5.

Mezcla de reacción de PCR:

H ₂ O	18.8 µl
Buffer(+MgCl ₂) 10X	2.5 µl
dNTPs 10 mM	0.5 µl
OligoF 10 µM	1.0 µl
OligoR 10 µM	1.0 µl
DNA	1.0 µl
TaqPol	0.2 µl
Volumen final	25.0 µl

Condiciones de reacción:

1 ciclo: 94°C 1 min

30 ciclos:

94°C 30 seg	Desnaturalización
55°C 30 seg	Alineamiento de oligonucleótidos

72°C 40 seg Extensión
 1 ciclo: { 72°C 5 min.

El producto de PCR se desnaturalizó y re-naturalizó lentamente utilizando el programa de alineamiento.

Programa de alineamiento

10 min 95°C
 1 min 85°C
 1 min 75°C
 1 min 65°C
 1 min 55°C
 1 min 45°C
 1 min 35°C

Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar una región de DNA genómico que flanquea el sitio de unión de las guías CRISPR.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)
MCTP2bHMA-F MCTP2bHMA-R	CAAAGATCAAACAATCAGTTATTAG ATCTCAACGACCCTCACTGGCAC	629
Tyr-F Tyr-R	GAGTCTGCACCTCCCCAGAAGTC CTGACAGAACCCTCGACCTGACTG	104

5.6.4.7 Gel de acrilamida

El DNA amplificado se separó en un gel de acrilamida al 14 %. Preparado de la siguiente manera:

H₂O 2.8 ml
 Acrilamida 30% 3.1 ml (Solución de acrilamida y bisacrilamida, 29:1)
 TBE 5X 1.16 ml
 TMED 2.04 µl

PSA 10% 40.66 µl

- Se cargaron 200 ng de DNA por carril utilizando buffer de carga.
- Se corrió a 100 V por 3.5 h.
- Se tiñó 5 min con bromuro de etidio y se enjuagó con agua corriente.

En los amplicones donde hubo edición del DNA se forma un apareamiento erróneo que retrasa la corrida del DNA, formándose los heterodúplex, como se muestra en la Figura 8.

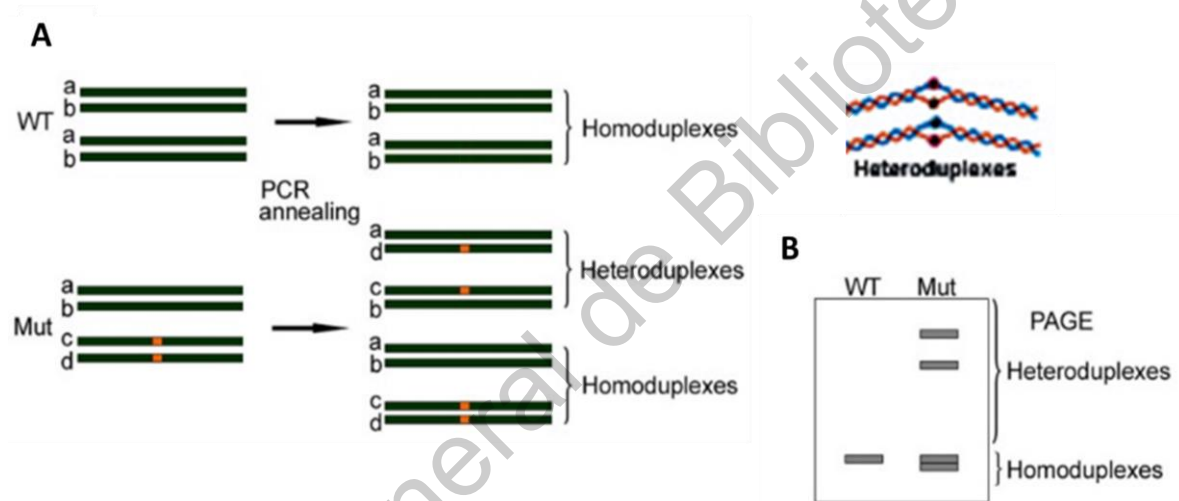


Figura 8. A) Esquema del principio de la genotipificación por ensayo de movilidad de heterodúplex. B) Esquema de un gel de poliacrilamida mostrando el patrón de corrida de los heterodúplex.

5.6.5 Genotipificación por secuenciación

Para confirmar que las muestras que resultaron positivas a la formación de heterodúplex tuvieran el DNA editado, y determinar el tipo de edición, se extrajo DNA genómico de una parte de los embriones microinyectados utilizando el protocolo del apartado 5.6.5.4 y se amplificó un fragmento corto flanqueando el sitio blanco de la guía utilizando las condiciones del apartado 5.6.4.6 utilizando el par de oligos PTguides1-2 para las guías 1 y 2, y los oligos PTguides3 para la guía 3 (tabla

6), cada fragmento se clonó utilizando las condiciones del apartado 5.4.2 y se mandaron secuenciar 10 clonas de cada uno.

Tabla 6. Oligonucleótidos específicos utilizados para amplificar un fragmento de DNA genómico de los exones 2 y 4 del gen *mctp2b* (Figura 6-A).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)
PTguides1-2-F PTguides1-2-R	GAAATCAACTTGTCTGAGTTGCC TGTTTTCTTTCTCCTCAGGGTC	169
PTguide3-F PTguide3-R	GTTTGTTTTATTTGTGTTTGGCA CTGTGGGCATTCAGGTTTAAGT	180

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación del patrón de expresión de los genes *mctp* del pez cebra

6.1.1 Extracción de RNA total de pez cebra

Se extrajo RNA total de mezclas de 3 peces de cada edad indicada en la Figura 3. Se analizaron estas edades, debido a que son etapas del desarrollo importantes: 1) El embrión recién fertilizado, cuando todavía no comienza a sintetizar sus propios RNA mensajeros; 2) Gástrula, donde las células comienzan a diferenciarse en las líneas celulares que darán lugar a los órganos y tejidos; 3) 18 somita, que es cuando el corazón ya está desarrollado; 4) Prim 5 donde los órganos están completamente formados; 5) Periodo de eclosión; 6) Larva de 5 dpf, comienza a alimentarse y sus órganos y sistemas principales están desarrollados. La integridad del RNA se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, como se muestra en la Figura 9.

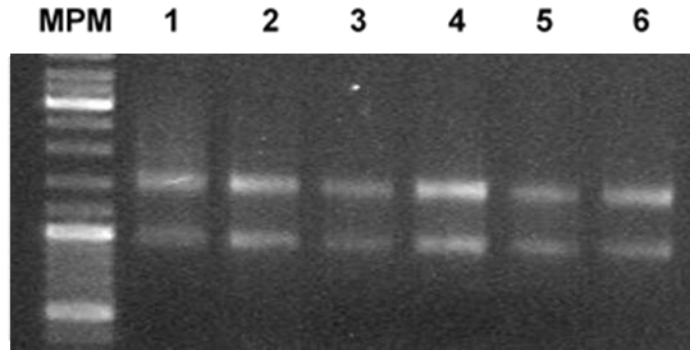


Figura 9. Gel de agarosa representativo con 1 μ l de RNA total extraído de pez cebra por carril. El número indica la etapa del desarrollo correspondiente a las etapas mostradas en la Figura 3.

6.1.2 Amplificación por RT-PCR

Para determinar el patrón de expresión de los genes *mctp* en las diferentes etapas del desarrollo, se amplificó un fragmento de cada gen utilizando un par de oligonucleótidos específicos diseñados en regiones no-homólogas y entre intrones, de tal manera que no hubiera amplificación cruzada o amplificación a partir de contaminación de DNA genómico. Como control positivo, se amplificó un fragmento del gen ubicuo tubulina; y como control negativo, se usaron mezclas de reacción sin RNA (DNA genómico de pez cebra 24 hpf y agua libre de RNasas). Como se puede observar en la Figura 10-A, se encontró que los cuatro genes *mctp* se expresan a través del desarrollo, desde que el embrión está recién fertilizado, lo que indica que hay RNA mensajero materno, ya que, en esta etapa, aun no comienzan a expresarse los RNA mensajeros propios del embrión. Este hallazgo nos sugiere que la función de las proteínas codificadas en estos genes puede ser esencial para el desarrollo.

Además, como se observa en la Figura 10-B, también se determinó que había expresión de los cuatro genes *mctp* en todos los tejidos de pez cebra adulto analizados. En un trabajo anterior, se detectó MCTP1 en varios órganos, incluidos cerebro, riñón, hígado, corazón, pulmón, músculo esquelético, testículo y bazo (Qiu *et al.*, 2015).

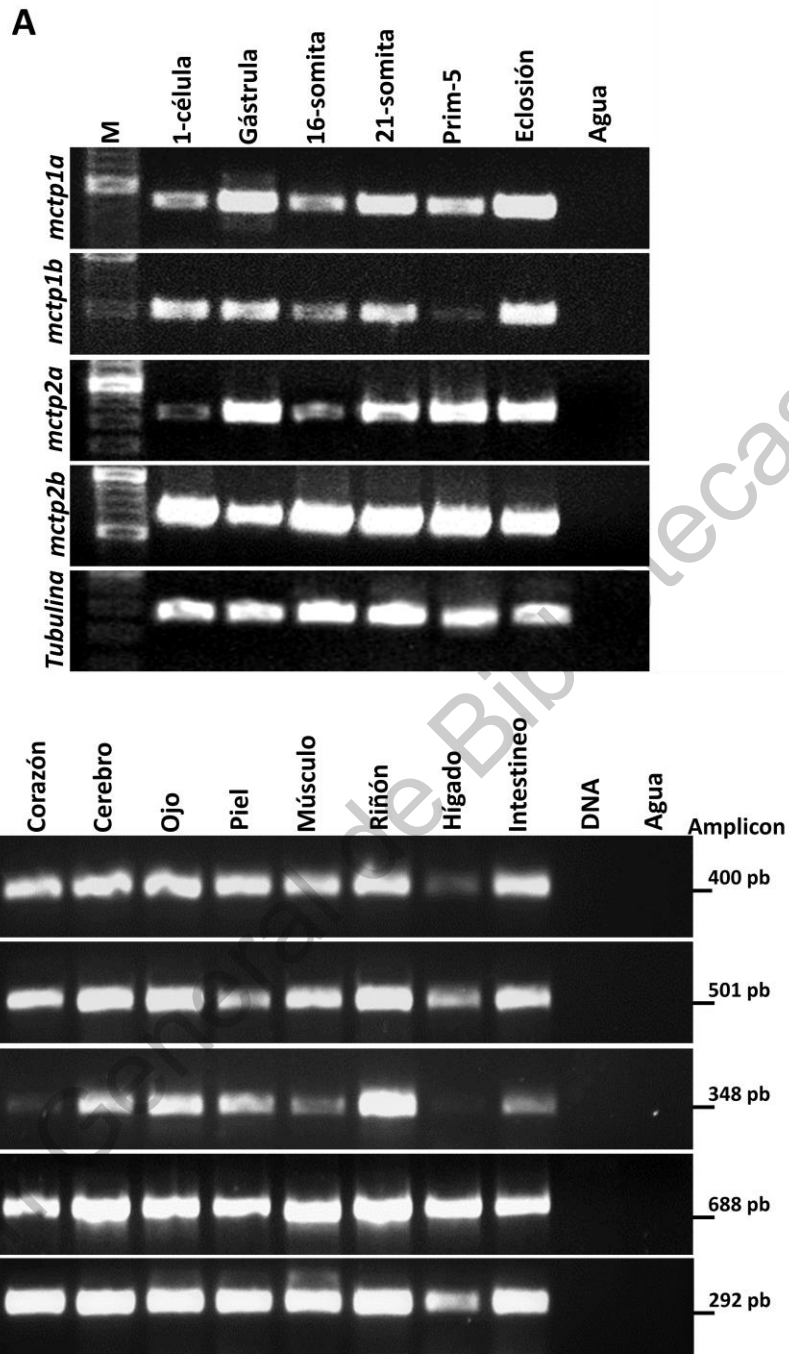


Figura 10. Geles de agarosa al 1.5 % con 1 μ l de amplificación por RT-PCR de un fragmento de cada gen *mctp* y de tubulina (control positivo) a partir de RNA de A) embriones de pez cebra en las etapas de desarrollo mostradas en la Figura 3, B) tejidos de pez cebra adulto macho.

6.2 Caracterización molecular de la secuencia codificantes de los genes *mctp* del pez cebra

6.2.1 Determinación de la secuencia codificantes de los genes *mctp* del pez cebra

Para determinar las secuencias codificantes de los genes *mctp*, se diseñaron oligonucleótidos con base en los marcos de lectura abiertos putativos de los genes *mctp* reportadas en el genoma del pez cebra, versión GRCz11 (Tabla 3). Se amplificaron por RT-PCR, los amplicones se clonaron en el vector pGEMT-Easy (Promega) y se mandaron secuenciar 10 clonas completas de cada uno utilizando oligonucleótidos del vector y oligonucleótidos internos. Las secuencias resultantes se ensamblaron utilizando el programa ChromasPro 2.1.8 (Technelysium). En la Figura 11 se muestra el gel de agarosa con la amplificación de los cDNA completos de cada gen *mctp*, el gel con los mismos cDNAs purificados, y un gel representativo de clonas enviadas a secuenciar.

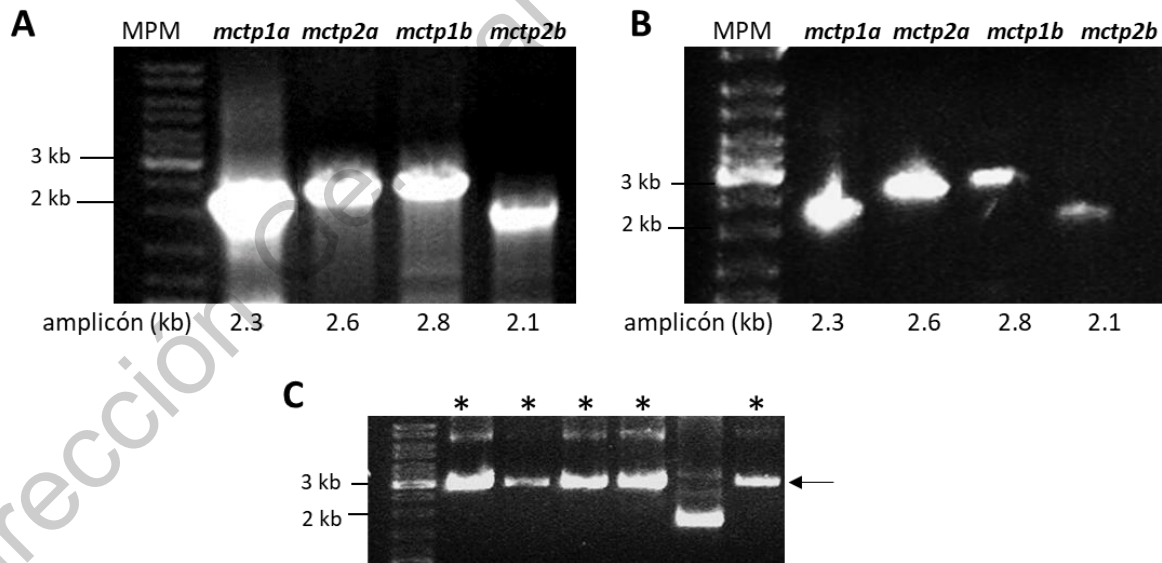


Figura 11. Geles de agarosa al 1.5 % con 1 μ l de A) el cDNA amplificado por RT-PCR, B) el cDNA de A purificado y C) clonas representativas mandadas a secuenciar (marcadas con asteriscos).

Las secuencias ensambladas completas, mostradas en el anexo 1, se tradujeron a secuencia aminoacídica utilizando el programa ExPASy (Artimo *et al.*, 2012) y se muestran en el anexo 2. Se hicieron alineamientos, tanto de las secuencias nucleotídicas obtenidas (anexo 3), como de las secuencias aminoacídicas (anexo 4), esto utilizando el software Mega X (Kumar *et al.*, 2018). Se encontró que tres de los cuatro genes presentan eventos de empalme alternativo, dando como resultado al menos nueve proteínas con diferencias en las asas localizadas entre los dominios C2: tres variantes de *mctp1a*, dos de *mctp1b*, una de *mctp2a* y dos de *mctp2b*. Además, se encontró una alta frecuencia de cambios nucleotídicos en todas las variantes. En la Figura 12 se muestra un esquema de las isoformas encontradas de cada gen indicando los sitios donde se localiza las diferencias entre las isoformas generadas por eventos de empalme alternativos.

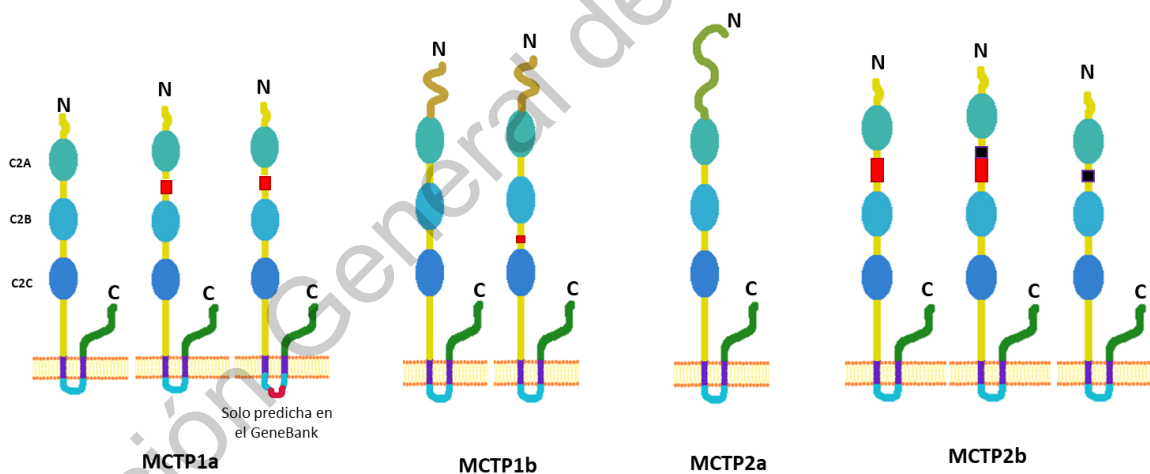


Figura 12. Esquema de las isoformas encontradas de las proteínas Mctp del pez cebra. Los recuadros rojos y negros indican los sitios donde se encontraron diferencias generadas por eventos de empalme alternativo.

6.2.2 Análisis de las secuencias aminoacídicas de las proteínas Mctp del pez cebra

Se hizo un alineamiento de las secuencias de la isoforma más frecuente de cada una de las proteínas con la secuencia de las proteínas de humano y de los principales modelos de mamífero (rata y ratón), los cuales tienen 2 proteínas (MCTP1 Y MCTP2), y con los principales modelos de invertebrados (*C. elegans* y *D. melanogaster*) los cuales tienen solo una proteína (MCTP). Como se puede observar en la Figura 13, hay una alta homología en las regiones correspondientes a los dominios C2 y pases transmembranales; sin embargo, en la secuencia amino-terminal hay una alta variabilidad. Las proteínas Mctp1a y Mctp1b de pez cebra parecen estar evolutivamente más cercanas a las proteínas MCTP1 de mamífero y las proteínas Mctp2a y 2b de pez cebra a las MCTP2 de mamífero como se observa en la Figura 14.

La identidad de secuencia entre el pez cebra y las proteínas MCTP humanas es 46-76% y es mayor en los dominios C2 predichos, particularmente el dominio C2C (identidad de hasta 91.45%). Los sitios de unión de Ca^{2+} también se conservan, lo que sugiere una función conservada.

Además, utilizando el programa Chimera 1.13 (Pettersen *et al.*, 2004), se creó un modelo de la posible estructura de cada una de las proteínas Mctp del pez cebra. En las cuatro proteínas se predice la misma estructura. En la Figura 15 se muestra la estructura de Mctp2b como Figura representativa. Se observó que en las cuatro proteínas se predicen los dos pases transmembranales; además, se observó que los dominios C2A y C2B se localizan juntos. En los tres dominios C2, los sitios putativos de unión a Ca^{2+} se localizan en la cara externa superior de cada dominio; además, en los sitios C2A y C2B se localizan los clústers de posible unión a PtdIns(4,5)P2 viendo hacia la cara lateral externa del mismo lado.

MCTP utilizadas para la alineación son de: *C. elegans*, número de acceso de GenBank CCD68502.1 (Ce-MCTP); *D. melanogaster*, número de acceso de GenBank NP_611372.3 (Dm-MCTP); *M. musculus*, número de acceso de GenBank XP_006517525.3 (Mm-MCTP1) y NP_001019874.1 (Mm-MCTP2); *R. norvegicus*, número de acceso de GenBank XP_017446641.1 (Rn-MCTP1) y NP_001178554.1 (Rn-MCTP2); *H. sapiens*, número de acceso de GenBank AAT73058.1 (Hs-MCTP1) y AAT73060.1 (Hs-MCTP2); *D. rerio*, número de acceso de GenBank MK532709 (Dr-Mctp1a), MK532711 (Dr-Mctp1b), MK532713 (Dr-Mctp2a) y MK532718 (Dr-Mctp2b). La alineación de secuencias se generó utilizando el programa Mega X con edición manual.

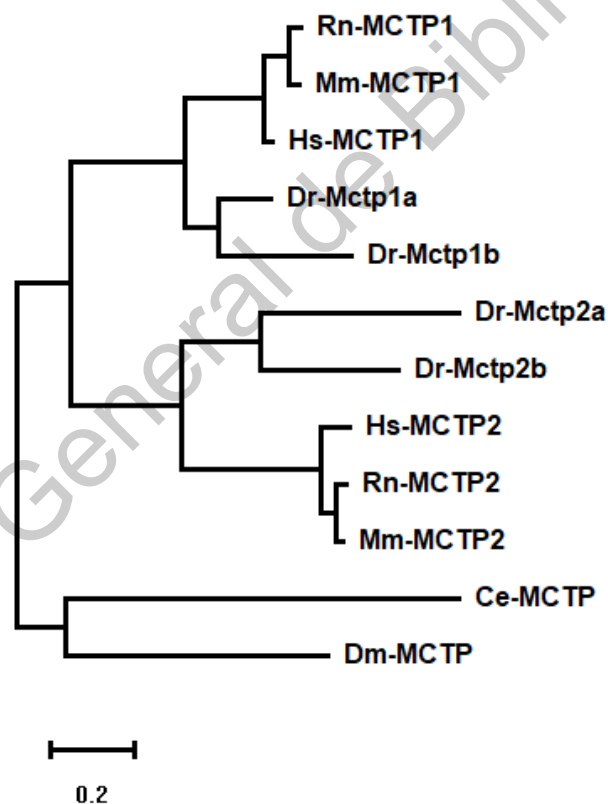


Figura 14. Árbol filogenético generado con MEGA-X utilizando el método de probabilidad máxima (Kumar, Stecher, Li, Knyaz y Tamura, 2018) basado en la alineación mostrada en la Figura 13. Rn, rata; Mm, ratón, Hs, humano, Dr, pez cebra. La barra de escala representa la sustitución de 0.2 aminoácidos.

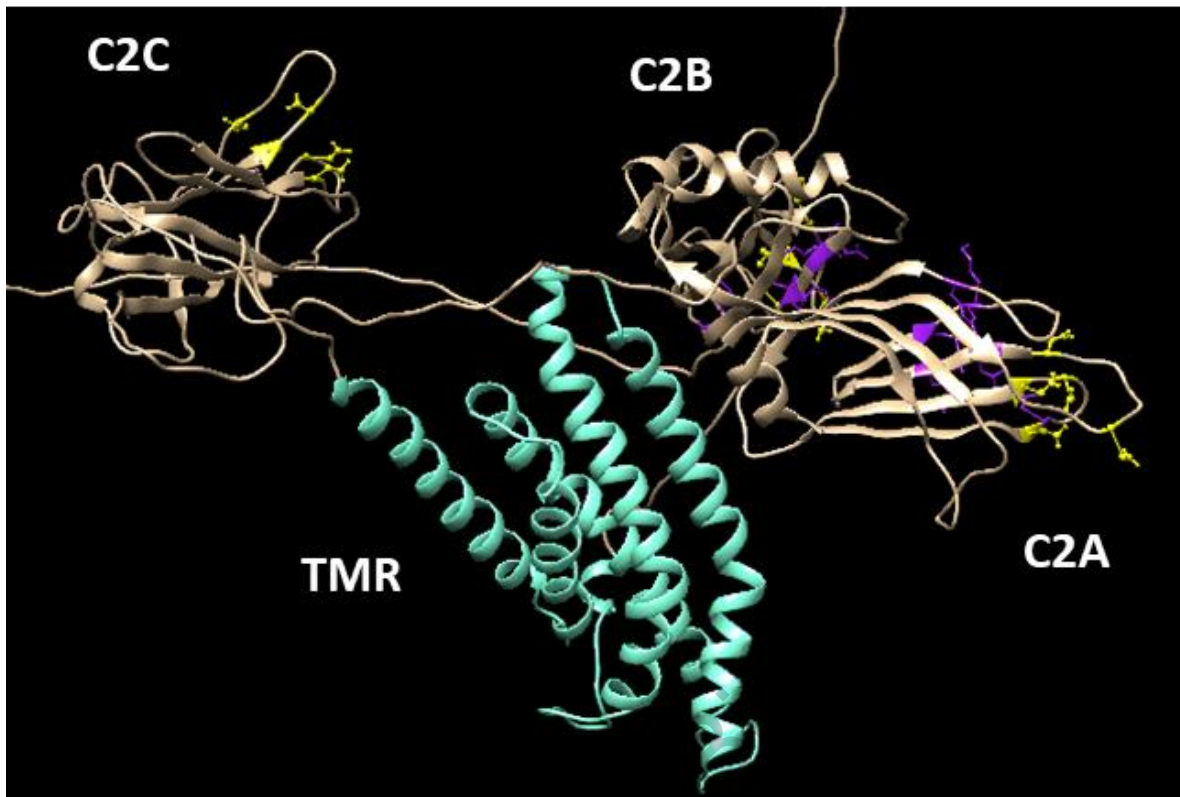


Figura 15. Modelo de la estructura de la proteína Mctp2b de pez cebra, en amarillo se muestran los aminoácidos conservados de unión a Ca^{2+} , en violeta los aminoácidos del clúster de unión a $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ y las regiones transmembranales se muestran en cian.

6.3 Patrón de distribución de la expresión de los genes *mctp* de pez cebra

Se determinó el patrón de distribución de la expresión de los genes *mctp* en el pez cebra a través del desarrollo. Esto se hizo por hibridación *in situ* utilizando sondas de RNA marcadas con digoxigenina. Para esto, se amplificaron por RT-PCR fragmentos del RNA mensajero de cada gen en regiones de baja homología (Figura 16-A), utilizando oligonucleótidos específicos. Dichos fragmentos se clonaron en un vector con el promotor T7 RNA polimerasa. En la Figura 16-C se muestra un ejemplo de un gel de agarosa con algunas de las clonas analizadas. Las clonas se caracterizaron por su patrón de restricción con las enzimas indicadas en la Figura 4. En la Figura 16-D se muestra como ejemplo un gel de agarosa con algunas de las clonas digeridas, indicando el sentido en el que los fragmentos se clonaron. Se

escogieron plásmidos de cada uno con el fragmento clonado en sentido contrario para utilizar como templado para sintetizar las sondas con una secuencia complementaria al RNA mensajero de los genes; y otro con el fragmento clonado en sentido para sintetizar sondas para utilizarse como controles negativos.

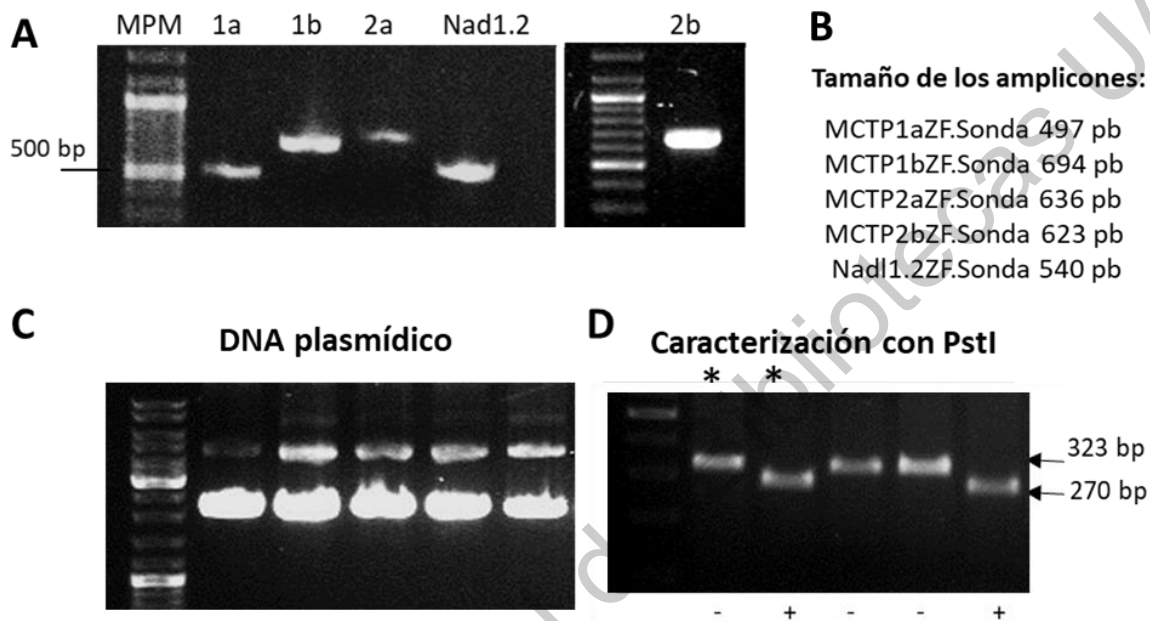


Figura 16. A, gel de agarosa al 1% con los fragmentos de DNA amplificados correspondientes a cada mRNA de los genes *mctp*. B, Tamaño de los fragmentos amplificados en A. C, DNA plasmídico de las clonas pGEMT-Easy que contienen los fragmentos amplificados. D, caracterización por restricción de algunas de las clonas, utilizando las enzimas indicadas en la figura 4. Se indica abajo con un signo (+) los fragmentos clonados en sentido y con un signo (-) los fragmentos clonados en anti-sentido.

Las clonas seleccionadas se propagaron y se purificaron como se muestra en la Figura 17-A. Posteriormente se linealizaron utilizando la enzima indicada en la Figura 4. Los DNA linealizados se purificaron, se cuantificaron, y se verificó su integridad en un gel de agarosa como se muestra en la Figura 17-B. Utilizando estos DNAs linealizados como templados, se sintetizaron las sondas de RNA marcadas con digoxigenina por medio de una reacción de transcripción *in vitro*. Las sondas se

purificaron, se cuantificaron y se verificó su integridad en un gel de agarosa como se muestra en la Figura 17-C.

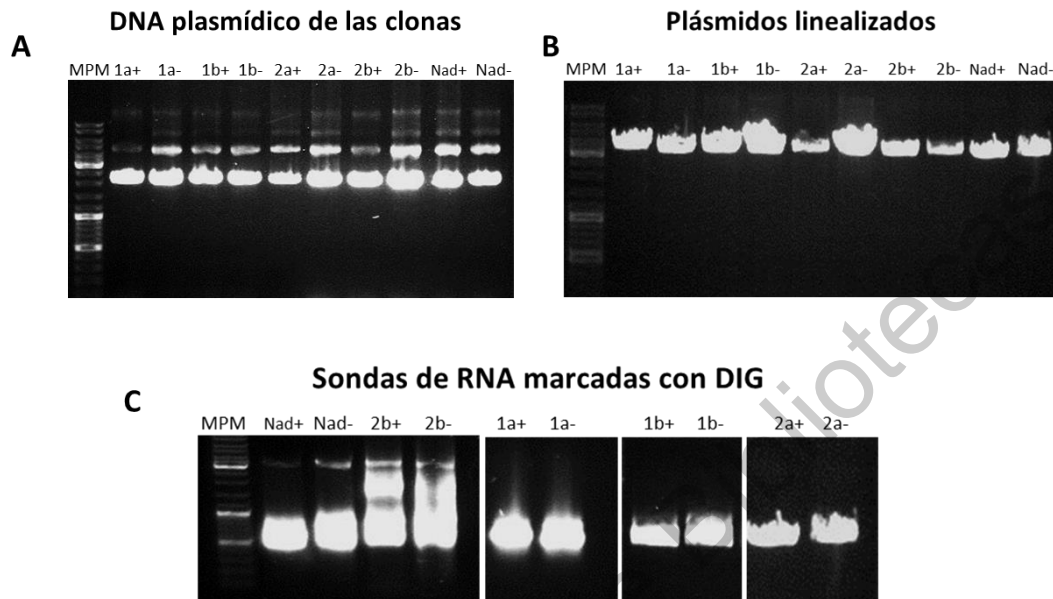


Figura 17. Geles de agarosa al 0.7 % de: A, DNA plasmídico de las clonas con los fragmentos seleccionados para usar como moldes para sintetizar las sondas para hibridación *in situ*; B, los plásmidos linealizados y purificados; C, las sondas de RNA sintetizadas y purificadas.

Para determinar el patrón de distribución de la expresión utilizando las sondas de RNA sintetizadas específicas para cada mRNA de los genes *mctp*, se realizaron hibridaciones *in situ* en embriones de pez cebra durante el desarrollo en las siguientes etapas: 1-célula (0.5 hpf), gástrula (6.5 hpf), 16-somita (16 hpf), 20-somita (20 hpf) y prim-5 (24 hpf). Se hicieron 3 experimentos independientes en las etapas indicadas, probando todas las sondas en cada repetición.

En la etapa de 1-célula, el embrión está recién fertilizado. En esta etapa, el citoplasma fluye hacia el polo animal para formar el blastodisco. Como se muestra en la Figura 18, se observa una fuerte expresión de *mctp2b*. También se observa una expresión marcada de *mctp1a*, aunque de menor intensidad que *mctp2b*. Por

otro lado, se observa baja expresión de *mctp1b*. *mctp2a* muestra la menor expresión.

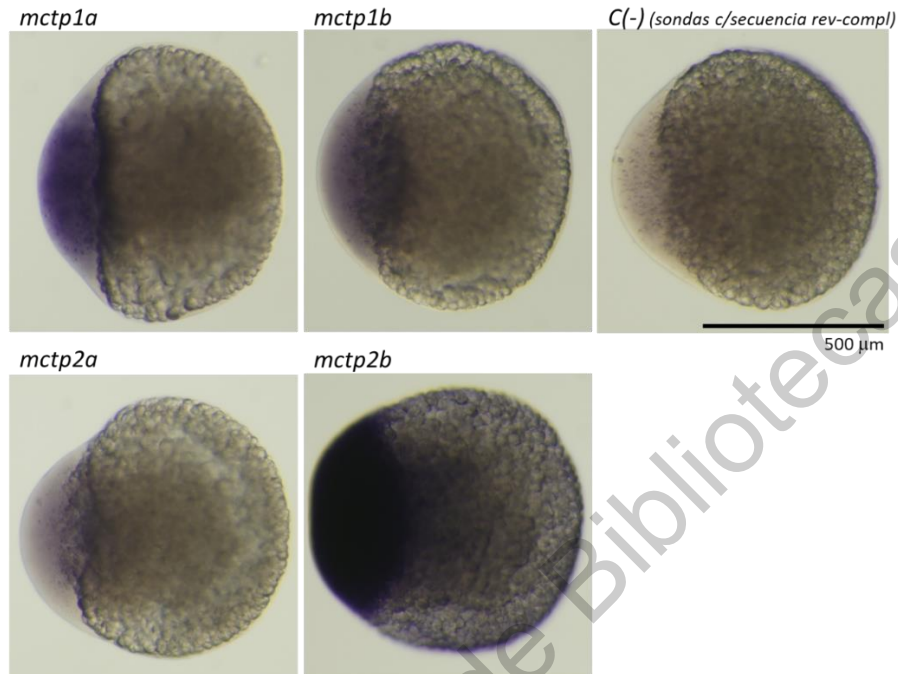


Figura 18. Patrón de la distribución de la expresión de los genes *mctp* en embriones de pez cebra en etapa 1-célula (0.5 hpf) por ISH.

En la etapa de gástrula, el escudo embrionario es visible desde el polo animal y presenta un 50% de epibolia. Como se muestra en la Figura 19, se observa que la expresión de *mctp2a* aumenta, siendo el que más se expresa en esta etapa. *mtp2b* ha disminuido su expresión, mientras que *mctp1a* y *mctp1b* parecen mantener sus niveles de expresión.

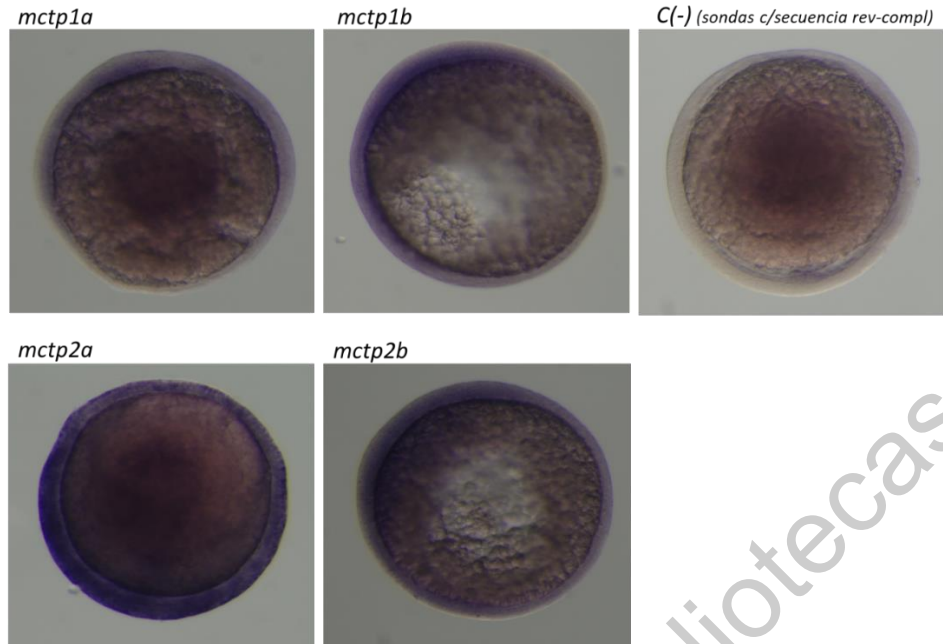


Figura 19. Patrón de la distribución de la expresión de los genes *mctp* en embriones de pez cebra en etapa gástrula (6.5 hpf) por ISH.

En la etapa 16-somita, comienza la organogénesis y el desarrollo de los neurómeros. Como se muestra en la Figura 20, se observa expresión de los genes *mctp* principalmente en las células cercanas al vitelo (como se indica con las flechas). *mctp1a* y *mctp1b* parecen mantener sus niveles de expresión. El nivel de expresión de *mctp2a* ha disminuido y la de *mctp2b* ha aumentado, siendo nuevamente el que más se expresa.

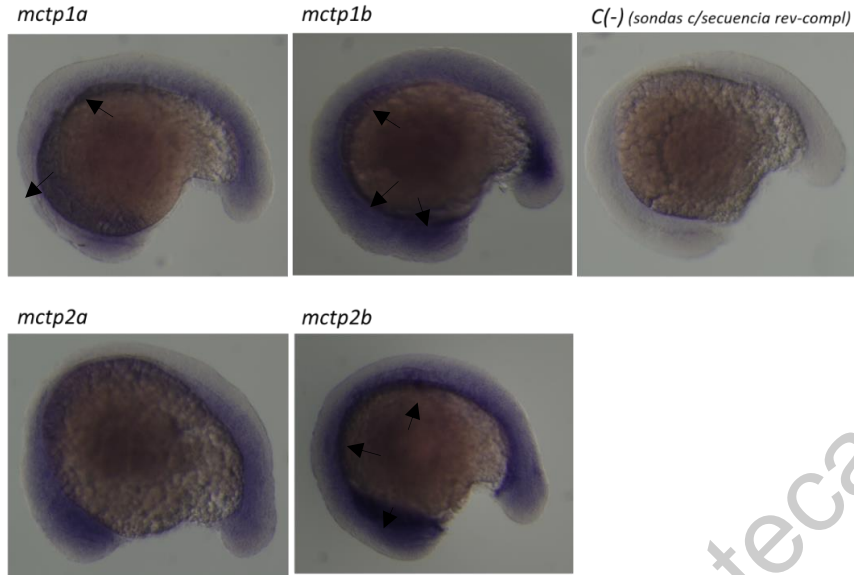


Figura 20. Patrón de la distribución de la expresión de los genes *mctp* en embriones de pez cebra en etapa 16-somita (16 hpf) por ISH.

En la etapa 20-somita, comienza a haber contracciones musculares y se han formado el lente y la vesícula ótica, y los neurómeros del cerebro posterior son prominentes. Como se muestra en la Figura 21, se observa expresión de los genes *mctp* se mantiene con un patrón similar al observado en la etapa 16-somita.

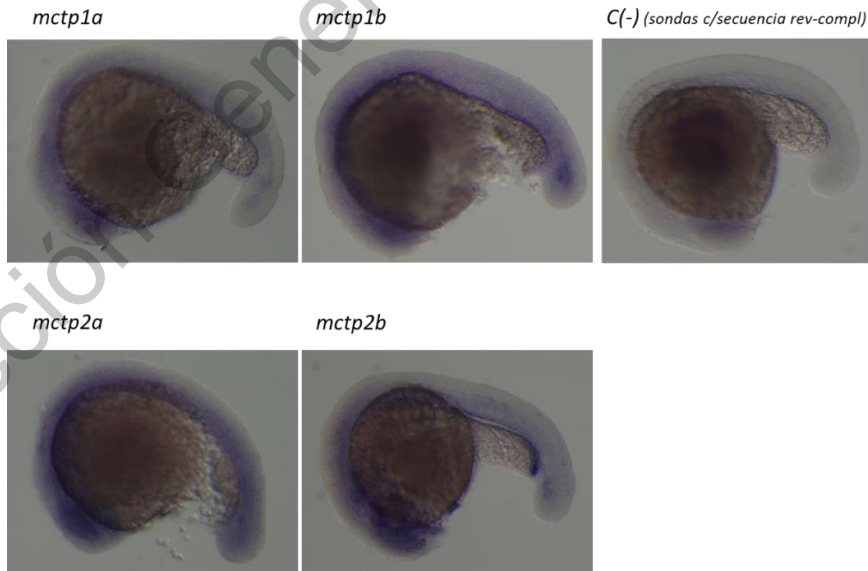


Figura 21. Patrón de la distribución de la expresión de los genes *mctp* en embriones de pez cebra en etapa 20-somita (20 hpf) por ISH.

En la etapa 5-prim, los órganos y tejidos ya están diferenciados y comienza la circulación sanguínea. Como se muestra en la Figura 22, se observa expresión de los cuatro genes principalmente en el cerebro y en el sistema muscular. Nuevamente hay una fuerte expresión de *mctp2b*, una expresión marcada de *mctp2a* y *mctp1b* y una expresión menor de *mctp1a*. Se observa que la expresión está distribuida a través de todo el cerebro como puede observarse en la Figura 23.

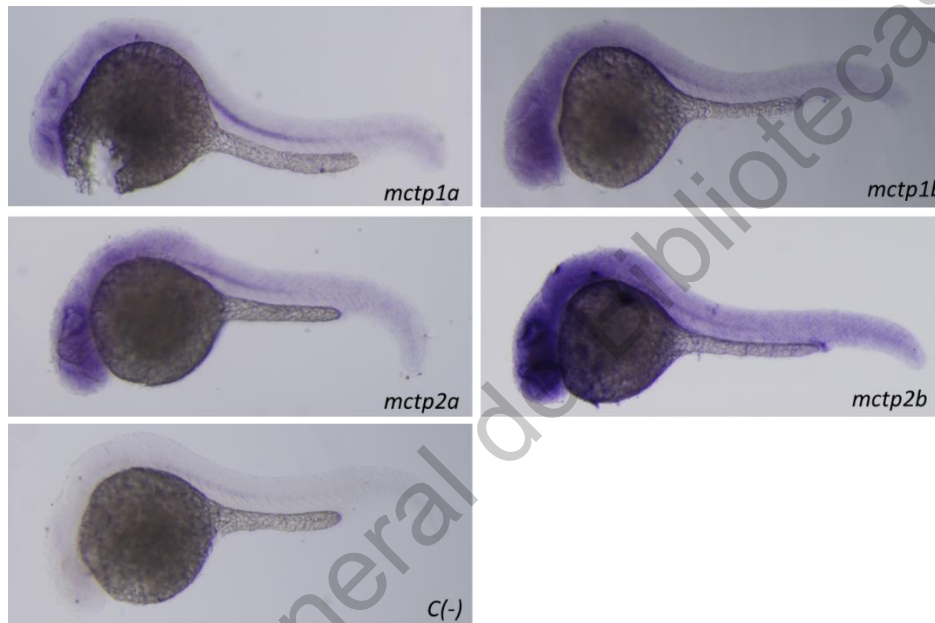


Figura 22. Patrón de la distribución de la expresión de los genes *mctp* en embriones de pez cebra en etapa prim-5 (24 hpf) por ISH.

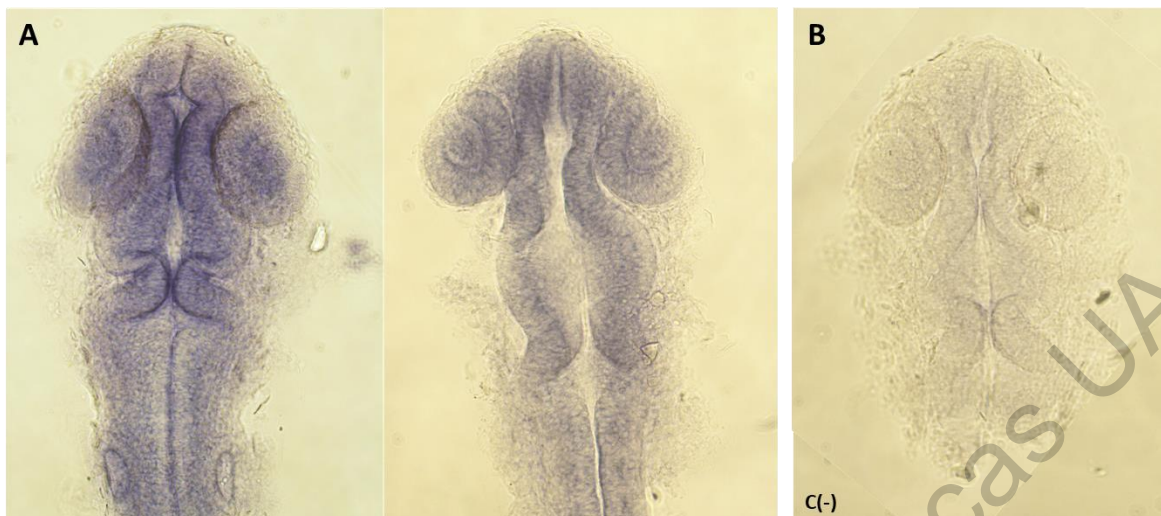


Figura 23. Hibridación *in situ* mostrando: **A)** Expresión del gen *mctp2b* en el cerebro de embriones de pez cebra en etapa prim-5 (24 hpf) (vista dorsal y ventral) y **B)** el control negativo, donde se utiliza una sonda *mctp2b* sentido.

6.4 Efecto de la disrupción del gen *mctp2b* por edición del genoma utilizando el sistema CRISPR/cas9

El gen *mctp2b* mostró la mayor expresión desde la etapa de una célula hasta la etapa prim-5; por lo tanto, se decidió investigar los efectos de la disrupción de este gen. Para esto, se utilizó el sistema CRISPR/Cas9. Se microinyectaron una mezcla de 2 guías CRISPR de RNA junto con mRNA de Cas9. Para la síntesis de las guías, se ensambló el oligonucleótido universal (oligo 2 de la Figura 7) con el correspondiente oligo específico para cada sitio blanco (oligo 1 de la Figura 7, donde las Ns se sustituyen por la secuencia correspondiente mostradas en la tabla 4). En la Figura 24-A se muestra esos oligonucleótidos ensamblados. Se hizo una mezcla del ensamble 1 y 4 y otra del 2 y 3. Se realizó una transcripción *in vitro* utilizando como molde el DNA ensamblado específico de cada guía CRISPR. También se sintetizó mRNA de la enzima Cas9. En la Figura 24-B se muestran estos RNAs utilizados para la mezcla de inyección.

Se hicieron 10 experimentos independientes. En cada uno, se utilizaron embriones recién fertilizados (20-45 minutos post-fertilización), antes de que los embriones llegaran a la etapa de 2-células. Los embriones se dividieron en tres

grupos, una parte se microinyectaron con la mezcla correspondiente a las guías CRISPR de *mctp2b*; otra parte con la guía albino (gen *slc45a2*) como control; y otra parte se dejaron sin inyectar como control negativo. A las 6 horas post-inyección (hpi), se eliminaron los embriones muertos por efecto de la manipulación y la microinyección.

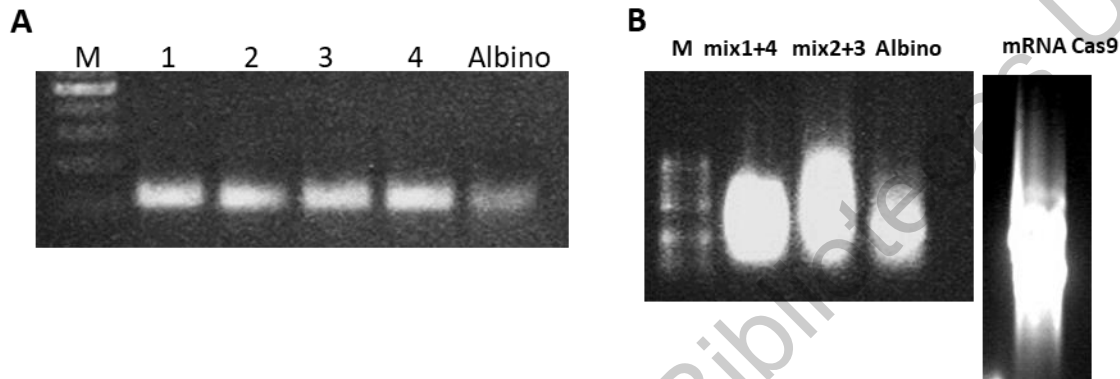


Figura 24. A) gel de agarosa al 2% mostrando los oligonucleótidos ensamblados utilizados como molde para sintetizar las guías CRISPR. **B)** geles de agarosa al 1 % mostrando las guías CRISPR de RNA y el mRNA de Cas9.

A las 24 hpi se observa en los embriones inyectados con las guías *mctp2b* un porcentaje de muerte que va de entre el 24.8 y el 38.8 %. En el control positivo solo se observa una mortalidad del 15 %, mientras que en el control negativo es solo del 3%. Además, de los embriones que sobreviven, se observa un fuerte efecto sobre el desarrollo general de los embriones que va desde un 9.9 a un 19 % (Figura 25 y 26). En el control positivo se observa un fenotipo albino en más del 90 % de los embriones, aunque como se observa en la Figura 26, el grado de despigmentación varía, lo que refleja los diferentes grados de mosaicismo. Sin embargo, no se observan otros efectos evidentes en el desarrollo como el observado en los embriones inyectados con las guías *mctp2b*.

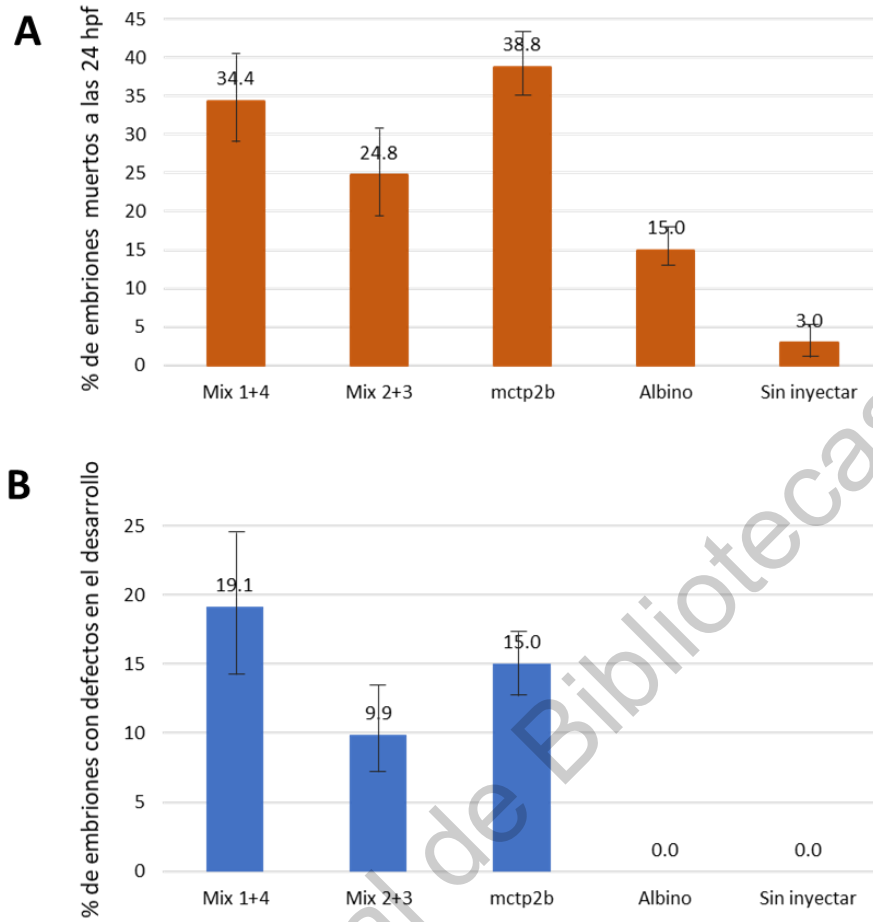


Figura 25. Gráficas mostrando los porcentajes de **A)** mortalidad y **B)** efectos en el fenotipo en los embriones microinyectados con las guías CRISPR. $p=0.001$.

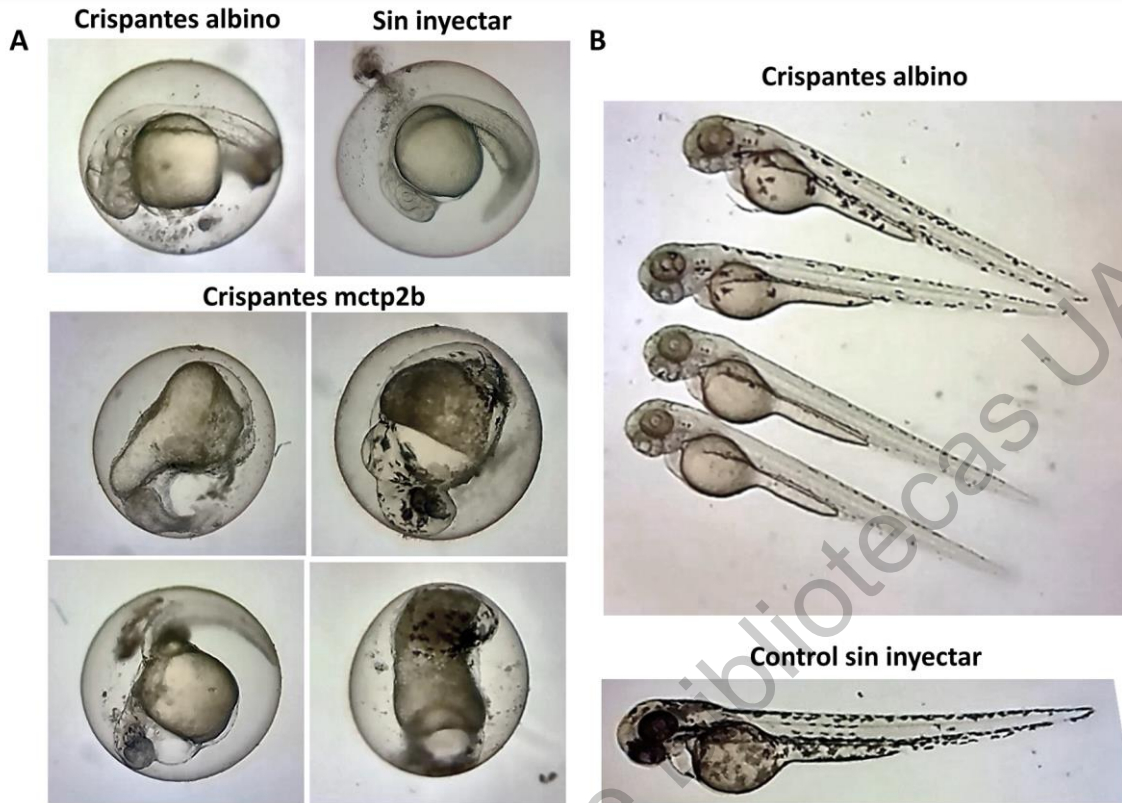


Figura 26. Fenotipo de los embriones editados con el sistema CRISPR. A, control positivo inyectado con la guía albino y control negativo sin inyectar a las 24 hpi. B, control positivo inyectado con la guía albino y control negativo sin inyectar a las 24 hpi. C, inyectados con las guías mctp2b a las 24 hpi.

Para determinar en qué etapa del desarrollo comienza a afectarse el desarrollo de los crispantes de mctp2b, se tomaron fotografías de embriones inyectados con la guía mctp2b y con la guía control albino, esto durante varias etapas del desarrollo. Los resultados se muestran en la Figura 27. Hasta la etapa de blástula, no se observan diferencias en los crispantes de mctp2b comparados con el control albino. En la etapa gástrula, se observa un retraso en el desarrollo de los crispantes mctp2b, el escudo embrionario es más delgado en comparación con los crispantes albinos. En esta etapa se inician los eventos críticos que determinan el destino celular, la internalización y la formación de la capa germinal, estos eventos posiblemente están siendo afectados en los crispantes mctp2b. En la etapa de 10-somita, hay una clara diferencia entre el desarrollo de los crispantes mctp2b

en comparación con los crispantes albinos, el cerebro y el primordio óptico no son distinguibles y no se observa la formación de las somitas. En la etapa 5-prim (24 hpi), los crispantes *mctp2b* mostraron una alta mortalidad (Figura 25). Las larvas que sobreviven a esta etapa presentan defectos de desarrollo: muestran una clara pérdida de simetría y lateralidad, aunque sí presentan contracciones espontáneas típicas; El latido del corazón es evidente pero claramente irregular. Las somitas no se distinguen y presentan claras deformaciones; el pliegue medio de la aleta no es reconocible. La cabeza y los ojos son distinguibles, pero con malformaciones. En contraste, la mayoría de los crispantes albinos tienen un desarrollo normal. Ninguno de los crispantes *mctp2b* afectados sobrevive a las 48 hpi, mientras que todos los crispantes albinos sobreviven.

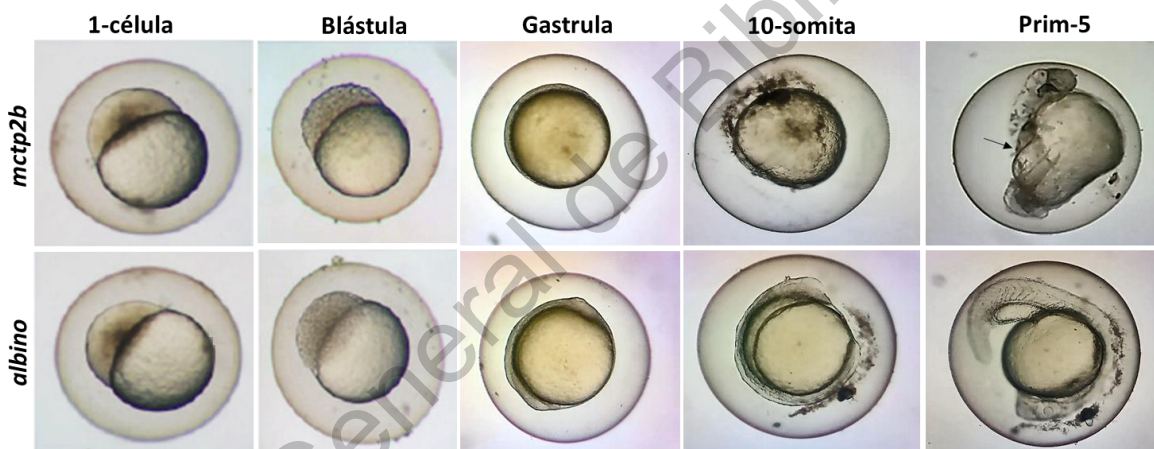


Figura 27. Fenotipo de los crispantes *mctp2b* comparados con el control albino en las etapas de desarrollo indicadas.

6.4.1 Genotipificación

Para determinar si efectivamente había ediciones en el genoma de los embriones inyectados en el sitio blanco, se realizaron ensayos de movilidad de heterodúplex. Para esto, se colectaron mezclas de 3 embriones inyectados en cada condición a las 24 hpf. A partir de estas mezclas de embriones, se amplificó un fragmento de DNA flanqueando el sitio de unión de las guías CRISPR y se corrieron en un gel de poliacrilamida. Se observó formación de heterodúplex en aproximadamente en el 65 % de las mezclas de embriones inyectados con las guías

para mctp2b, mientras que no se encontraron en el control negativo. En la Figura 28 se muestran geles representativos.

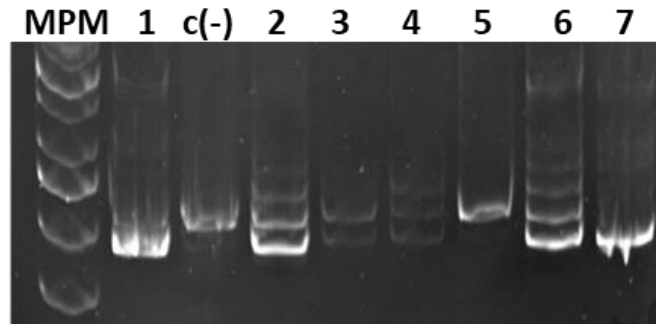


Figura 28. Gel de poliacrilamida mostrando los heterodúplex formados por el apareamiento de los DNAs con ediciones.

Para determinar los tipos de ediciones generadas en los embriones inyectados con las guías mctp2b, se clonaron amplicones de cada mezcla de guías que resultaron positivos en el ensayo de HMA, se clonaron en el vector pJET1.2 (Anexo 6). Se verificó por restricción que las clonas tuvieran insertado el amplicón y se mandaron secuenciar 5 clonas de cada mezcla. En la Figura 29 se muestran los InDels generadas. Como se puede observar, hay una frecuencia mucho más alta de deleciones que de inserciones, y a excepción de dos secuencias, en la mayoría se pierde el marco de lectura abierto, evitando así que la proteína Mctp2b se traduzca correctamente.

Mix guías 1+4

		2302			2366		
Guía1	(1)	-----	AAA	GCCTGCACCGGAGCCTC	-----		
mctp2b seq	(2297)	GGTGTTCATCACTCCC	-----	AAA	GCCTGCACCGGAGCCTC	CATTTCAGATCT	
C2-g1	(74)	GGTGTTCATCACTCCC	-----	AAA	GCCTGCACCGGAGCCTC	CATTTCAGATCT	0
C1-g1	(68)	GGTGTTCATCACTCCC	-----		TGCACCGGAGCCTC	CATTTCAGATCT	-6
C3-g1	(73)	GGTGTTCATCACTCCC	TCC-----		GCCTGCACCGGAGCCTC	CATTTCAGATCT	-1
C4-g1	(72)	GGTGTTCATCACTCCC	AAATTACAATTTGTCT		GCCTGCACCGGAGCCTC	CATTTCAGATCT	+14
C5-g1	(127)	GGTGTTCATCACTCCC	-----		TGCACCGGAGCCTC	CATTTCAGATCT	-6

		86			140	
Guía4	(1)	-----	TACAAGACAACGAGCAAAAC	-----		
mctp2b-pG4	(85)	GATTCAGATTCAGGCTCCA	TACAAGACAACGAGCAAAAC	GGTGTAAAGTATTAACA		
C13-g4	(86)	GATTCAGATTCAGGCTCCA	TACAAGACAACGAGCAAAAC	GGTGTAAAGTATTAACA		0
C11-g4	(22)	GATTCAGATTCAGGCTCCA	TACAAGACAACGAGCAAAAC	GGTGTAAAGTATTAACA		0
C12-g4	(22)	GATTCAGATTCAG	---CA	TACAAGACAACGAGCAAAAC	GGTGTAAAGTATTAACA	-4

Mix guías 1+4

		2268			2320		
Guía2	(1)	-----	GTGACCTGGAGC	CGGG	CCG	-----	
mctp2b seq	(2268)	TTTCCTGTGACCTGGAGC	CGGG	CCGGG	-----	GCAAGGTGGTGTTCATCA	
C6-g2	(68)	TTTCCTGTGACCTGGAGC	CGGG	CCGGG	CCGGG	GCAAGGTGGTGTTCATCA	+5
C14-g2	(67)	TTTCCTGTGACCTGGAGC	CGGG	-----		GCAAGGTGGTGTTCATCA	-5
C15-g2	(69)	TTTCCTGTGACCTGGAGC	TGG	-----		TTTCATCA	-17
C17-g2	(95)	TTTCCTGTGACCTGGAGC	CGGG	---	g	GCAAGGTGGTGTTCATCA	-4
C18-g2	(71)	TTTCCTGTGACCTGGAGC	CGGG	-----		GCAAGGTGGTGTTCATCA	-5
C19-g2	(67)	TTTCCTGTGACCTGGAGC	CGGG	CCGG	g	GCAAGGTGGTGTTCATCA	0
C20-g2	(97)	TTTCCTGTGACCTGGAGC	CGGG	-----		GCAAGGTGGTGTTCATCA	-5
C21-g2	(93)	TTTCCTGTGACCTGGAGC	CGGG	CCGG	g	GCAAGGTGGTGTTCATCA	0

		132			175	
Guía3	(1)	-----	GGAGGGACCTGAGAGATGT	-----		
MCTP2b-pG3	(27)	GTTTGAAGAACACCG	GTGAGGGACCTGAGAGATGT	TGGTTTTTCTC		
C27-g3	(132)	GTTTGAAGAACACCG	GTGAGGGACCTGAGAGATGT	TGGTTTTTCTC		0

Figura 29. InDels encontrados en los embriones inyectados con las guías mctp2b indicadas.

6.5 Discusión general

En este trabajo, confirmamos que el pez cebra tiene cuatro genes *mctp* estructuralmente similares a otros vertebrados e invertebrados (Genç *et al.*, 2017; Qiu *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2005). Amplificamos y secuenciamos las regiones codificantes de los cuatro genes *mctp* del pez cebra y observamos que la identidad de secuencia aminoacídica es del 70% entre Mctp1a y Mctp1b y del 56% entre Mctp2a y Mctp2b. Además, encontramos que todos tienen grados más altos de conservación de secuencia en los dominios C2 y TMR entre ellos y otras especies (Figura 13). Encontramos que hay isoformas resultado de empalme alternativo. En trabajos previos, se ha encontrado que los genes *MCTP1* y *MCTP2* de humano presentan eventos de empalme alternativo, generando variantes de las proteínas codificadas; algunos de ellos poseen solo el segundo TMR (Qiu *et al.*, 2015). También se han reportado diferencias de longitud en la secuencia que separa los dominios C2A y C2B (Shin *et al.*, 2005). Además, el empalme de *MCTP1* en ratas da lugar a tres variantes, dos de ellas con diferencias en la longitud del extremo N-terminal y una proteína truncada adicional que carece de ambos TMR (Qiu *et al.*, 2015). En el pez cebra, no encontramos ninguna isoforma trunca que carezca de TMR, pero encontramos isoformas con diferencias en longitud y secuencia en el conector entre los dominios C2A y C2B, y también entre los dominios C2B y C2C. Estos cambios podrían dar lugar a diferencias en la función de las variantes de proteínas.

También determinamos la distribución de la expresión de los cuatro genes *mctp* en el embrión de pez cebra y en tejidos de adulto. Se encontró la presencia de mRNA de los cuatro genes desde la etapa de 1-célula y en todas las etapas de desarrollo analizadas. Interesantemente, en la etapa de 1-célula, los transcritos de *mctp2b* son notablemente más abundantes que los mRNA de los otros tres genes *mctp*, lo que sugiere que *mctp2b* podría desempeñar un papel importante durante las primeras divisiones celulares. En la etapa prim-5, la mayor expresión se localiza distribuida de manera homogénea a través de todo el sistema nervioso, en todo el cerebro anterior, el mesencéfalo y el cerebro posterior, particularmente alrededor de los ventrículos y la retina. La expresión también se observa a través del sistema muscular y la notocorda. La localización temporal y espacial durante el desarrollo

no se ha explorado en otros vertebrados, pero hay evidencia de que el mRNA de MCTP2 está presente en el corazón de los embriones de ratón, especialmente durante las fases críticas de maduración y morfogénesis del tubo cardíaco primario (Lalani *et al.*, 2013); y de que el mRNA de MCTP1 se encuentra ampliamente distribuido a través del cerebro de rata (Qiu *et al.*, 2015). Además, encontramos la presencia de mRNA de los cuatro genes *mctp* en todos los tejidos de adulto analizados (corazón, cerebro, ojo, piel, músculo, riñón, hígado e intestino). Todos estos resultados coincidieron con el hallazgo de que MCTP1 se expresa ampliamente en el sistema nervioso central, y varios órganos, incluidos cerebro, riñón, hígado, corazón, pulmón, músculo esquelético, testículo y bazo (Qiu *et al.*, 2015).

En otros experimentos realizados en el laboratorio, las secuencias codificantes de los genes *mctp* de pez cebra clonados en este trabajo, se fusionaron a reporteros fluorescentes y se co-transfectaron en cultivos de células HEK-293. Se encontró que las cuatro proteínas Mctp tienen la misma localización intracelular (Espino-Saldaña *et al.*, 2020). Posteriormente, dichas quimeras fluorescentes se electroporaron en peces cebra 24 hpf, y se encontró que la expresión de la proteína Mctp se distribuyen en las neuronas de pez cebra principalmente a través del retículo endoplasmático, y también en una porción de los lisosomas y endosomas (Espino-Saldaña *et al.*, 2020). En otros trabajos, MCTP se ha localizado a nivel celular en retículo endoplasmático, dendritas, axón y terminales presinápticas de las motoneuronas de *D. melanogaster* (Genç *et al.*, 2017); y se observó MCTP1 *in vitro* en vesículas sinápticas neuronales y parcialmente en vesículas de vías de reciclaje secretoras y endocíticas, esto en ratas (Qiu *et al.*, 2015). La localización intracelular de MCTP2 no se ha explorado. Esto sugiere que las proteínas MCTPs podrían tener un papel en la vía de reciclaje endocítica.

Debido a que *mctp2b* mostró un nivel de expresión mayor comparado con *mctp1a*, *mctp1b* y *mctp2a*, se interrumpió la expresión de este gen mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9. En aproximadamente el 30% de los crispantes, encontramos defectos de desarrollo durante el periodo gástrula, una etapa de división celular rápida durante la cual los transitorios de Ca^{2+} son esenciales para la

segregación ooplasmática (Leung, Webb, and Miller 1998). La tasa de supervivencia parcial de los embriones puede explicarse por el mosaicismo observado típicamente en los embriones editados, ya que solo se edita una fracción de las células del pez, y esta fracción varía dependiendo de la eficiencia de la guía CRISPR y de la inyección *per se*. Por lo que una fracción de las células estaría expresando la proteína Mctp2b, permitiendo que el embrión se desarrolle hasta etapas posteriores, aunque con defectos evidentes.

En resumen, en este trabajo proporcionamos evidencia experimental de la expresión de los genes *mctp* en el pez cebra. Encontramos que hay isoformas generadas por empalme alternativo. Aunque todavía no tenemos evidencia concluyente del papel funcional de las proteínas Mctps en la célula, está claro que Mctp2b es funcionalmente relevante para el desarrollo embrionario.

VII. CONCLUSIONES

- Se identificaron cuatro genes predichos en el genoma del pez cebra ubicados en diferentes cromosomas; se determinó que presentan eventos de empalme alternativo, dando como resultado a al menos nueve proteínas con diferencias en las asas localizadas entre los dominios C2: tres variantes de *mctp1a*, dos de *mctp1b*, una de *mctp2a* y tres de *mctp2b*. Además, se encontró una alta frecuencia de cambios nucleotídicos en todas las variantes.
- Se determinó el patrón de expresión diferencial de los genes *mctp* durante el desarrollo del pez cebra. Se encontró que todos se expresan a través del desarrollo; y en varios tejidos de pez cebra adulto.
- Se determinó el patrón de distribución de la expresión de los genes *mctp* durante el desarrollo del pez cebra. En embriones recién fertilizados el mRNA de *mctp2b* se encuentra abundantemente, y en menor proporción *mctp1a*, *mctp1b* y *mctp2a*. La expresión de *mctp2b* va disminuyendo y en la etapa 16-somita donde comienza la organogénesis y el desarrollo de los neurómeros, se observa solo en las células cercanas al vitelo; después de esta etapa, comienza a aumentar su expresión. Por otro lado, *mctp2a* presenta un pico máximo de expresión en la etapa de gástrula; mientras que *mctp1a* y *mctp1b* parecen mantener un nivel de expresión constante durante todo el desarrollo. En la etapa 5-prim, donde los órganos y tejidos ya están diferenciados y comienza la circulación sanguínea, los cuatro genes se expresan principalmente a través del sistema nervioso y en menor medida en el sistema muscular siendo también *mctp2b* es el que más se expresa.
- Se determinó que la disrupción del gen *mctp2b* afecta dramáticamente el desarrollo, indicando que la proteína Mctp2b es funcionalmente relevante para el desarrollo embrionario.

VIII. REFERENCIAS

- Albadri, Shahad, Filippo Del Bene, and Céline Revenu. 2017. "Genome Editing Using CRISPR/Cas9-Based Knock-in Approaches in Zebrafish." *Methods* 121–122:77–85.
- Artimo, P., M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. de Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier, E. Gasteiger, A. Grosdidier, C. Hernandez, V. Ioannidis, D. Kuznetsov, R. Liechti, S. Moretti, K. Mostaguir, N. Redaschi, G. Rossier, I. Xenarios, and H. Stockinger. 2012. "ExpASy: SIB Bioinformatics Resource Portal." *Nucleic Acids Research* 40(W1):W597–603.
- Ashbrook, David G., Robert W. Williams, Lu Lu, and Reinmar Hager. 2015. "A Cross-Species Genetic Analysis Identifies Candidate Genes for Mouse Anxiety and Human Bipolar Disorder." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9:171.
- Blader, P. and U. Strähle. 2000. "Zebrafish Developmental Genetics and Central Nervous System Development." *Human Molecular Genetics* 9(6):945–51.
- Bonventre, Josephine A., Chelsea Holman, Aayushi Manchanda, Sara J. Coddling, Trisha Chau, Jacob Huegel, Carrie Barton, Robert Tanguay, and Colin P. Johnson. 2018. "Fer1l6 Is Essential for the Development of Vertebrate Muscle Tissue in Zebrafish." *Molecular Biology of the Cell* 30(3):293–301.
- Bornschein, Grit and Hartmut Schmidt. 2019. "Synaptotagmin ca 2+ Sensors and Their Spatial Coupling to Presynaptic ca v Channels in Central Cortical Synapses." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11(January):1–15.
- Brinkman, Eva K., Tao Chen, Mario Amendola, and Bas van Steensel. 2014. "Easy Quantitative Assessment of Genome Editing by Sequence Trace Decomposition." *Nucleic Acids Research* 42(22):e168–e168.
- Burgoyne, Robert D., Nordine Helassa, Hannah V. McCue, and Lee P. Haynes. 2019. "Calcium Sensors in Neuronal Function and Dysfunction." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11(5).
- Cai, Mengxin, Lichen Han, Lusha Liu, Feng He, Wuying Chu, Jianshe Zhang, Zhenjun Tian, and Shaojun Du. 2019. "Defective Sarcomere Assembly in *Smyd1a* and *Smyd1b* Zebrafish Mutants." *The FASEB Journal* fj.201801578R.
- Chatterjee, Paroma, Murugesh Padmanarayana, Nazish Abdullah, Chelsea L. Holman,

- Jane LaDu, Robert L. Tanguay, and Colin P. Johnson. 2015. "Otoferlin Deficiency in Zebrafish Results in Defects in Balance and Hearing: Rescue of the Balance and Hearing Phenotype with Full-Length and Truncated Forms of Mouse Otoferlin." *Molecular and Cellular Biology* 35(6):1043–54.
- Cho, W. and R. Stahelin. 2006. "Membrane Binding and Subcellular Targeting of C2 Domains." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761(8):838–49.
- Corbalan-Garcia, Senena and Juan C. .. Gómez-Fernández. 2014. "Signaling through C2 Domains: More than One Lipid Target." *Biochimica et Biophysica Acta* 1838(6):1536–47.
- Cordero-maldonado, Maria Lorena, Simon Perathoner, Kees-jan Van Der Kolk, Ralf Boland, Ursula Heins-marroquin, Herman P. Spaink, Annemarie H. Meijer, Alexander D. Crawford, Jan De Sonnevile, and Bad Nauheim. 2018. "Deep Learning Image Recognition Enables Efficient Genome Editing in Zebrafish by Automated Injections." (Mlcm):1–18.
- D'Agostino, Ylenia, Annamaria Locascio, Filomena Ristoratore, Paolo Sordino, Antonietta Spagnuolo, Marco Borra, and Salvatore D'Aniello. 2015. "A Rapid and Cheap Methodology for CRISPR/Cas9 Zebrafish Mutant Screening." *Molecular Biotechnology*.
- Djurovic, Srdjan, Stephanie Le Hellard, Anna K. Kähler, Erik G. Jönsson, Ingrid Agartz, Vidar M. Steen, Håkan Hall, August G. Wang, Henrik B. Rasmussen, Ingrid Melle, Thomas Werge, and Ole a. Andreassen. 2009. "Association of MCTP2 Gene Variants with Schizophrenia in Three Independent Samples of Scandinavian Origin (SCOPE)." *Psychiatry Research* 168(3):256–58.
- Di Donato, Vincenzo, Flavia De Santis, Thomas O. Auer, Noé Testa, Héctor Sánchez-Iranzo, Nadia Mercader, Jean-Paul Concordet, and Filippo Del Bene. 2016. "2C-Cas9: A Versatile Tool for Clonal Analysis of Gene Function." *Genome Research* 26(5):681–92.
- Espino-Saldaña, Ángeles Edith, Karina Duran-Rios, Eduardo Olivares-Hernandez, Roberto Rodriguez-Ortiz, Fausto Arellano-Carbajal, and Ataúlfo Martínez-Torres. 2020. "Temporal and Spatial Expression of Zebrafish Mctp Genes and Evaluation of Frameshift Alleles of Mctp2b." *Gene*.

- Espino-Saldaña, Angeles Edith, Roberto Rodríguez-Ortiz, Elizabeth Pereida- Jaramillo, and Ataúlfo Martínez-Torres. 2019. "Modeling Neuronal Diseases in Zebrafish in the Era of CRISPR." *Current Neuropharmacology* 17.
- Fernandez, Imma, Demet Araç, Josep Ubach, Stefan H. Gerber, Ok Ho Shin, Yan Gao, Richard G. W. Anderson, Thomas C. Südhof, and Josep Rizo. 2001. "Three-Dimensional Structure of the Synaptotagmin 1 C 2 B-Domain: Synaptotagmin 1 as a Phospholipid Binding Machine." *Neuron* 32(6):1057–69.
- Fontana, Barbara D., Nathana J. Mezzomo, Allan V. Kalueff, and Denis B. Rosemberg. 2018. "The Developing Utility of Zebrafish Models of Neurological and Neuropsychiatric Disorders: A Critical Review." *Experimental Neurology* 299(September 2017):157–71.
- Foster, Samantha D., Sarah R. Glover, Ashley N. Turner, Kiranam Chatti, and Anil K. Challa. 2019. "A Mixing Heteroduplex Mobility Assay (MHMA) to Genotype Homozygous Mutants with Small Indels Generated by CRISPR-Cas9 Nucleases." *MethodsX* 6:1–5.
- Gagnon, James A., Eivind Valen, Summer B. Thyme, Peng Huang, Laila Ahkmetova, Andrea Pauli, Tessa G. Montague, Steven Zimmerman, Constance Richter, and Alexander F. Schier. 2014. "Efficient Mutagenesis by Cas9 Protein-Mediated Oligonucleotide Insertion and Large-Scale Assessment of Single-Guide RNAs" edited by B. Riley. *PLoS ONE* 9(5):e98186.
- Genç, Özgür, Dion K. Dickman, Wenpei Ma, Amy Tong, Richard D. Fetter, and Graeme W. Davis. 2017. "MCTP Is an ER-Resident Calcium Sensor That Stabilizes Synaptic Transmission and Homeostatic Plasticity." *ELife* 6:1–23.
- Herdman, Chelsea and Tom Moss. 2016. "Extended-Synaptotagmins (E-Syts); The Extended Story." *Pharmacological Research* 107:48–56.
- Hildebrand, David Grant Colburn, Marcelo Cicconet, Russel Miguel Torres, Woohyuk Choi, Tran Minh Quan, Jungmin Moon, Arthur Willis Wetzel, Andrew Scott Champion, Brett Jesse Graham, Owen Randlett, George Scott Plummer, Ruben Portugues, Isaac Henry Bianco, Stephan Saalfeld, Alex David Baden, Kunal Lillaney, Randal Burns, Joshua Tzvi Vogelstein, Alexander Franz Schier, Wei-Chung Allen Lee, Won-Ki Jeong, Jeff William Lichtman, and Florian Engert. 2017. "Whole-Brain Serial-Section Electron Microscopy In Larval Zebrafish." *BioRxiv*.

Hisano, Yu, Tetsushi Sakuma, Shota Nakade, Rie Ohga, Satoshi Ota, Hitoshi Okamoto, Takashi Yamamoto, and Atsuo Kawahara. 2015. "Precise In-Frame Integration of Exogenous DNA Mediated by CRISPR/Cas9 System in Zebrafish." *Scientific Reports* 5:8841.

Howe, Kerstin, Matthew D. Clark, Carlos F. Torroja, James Torrance, Camille Berthelot, Matthieu Muffato, John E. Joanna Collins, Sean Humphray, Karen McLaren, Lucy Matthews, Stuart McLaren, Ian Sealy, Mario Caccamo, Carol Churcher, Carol Scott, Jeffrey C. Barrett, Romke Koch, Gerd-Jörg Rauch, Simon White, William Chow, Britt Kilian, Leonor T. Quintais, José A. Guerra-Assunção, Yi Zhou, Yong Gu, Jennifer Yen, Jan-Hinnerk Vogel, Tina Eyre, Seth Redmond, Ruby Banerjee, Jianxiang Chi, Beiyuan Fu, Elizabeth Langley, Sean F. Maguire, Gavin K. Laird, David Lloyd, Emma Kenyon, Sarah Donaldson, Harminder Sehra, Jeff Almeida-King, Jane Loveland, Stephen Trevanion, Matt Jones, Mike Quail, Dave Willey, Adrienne Hunt, John Burton, Sarah Sims, Kirsten McLay, Bob Plumb, Joy Davis, Chris Clee, Karen Oliver, Richard Clark, Clare Riddle, David Elliot, David Elliott, Glen Threadgold, Glenn Harden, Darren Ware, Sharmin Begum, Beverley Mortimore, Beverly Mortimer, Giselle Kerry, Paul Heath, Benjamin Phillimore, Alan Tracey, Nicole Corby, Matthew Dunn, Christopher Johnson, Jonathan Wood, Susan Clark, Sarah Pelan, Guy Griffiths, Michelle Smith, Rebecca Glithero, Philip Howden, Nicholas Barker, Christine Lloyd, Christopher Stevens, Joanna Harley, Karen Holt, Georgios Panagiotidis, Jamieson Lovell, Helen Beasley, Carl Henderson, Daria Gordon, Katherine Auger, Deborah Wright, John E. Joanna Collins, Claire Raisen, Lauren Dyer, Kenric Leung, Lauren Robertson, Kirsty Ambridge, Daniel Leongamornlert, Sarah McGuire, Ruth Gilderthorp, Coline Griffiths, Deepa Manthravadi, Sarah Nichol, Gary Barker, Siobhan Whitehead, Michael Kay, Jacqueline Brown, Clare Murnane, Emma Gray, Matthew Humphries, Neil Sycamore, Darren Barker, David Saunders, Justene Wallis, Anne Babbage, Sian Hammond, Maryam Mashreghi-Mohammadi, Lucy Barr, Sancha Martin, Paul Wray, Andrew Ellington, Nicholas Matthews, Matthew Ellwood, Rebecca Woodmansey, Graham Clark, James D. Cooper, James D. Cooper, Anthony Tromans, Darren Grafham, Carl Skuce, Richard Pandian, Robert Andrews, Elliot Harrison, Andrew Kimberley, Jane Garnett, Nigel Fosker, Rebekah Hall, Patrick Garner, Daniel Kelly, Christine Bird, Sophie Palmer, Ines Gehring, Andrea Berger, Christopher M. Dooley, Zübeyde Ersan-Ürün, Cigdem Eser, Horst Geiger, Maria Geisler, Lena Karotki, Anette Kirn, Judith Konantz, Martina Konantz, Martina

Oberländer, Silke Rudolph-Geiger, Mathias Teucke, Christa Lanz, Günter Raddatz, Kazutoyo Osoegawa, Baoli Zhu, Amanda Rapp, Sara Widaa, Cordelia Langford, Fengtang Yang, Stephan C. Schuster, Nigel P. Carter, Jennifer Harrow, Zemin Ning, Javier Herrero, Steve M. J. Searle, Anton Enright, Robert Geisler, Ronald H. A. Plasterk, Charles Lee, Monte Westerfield, Pieter J. de Jong, Leonard I. Zon, John H. Postlethwait, Christiane Nüsslein-Volhard, Tim J. P. Hubbard, Hugues Roest Crolius, Jane Rogers, and Derek L. Stemple. 2013. "The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome." *Nature* 496(7446):498–503.

Hwang, Woong Y., Yanfang Fu, Deepak Reyon, Morgan L. Maeder, Shengdar Q. Tsai, Jeffry D. Sander, Randall T. Peterson, J. R. Joanna Yeh, and J. Keith Joung. 2013. "Efficient Genome Editing in Zebrafish Using a CRISPR-Cas System." *Nature Biotechnology* 31(3):227–29.

Jao, Li-En, Susan R. Wentz, and Wenbiao Chen. 2013. "Efficient Multiplex Biallelic Zebrafish Genome Editing Using a CRISPR Nuclease System." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(34):13904–9.

Jia Li, Baibing Zhang, Jiwen Bu, Jiulin Du. 2015. "Intron-Based Genomic Editing: A Highly Efficient Method for Generating Knockin Zebrafish." *Oncotarget* (Table 1):7–10.

Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity." *Science* 337(6096).

Kim, Seong-Bin, Salme Timmusk, B. Niu, C. Rueckert, J. Blom, Q. Wang, R. Borriss, W. Raza, W. Yang, Q. R. Shen, S Timmusk, V. Paalme, T. Pavlicek, J. Bergquist, A. Vangala, S Timmusk, P. van West, NA Gow, RP Huffstutler, WM Haggag, S Timmusk, S Timmusk, EG Wagner, QT Phi, YM Park, KJ Seul, CM Ryu, SH Park, QT Phi, SH Oh, YM Park, SH Park, CM Ryu, S. Lai, S. Tabacchioni, S Timmusk, B. Nicander, U. Granhall, E. Tillberg, M. Shaheen, J. Li, AC Ross, JC Vederas, SE Jensen, J. Li, SE Jensen, JF Kim, H. Jeong, SY Park, SB Kim, YK Park, M. Ma, C. Wang, Y. Ding, L. Li, D. Shen, SK Choi, SY Park, R. Kim, SB Kim, CH Lee, SK Choi, SY Park, R. Kim, CH Lee, JF Kim, J. Li, PK Beatty, S. Shah, SE Jensen, F. Friedberg, C. Rhodes, J. Hinds, E. Mahenthiralingam, KE Kempcell, K. Duncan, RW Stokes, SH Oh, KF Chater, S Timmusk, V. Paalme, T. Pavlicek, J. Bergquist, A. Vangala, QT Phi, YM Park, CM Ryu, SH Park, SY Ghim, KA Datsenko, BL Wanner, B. Gust, GL Challis, K. Fowler, T. Kieser, KF Chater, L. Vial, MC Groleau, MG

- Lamarche, G. Filion, J. Castonguay-Vanier, IR Henderson, P. Owen, JP Nataro, CD Bayliss, ME Palmer, MM Metruccio, E. Pigozzi, D. Roncarati, F. Berlanda Scorza, and N. Norais. 2013. "A Simplified Method for Gene Knockout and Direct Screening of Recombinant Clones for Application in *Paenibacillus Polymyxa*" edited by J. Sturtevant. *PLoS ONE* 8(6):e68092.
- Kimmel, Charles B., William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann, and Thomas F. Schilling. 1995. "Stages of Embryonic Development of the Zebrafish." *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* 203(3):253–310.
- Kleinstiver, Benjamin P., Michelle S. Prew, Shengdar Q. Tsai, Ved V. Topkar, Nhu T. Nguyen, Zongli Zheng, Andrew P. W. Gonzales, Zhuyun Li, Randall T. Peterson, Jing-Ruey Joanna Yeh, Martin J. Aryee, and J. Keith Joung. 2015. "Engineered CRISPR-Cas9 Nucleases with Altered PAM Specificities." *Nature* 523(7561):481–85.
- Komor, Alexis C., Ahmed H. Badran, David R Liu, J. P. Guilinger, J. L. Bessen, J. H. Hu, M. L. Maeder, J. K. Joung, Z. Y. Chen, D.R. Liu, and Et Al. 2017. "CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes." *Cell* 168(1–2):20–36.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, and Koichiro Tamura. 2018. "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms" edited by F. U. Battistuzzi. *Molecular Biology and Evolution* 35(6):1547–49.
- Labun, Kornel, Tessa G. Montague, James A. Gagnon, Summer B. Thyme, and Eivind Valen. 2016. "CHOPCHOP v2: A Web Tool for the next Generation of CRISPR Genome Engineering." *Nucleic Acids Research* 44(W1):W272–76.
- Lalani, Seema R., Stephanie M. Ware, Xueqing Wang, Gladys Zapata, Qi Tian, Luis M. Franco, Zhengxin Jiang, Kristine Bucasas, Daryl a. Scott, Philippe M. Campeau, Neil Hanchard, Luis Umaña, Ashley E. Cast, Ankita Patel, Sau W. Cheung, Kim L. McBride, Molly Bray, a. Craig Chinault, Barbara a. Boggs, Miao Huang, Mariah R. Baker, Susan Hamilton, Jeffrey a Towbin, John L. Jefferies, Susan D. Fernbach, Lorraine Potocki, and John W. Belmont. 2013. "MCTP2 Is a Dosage-Sensitive Gene Required for Cardiac Outflow Tract Development." *Human Molecular Genetics* 22(21):4339–48.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland,

L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, Y. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V Olson, R. Kaul, C. Raymond, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blöcker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowki, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P.

- Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y. J. Chen, J. Szustakowki, and International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. "Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome." *Nature* 409(6822):860–921.
- Lek, Angela, Frances J. Evesson, R. Bryan Sutton, Kathryn N. North, and Sandra T. Cooper. 2012. "Ferlins: Regulators of Vesicle Fusion for Auditory Neurotransmission, Receptor Trafficking and Membrane Repair." *Traffic* 13(2):185–94.
- Leung, C. F., S. E. Webb, and A. L. Miller. 1998. "Calcium Transients Accompany Ooplasmic Segregation in Zebrafish Embryos." *Development, Growth & Differentiation* 40(3):313–26.
- Liu, Da, Zhanxiang Wang, An Xiao, Yutian Zhang, Wenyuan Li, Yao Zu, Shaohua Yao, Shuo Lin, and Bo Zhang. 2014. "Efficient Gene Targeting in Zebrafish Mediated by a Zebrafish-Codon-Optimized Cas9 and Evaluation of Off-Targeting Effect." *Journal of Genetics and Genomics* 41(1):43–46.
- Ma, Dongyuan and Feng Liu. 2015. "Genome Editing and Its Applications in Model Organisms." *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 13(6):336–44.
- Maeda, Ikuma, Yuji Kohara, Masayuki Yamamoto, and Asako Sugimoto. 2001. "Large-Scale Analysis of Gene Function in *Caenorhabditis Elegans* by High-Throughput RNAi." *Current Biology* 11(3):171–76.
- Marraffini, Luciano A. and Erik J. Sontheimer. 2010. "CRISPR Interference: RNA-Directed Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea." *Nature Reviews. Genetics* 11(3):181–90.
- Marty, Naomi J., Chelsea L. Holman, Nazish Abdullah, and Colin P. Johnson. 2013. "The C2 Domains of Otoferlin, Dysferlin, and Myoferlin Alter the Packing of Lipid Bilayers." *Biochemistry* 52(33):5585–92.
- Miklowitz, David J. and Jan Scott. 2009. "Psychosocial Treatments for Bipolar Disorder: Cost-Effectiveness, Mediating Mechanisms, and Future Directions." *Bipolar Disorders* 11 Suppl 2:110–22.
- Moreno-Mateos, Miguel A., Charles E. Vejnár, Jean Denis Beaudoin, Juan P. Fernandez, Emily K. Mis, Mustafa K. Khokha, and Antonio J. Giraldez. 2015. "CRISPRscan: Designing Highly Efficient SgRNAs for CRISPR-Cas9 Targeting in Vivo." *Nature*

Methods 12(10):982–88.

- Mueller, Thomas, Mario F. Wullimann, and Su Guo. 2008. “Early Teleostean Basal Ganglia Development Visualized by Zebrafish *Dlx2a*, *Lhx6*, *Lhx7*, *Tbr2* (Eomesa), and *GAD67* Gene Expression.” *The Journal of Comparative Neurology* 507(2):1245–57.
- Mushtaq, Mian Yahya, Robert Verpoorte, and Hye Kyong Kim. 2013. “Zebrafish as a Model for Systems Biology.” *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 29(2):187–205.
- Ota, Satoshi and Atsuo Kawahara. 2014. “Zebrafish: A Model Vertebrate Suitable for the Analysis of Human Genetic Disorders.” *Congenital Anomalies* 54(1):8–11.
- Park, Yongsoo and Je Kyung Ryu. 2018. “Models of Synaptotagmin-1 to Trigger Ca²⁺-Dependent Vesicle Fusion.” *FEBS Letters* 592(21):3480–92.
- Perathoner, Simon, Maria Lorena Cordero-Maldonado, and Alexander D. Crawford. 2016. “Potential of Zebrafish as a Model for Exploring the Role of the Amygdala in Emotional Memory and Motivational Behavior.” *Journal of Neuroscience Research* 94(6):445–62.
- Pérez-Lara, Ángel and Reinhard Jahn. 2015. “Extended Synaptotagmins (E-Syts): Architecture and Dynamics of Membrane Contact Sites Revealed.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(16):4837–38.
- Perin, M. S., V. a Fried, G. a Mignery, R. Jahn, and T. C. Südhof. 1990. “Phospholipid Binding by a Synaptic Vesicle Protein Homologous to the Regulatory Region of Protein Kinase C.” *Nature* 345(6272):260–63.
- Pettersen, Eric F., Thomas D. Goddard, Conrad C. Huang, Gregory S. Couch, Daniel M. Greenblatt, Elaine C. Meng, and Thomas E. Ferrin. 2004. “UCSF Chimera?A Visualization System for Exploratory Research and Analysis.” *Journal of Computational Chemistry* 25(13):1605–12.
- Qiu, Lifeng, Hanry Yu, and Fengyi Liang. 2015. “Multiple C2 Domains Transmembrane Protein 1 (MCTP1) Is Expressed in CNS Neurons and Possibly Regulates Cellular Vesicle Retrieval and Oxidative Stress.” *Journal of Neurochemistry* 1–16.
- Rafferty, Sara A. and T. Alexander Quinn. 2018. “A Beginner’s Guide to Understanding and Implementing the Genetic Modification of Zebrafish.” *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 138:1–17.

- Redpath, Gregory M. I., Reece A. Sophocleous, Lynne Turnbull, Cynthia B. Whitchurch, and Sandra T. Cooper. 2016. "Ferlins Show Tissue-Specific Expression and Segregate as Plasma Membrane/Late Endosomal or Trans-Golgi/Recycling Ferlins." *Traffic* 17(3):245–66.
- Saheki, Yasunori and Pietro De Camilli. 2017. "The Extended-Synaptotagmins." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1864(9):1490–93.
- Scott, Laura J., Pierandrea Muglia, Xiangyang Q. Kong, Weihua Guan, Matthew Flickinger, Ruchi Upmanyu, Federica Tozzi, Jun Z. Li, Margit Burmeister, Devin Absher, Robert C. Thompson, Clyde Francks, Fan Meng, Athos Antoniadis, Audrey M. Southwick, Alan F. Schatzberg, William E. Bunney, Jack D. Barchas, Edward G. Jones, Richard Day, Keith Matthews, Peter McGuffin, John S. Strauss, James L. Kennedy, Lefkos Middleton, Allen D. Roses, Stanley J. Watson, John B. Vincent, Richard M. Myers, Ann E. Farmer, Huda Akil, Daniel K. Burns, and Michael Boehnke. 2009. "Genome-Wide Association and Meta-Analysis of Bipolar Disorder in Individuals of European Ancestry." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(18):7501–6.
- Shao, Xuguang, Imma Fernandez, Thomas C. Südhof, and Josep Rizo. 1998. "Solution Structures of the Ca²⁺-Free and Ca²⁺-Bound C2A Domain of Synaptotagmin I: Does Ca²⁺ Induce a Conformational Change?" *Biochemistry* 37(46):16106–15.
- Shin, O. H., W. Han, Y. Wang, and T. C. Südhof. 2005. "Evolutionarily Conserved Multiple C2 Domain Proteins with Two Transmembrane Regions (MCTPs) and Unusual Ca²⁺ Binding Properties." *Journal of Biological Chemistry* 280(2):1641–51.
- Shupliakov, Oleg and Lennart Brodin. 2010. "Recent Insights into the Building and Cycling of Synaptic Vesicles." *Experimental Cell Research* 316(8):1344–50.
- Simone, Brandon W., Gabriel Martínez-Gálvez, Zachary WareJoncas, and Stephen C. Ekker. 2018. "Fishing for Understanding: Unlocking the Zebrafish Gene Editor's Toolbox." *Methods* (July).
- Stewart, Adam Michael and Allan V Kalueff. 2012. "The Developing Utility of Zebrafish Models for Cognitive Enhancers Research." *Current Neuropharmacology* 10(3):263–71.
- Tunstall, Narelle E., Anabel Herr, Marien de Bruyne, and Coral G. Warr. 2012. "A Screen for Genes Expressed in the Olfactory Organs of *Drosophila Melanogaster* Identifies

Genes Involved in Olfactory Behaviour.” *PLoS ONE* 7(4).

Varshney, Gaurav K., Wuhong Pei, Matthew C. Lafave, Jennifer Idol, Lisha Xu, Viviana Gallardo, Blake Carrington, Kevin Bishop, Marypat Jones, Mingyu Li, Ursula Harper, Sunny C. Huang, Anupam Prakash, Wenbiao Chen, Raman Sood, Johan Ledin, and Shawn M. Burgess. 2015. “High-Throughput Gene Targeting and Phenotyping in Zebrafish Using CRISPR / Cas9.” 1030–42.

Varshney, Gaurav K., Raman Sood, and Shawn M. Burgess. 2015. “Understanding and Editing the Zebrafish Genome.” *Advances in Genetics* 92:1–52.

Vejnar, Charles E., Miguel A. Moreno-Mateos, Daniel Cifuentes, Ariel A. Bazzini, and Antonio J. Giraldez. 2016. “Optimized CRISPR-Cas9 System for Genome Editing in Zebrafish.” *Cold Spring Harbor Protocols* 2016(10):pdb.prot086850.

Washington, Nicole L. and Samuel Ward. 2006. “FER-1 Regulates Ca²⁺-Mediated Membrane Fusion during *C. Elegans* Spermatogenesis.” *Journal of Cell Science* 119(12):2552–62.

Wu, Wenyi, Yanhui Yang, and Hetian Lei. 2018. “Progress in the Application of CRISPR: From Gene to Base Editing.” *Medicinal Research Reviews* (August 2018):665–83.

Wuhong Pei and Shawn M. Burgess. 2019. “Microinjection in Zebrafish for Genome Editing and Functional Studies.” *Methods Mol Biol* 1019:543–61.

Xiao, Jian, Jie Luo, Ao Hu, Ting Xiao, Meixin Li, Zekai Kong, Luyi Jiang, Zimu Zhou, Yacheng Liao, Chang Xie, Beibei Chu, Honghua Miao, Boliang Li, Xiongjie Shi, and Bao Liang Song. 2019. “Cholesterol Transport through the Peroxisome-ER Membrane Contacts Tethered by PI(4,5)P₂ and Extended Synaptotagmins.” *Science China Life Sciences*.

Xu, Xiaoshu and Lei S. Qi. 2018. “A CRISPR–DCas Toolbox for Genetic Engineering and Synthetic Biology.” *Journal of Molecular Biology* 431(1):34–47.

Zhao, Yuliang, Hui Sun, Xiaopeng Sha, Lijia Gu, Zhikun Zhan, Wen Li, Yuliang Zhao, Hui Sun, Xiaopeng Sha, Lijia Gu, Zhikun Zhan, and Wen J. Li. 2018. “A Review of Automated Microinjection of Zebrafish Embryos. *Micromachines* [Internet]. 2018;10(1):7. Available from: [Http://Www.Mdpi.Com/2072-666X/10/1/7](http://www.mdpi.com/2072-666X/10/1/7)ew of Automated Microinjection of Zebrafish Em.” *Micromachines* 10(1):7.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IX. ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de variantes de los cDNA de los genes *mctp* encontradas en el pez cebra.

>*mctp1a* [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 1a, isoform 1

ATGTTAGCACTCTCGCTTTCCTCCGTGGGACAAAGCTTGTCTGGCATCAATATTGTGGAGCCAAGTAATGAC
GAACTTCTCCGTTGCCAAAGCCAAGGATGTATCAGCTGGACATTGTGTTGAAGAAGGGCAATAATCTGGC
CATCAGGGACAGAGGAGGAACGAGTGATCCCTATGTGAAGTTAAGATCGCAGGAAAGGAGGTTTTTCGC
AGCAAGACAATCCACAAGAACCTGAACCCAGTATGGGAGGAGAAAGTCAGTCTGCTGGTGGAGAGTTTGA
GAGAGCCACTTTACGTGAAAGTCTTTGACTATGACTTCGGGCTGCAGGATGACTTTATGGGATCTGCATATC
TCTATTTAGAGTCCCTGGAGCACCAAAGGACTCTGGATGTAACCCTTGACCTCAAAGATCCCCACTATCCCA
AACAGGACCTGGGTTCAGTGGAGCTGGCGGTCACACTAATCCAAAAGAGGGGGATTCAGGGAAGCTCA
TCAGAGTCTGAGGTTATCAGACGTTACAGAAAAGCTCAGCTGTGGAGAGGCATTGTTAGCATCAGTCTCA
TCGAGGCACATGACCTCCAGCCAATGGACAACAATGGCCTTAGTGACCCTTATGTCAAATTCAGACTGGGA
CATCAAAAGTACAAAAGTAAGACGATACCAAAAACTAAACCCCAAGTGGAGAGAGCAGTTTGACTTCCA
TCTCTATGATGAACAGGGTGGTTTTGTTGACATCACTGTTTGGGACAAAGATGCAGGGAAGAAGGATGACT
TCATGGGCAGGTGCCAGGTGGACCTGTCTCTTCTGTCAAAGGAATGCACACACAGACTGGACCTGCCGCTG
GAGGAGGGCGAGGGCATGCTGGTGCTTCTGGTCACCCTTACAGCCTCTGCTGCCGTCTCCATTGCAGACCT
GTCTGTCAACGTAAGTGGACGACCCACATGAGAGGAAAGAGATTCTCCACAGATATAATGTGCCGAGATCCT
TTCACAACATTAAGATGTGGGCATGGTGCAGGTGAAGGTGATCCGTGCCGAGGGGGCTGATGGCAGCTGA
TGTTACAGGCAAGAGTGACCCTTCTGTGTCTGGGGCTCAGCAACGATCGCTTACAGACACACACCGTGT
ACAAAAACCTCAACCCGAGTGGAACAAAGTCTTACGTTCAATGTGAAAGACATTCACTCAGTCTTAGAG
GTGACTGTCTATGATGAGGACAGAGACCGAAGTGCCGACTTCTGGGCAAAGTGCTATACCGTTGTTAAA
TATCCAAAATGGAGAACGCAAAGCTTACGCCTTGAAGCAAGGAAGTACAGGGCCAACCAAAGGGGTC
ATCTTTCTCGAAATAGACGTGATTTATAACGTCGTAAGGCTGGCATGAGAACGCTGATCCCCATCGAGCAG
AAATACATCGAAGAGGAGCCGCGAGTATCTAAACAGCTGCTGCTGCAGAACTTCAACAGAGTGAGGCGTT
GTATCATGTTCTGATCAATGCTGGCTGCTACATCAACAGCTGCTTTGAGTGGGAGTCTCCTCAGAGGAGCA
TCTGTGCCTTCTGCTTTTCGTTTTGGTGGTGTGGAATTTGAGCTGTATATGATCCCGCTTGTCTCCTGATG
CTGCTGGCCTGGAACACTACATTCTCATTGCTTACAGGGAAGGACACAAGGCAGGGAGATGTGCAAGCAGTGG
AGGATTTGCTGGAGGACGAGGATGAAGACTTTGACAGAGATGACAAGGACTCCGAGAGAAAAGGGTTTCAT
GAACAAGCTGTATGCCATTGAGGATGTGTGTATCAGTGTGCAGAAATGCTCTGGATGAAGTGGCCTCCTATG
GTGAGAGGATAAAGAATACCTTCAACTGGACCGTGCCTTTCCTCAGCTGGCTGGCGATAGTGGCTCTATGT
GTGGTCACTCTAGTGTCTTACTTCACTCCTCAGATACATCGTACTGGCCTGGGGGGTGAACAAGTTTACC
AAAAAACTACGAGACCCGTACAGCATCGACAACAATGAGCTTTTGGACTTCTTGTCCCGAGTGCCCTCAGAT
GTTCAAGTGATGCAGTACCGAGAGCTGAAAGTGGACCCCTGTACAGCCCAAACAAAAGAAAAGAAAATA
ACCCAGGATAG

>*mctp1a* [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 1a, isoform 2

ATGTTAGCACTCTCGCTTTCCTCCGTGGGACAAAGCTTGTCTGGCATCAATATTGTGGAGCCAAGTAATGAC
GAACTTCTCCGTTGCCTAAGCCAAGGATGTATCAGCTGGACATTGTGTTGAAGAAGGGCAATAATCTGGC
CATCAGGGACAGAGGAGGAACGAGTGATCCCTATGTGAAGTTAAGATCGCAGGAAAGGAGGTTTTTCGC
AGCAAGACAATCCACAAGAACCTGAACCCAGTATGGGAGGAGAAAGTCAGTCTGCTGGTGGAGAGTTTAA
GGGAGCCACTTTACGCGAAAGTCTTTGACTATGACTTCGGGCTGCAGGATGACTTTATGGGATCTGCATATC
TCTATTTAGAGTCCCTGGAACACCAAAGGACTCTGGATGTAACCCTTGACCTCAAAGATCCCCACTATCCCA
AACAGGACCTGGGTTCAGTGGAGCTGGCGGTCACACTAATCCAAAAGAGGGGGATTCAGGGAAGCTCA
TCAGAGTCTGAGGTTATCAGACGTTACAGAAAATCTCAGCTGTGGAGAGGCATTGTTAGCATCAGTCTCAT
CGAGGCACATGACCTCCAGCCAATGGACAACAATGGCCTTAGTGACCCTTATGTCAAATTCAGAAATGGGAC

ATCAAAAGTACAAAAGTAAGACGATACCAAAAACACTAAACCCCCAGTGGAGAGAGCAGTTTACTTCCAT
CTCTATGATGAACAGGGTGGTTTTGTTGACATCACTGTTTGGGACAAAGATGCAGGGAAGAAGGATGACTT
CATGGGCAGGTGCCAGGTGGACCTGCCTTCTGTCAAAGGAATGCACACACAGACTGGACCTGCCGCTGG
AGGAGGGCGAGGGCATGCTGGTCTTCTGGTCACCTTACAGCCTCTGCTGCCGTCTCCATTGCAGACCTGT
CTGTCAACGTAAGTGGACGACCCACATGAGAGGAAAGAGATTCTCCACAGATATAATGTGCTGAGATCCTTTC
ACAACATTAAGATGTGGGCATGGTGCAGGTGAAGGTGATCCGTGCCGAGGGGCTGATGGCAGCTGATGT
TACAGGCAAGAGTGACCTTTCTGTGTCGTGGAGCTCAGCAACGATCGCTTACAGACACACACCGTGTACA
GAAACCTCAACCCGGAGTGAACAAAGTCTTACAGTTCATGTGAAAGACATTCACTCAGTCTTAGAGGTG
ACTGTCTATGATGAGGACAGAGACCGAAGTGCCGACTTCTTGGGCAAAGTGGCTATACCGTTGTTAAATAT
CCAAAATGGAGAACGCAAAGCTTACGCCTTGAAAAGCAAGGAAGTACAGGGCCAACCAAAGGGGTCATC
TTTCTCGAAATAGACGTGATTTATAACGTCGTAAAAGCTGGCATGAGAACGCTGATCCCCATCGAGCAGAA
ATACATCGAAGAGGAGCCGCGAGTATCTAACAGCTGCTGCTGCAGAACTTCAACAGAGTGAGGCGCTGT
ATCATGTTCTGATCAATGCTGGCTGCTACATCAACAGCTGCTTTGAGTGGGAGTCTCCTCAGAGGAGCATC
TGTGCCTTTCTGCTTTTTGTTTTGGTGGTGTGGAATTTGAGCTGTATATGGTCCCCTGGTTCTCCTGATGC
TGCTGGCCTGGAACACTATTCTCATTGCTTCAGGGAAGGACACAAGGCAGGGAGATGTGCAAGCAGTGGA
GGATTTGCTGGAGGACGAGGATGAAGACTTTGACAGAGATGACAAGGACTCCGAGAGAAAGGGTTTCATG
AACAAGCTGTATGCCATTCAGGATGTGTGTATCAGTGTGCAGAATGCTCTGGATGAAGTGGCCTCCTATGG
TGAGAGGATAAAGAATACCTTCAACTGGACCGTGCCTTTCTCAGTTGGCTGGCGATAGTGGCTCTATGTG
GGTCACTCTAGTGTACTTCTCCTCAGATACATCGTACTGGCCTGGGGGGTGAACAAGTTTACCAA
AAAACACTACGAGACCCGTACAGCATCGACAGCAATGAGCTTTTGGACTTCTTGTCCCGAGTGCCCTCAGATG
TCAAGTGATGCAGTACCGAGAGCTGAAAGTGGACCCCTGTACAGCCCAACAAGAGAAAGAAAATAAC
CCAGGATAG

>mctp1a [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 1a, isoform 3

ATGTTAGCACTCTCGCTTTCCTCCGTGGGACAAAGCTTGTCTGGCATCAATATTGTGGAGCCAAGTAATGAC
GAACTTCTCCGTTGCCTAAGCCAAGGATGTATCAGCTGGACATTGTGTTGAAGAAGGGCAATAATCTGGC
CATCAGGGACAGAGGAGGAACGAGTGATCCCTATGTGAAGTTAAGATCGCAGGAAAGGAGGTTTTTCGC
AGCAAGACAATCCACAAGAACCTGAACCCAGTATGGGAGGAGAAAGTCAGTCTGCTGGTGGAGAGTTTAA
GGGAGCCACTTTACGTGAAAGTCTTTGACTATGACTTCGGGCTGCAGGATGACTTTATGGGATCTGCATATC
TCTATTTAGAGTCCCTGGAACACCAAAGGACTCTGGATGTAACCCCTTGACCTCAAAGATCCCCACTATCCCA
AACAGGACCTGGGTTCACTGGAGCTGGCGGTCACACTAATCCAAAAGAGGGGGATTCAGGGAAGCTAC
CATGCTTATGAGAAGGAGCTGGAACGATCCAGTAAGCATCAGAGTCTGAGGTTATCAGACGTTACAGAA
AATCTCAGCTGTGGAGAGGCATTGTTAGCATCAGTCTCATCGAGGCACATGACCTCCAGCCAATGGACAAC
AATGGCCTTAGTGACCCTTATGTCAAATTCAGAATGGGACATCAAAAGTACAAAAGTAAGACGATACCAAA
AACACTAAACCCCAAGTGGAGAGAGCAGTTTACTTCCATCTCTATGATGAACAGGGTGGTTTTGTTGACaT
CACTGTTTGGGACAAAGATGCAGGGAAGAAGGATGACTTATGGGCAGGTGCCAGGTGGACCTGTCTCTT
CTGTCAAAGGAATGCACACACAGACTGGACCTGCCGCTGGAGGAGGGCGAGGGCATGCTGGTGGTCTTGG
TCACCCCTTACAGCCTCTGCTGCCGTCTCCATTGCAGACCTGTCTGTCAACGTAAGTGGACGACCCACATGAGA
GGAAAGAGATTCTCCACAGATATAATGTGCTGAGATCCTTTCACAACATTAAGATGTGGGCATGGTGCAG
GTGAAGGTGATCCGTGCCGAGGGGCTGATGGCAGCTGATGTTACAGGCAAGAGTGACCTTTCTGTGTCGT
GGAGCTCAGCAACGATCGCTTACAGACACACACCGTGTACAAAAACCTCAACCCGGAGTGAACAAAGTCT
TCACGTTCAATGTGAAGGACATTCAGTCTTAGAGGTGACTGTCTATGATGAGGACAGAGACCGAAGT
GCCGACTTCTTGGGCAAAGTGGCTATACCGTTGTTAAATATCCAAAATGGAGAACGCAAAGCTTACGCCTT
GAAAAGCAAGGAAGTATAGGGCCAACCAAAGGGGTCATCTTTCTCGAAATAGACGTGATTTATAACGTCG
TAAAAGCTGGCATGAGAACGCTGATCCCCATCGAGCAGAAATACATCGAAGAGGAGCCGCGAGTATCTAA
ACAGCTGCTGCTGCAGAACTTCAACAGAGTGAGGCGCTGTATCATGTTCTGATCAATGCTGGCTGCTACAT
CAACAGCTGCTTTGAGTGGGAGTCTCCTCAGAGGAGCATCTGTGCCTTTCTGCTTTTTGTTTTGGTGGTGTG
GAATTTGAGCTGTATATGGTCCCCTGGTTCTCCTGATGCTGCTGGCCTGGAACACTATTCTCATTGCTTCA

GGGAAGGACACAAGGCAGGGAGATGTGCAAGCAGTGGAGGATTTGCTGGAGGACGAGGATGAAGACTTT
GACAGAGATGACAAGGACTCCGAGAGAAAGGGTTTCATGAACAAGCTGTATGCCATTCAGGATGTGTGTA
TCAGTGTGCAGAATGCTCTGGATGAAGTGGCCTCTATGGTGAGAGGATAAAGAATACCTTCAACTGGACC
GTGCCTTTCTCAGTTGGCTGGCGATAGTGGCTCTATGTGTGGTCACTCTAGTGTACTTCACTTCTCTCA
GATACATCGTACTGGCCTGGGGGGTGAACAAGTTTACCAAAAACTACGAGACCCGTACAGCATCGACAAC
AATGAGCTTTTGGACTTCTTGTCCCGAGTGCCTCAGATGTTCAAGTGATGCAGTACCGAGAGCTGAAAGT
GGACCCCTGTACAGCCCAAACAAAAGAAAATAACCCAGGATAG

>mctp1b [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 1b, isoform 1

ATGGAAGCGAGTATGGACGTGGATGATGTTTCTCCATCCATCAGCAGCAGAATCAGCGGGGCTTGTGGA
AATCTTTCCACGGTAAATCCAACTCCATGGCAGCCCCAACTGAGCAAAAAAGACAGAAAGCCAGAAAGT
GTGTTTCGGATATTTAAAAAGAAGCGTGATCATGGCTTGGACCGAGCTGTGTCTTCATCTCAGCCCAATCTG
CACAGCGCAGCAGCGGACGGAGAAGGCAGCGGGAGGACGCGCTGCGGCACGCCGGAGATGAGTGCCTGT
ACGGCGCCCGGGCTGCAGCGTCTCGGTGCGGAGATCCAGATGCTGAAAAGATCCGGCAGCCCCAAAC
CAACGCTCTCCAGCTGCTGGAGCCTCAGTATAAGCCTGCTTCCACATGCACAGATGATGCACAGACGCACA
GTGATGAAGAACAGGGCGATAAAAGTGTGGGTGTTACTACAGTTGCTAAGGGTGTGTACAGCCTGCACT
GCCACTTCAACTGTACCAGCTGGATATCGTGCTGAAAAGAGGAAACAACCTCGCCATTGAGACCCGCG
CCGGAACGAGTGACCCATATGTGAAGTTTAAATTAGCCGGTAAAGAGGTTTTCCGTAGTAAATCATCCAG
AAGAACCTGAACCCGTTTTGGGATGAACGCGTTTGCCTAATAGTGGAACCTTAAAGAGCCTCTGTATAT
GAAGGTGTTTACTATGATTTTGGCCTTCAGTATGATTTTATGGGCTCGGCTTACCTTTACCTGGAGTCTCTG
GAGCAGCAGAGACCTCTTGATGTTGCGCTGGACCTCAGGACCCTCACTGCCCTGATCAGGACTTGGGCTCT
CTAGAGCTGACGGTCACTCTTACCCGAGAAGCCAGCGGACAGAGAGGGCTCAGACAGCAGCAGCAGC
AGATGCAGCAGCAGAGTCCCCGTCTGTGATCTGCACAGAAAGCCTCAGATGTGGAAGGGTATTGTGAG
CATTAGACTCATCGAGGGACGAAATCTCATCGCGATGGACCAGAATGGCTTACGCGACCCTTACGTCAAGT
TCAAACCTGGGCCCTCAGAAGTACAAGAGCAAGACAATTCAAAAACCCTGAACCCGAGTGGAGGGAGCA
GTTTCGACCTGCATCTGTACGATGAGGAGGGAAGAATTCTGGAGATTTCTGTCTGGGATAAAGACATCGGAC
GGAGAGATGACTTCATCGGCCAGTGTGAGCTGGAGCTGTGGAAGCTGAGCCGAGAGAAGACCCACAAGCT
GGAGCTGCATCTGGAGGAGGACAAGGGCACGCTGGTGTCTTGGTGACGCTACCCGCTACAGCCACCGTC
TCTATCTGACCCGTCTGTAAACCTGCTGGACGACCCAGACCAGCGGCAGCACATCAGCAGGAGATACGT
GAGTCTGAAAGTCCGCTCAAGTCTTCTTAATCTGAAGGATGTGGGGATTTTGCAGGTGAAGATCCTGC
GGGCCGAGGGACTGATGGCTGCTGATGTCACAGGAAAGAGCGACCCGTTCTGCATCGCGGAGCTGTGTAA
CGACCTTCTGAAACACACACCGTCTACAAGACTCTGAACCCCGAGTGAATAAAGTCTTACGCTTTAATGT
AAAGGACATCCACTCAGTGTGGAGATCTCAGTATATGATGAGGACAGAGACCCGAGTGTGCTGACTTTCTGG
GGAAAGTGGCCATCCCATTATTAACATCTGCAGCAGCCAACAGAAGGCCTACGTCTTAAAAACAAGGAG
CTGACAGGGCCAACAAAGGGGGTCACTCTTCTCCAAGCGGACGTCATCTTAAACGCCGTGAGAGCCAGTTT
GCGGACGTTTGTTCCTGCAGAACAGAAGTACATCGAGGAGGAGGCGAAAGTCTCTAAACAGCTGCTGCAG
CAGAATTTTAAACCGAGTGAAGCGCTGCGTCTCTTCTCATTAAATGTGGGCTACTACATCAACAGCTGCTTCC
AGTGGGAGTCTCCACGCAGGAGTCTGTGCGTTTTCTGATCTTTGTGGTGGTGTGGAATTTGAGATCT
ACATGCTGCCGTTGCTTTATTGCTGCTGCTGATCTGGAATTACCTCCGGAAGGCCTCTGGGAAGGGGACGT
GTGAGGGAAATGTGGAAGTGTGGAGGATCTTCTAGAGGACGTGGATGAAGACTCTGACAAAGAAGACA
AGGACTCTGAGAAAAAGGGCTTCTTGGACAAATTCTACGCAATTCAGATGTGATTATAACAGTTTACAGACC
GCTCTGGATGAAGTGGCCAGCTTTCGGGGAACGAGTAAAAACACGTTTAACTGGTCTGTGCCTTTTCTGAG
CTGGTTGGCCATAACAGTGTGTGCTGGTGTACCATAACATATTTTCACTCCACTGCGATACATCGTGTCT
GGTCTGGGGTATCAATAAATTCACCAAAAACTTCAGCCCCCTACAGTATCAATAATAACGAACTGCTGGA
CTTTCTGTCTCGAGTTCTTACAGACATCCAGATGTTCAATACAAAGAGCTAAAAGCGGACGCCAATCAGAG
TCCAATAAAAAACGGAGGAACAACCTGGATAA

>mctp1b [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 1b, isoform 2

ATGGAAGCGAGTATGGACGTGGATGATGTTTCTCCATCCCATCAGCAGCAGAATCAGCGGGGCTTGTGGA
AATCTTTCCACGGTAAATCCAACTCCATGGCAGCCCCAACTGAGCAAAAAAGACAGAAAGCCAGAAAGT
GTGTTTCGGATATTTAAAAAGAAGCGTGATCATGGCTTGGACCGAGCTGTGTCTTCATCTCAGCCCAATCTG
CACAGCGCAGCAGCGGACGGAGAAGGCAGCGGGAGGACGCGCTGCGGCACGCCGGAGATGAGTGCCTGT
ACGGCGGCCCGGGCTGCAGCGTCTCTCGGTGCGGAGATCCAGATGCTGAAAAGATCCGGCAGCCCCAAAC
CGACGCTCTCCAGCTGCTGGAGTCTCAGTATAAGCCTGCTTCCACATGCACAGATGATGCACAGACGCACA
GTGATGAAGAACAGGGCGATAAAAAGTGTGGGTGTTACTACAGTTGCTAAGGGTGTGTACAGCCTGCACT
GCCCCACTTCAACTGTACCAGCTGGATATCGTGCTGAAAAGAGGAAACAACCTCGCCATTCGAGACCGCG
CCGGAACGAGTGACCCATATGTGAAGTTTAAATTAGCCGGTAAAGAGGTTTTCCGTAGTAAAATCATCCAG
AAGAACCTGAACCCGTTTTGGGATGAACGCGTTTGCCTAATAGTGGACAACCTTAAAGAGCCTCTGTATAT
GAAGGTGTTGACTATGATTTTGGCCTTCAGGATGATTTTATGGGCTCGGCTTACCTTTACCTGGAGTCTCTG
GAGCAGCAGAGACCTCTTGATGTTTCGGCTGGACCTTCAGGACCCTCACTGCCCTGATCAGGACTTGGGCTCT
CTAGAGCTGACGGTCACTCTTACCCGAGAAGCCAGCGGACAGAGAGGCGCTCAGACAGCAGCAGCAGC
AGATGCAGCAGCAGAGTCCCCGTCTGTGAGATCTGCACAGAAAGCCTCAGATGTGGAAGGGTATTATGAG
CATTAGACTCATCGAGGGACGAAATCTCATCGCGATGGACCAGAATGGCTTCAGCGACCCTTACGTCAAGT
TCAAACCTGGGCCCTCAGAAGTACAAGAGCAAGACAATCCAAAAACCCTGAACCCGCACTGGAGGGGAGCA
GTTTCGACCTGCATCTGTACGATGAGGAGGGAGGAATTCTGGAGATTTCTGTCTGGGATAAAGACATCGGAC
GGAGAGATGACTTCATCGGCCAGTGTGAGCTGGAGCTGTGGAAGCTGAGCCGAGAGAAGACCCACAAGCT
GGAGCTGCATCTGGAGGAGGACAAGGGCACGCTGGTGTCTTGGTGACGCTCACCGCTACAGCCACCGTC
TCTATCTCTGACCTGTCTGTAAACCTGCTGGACGACCCAGACCAGCGGCAGCACATCAGCAGGAGATACAG
TCCGCTCAAGTCCTTCTTAAATcTGAAGGATGTGGGGATTTTGCAGGTGAAGATCCTGCGGGCCGAGGGAC
TGATGGCTGTGATGTACGGGAAAGAGCGACCCGTTCTGCATCGCGGAGCTGTGTAACGACCGTCTGCAA
ACACACACCGTCTACAAGACTcTGAaCCCCGAGTGGAAATAAAGTctTCAGCTTtaATGTAAAGGACatCCACTC
AGTGCTGGAGATCTCAGTATATGATGAGGACAGAGACCCGAGTGTGACTTTCTGGGGAAAGTGGCCATC
CCTTTATTAACATCTGCAGCAGCCAACAGAAGGCCTACGTCTAAAAACAAGGAGCTGACAGGGCCAAC
AAAGGGGGTCACTCTTCTCCAAGCGGACGTCATCTTAAACGCCGTGAGAGCCAGTTTTCGGACGTTTGTCC
TGCAGAACAGAAGTACATCGAGGAGGAGGCGAAAGTCTCTAAACAGCTGCTGCAGCAGAATTTAACCGA
GTGAAGCGCTGCGTCTTCTCCTCATTAAATGTGGGCTACTACATCAACAGCTGCTCCAGTGGGAGTCTCCA
CGCAGGAGTCTGTGCGCTTTTCTGATCTTTGTGGTGGTGGTCTGGAATTTTCGAGATCTACATGCTGCCGTTG
TCTTTATTGCTGCTGCTGATCTGGAATTACCTCCGGAAGGCCTCTGGGAAGGGGACGTGTGAGGGAAATGT
GGAAGTGTGGAGGATCTTCTAGAGGACGTGGATGAAGACTCTGACAAAGAAGACAAGGACTCTGAGAA
AAAGGGCTTCTTGACAAATCTACGCAATCAAGATGTGATTATAACAGTTCAGACCGCTCTGGATGAAGT
GGCCAGCTTCGGGGAACGGGTAAAAAACACGTTTAACTGGTCTGTGCCTTTTCTGAGCTGGTTGGCCATAA
CAGTGCTGTGTGCCGGTGTACCATAACATATTTTATCCACTGCGATACATCGTGCTGGTCTGGGGTATCA
ATAAATTCACCAAAAACTTCGAGCCCCCTACAGTATCAATAATAACGAAGTCTGGACTTTCTGTCTCGAGT
TCCTTCAGACATCCAGATGGTTCAATACAAAGAGCTAAAAGCGGACGCCAATCAGAGTCCAATAAAAAAC
GGAGGAACAACCTGGATAA

>mctp1b [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 1b, isoform 3

ATGGAAGCGAGTATGGACGTGGATGATGTTTCTCCATCCCATCAGCAGCAGAATCAGCGGGGCTTGTGGA
AATCTTTCCACGGTAAATCCAACTCCACGGCAGCCCCAACTGAGCAAAAAAGACAGAAAGCCAGAAAGT
GTGTTTCGGATATTTAAAAAGAAGCGTGATCATGGCTTGGACCGAGCTGTGTCTTCATCTCAGCCCAATCTG
CACAGCGCAGCAGCGGACGGAGAAGGCAGCGGGAGGACGCGCTGCGGCACGCCGGAGATGAGTGCCTGT
ACGGCGGCCCGGGCTGCAGCGTCTCTCGGTGCGGAGATCCAGATGCTGAAAAGATCCGGCAGCCCCAAAC
CGACGCTCTCCAGCTGCTGGAGTCTCAGTATAAGCCTGCTTCCACATGCACAGATGATGCACAGACGCACA
GTGATGAAGAACAGGGCGATAAAAAGTGTGGGTGTTACTACAGTTGCTAAGGGTGTGTACAGCCTGCACT
GCCCCACTTCAACTGTACCAGCTGGATATCGTGCTGAAAAGAGGAAACAACCTCGCCATTCGAGACCGCG
CCGGAACGAGTGACCCATATGTGAAGTTTAAATTAGCCGGTAAAGAGGTTTTCCGTAGTAAAATCATCCAG

AAGAACCTGAACCCGTTTTGGGATGAACGCGTTTGCCTAATAGTGGACAACCTTAAAGAGCCTCTGTATAT
GAAGGTGTTTACTATGATTTTGGCCTTCAGGATGATTTTATGGGCTCGGCTTACCTTTACCTGGAGTCTCTG
GAGCAGCAGAGACCTCTTGATGTTTCGGCTGGACCTTCAGGACCCTCACTGCCCTGATCAGGACTTGGGCTCT
CTAGAGCTGACGGTCACTCTTTACCCGAGAAGCCCAGCGGACAGCGAGGCGCTCAGACAGCAGCAGCAGC
AGCAGATGCAGCAGCAGAGTCCCCGTCTGTACAGATCTGCACAGAAAGCCTCAGATGTGGAAGGGTATTGT
GAGCATTAGACTCATCGAGGGACGAAATCTCATCGGATGGACCAGAATGGCTTCAGCGACCCTTACGTCA
AGTTCAAACCTGGGCCCTCAGAAGTACAAGAGCAAGACAATTCCAAAAACCTGAACCCGCAGTGGAGGGA
GCAGTTCGACCTGCATCTGTACGATGAGGAGGGAGGAATTCTGGAGATTTCTGTCTGGGATAAAGACATCG
GACGGAGAGATGACTTCATCGCCAGTGTGAGCTGGAGCTGTGGAAGCTGAGCCGAGAGAAGACCCACA
AGCTGGAGCTGCATCTGGAGGAGGACAAGGGCACGCTGGTGTCTTCTGGTGACGCTCACCGCTACAGCCAC
CGTCTCTATCTGACCTGTCTGTAAACCTGCTGGACGACCCAGACCAGCGGCAGCACATCAGCAGGAGAT
ACAGTCCGCTCAAGTCTTTAATCTGAAGGATGTGGGGATTTTGCAGGTGAAGATCCTGCGGGCCGAG
GGACTGACGGCTGCTGATGTCACAGGAAAGAGCGACCCGTTCTGCATCGCGGAGCTGTGTAACGACCGTCT
GCAAACACACACCGTCTACAAGACTCTGAACCCGAGTGGAAATAAAGTCTTCAGCTTTAATGTAAAGGACAT
CCTCAGTGCTGGAGATCTCAGTATATGATGAGGACAGAGACCAGTGTGCTGACTTTCTGGGGAAAGTG
GCCATCCCTTTATTAACATCTGCAGCAGCCAACAGAAGGCgTACGTCTAAAAACAAGGAGCTGACAGG
GCCAACAAAGGGGGTCACTcTTCTCCAAGCGGACGTCACTTTAACGCCGTGAGAGCCAGTTTTCGGGACGT
TTGTTCTGCAGAACAGAAGTACATCGAGGAGGAGGCGAAAGTCTCTAAACAGCTGCTGCAGCAGAATTTT
AACCGAGTGAAGCGCTGCGTCTCTCTCATTAAATGTGGGCTACTACATCAACAGCTGCTTCCAGTGGGAG
TCTCCACGCAGGAGTCTGCGCGCTTTTCTGATCTTTGTGGTGGTGGTCTGGAATTTTCAGATCTACATGCTG
CCGTTGTCTTTATTGCTGCTGCTGATCTGGAATTACCTCCGGAAGGCCTCTGGGAAGGGGACGTGTGAGGG
AAATGTGGAAGTGTGAGGATCTTCTAGAGGACGTGGATGAAGACTCTGACAAAGAAGACAAGGACTCT
GAGAAAAAGGGCTTCTGGACAAATTCTACGCAATTCAAGATGTGATTATAACAGTTCAGACCGCTCTGGAT
GAAGTGGCCAGCTTCGGGGAACGAGTAAAAACACGTTAACTGGTCTGTGCCTTTTCTGAGCTGGTTGGC
CATAACAGTGTGTGTGCCGGTGTACCATAACATATTTATCCACTGCGATACATCGTGTGGTCTGGGG
TATCAATAAATTACCAAAAAACTTCGAGCCCCCTACAGTATCAATAATAACGAAGTCTGGACTTTCTGTCT
CGAGTTCCTTCAGACATCCAGATGGTTCAATACAAAGAGCTAAAAGCGGACGCCAATCAGAGTCCCAATAA
AAAACGGAGGAACAACCTGGATAA

>mctp2a [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 2a, variant 1

ATGGACCCAAGGAAGAAAATGTGGTCCAATCTCCGGGAGAGAGCAAAGCCTGTGCTAAATCTGAAGATTG
GAAAGAAGAAGAAGAAAACCCCTCTGAAATACCGGAGGAGCATGTCAGTACCAGACCTCAGGTTTAAACC
CCGCGCCATGATGGCTTTACAGGATGAGTCCAGCACACCGAGTCAAGCCTCTGCCTTCTTTGATAACACAGA
CGGTTTAGGTGACATAGATGATACAGCTAGCGAAACCTCCAGTGTAGCATTCTGAGCGTTTCAGTGTAGC
TGACGTCCCATACGTCTGCAGCCCAGCACCATCAGAAAGATCAGCTCCCGTCGACTTCCAATTTTCAGCGGA
AACCGATAAACGTCAAAGAGCCACTACATGGTACTTCGAGGATTCGGATTCGGTACTGGAGTCACACCTT
CATCTGCAGAACTACAGATGACAGCTGGTCTGCTGAGAGGAGGCCAACAGAGTCTTCAGATAAACTGGTG
GCGGCCCTCGGCAGAGCTCGTGCTTTAGATGACATGTCTATTTTCATCTGAGGAGAAAGCTTGGCATACTGA
ACATGAGCCATCCTCTCCTTTGTCTATGTTTGTGAGGATCAGCTGAGTATCTGGACTCCTAATGAAACC
AGTGACTTTGATGATCTCTCAGAACATGAACGAAATATCTCAGGAGGGTTAACAGAGAGTCAAAGTGCTGC
AGGTCTACAGAAGCTCCAGTATCTTCTACCATCAATCTAAAGGAAGGCAGAAACCTGGTTGTGAGAGACC
GTTTCAGGTACAAGTGACCCATTCTGCAAAATCAAGTTAGATGGCAAGCACATCTACAAGAGCAAAGTTGTG
AACAAGAACTTGAATCCACATGGAATGAATCATTTTCTTGCCTGTCAGAGATCTCGATCAGACTCTTCATC
TCAAGGTGTATGATCGTGACCTAAGATCCAATGACTTCATGGGATCAAGCAGCTTTCCTCTCAGTAACTGG
AGCTGGACAGGATGGTTCTGATGACGCTGTCTTGGAAAGACCCCAACAGTGAAGGAAAGCGATATGGGAGT
GATCATTATAGAGGCCTGTCTGTCCATCCGAGAGGAACCGGCCAAACGAAATAAGTGGCTCCTAAGAAGAA
AGGGATCCTTCAATAAGGGTCACTCCGATAAGCCAGGCGCAGTTTGGGCGGTTCAAAAGAGTCAGGTTTG
GTCAGGCGTTTACTGTTATCCTGGTGGAAAGGACAGGACATGCCAGACTGTGGACAAGGAGACGTTTAC

GTCCGCTTTAGACTTGGAGACCAGCGGGTCAGGAGCAAGAGTCTGTGTATTAAGGCAAACCCGCAGTGGAGGGAGTCTTCGACTTTAACAGTTCAGGATGCGCAGGAAAATCTGGTGGTGGAAAGTTTGCTGCAAGAGGGCAGGAAGTCAGAGGAGTCTGGGGAGTACTAGATATTGACCTGAGCAGACTTCCTGTCAATCAGAGACAGTTATACACTTATGAGCTGGACCCACAGAAGGGAAAAGTGCAGTTTTTGGTACCCTGACCCCATGTTCAAGTGCCTCATCTCAGACATCCAGTCTGCTCCACTGGATAACCCTAACACCTTCGAGAAGATGCGTGAGCAATATAGACCGATGAACATTCTTGGAGACTTTAAAAATGTCGGCTTTCTCAAGTCAAGTTAATAAGAGCCACAGATCTTCCATCAACAGATATAAGTGGTAAAAGTGACCCTTTTGTACCCTTGAGCTGGGTAACAGCAAAGTCAAACCTCACACCATATGTAACACTGAATCCTGAATGGAGAACAGCCCTGACTTTCCCATAGGGACATCATGACGTTTTGGTGTCTCACAGTCTATCATGAAGATGGAGATAAAGCTCCAGACTTCCTGGGAAAAGTTGCATTCTTTGTTGACTATTTCTAACGGCCAACAATAACCAGAATGTTGAAGACTAATAATTTATCAAGGGCAAAACAAAGGCAGTATCACACTTGAGCTTAAAGTCTCTACAACCCTATCAAAGCAGGAATCAAACCTTCCAAACAAAAGAAACCATGTTTGCAGGAGACAATCCCAAGTTTAAACAAAAGCTTTTAGCACGTAATATCTATCGAGTGAGGAAGATCAGCATGGCCATTCTCTATACGCTGCAGTATATAAAGCTGCTCCACTGGGAGAACACGCAGAGGAGTATTACAGCCTTCTGATATTTGTGGTGGCAGTGTGGCTTTGGGAGCTGTTGCTGCCTCTTTCTCTCTGCTCATTGGCTGGAAGTACTTCCACATCACACCAGGCATGGCCAGCTACAGTCAGGACTTGAGCACATGTCCGTGGCTGAGGACGAGGACGAGGATGAAAAGGAATCAGAGAAAAGAGGACTGATGGAATAAATCCACATGGTTCAAGAAATTGTGCTTACAGTTCAGAGCACTTTAGATGAAGTGGCTTGCTGTTGAAAGAGTGAAAAACACATTCAACTGGTCAAGTCCCGTTCTTGTGCTGTTGGCCTGCCTGGTGTGTTGCGATTGTCCGCTTGTACTACATCCCGCTGCGCTACATAGTTTTACTGTGGGGTGTAAACAAATTTACCAAGAAGCTTTTCAACCCATATGCCATTGACAATAATGAAATGCTGGATTTCTCAAGAGGGTGCCTTCTGATGTTCAAAGGTGCAGTACAGCGAGCTGAGAGCCGAGCTTGGCAACCAGGGCCCGGTGAAGAAGAAACGCGGGCCTGA

>mctp2a [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 2a, variant 2

ATGGACCCAAGGAAGAAAATGTGGTCCAATCTCCGGGAGAGAGCAAAGCCTGTGCTAAATCTGAAGATTGAAAGAAGAAGAAGAAAACCCCTCTGAAATACCGGAGGAGCATGTCAGTACCAGACCTCAGGTTTAAACCCCGCGCCATGATGGCTTACAGGATGAGTCCAGCACACCGAGTCAAGCCTCTGCCTTCTTTGATAACACAGACGGTTTAGGTGACATAGATGATACAGCTAGCGAAACCTCCAGTGTAGCATTCTGAGCGTTTCAGTGTAGCTGACGTCCCATACGTCTGCAGCCAGCACCATCAGAAAGATCAGCTCCCGTGCAGTTCACAGTTTCAGCGGAACCGATAAACGTCAAAGAGCCACTACATGGTACTTCGAGGATTCGGATTCGGTACTGGAGTCACACCTTCATCTGCAGAACTACAGATGACAGCTGGTCAATGCTGAGAGGAGGCCAACAGAGTCTCAGATAAACTGGTGCGGCCCTCGGCAGAGCTCGTGTCTTATGATGACATGTCTATTTCACTGAGGAGAAAGCTTGGCATACTGACATGAGCCATCCTCTCCTTTGTCTATGTTTGTGTTGTTAGGATCAGCTGAGTATCTGGACACTCCTAATGAAACAGTGACTTTGATGATCTCTCAGAACATGAACGAAATATCTCAGGAGGGTTAACAGAGAGTCAAAGTGTCTGCAAGGTCTACAGAAGCTCCAGTATCTTCTACCATCAATCTAAAGGAAGGCAGAAACCTGGTTGTCAGAGACGTTTCAGGTACAAGTGACCCATTCTGCAAAATCAAGTTAGATGGCAAGCACATCTACAAGAGCAAAGTTGTGAACAAGAACTTGAATCCACATGGAATGAATCATTTTCTTGCCTGTGAGAGATCTCGATCAGACTCTTCATCTCAAGGTGATGATCGTGACCTAAGATCCAATGACTTCATGGGATCAAGCAGCTTCTCTCAGTAAACTGGAGCTGGACAGGATGGTTCTGATGACGCTGTCTTGGAAAGACCCCAACAGTGAGGAAAGCGATATGGGAGTGATCATTATAGAGGCCTGTCTGTCCATCCGAGAGGAACCGGCCAAACGAAATAAGTGGCTCCTAAGAAGAAAGGGATCCTTCAATAAGGGTCAATCCGATAAGCCAGGCGAGTTTGGGCGGTTCAAAAGAGTCAGGTTTGTCAGGCGTTTACTACTGTTATCCTGGTGGAAAGGACAGGACATGCCAGGCTGTGGACAAGGAGACGTTTACGTCCGCTTTAGACTTGGAGACCAGCGGGTCAGGAGCAAGAGTCTGTGTATTAAGGCAAACCCGCAGTGGAGGGAGTCTTCGACTTTAACAGTTCAGGATGCGCAGGAAAATCTGGTGGTGGAAAGTTTGCTGCAAGAGGGCAGGAAGTCAGAGGAGTCTGGGGAGTACTAGATATTGACCTGAGCAGACTTCCTGTCAATCAGAGACAGTTATATACTTATGAGCTGGACCCACAGAAGGGAAAAGTGCAGTTTTTGGTACCCTGACCCCATGTTCAAGTGCCTCATCTCAGACATCCAGTCTGCTCCACTGGATAACCCTAACACCTTCGAGAAGATGCGTGAGCAATATAGACCGATGAACATTCTTGGAGACTTTAAAAATGTCGGCTTTCTCAAGTCAAGTTAATAAGAGCCACA

GATCTTCCATCAACAGATATAAGTGGTAAAAGTGACCCTTTTTGTACCCTTGAGCTGGGTAACAGCAAAGTGC
CAAACCTCACACCATATGTAAAACACTGAATCCTGAATGGAGAACAGCCCTGACTTTCCCATAGGGACATC
CATGACGTTTTGGTGCTCACAGTCTATCATGAAGATGGAGATAAAGCTCCAGACTTCCTGGGAAAAGTTGC
CATTCTTTGTTGACTATTTCTAACGGCCAACAATAACCAGAATGTTGAAGACTAATAATTTATCAAGGGCA
AACAAAGGCAGTATCACACTTGAGCTTAAAGTCTCTACAACCCTATCAAAGCAGGAATCAAACCTTCCAG
CCAAAAGAAACCATGTTTGCGGAGGACAATCCCAAGTTTAAACAAAAGCTTTTAGCACGTAATATCTATCGA
GTGAGGAAGATCAGCATGGCCATTCTCTATACGCTGCAGTATATAAAGCTGCTTCCACTGGGAGAACAC
GCAGAGGAGTATTACAGCCTTCTGATATTTGTGGTGGCAGTGTGGCTTTGGGAGCTGTTTATGCTGCCTCT
CTTTCTCCTCCTGCTCATTGGCTGGAACACTTCCACATCACACCAGGCATGGCCAGCTACAGTCAGGACTTG
GAGCACATGTCGGTGGCTGAGGACGAGGACGAGGATGAAAAGGAATCAGAGAAAAGAGGACTGATGGA
AAAAATCCACATGGTTCAAGAAATTGTGCTTACAGTTCAGAGCACTTTAGATGAAGTGGCTTGCTTGGGG
AAAGAGTGAAAAACACATTCAACTGGTCAGTCCCGTTCTTGTCTTGTGGCTGCCTGGTGCCTTGTGG
CGACTGTCGGCTTGTACTACATCCCGCTGCGCTACATAGTTTTACTGTGGGGTGTAAACAAATTTACCAAGA
AGCTTTTCAACCCATATGCCATTGACAATAATGAAATGCTGGATTTCTCAAGAGGGTGCCTTCTGATGTTCA
AAAGGTGCAGTACAGCGAGCTGAGAGCCGAGCTTGGCAACCAGGGCCCGGTGAAGAAGAAACGCGGGCC
CTGA

>mctp2a [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 2a, variant 3

ATGGACCCAAGGAAGAAAATGTGGTCCAATCTCCGGGAGAGAGCAAAGCCTGTGCTAAATCTGAAGATTG
GAAAGAAGAAGAAGAAAACCCCTCTGAAATACCGGAGGAGCATGTCAGTACCAGACCTCAGTTTAAACC
CCGCGCCATGATGGCTTTACAGGATGAGTCCAGCACACCCGAGTCAAGCCTCTGCCTTCTCTGATAACACAGA
CGGTTTAGGTGACATAGATGATACAGCTAGCGAAACCTCCAGTGTAGCATTCTGAGCGTTTCAGTGTAGC
TGACGTCCCATACGTCTGCAGCCCAGCACCATCAGAAAGATCAGCTCCCGTGCAGTTCAGGTTTCAGCGGA
AACCGATAAACGTCAAAGAGCCACTACATGGTACTTCGAGGATTTCGGATTTCGGTACTGGAGTCACACCTT
CATCTGCAGAACTACAGATGACAGCTGGTCATGCTGAGAGGAGGCCAACAGAGTCTTCAGATAAACTGGT
GCGGCCCTCGGCAGAGCTCGTGCTTTAGATGACATGTCTATTTTCTGAGGAGAAAGCTTGGCATACTGA
ACATGAGCCATCCTCTCCTTTGTCTATGTTTGTAGGATCAGCTGAGTATCTGGACACTCCTAATGAAACC
AGTGACTTTGATGATCTCTCAGAACATGAACGAAATATCTCAGGAGGGTTAACAGAGAGTCAAAGTGTCTGC
AGGTCTACAGAAGCTCCAGTATCTTCTACCATCAATCTAAAGGAAGGCAGAAACCTGGTTGTGAGAGACC
GTTTCAAGTACAAGTGACCCATTCGTCAAATCAAGTTAGATGGCAAGCACATCTACAAGAGCAAAGTTGTG
AACAAAGAACTTGAATCCACATGGAATGAATCATTTTCTTGCCTGTCAGAGATCTCGATCAGACTCTTCATC
TCAAGGTGTATGATCGTGACCTAAGATCCAATGACTTCATGGGATCAAGCAGTTTCTCTCAGTAACTGG
AGCTGGACAGGATGGTTCTGATGACGCTGTCTCTGGAAGACCCCAACAGTGAAGGAAAGCGATATGGGAGT
GATCATTATAGAGGCCTGTCTGTCCATCCGAGAGGAACCGGCCAAACGAAATAAGTGGCTTCTAAGAAGAA
AGGGATCCTTCAATAAGGGTCATCCGATAAGCCAGGCGCAGTTTGGGCGGTTCAAAAGAGTCAGTTTG
GTCAGGCGTTTACTGTTATCCTGGTGAAGGACAGGACATGCCAGACTGTGGACAAGGAGACGTTTAC
GTCCGCTTTAGACTTGGAGACCAGCGGGTCAGGAGCAAGAGTCTGTGTATTAAGGCAAACCCGCAAGTGA
GGGAGTCTTCACTTTAACCAGTTCCAGGATGCGCAGGAAAATCTGGTGGTGAAGTTTGTGCAAGAG
GGCAGGAAGTCAGAGGAGTGTGGGGAGTACTAGATTTGACCTGAGCAGACTTCTGTCAATCAGAGA
CAGTTATATACTTATGAGCTGGACCCACAGAAGGGAAAACCTGCGGTTTTTGGTACCCTGACCCCATGTTCA
GGTGCCTCATCTCAGACATCCAGTCTGCTCCACTGGATAACCCTAACACCTTCGAGAAGATGCGTGAGCAA
TATAGACCGATGAACATTCTTGGAGACTTTAAAATGTGGGCTTTCTTCAAGTCAAGTTAATAAGAGCCACA
GATCTTCCATCAACAGATATAAGTGGTAAAAGTGACCCTTTTTGTACCCTTGAGCTGGGTAACAGCAAAGTGC
CAAACCTCACACCATATGTAAAACACTGAATCCTGAATGGAGAACAGCCCTGACTTTCCCATAGGGACTTC
CATGACGTTTTGGTGCTCACAGTCTATCATGAAGATGGAGATAAAGCTCCAGACTTCCTGGGAAAAGTTGC
CATTCTTTGTTGACTATTTCTAACGGCCAACAATAACCAGAATGTTGAAGACTAATAATTTATCAAGGGCA
AACAAAGGCAGTATCACACTTGAGCTTAAAGTCTCTACAACCCTATCAAAGCAGGAATCAAACCTTCCAG
CCAAAAGAAACCATGTTTGCGGAGGACAATCCCAAGTTTAAACAAAAGCTTTTAGCACGTAATATCTATCGA

GTGAGGAAGATCAGCATGGCCATTCTCTATACGCTGCAGTATATTAAGCTGCTTCCACTGGGAGAACAC
GCAGAGGAGTATTACAGCCTTCTGATATTTGGTGGCAGTGTGGCTTTGGGAGCTGTTTCATGCTGCCTCT
CTTTCTCTCTGCTCATTGGCTGGAACACTTCCACATCACACCAGGCATGGCCAGCTACAGTCAGGACTTG
GAGCACATGTCCGGTGGCTGAGGACGAGGACGAGGATGAGAAGGAATCAGAGAAAAGAGGACTGATGGA
AAAAATCCACATGGTTCAAGAAATTGTGCTTACAGTTCAGAGCACTTTAGATGAAGTGGCTTGCATTGGGG
AAAGAGTGAAAAACACATTCAACTGGTCAGTCCCGTTCTTGTTCATTGTTGGCCTGCCTGGTGTGCTTGTGG
CGACTGTCCGGCTTGTACTACATCCCGCCGCGCTACATAGTTTACTGTGGGGTGTAAACAAATTTACCAAGA
AGCTTTTCAACCCATATGCCATTGACAATAATGAAATGCTGGATTTCTCAAGAGGGTGCCTTCTGATGTTCA
AAAGGTGCAGTACAGCGAGCTGAGAGCCGAGCTTGCAACCAGGGCCCGGTGAAGAAGAAACGCGGGCG
CTGA

>mctp2b [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 2b, isoform 1

ATGCGAGGCTTTTTTTTTAAGAAGTCGAATTACGACAAAAATGATTCAGATTCAGGCTCCATAACAAGAC
AATGAGCAAACGGTATTTTAGACATCAGTGCAGAGATGCCAGGAGTGTGTGAGAATCAGCGGGAGTCTC
AGAGGACATATCTGCTCACTATCTGCCTGAAGGAGGGCCGTAACCTGGTCATCAGAGACCGCTGTGGCAGC
AGTGATCCATATGTGAAGGTCAAGCTGGATGGGAAGATGGTGTACAAAAGTAAAGTGGTGTAAAGAACC
TGAACCCAGTCTGGAATGAGTCTTTACCTCCCGATCCGCAGCCTGGAGCAGACAGTCTTCATCAAGGTTT
TTGACCGAGATCTGACTTCAGATGACTTCATGGGCTCCTGCAGTGTGGGCTGGATAAACTGGAACCTGAA
AAGACCACTGAGATGGTGTCTTCCATTAGACGATCCCAACAGTCTGGAGGAAGATATGGGTTTCATAGCCAT
CGATATCTGTGTCTATGAGAGGCGGCAAAAAACAAAAACAAGGAAATTCAAACGAGTACAAACGTATG
AGCGAGTCTGTAATAAGAGTCAGCTGTGGATCGGCCTCTACACCATCACTCTCGTGGATGGACGGGATTT
ACCGAAGGACGGACAGGGGGACTTGTTTGTGCGCTTCAAACCTGGGTGATCAGAAATTCAAAAGCAAGTCT
CGCTCGAAGAAAGTCATCACAGAGTGGAGAGAAAGATTTGACTTTTACCAGTTCCCCGATGCATCTAGCCTT
CTGGAGATTGAAGTTGTCTTAAAGATGGACGGAAGAGTGAAGAAAAGTTACGGATTGTCTGAAATCAACTT
GTCTGAGTTGCCGCTGAATGAATCCACATTGTTTTCTGTGACCTGGAGCCGGGCCGGGGCAAGGTGGTGT
TTCTCATCACTCCCAAAGCCTGCACCGGAGCCTCCATTTAGGTCTCATCACCCCGCCTCTGGAGGACCCTGA
GGAGAAAGAAAACATACTGGCTAAATATAGTTTGAAGAACACAGTGAAGGACCTGAGAGATGTTGGTTTTT
CTCCAGGTTAAAGTGATCAAGGCCACTGACCTCATCTCTGCTGATCTAAATGGAAAGAGCGACCCGTTTTGT
GTCCTGGAATTGGGAAACAGCCGGCTACAGACCCACACCATATACAAAACCCTCAACCCTGAGTGAATAA
AGTCTTCACTTTCCCTGTTAAAGACATTCATGAGGTTCTGGAAGTACTGTGTTTGTGAGGATGGAGACAA
AGCCCCAGATTTCTGGGGAAGGTGGCGATTCTTTAGTCTCAGCGTGTCAAGGTCAGCAGTTCAATTTGCC
TCTGAGGAAAGAGAATTTGACATCAATGTCTAAGGGAGCTGTAATACTGGAGCTGGAAATCCTCTTCAATC
CTATCAAAGCAAGCATCATAACCTTTACACCTCGAGAACAGAAATTTCTGAGGACAATCCAAGTTTTCAA
AGAAGATTCTTTCCAGGAATATTGGTCTGTGAGGAACTTTTTCTGCTGTGCTTACTCTCACCAGTTCAT
CACAAGCTGCTTACGTGGGAAAGTGTGAGGAGGAGCATTACGGCATTCTGTTTTTCTTCTGGCAGTGTG
GTACTTTGAGTTCTACATGCTGCCCTTGTCTTGGTTCTTCTCATCTCGTGGAACTATCTCCAGATCGCCACTG
AGAGAGTCAACAGAGACCCAGAAAATATGGAATATGTGACGATGACGATGATGATGAAAAGGATTCTGA
AAAAAAGGTCTGATGGAGAAAATCCACATGGTTCAAGAGGTTGTCGTTACAGTGCAGAACCTGCTGGAG
GAGATTGCATCCCTCGGTGAAAGAATAAAGAACACATTCAACTGGTCAGTGCCATTCTGTCTAAACTGGCC
TTAATGATTTTCATCATGGCCACAGTGAATCACTTACTTTGTTTCACTGCGCTACATAGTTTTATTATATGGCAT
ACATAAATTCACGAAGAACTGCGCAATCCCTATGCCATTGAAAACAATGAGCTGTTGGATTTCTCTCCAG
AGTGCCTTCAGATATCCAAATGACCCAGTACACTGAAATGAGCAGCTGCAGTATTAACAGTCCCTACAGAAA
AAGAAGATCCTCACCATAG

>mctp2b [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 2b, isoform 2

ATGCGAGGCTTTTTTTTTAAGAAGTCGAATTACGACAAAAATGATTCAGATTCAGGCTCCATAACAAGAC
AACGAGCAAACGGTATTTTAGACATCAGTGCAGAGATGCCAGGAGTGTGTGAGAATCAGCGGGAGTCTC
AGAGGACATATCTGCTCACTATCTGCCTGAAGGAGGGCCGTAACCTGGTCATCAGAGACCGCTGTGGCAGC

AGTGATCCATATGTGAAGGTCAAGCTGGATGGGAAGATGGTGTACAAAAGTAAAGTGGTGTAAAGAACC
TGAACCCAGTCTGGAATGAGTCCTTTACCTTCCCGATCCGCAGCCTGGAGCAGACAGTCTTCATCAAGGTTT
TTGACCGAGATCTGACTTCAGATGACTTCATGGGCTCCTGCAGTGTTGGGCTGGATAAACTGGAACCTGAA
AAGACCACTGAGATGGTGCTTCCATTAGACGATCCCAACAGTCTGGAGGAAGATATGGGTTTCATAGCCAT
CGATATCTGTGTGTCTATGAGAGGCGGCAAAAACAAAAACAAGGAAATTCAAACGAGTACAAACGTATG
AGCGAGTCTGTAATAAGAGTCAGCTGTGGATCGGCCTCTACCCATCACTCTCGTGGATGGACGGGATTT
ACCGAAGGACGGACAGGGGGACTTGTTTGTGCGCTTCAAACCTGGGTGATCAGAAATTCAAAAGCAAGTCT
CGCTCGAAGAAAGTCATCACAGAGTGGAGAGAAAGATTTGACTTTTACCAGTTCCCCGATGCATCTAGCCTT
CTGGAGATTGAAGTTGTCTTAAAAGATGGACGGAAGAGTGAAGAAAGTTACGGATTGTCTGAAATCAACTT
GTCTGAGTTGCCGCTGAATGAATCCACATTGTTTTCTGTGACCTGGAGCCGGGCCGGGGCAAGGTGGTGT
TTCTCATCACTCCCAAAGCCTGCACCGGAGCCTCCATTTAGACCTCATACCCCGCCTCTGGAGGACCCTGA
GGAGAAAGAAAACATACTGGCTAAATATAGTTTGAAGAACACAGTGAAGGACCTGAGAGATGTTGGTTTT
CTCCAGGTTAAAGTGATCAAGGCCACTGACCTCATCTGCTGATCTAAATGGAAAGAGCGACCCGTTTTGT
GTCCTGGAATTGGGAAACAGCCGGCTACAGACCCACACCATATACAAAACCTCAACCCTGAGTGGAATAA
AGTCTTCACTTTCCCTGTTAAAGACATTCATGAGGTTCTGGAAGTGACTGTGTTTGATGAGGATGGAGACAA
AGCCCCAGATTTCTTGGGGAAGGTGGCGATTCTTTAGTCTCAGCGTGTCAAGGTCAGCAGTTCATTTGTCC
TCTGAGGAAAGAGAATTTGACATCAATGTCTAAGGGAGCTGTAATACTGGAGCTGGAAATCCTCTTCAATC
CTATCAAAGCAAGCATCATAACCTTTACACCTCGAGAACAGAAATTTCTGAGGACAATCCCAAGTTTTCAA
AGAAGATTCTTCCAGGAATATTGGTCGTGTGAGGAACCTTTTTCTGCTGTGTCTTACTCTCACCAGTTCAT
CACAAGCTGCTTACGTGGGAAAGTGTGAGGAGGAGCATTACGGCATTCTGTTTTTCTTCTGGCAGTGTG
GTACTTTGAGTTCTACATGCTGCCCTTGTCTTGGTTCTTCTCATCTCGTGGAACTATCTCCAGATCGCCACTG
AGAGAGTCACCAGAGACCCAGAAAATATGGAATATGTGACGATGACGATGATGATGAAAAGGATTCTGA
AAAAAAGGTCTGATGGAGAAAATCCACATGGTTCAAGAGATTGTCGTTACAGTGCAGAACCTGCTGGAG
GAGATTGCATCCCTCGGTGAAAGAATAAAGAACACATTCAACTGGTCAGTGCCATTCTGTCTAAACTGGCC
TTAATGATTTTCATCATGGCCACAGTGATCACTTACTTTGTTTCACTGCGCTACATAGTTTTATTATATGGCAT
ACATAAATTCACGAAGAACTGCGCAATCCCTATGCCATTGAAAACAATGAGCTGTTGGATTTCTCTCCAG
AGTGCCTTCAGATATCCAAATGACCCAGTACACTGAAATGAGCAGCTGCAGTATTAACAGTCCCTACAGAAA
AAGAAGATCCTCACCATAG

>mctp2b [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 2b, isoform 3

ATGCGAGGCTTTTTTTCTTTTTAAGAAGTCGAATTACGACAAAAATGATTCAGATTCAGGCTCCATACAAGAC
AACGAGCAAACGGTATTTTAGACATCAGTGAGAGGTGCCAGGAGTGTGTGAGAATCAGCGGGAGTCTC
AGAGGACATATCTGCTCACTATCTGCCTGAAGGAGGGCCGTAACCTGGTCATCAGAGGCCGCTGTGGCAGC
AGTGATCCATATGTGAAGGTCAAGCTGGATGGGAAGATGGTGTACAAAAGTAAAGTGGTGTAAAGAACC
TGAACCCAGTCTGGAATGAGTCCTTTACCTTCCCGATCCGCAGCCTGGAGCAGACAGTCTTCATCAAGGTTT
TTGACCGGGATCTGACTTCAGATGACTTCATGGGCTCCTGCAGTGTTGGGCTGGATAAACTGGAACCTGAA
AAGACCACTGAGATGGTGCTTCCATTAGACGATCCCAACAGTCTGGAGGAAGATATGGGTTTCATAGCCAT
CGATATCTGTGTGTCTATGAGAGGCGGCAAAAACAAAAACAATAAGGGCCAGAGGAACATAAGGAGC
CTCATGGGAAATTCAAACGAGTACAAACGTATGAGCGAGTCTGTAATAAGAGTCAGCTGTGGATCGGCCT
CTACCCATCACTCTCGTGGATGGACGGGATTTACCGAAGGACGGACAGGGGGACTTGTTTGTGCGCTTCA
AACTGGGTGATCAGAAATTCAAAAGCAAGTCTCGCTCGAAGAAAGTCATCACAGAGTGGAGAGAAAGATT
TGACTTTTACCAGTTCCCCGATGCATCTAGCCTTCTGGAGATTGAAGTTGTCTTAAAAGATGGACGGAAGAG
TGAAGAAAGTTACGGATTGTCTGAAATCAACTTGTCTGAGTTGCCGCTGAATGAATCCACATTGTTTTCTG
TGACCTGGAGCCGGGCCGGGGCAAGGTGGTGTCTCATCACTCCCAAAGCCTGCACCGGAGCCTCCATTT
CAGATCTCATACCCCGCCTCTGGAGACCCTGAGGAGAAAAGAAAACATACTGGCTAAATATAGTTTGAAG
AACATAGTGAAGGACCTGAGAGATGTTGGTTTTCTCCAGGTTAAAGTGATCAAGGCCACTGACCTCATCTCT
GCTGATCTAAATGGAAAGAGCGACCCGTTTTGTGTCCTGgAATTGGGAAACAGCCGGCTACAGACCCACAC
CATATACAAAACCTCAACCCTGAGTGGAATAAAGTCTTCACTTTCCCTGTTAAAGACATTCATGAGGTTCTG

GAAGTACTGTGTTTGATGAGGATGGAGACAAAGCCCCAGATTTCTTGGGGAAGGTGGCGATTCTTTAGT
CTCAGCGTGTCAAGGTCAGCAGTTCATTTGTCCTCTGAGGAAAGAGAATTTGACATCAATGTCTAAGGGAG
CTGTAATACTGGAGCTGGAAATCCTCTTCAATCCTATCAAAGCAAGCATATAACCTTTACACCTCGAGAAC
AGAAATTTCTTGAGGACAATCCCAAGTTTTCAAAGAAGATTCTTCCAGGAATATTGGTCGTGTGAGGAACC
TTTTTCGTGCTGTGTCTTACTCTCACCAGTTCATCACAAGCTGCTTACGTGGGAAAGTGTGAGGAGGAGCA
TTACGGCATTCTGTTTTTCTTCTGGCAGTGTGGTACTTTGAGTTCTACATGCTGCCCTTGTCTTGGTTCTT
CTCATCTCGTGGAATATCTCCAGATCGCCACTGAGAGAGTACCAGAGACCCAGAAAATATGGAAATATG
TGACGATGACGATGATGATGAAAAGGATTCTGAAAAAAAAGGTCTGATGGAGAAAATCCACATGGTTCAA
GAGATTGTCGTTACAGTGCAGAACCTGCTGGAGGAGATTGCATCCCTCGGTGAAAGAATAAAGAACACATT
CAACTGGTCAGTGCCATTCTGTCTAACTGGCCTTAATGATTTTCATCATGGCCACAGTGATCACTTACTTT
GTTTCAGTGCCTGCATAGTTTTATTATATGGCATAATAAATTCACGAAGAACTGCGCAATCCCTATGCC
ATTGAAAACAATGAGCTGTTGGATTTCTCTCCAGAGTGCCTTCAGATATCCAAATGACCCAGTACACTGAA
ATGAGCAGCTGCAGTATTAACAGTCCCTACAGAAAAAGAAGATCCTCACCATAG

Dirección General de Bibliotecas

Anexo 2. Secuencias aminoacídicas de las variantes de las proteínas Mctp encontradas en el pez cebra.

>mctp1a [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 1a, isoform 1

MLALSLSVVGQSLSGINIVEPSNDELPLPKPRMYQLDIVLKKGNNLAIRDGGTSDPYVKFKIAGKEVFRSKTIHK
NLNPVWEEKVSLLESLREPLYVKVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEHQRTLDVTLDLKDPHYPKQDLGSLELA
VTLPKEGDFREAHQSLRLSDVHRKAQLWRGIVSISLIEAHDLPMDNNGLSDPYVKFRLGHQKYKSKTIPKTLNP
QWREQDFHLYDEQGGFVDITVWDK DAGKKDDFMGRCQVDLSLLSKECTHRLDLPLEEGEGMLVLLVTLTASA
AVSIADLSVNVLDLDDPHERKEILHRYNVPRSFHNKIDVGMVQVKVIRAEGMAADVTGKSDPFCVVGSLNDRLOQT
HTVYKLNLPENKVFVTFNVKDIHSVLEVTYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNIQNGERKAYALKSKELTGPTKGVIF
LEIDVIYNVVKAGMRTLPIEQKYIEEPRVSKQLLLQNFNRVRRCIMFLINAGCYINSCFEWESPQRSICAFLLFVLV
VWNFELYMIPLVLLMMLLAWNYILIASGKDTRQGDVQAVEDLLEDEDEDFRDDDKDSEKGF MNKLYAIQDVCIS
VQNALDEVASYGERIKNTFNWTVPFLSWLAIVALCVVTLVLYFIPLRYIVLAWGVNKFTKKLRDPYSIDNNELLDFL
SRVPSDVQVMQYRELKVDPC HSPNKRKKNPG

>mctp1a [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 1a, isoform 2

MLALSLSVVGQSLSGINIVEPSNDELPLPKPRMYQLDIVLKKGNNLAIRDGGTSDPYVKFKIAGKEVFRSKTIHK
NLNPVWEEKVSLLESLREPLYAKVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEHQRTLDVTLDLKDPHYPKQDLGSLELA
VTLPKEGDFREAHQSLRLSDVHRKSQLWRGIVSISLIEAHDLPMDNNGLSDPYVKFRMGHQKYKSKTIPKTLN
PQWREQDFHLYDEQGGFVDITVWDK DAGKKDDFMGRCQVDLPLLSKECTHRLDLPLEEGEGMLVLLVTLTASA
AAVSIADLSVNVLDLDDPHERKEILHRYNVLRSFHNKIDVGMVQVKVIRAEGMAADVTGKSDPFCVVELSNDRLQ
THTVYRNLNPEWNVKVFVTFNVKDIHSVLEVTYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNIQNGERKAYALKSKELTGPTKGVIF
LEIDVIYNVVKAGMRTLPIEQKYIEEPRVSKQLLLQNFNRVRRCIMFLINAGCYINSCFEWESPQRSICAFLLFVLV
VWNFELYMVPLVLLMMLLAWNYILIASGKDTRQGDVQAVEDLLEDEDEDFRDDDKDSEKGF MNKLYAIQDVCIS
VQNALDEVASYGERIKNTFNWTVPFLSWLAIVALCVVTLVLYFIPLRYIVLAWGVNKFTKKLRDPYSIDSNELLD
FLSRVPSDVQVMQYRELKVDPC HSPNKRKKNPG

>mctp1a [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 1a, isoform 3

MLALSLSVVGQSLSGINIVEPSNDELPLPKPRMYQLDIVLKKGNNLAIRDGGTSDPYVKFKIAGKEVFRSKTIHK
NLNPVWEEKVSLLESLREPLYVKVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEHQRTLDVTLDLKDPHYPKQDLGSLELA
VTLPKEGDFREATMLMRRSWKRSSKHQSLRLSDVHRKSQLWRGIVSISLIEAHDLPMDNNGLSDPYVKFRM
GHQKYKSKTIPKTLNPQWREQDFHLYDEQGGFVDITVWDK DAGKKDDFMGRCQVDLSLLSKECTHRLDLPLE
EGEGMLVLLVTLTASAAVSIADLSVNVLDLDDPHERKEILHRYNVLRSFHNKIDVGMVQVKVIRAEGMAADVTGK
SDPFCVVELSNDRLQHTVYKLNLPENKVFVTFNVKDIHSVLEVTYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNIQNGERKA
YALKSKELIGPTKGVIFLEIDVIYNVVKAGMRTLPIEQKYIEEPRVSKQLLLQNFNRVRRCIMFLINAGCYINSCFE
WESPQRSICAFLLFVLVWNFELYMVPLVLLMMLLAWNYILIASGKDTRQGDVQAVEDLLEDEDEDFRDDDKDSE
RKGFMNKLYAIQDVCISVQNALDEVASYGERIKNTFNWTVPFLSWLAIVALCVVTLVLYFIPLRYIVLAWGVNKFT
KKLRDPYSIDNNELLDFLSRVPSDVQVMQYRELKVDPC HSPNKRKKNPG

>mctp1b [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 1b, isoform 1

MEASMDVDDVSPSHQQNQQRGLWKSFHGKSKLHGSPKLSKKDRKPESVFRIFKKKRHDGLDRAVSSSQPNLH
SAAADGEGSGRTRCGTPEMSACTAAAAASLGAIEQMLKRSKSPKPTLSQLLEPQYKPASTCTDDAQTHSDEEQ
GDKSVGVTVAKGAVQPALPTSTLYQLDIVLKRGNLAIRDAGTSDPYVKFKLAGKEVFRSKIIQKLNLPVWDE
RVCLIVDNLKEPLYMKVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEQQRPLDVRDLQDPHCPDQDLGSLELTVTLYPRSP
ADREALRQQQMQQSPRLSDLHRKPQMWKGVISIRLIEGRNLIAMDQNGFSDPYVKFKLGPQKYKSKTIPK
TLNPQWREQFDLHLYDEEGRILEISVWDKDIGRRDDFIGQCELELWKSREKTHKLELHLEEDKGLTVLLVTLTAT
ATVSISDPSVNLDDPDQRQHISRRYVSPESPLKSFNLKDVGILQVKILRAEGMAADVTGKSDPFCIAELCNDLL
QTHTVYKTLNPEWNVKVFVTFNVKDIHSVLEISVYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNICSSQQKAYVLKNKELTGPTKGVIF
LLQADVIFNAVRASLRTFVPAEQKYIEEAKVSKQLLQNFNRVRCVFLINVGYYINSCFQWESPRRSLCAFLIF

VVVVWNFEIYMLPLSLLLLLLIWNYLRKASGKGTCEGNVEVMEDLLEDVDESDKEDKDSEKKGFLDKFYAIQDVII
TVQTALDEVASFGERVKNTFNWSVPFLSWLAITVLCAGATITYFIPLRYIVLVWGINKFTKCLRAPYSINNNELLD
LSRVPSDIQMVQYKELKADANQSPNKKRRNNPG

>mctp1b [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 1b, isoform 2
MEASMDVDDVSPSHQQNQRLWKSFHGKSKLHGSPKLSKKDRKPESVFRIFKKKRDHGLDRAVSSSQPNLH
SAAADGEGSGRTRCGTPEMSACTAAAAASLGAIEIQLKRSRSGSPKPTLSQLLESQYKPASTCTDDAQTHSDEEQ
GDKSVGVTTVAKGAVQPALPTSTLYQLDIVLKRGNLAIRDAGTSDPYVKFKLAGKEVFRSKIIQKLNLPVWDE
RVCLIVDNLKEPLYMKVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEQQRPLDVRLDLQDPHCPDQDLGSLELTVTLYPRSP
ADREALRQQQQMQQQSPRLSDLHRKPQMWKGIMSIRLIEGRNLIAMDQNGFSDPYVKFKLGPQKYKSKTIP
KTLNPQWREQFDLHLYDEEGGILEISVWDKDIGRRDDFIGQCELELWKSREKTHKLELHLEEDKGTLLVLT
TATVSISDLSVNLDDDPDQRQHISRRYSPLKSFNLKDVGILQVKILRAEGLMAADVTGKSDPFCAELCNDRLQTH
TVYKTLNPEWNVKVSFNVKDIHSVLEISVYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNICSSQQKAYVLKNKELTGPTKGVILLQ
ADVIFNAVRASLRTFVPAEQYIEEEAKVSKQLLQNFNRVKRCVFLINVGYYINSCFQWESPRRSLCAFLIFVVV
VWNFEIYMLPLSLLLLLLIWNYLRKASGKGTCEGNVEVMEDLLEDVDESDKEDKDSEKKGFLDKFYAIQDVII
TVQTALDEVASFGERVKNTFNWSVPFLSWLAITVLCAGATITYFIPLRYIVLVWGINKFTKCLRAPYSINNNELLD
FLSRVPSDIQMVQYKELKADANQSPNKKRRNNPG

>mctp1b [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 1b, isoform 3
MEASMDVDDVSPSHQQNQRLWKSFHGKSKLHGSPKLSKKDRKPESVFRIFKKKRDHGLDRAVSSSQPNLH
SAAADGEGSGRTRCGTPEMSACTAAAAASLGAIEIQLKRSRSGSPKPTLSQLLESQYKPASTCTDDAQTHSDEEQ
GDKSVGVTTVAKGAVQPALPTSTLYQLDIVLKRGNLAIRDAGTSDPYVKFKLAGKEVFRSKIIQKLNLPVWDE
RVCLIVDNLKEPLYMKVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEQQRPLDVRLDLQDPHCPDQDLGSLELTVTLYPRSP
ADSEALRQQQQMQQQSPRLSDLHRKPQMWKGIVSIRLIEGRNLIAMDQNGFSDPYVKFKLGPQKYKSKTIP
KTLNPQWREQFDLHLYDEEGGILEISVWDKDIGRRDDFIGQCELELWKSREKTHKLELHLEEDKGTLLVLT
TATVSISDLSVNLDDDPDQRQHISRRYSPLKSFNLKDVGILQVKILRAEGLTAADVTGKSDPFCAELCNDRLQTH
TVYKTLNPEWNVKVSFNVKDIHSVLEISVYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNICSSQQKAYVLKNKELTGPTKGVILLQ
ADVIFNAVRASLRTFVPAEQYIEEEAKVSKQLLQNFNRVKRCVFLINVGYYINSCFQWESPRRSLRAFLIFVVV
VWNFEIYMLPLSLLLLLLIWNYLRKASGKGTCEGNVEVMEDLLEDVDESDKEDKDSEKKGFLDKFYAIQDVII
TVQTALDEVASFGERVKNTFNWSVPFLSWLAITVLCAGATITYFIPLRYIVLVWGINKFTKCLRAPYSINNNELLD
FLSRVPSDIQMVQYKELKADANQSPNKKRRNNPG

>mctp2a [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 2a, variant 1
MDPRKMMWSNLRERAKPVLNLKIGKKKKKTPLKYRRMSVVDLRFNPRAMMALQDESSTPSQASAFFDNTDG
LGDIDDTASETSSVAFSERFSVADVPYVCS PAPSERSAPVDFPISAETDKRQRATTWYFEDSDSVTGVTSSAELQ
MTAGHAERRPTESDKLVAALGRARALDDMSISSEKAWHTEHEPSSPLSMFVVGSAEYLDTPNETSDFDDLSE
HERNISGGLTESQSAAGLQKLQYLLTINLKEGRNLVVRDRSGTSDPFVKFKLDGKHIYKSKVVKLNLPWNESFS
LPVRDLQTLHLKVYDRDLRSNDFMGSSSFPLSKLELDRMVLMTLSLEDPNSEESDMGVIIIACLSIREEPAKRN
KWLRLRRKGSFNKGHPISQAQFGRFTKSQVWVGVTYVILVEGQDMPDCGQGDVYVFRFLGDQRVRSKSLCIKAN
PQWRESFDFNQFQDAQENLVVEVCKRGRKSEECWGVLDIDLSRLPVNQRQLTYEYELDPQKGLRFLVTLTPCS
GASISDIQSAPLDNPNTFEKMRQYRPMNILGDFKNVGFQVKLIRATDLPSTDISGKSDPFCTLELGNLQTH
CKTLNPEWRTALTFPIRDIHDVLLVTVYHEDGDKAPDFLQKVAIPLLTISNGQQITRMLKTNLNRANKGSITLLEK
VLYNPIKAGIKTFQPKETMFAEDNPKFNKLLARNIYRVRKISMAILYTLQYIKSCFHMENTQRSITAFIFVAVW
LWELFMLPLFLLLIGWNYFHITPGMASYSQDLEHMSVAEDEDKESKRLMEKIHMVQEIVLTVQSTLDE
VACIGERVKNTFNWSVPFLSLLACLVLVAIVGLYYIPLRYIVLLWGVNFKTKLFPYAIIDNNEMLDLKRVP
SDVQKVQYSELRAELGNQGPVKKRGR

>mctp2a [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 2a, variant 2

MDPRKKMWSNLRERAKPVLNLKIGKGGKTKPLKYRRSMSVPLRFNPRAMMALQDESSTPSQASAFFDNTDG
LGDIDDTASETSSVAFSERFSVADVPYVCSPPASERSAPVDFPVSAETDKRQRATTWYFEDSDSVTGVTPSSAELQ
MTAGHAERRPTESDKLVAALGRARALDDMSISSEKAWHTEHEPSSPLSMFVVGSAEYLDTPNETSDFDDLSE
HERNISGGLTESQSAAGLQKLQYLLTINLKEGRNLVVRDRSGTSDPFVKFKLDGKHIYKSKVVKLNPTWNEFS
LPVRDLQTLHLKVYDRDLRSNDFMGSSSFPLSKLELDRMVLMTSLSEDPNSEESDMGVIIIACLSIREEPAKRN
KWLRLRRKGSFNKGHPISQAQFGRFTKSQVWSGVYTVILVEGQDMPGCGQGDVYVRFRLGDQRVRSKSLCIKAN
PQWRESFDNFQFQDAQENLVVEVCKRGRKSEECWGVLDIDLRLPVNQRQLTYEYLDPQKGLRFLVTLTPCS
GASISDIQSAPLDNPNTFEKMRQYRPMNILGDFKNVGFQVVKLIRATDLPSTDISGKSDPFCTLELGNLQTHTI
CKTLNPEWRTALTFPIRDIHDVLLVTVYHEDGDKAPDFLGKVAIPLLTISNGQQITRMLKTNLRSRANKGSITLKL
VLYNPIKAGIKTFQPKETMFAEDNPKFNKLLARNIYRVRKISMAILYTLQYIKSCFHENTQRSITAFILFVAVW
LWELFMLPLFLLLIGWNYFHITPGMASYSQDLEHMSVAEDEDDEKESEKRLMEKIHMVQEIVLTVQSTLDE
VACIGERVKNTFNWSVPFLSLLACLVLVATVGLYIPLRYIVLLWGVNKFTKLFNYPYIDNNEMLDFLKRVPD
QKVQYSELRAELGNQGPVKKRGR

>mctp2a [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 2a, variant 3

MDPRKKMWSNLRERAKPVLNLKIGKGGKTKPLKYRRSMSVPLRFNPRAMMALQDESSTPSQASAFSDNTDG
LGDIDDTASETSSVAFSERFSVADVPYVCSPPASERSAPVDFPVSAETDKRQRATTWYFEDSDSVTGVTPSSAELQ
MTAGHAERRPTESDKLVAALGRARALDDMSISSEKAWHTEHEPSSPLSMFVVGSAEYLDTPNETSDFDDLSE
HERNISGGLTESQSAAGLQKLQYLLTINLKEGRNLVVRDRSGTSDPFVKFKLDGKHIYKSKVVKLNPTWNEFS
LPVRDLQTLHLKVYDRDLRSNDFMGSSSFPLSKLELDRMVLMTSLSEDPNSEESDMGVIIIACLSIREEPAKRN
KWLRLRRKGSFNKGHPISQAQFGRFTKSQVWSGVYTVILVEGQDMPDCGQGDVYVRFRLGDQRVRSKSLCIKAN
PQWRESFDNFQFQDAQENLVVEVCKRGRKSEECWGVLDIDLRLPVNQRQLTYEYLDPQKGLRFLVTLTPCS
GASISDIQSAPLDNPNTFEKMRQYRPMNILGDFKNVGFQVVKLIRATDLPSTDISGKSDPFCTLELGNLQTHTI
CKTLNPEWRTALTFPIRDFHDVLLVTVYHEDGDKAPDFLGKVAIPLLTISNGQQITRMLKTNLRSRANKGSITLKL
VLYNPIKAGIKTFQPKETMFAEDNPKFNKLLARNIYRVRKISMAILYTLQYIKSCFHENTQRSITAFILFVAVW
LWELFMLPLFLLLIGWNYFHITPGMASYSQDLEHMSVAEDEDDEKESEKRLMEKIHMVQEIVLTVQSTLDE
VACIGERVKNTFNWSVPFLSLLACLVLVATVGLYIIPRYIVLLWGVNKFTKLFNYPYIDNNEMLDFLKRVPD
VQKVQYSELRAELGNQGPVKKRGR

>mctp2b [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 2b, isoform 1

5'3' Frame 1

MGRGFFLKKSNYDKNDSGSIQDNEQNGILDISAEMPGVCENQRESQRTYLLTICLKEGRNLVIRDRCGTSDPY
VKVKLDGKMVYKSKVVLKLNLPVWNESTFPPIRSLEQTVFIKVFDRDLTSDDFMGSCSVGLDKLEKTTEMVLP
LDDPNSLEEDMGFIAIDICVSMRGGKNNKQGNSEYKRMSESVNKSQWLWIGLYTITLVDGRDLPKDGQGDVFR
FKLGDQKFKSKSRKVKVITWRERFDYQFPDASSLLEIEVVLKDGKSEESYGLSEINLSELPLNESTLFSCDLEPGR
GKVVFLITPKACTGASISGLITPPLEDPEEKENILAKYSLKNTVRDLRDLVGLQVVKVikatDLISADLNGKSDPFVLE
LGNSRLQTHTIKTLNPEWNVKFTFPVKDIHEVLEVTVFDEGDGKAPDFLGKVAIPLVSACQGGQFICPLRKENLT
SMSKGAVILELEILFNPIKASITFTPREQKFLDENPKFSKILSRNIGRVRNLFRAVSYSHQFITSCFTWESVRRSITA
FLFLLAVWYFEFYMLPLFLVLLISWNYLQIATERVTRDPENMEICDDDDDEKDSEKGLMEKIHMVQEVVTV
QNLEEIASLGERIKNTFNWSVPFLSKLALMIFIMATVITYFVSVRYIVLLYGIHKFTKLRNYPYAIENNELLDFLSRVP
SDIQMTQYTEMSSCSINSPYKRSSP

>mctp2b [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 2b, isoform 2

MGRGFFLKKSNYDKNDSGSIQDNEQNGILDISAEMPGVCENQRESQRTYLLTICLKEGRNLVIRDRCGTSDPY
VKVKLDGKMVYKSKVVLKLNLPVWNESTFPPIRSLEQTVFIKVFDRDLTSDDFMGSCSVGLDKLEKTTEMVLP
LDDPNSLEEDMGFIAIDICVSMRGGKNNKQGNSEYKRMSESVNKSQWLWIGLYTITLVDGRDLPKDGQGDVFR
FKLGDQKFKSKSRKVKVITWRERFDYQFPDASSLLEIEVVLKDGKSEESYGLSEINLSELPLNESTLFSCDLEPGR
GKVVFLITPKACTGASISDLITPPLEDPEEKENILAKYSLKNTVRDLRDLVGLQVVKVikatDLISADLNGKSDPFVLE

LGNSRLQHTHIYKTLNPEWNVKVFVVKDIHEVLEVTVFDEEDGDKAPDFLGKVAIPLVSACQGQQFICPLRKENLT
SMSKGAVILELEILFNPIKASIIITFTPREQKFLEDNPKFSKKILSRNIGRVRNLFRAVSYSHQFITSCFTWESVRRSITA
FLFFLLAVWYFEFYMLPLFLVLLISWNYLQIATERVTRDPENMEICDDDDDDDEKDSEKKGLMEKIHMVQEIVVTV
QNLLLEEIASLGERIKNTFNWSVPFLSKLALMIFIMATVITYFVSVRYIVLLYGIHKFTKCLRNPYAIENNELLDFLSRVP
SDIQMTQYTEMSSCSINSPYRKRSSP

>mctp2b [Danio rerio] Multiple C2 domain and transmembrane region protein 2b, isoform 3

MRGFFLFKKSNDKSDSGSIQDNEQNGILDISAEPVGCENQRESQRTYLLTICLKEGRNLVIRGRCGTSDPYV
KVKLDGKMVYKSKVVLKLNLPVWNESTFTPIRSLEQTVFIKVFDRDLTSDDFMGSCSVGLDKLELEKTTEMVLP
DDPNSLEEDMGFIAIDICVSMRGGKKNKQKWAQRNIRSLMGNSNEYKRMSSEVNKSQLWIGLYTITLVDGRDL
PKDGQGDLFARFKLGDQKFKSKRSRKKVITWREDFYQFPDASSLLEIEVVLKDGRKSEESYGLSEINLSELPLNE
STLFSCDLEPGRGKVFLITPKACTGASISDLITPPLEDPEEKENILAKYSLKNIVRDLRDVGFQVQKVIKATDLISADL
NGKSDPFCVLELGNSRLQHTHIYKTLNPEWNVKVFVVKDIHEVLEVTVFDEEDGDKAPDFLGKVAIPLVSACQGQ
QFICPLRKENLTSMSKGAVILELEILFNPIKASIIITFTPREQKFLEDNPKFSKKILSRNIGRVRNLFRAVSYSHQFITSCF
TWESVRRSITAFLLAVWYFEFYMLPLFLVLLISWNYLQIATERVTRDPENMEICDDDDDDDEKDSEKKGLMEKI
HMOVQEIVVTVQNLLLEEIASLGERIKNTFNWSVPFLSKLALMIFIMATVITYFVSVRCIVLLYGIHKFTKCLRNPYAI
ENNELLDFLSRVPSDIQMTQYTEMSSCSINSPYRKRSSP

mctp2a

2a-2	(21)	209	408
2a-4	(22)		
2a-10	(21)		
2a-GB	(205)		
2a-2	(202)	409	608
2a-4	(22)		
2a-10	(21)		
2a-GB	(405)		
2a-2	(402)	609	808
2a-4	(42)		
2a-10	(41)		
2a-GB	(605)		
2a-2	(602)	1009	1208
2a-4	(62)		
2a-10	(61)		
2a-GB	(805)		
2a-2	(802)	1209	1408
2a-4	(82)		
2a-10	(81)		
2a-GB	(1005)		
2a-2	(1002)	1409	1608
2a-4	(102)		
2a-10	(101)		
2a-GB	(1205)		
2a-2	(1202)	1609	1808
2a-4	(122)		
2a-10	(121)		
2a-GB	(1405)		
2a-2	(1402)	1809	2008
2a-4	(142)		
2a-10	(141)		
2a-GB	(1605)		
2a-2	(1602)	2009	2208
2a-4	(162)		
2a-10	(161)		
2a-GB	(1805)		
2a-2	(1802)	2209	2408
2a-4	(182)		
2a-10	(181)		
2a-GB	(2005)		
2a-2	(2002)	2409	2608
2a-4	(202)		
2a-10	(201)		
2a-GB	(2205)		
2a-2	(2202)	2609	2808
2a-4	(222)		
2a-10	(221)		
2a-GB	(2405)		
2a-2	(2402)	2809	3008
2a-4	(242)		
2a-10	(241)		
2a-GB	(2605)		
2a-2	(2602)	3009	3208
2a-4	(262)		
2a-10	(261)		
2a-GB	(2805)		
2a-2	(2802)	3209	3408
2a-4	(282)		
2a-10	(281)		
2a-GB	(3005)		

mctp2b

2b-2	(13)	21	220
2b-4	(21)		
2b-6	(12)		
2b-GB	(2)		
2b-2	(21)	221	420
2b-4	(221)		
2b-6	(222)		
2b-GB	(202)		
2b-2	(41)	421	620
2b-4	(421)		
2b-6	(422)		
2b-GB	(602)		
2b-2	(565)	621	820
2b-4	(593)		
2b-6	(602)		
2b-GB	(602)		
2b-2	(780)	821	1020
2b-4	(788)		
2b-6	(802)		
2b-GB	(637)		
2b-2	(980)	1021	1220
2b-4	(988)		
2b-6	(1002)		
2b-GB	(837)		
2b-2	(1180)	1221	1420
2b-4	(1188)		
2b-6	(1202)		
2b-GB	(1037)		
2b-2	(1380)	1421	1620
2b-4	(1388)		
2b-6	(1402)		
2b-GB	(1237)		
2b-2	(1580)	1621	1820
2b-4	(1588)		
2b-6	(1602)		
2b-GB	(1437)		
2b-2	(1780)	1821	2020
2b-4	(1788)		
2b-6	(1802)		
2b-GB	(1637)		
2b-2	(1980)	2021	2220
2b-4	(1988)		
2b-6	(2002)		
2b-GB	(1837)		
2b-2	(2180)	2221	2420
2b-4	(2188)		
2b-6	(2202)		
2b-GB	(2037)		

Anexo 4. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de cada una de las proteínas *Mctp* encontradas en el pez cebra.

Mctp1a

		1		800
1a-1	(1)	MLALSLSVGGQSLSGINIVEPSNDELPLPKPRMYQLDIVLKKGNLAIRDGGTSDPYVKFKIAGKEVFRSKTIHKNLNPFVWEKVSLLVESLREPLYA		
1a-4	(1)	MLALSLSVGGQSLSGINIVEPSNDELPLPKPRMYQLDIVLKKGNLAIRDGGTSDPYVKFKIAGKEVFRSKTIHKNLNPFVWEKVSLLVESLREPLYA		
1a-7	(1)	MLALSLSVGGQSLSGINIVEPSNDELPLPKPRMYQLDIVLKKGNLAIRDGGTSDPYVKFKIAGKEVFRSKTIHKNLNPFVWEKVSLLVESLREPLYA		
1a-GB	(1)	MLALSLSVGGQSLSGINIVEPSNDELPLPKPRMYQLDIVLKKGNLAIRDGGTSDPYVKFKIAGKEVFRSKTIHKNLNPFVWEKVSLLVESLREPLYA		
		101		200
1a-1	(101)	KVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEHQRTLDTVLDLKDHPHYKQDLGSLAVTLIPKEGDFREA-----HQSLRLSDVHRKQLWRGIVSI		
1a-4	(101)	KVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEHQRTLDTVLDLKDHPHYKQDLGSLAVTLIPKEGDFREA-----HQSLRLSDVHRKQLWRGIVSI		
1a-7	(101)	KVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEHQRTLDTVLDLKDHPHYKQDLGSLAVTLIPKEGDFREA-----HQSLRLSDVHRKQLWRGIVSI		
1a-GB	(101)	KVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEHQRTLDTVLDLKDHPHYKQDLGSLAVTLIPKEGDFREA-----HQSLRLSDVHRKQLWRGIVSI		
		201		300
1a-1	(188)	SLIEAHDLPMDNNGLSDPYVKFRMGHQYKSKTIPTKLNQWREQDFHLYDEQGGFVLTWWDKAGKDDFMGRQVQLLSKECTHRLDPLEEG		
1a-4	(188)	SLIEAHDLPMDNNGLSDPYVKFRMGHQYKSKTIPTKLNQWREQDFHLYDEQGGFVLTWWDKAGKDDFMGRQVQLLSKECTHRLDPLEEG		
1a-7	(201)	SLIEAHDLPMDNNGLSDPYVKFRMGHQYKSKTIPTKLNQWREQDFHLYDEQGGFVLTWWDKAGKDDFMGRQVQLLSKECTHRLDPLEEG		
1a-GB	(201)	SLIEAHDLPMDNNGLSDPYVKFRMGHQYKSKTIPTKLNQWREQDFHLYDEQGGFVLTWWDKAGKDDFMGRQVQLLSKECTHRLDPLEEG		
		301		400
1a-1	(288)	EGMLVLLVLTASAAVSADLSVNVLDLDPHERKEILHRYNVRSPFNKIDVGMVQVKVIRAEGLMAADVTKGSDPFVCLSNDRLOQTHTVKLNPEWN		
1a-4	(288)	EGMLVLLVLTASAAVSADLSVNVLDLDPHERKEILHRYNVRSPFNKIDVGMVQVKVIRAEGLMAADVTKGSDPFVCLSNDRLOQTHTVKLNPEWN		
1a-7	(301)	EGMLVLLVLTASAAVSADLSVNVLDLDPHERKEILHRYNVRSPFNKIDVGMVQVKVIRAEGLMAADVTKGSDPFVCLSNDRLOQTHTVKLNPEWN		
1a-GB	(301)	EGMLVLLVLTASAAVSADLSVNVLDLDPHERKEILHRYNVRSPFNKIDVGMVQVKVIRAEGLMAADVTKGSDPFVCLSNDRLOQTHTVKLNPEWN		
		401		500
1a-1	(388)	KVFTFNVKDIHSVLETVYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNQNGERKAYALKSKELI GPTKGVIFLEIDVIYNNVVKAGMRTLPIEQYIEEPRVSKQLL		
1a-4	(388)	KVFTFNVKDIHSVLETVYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNQNGERKAYALKSKELI GPTKGVIFLEIDVIYNNVVKAGMRTLPIEQYIEEPRVSKQLL		
1a-7	(401)	KVFTFNVKDIHSVLETVYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNQNGERKAYALKSKELI GPTKGVIFLEIDVIYNNVVKAGMRTLPIEQYIEEPRVSKQLL		
1a-GB	(401)	KVFTFNVKDIHSVLETVYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNQNGERKAYALKSKELI GPTKGVIFLEIDVIYNNVVKAGMRTLPIEQYIEEPRVSKQLL		
		501		600
1a-1	(488)	LQNFNRRRCIMFLINAGCYINSCFEWESQRSICAFLLFVLVWNFELYMLPLVLLMLLAWNYILIASGKTRQGDVQAVEDLLEDEDEDFDRDDK		
1a-4	(488)	LQNFNRRRCIMFLINAGCYINSCFEWESQRSICAFLLFVLVWNFELYMLPLVLLMLLAWNYILIASGKTRQGDVQAVEDLLEDEDEDFDRDDK		
1a-7	(501)	LQNFNRRRCIMFLINAGCYINSCFEWESQRSICAFLLFVLVWNFELYMLPLVLLMLLAWNYILIASGKTRQGDVQAVEDLLEDEDEDFDRDDK		
1a-GB	(501)	LQNFNRRRCIMFLINAGCYINSCFEWESQRSICAFLLFVLVWNFELYMLPLVLLMLLAWNYILIASGKTRQGDVQAVEDLLEDEDEDFDRDDK		
		601		700
1a-1	(585)	-----DSERKGFNMNKLAIQDVCISVQNALDEVASYGERIKNTFNWTVPFLSWLAIVALCVVTLVLYPIRLYI		
1a-4	(585)	-----DSERKGFNMNKLAIQDVCISVQNALDEVASYGERIKNTFNWTVPFLSWLAIVALCVVTLVLYPIRLYI		
1a-7	(598)	-----DSERKGFNMNKLAIQDVCISVQNALDEVASYGERIKNTFNWTVPFLSWLAIVALCVVTLVLYPIRLYI		
1a-GB	(601)	SVPSQDGRPLPESHILADILASWHFEWIRVMV-----DSERKGFNMNKLAIQDVCISVQNALDEVASYGERIKNTFNWTVPFLSWLAIVALCVVTLVLYPIRLYI		
		701		760
1a-1	(654)	VLAGVGNKFTKKLRDPYSIDNELLDFLSRVPSDVQVMQYRELKVDPCHSFNKRKKNNG		
1a-4	(654)	VLAGVGNKFTKKLRDPYSIDNELLDFLSRVPSDVQVMQYRELKVDPCHSFNKRKKNNG		
1a-7	(667)	VLAGVGNKFTKKLRDPYSIDNELLDFLSRVPSDVQVMQYRELKVDPCHSFNKRKKNNG		
1a-GB	(701)	VLAGVGNKFTKKLRDPYSIDNELLDFLSRVPSDVQVMQYRELKVDPCHSFNKRKKNNG		

Mctp1b

		1		800
1b-2	(1)	MEASMDVDDVSPSHQQNQRLWKSFHGKSKLRSPLSKDRKPEVFRIFPKKRDHGLDRAVSSQPNLHSAADGEGSGRTRCGTPEMSACTAAAAA		
1b-7	(1)	MEASMDVDDVSPSHQQNQRLWKSFHGKSKLRSPLSKDRKPEVFRIFPKKRDHGLDRAVSSQPNLHSAADGEGSGRTRCGTPEMSACTAAAAA		
1b-9	(1)	MEASMDVDDVSPSHQQNQRLWKSFHGKSKLRSPLSKDRKPEVFRIFPKKRDHGLDRAVSSQPNLHSAADGEGSGRTRCGTPEMSACTAAAAA		
1b GB	(1)	MEASMDVDDVSPSHQQNQRLWKSFHGKSKLRSPLSKDRKPEVFRIFPKKRDHGLDRAVSSQPNLHSAADGEGSGRTRCGTPEMSACTAAAAA		
		101		200
1b-2	(101)	ASLGAETQMLKRSQPKPTLSQLELQYKPASTCTDDAQTSDHEEQGDKSVGVTIVAKGAVQPALPTSTLYQLDIVLKKGNLAIRDAGTSDPYVKFKL		
1b-7	(101)	ASLGAETQMLKRSQPKPTLSQLELQYKPASTCTDDAQTSDHEEQGDKSVGVTIVAKGAVQPALPTSTLYQLDIVLKKGNLAIRDAGTSDPYVKFKL		
1b-9	(101)	ASLGAETQMLKRSQPKPTLSQLELQYKPASTCTDDAQTSDHEEQGDKSVGVTIVAKGAVQPALPTSTLYQLDIVLKKGNLAIRDAGTSDPYVKFKL		
1b GB	(101)	ASLGAETQMLKRSQPKPTLSQLELQYKPASTCTDDAQTSDHEEQGDKSVGVTIVAKGAVQPALPTSTLYQLDIVLKKGNLAIRDAGTSDPYVKFKL		
		201		300
1b-2	(201)	AGKEVFRSKTIQKLNPFVWDERVCLIVDNLKEPLYMKVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEQQRPLDVRDLQDPHCPDQDLGSLAVTLVYPRSPADRE		
1b-7	(201)	AGKEVFRSKTIQKLNPFVWDERVCLIVDNLKEPLYMKVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEQQRPLDVRDLQDPHCPDQDLGSLAVTLVYPRSPADRE		
1b-9	(201)	AGKEVFRSKTIQKLNPFVWDERVCLIVDNLKEPLYMKVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEQQRPLDVRDLQDPHCPDQDLGSLAVTLVYPRSPADRE		
1b GB	(201)	AGKEVFRSKTIQKLNPFVWDERVCLIVDNLKEPLYMKVFDYDFGLQDDFMGSAYLYLESLEQQRPLDVRDLQDPHCPDQDLGSLAVTLVYPRSPADRE		
		301		400
1b-2	(301)	ALRQQQQQMQQQSPRLSDLHRKPMQMKGTISIRLIEGRNLIAMDQNGFSDPYVKFKLGPQYKSKTIPTKLNQWREQDFDLHLYDEEGGILEISVWDKD		
1b-7	(301)	ALRQQQQQMQQQSPRLSDLHRKPMQMKGTISIRLIEGRNLIAMDQNGFSDPYVKFKLGPQYKSKTIPTKLNQWREQDFDLHLYDEEGGILEISVWDKD		
1b-9	(301)	ALRQQQQQMQQQSPRLSDLHRKPMQMKGTISIRLIEGRNLIAMDQNGFSDPYVKFKLGPQYKSKTIPTKLNQWREQDFDLHLYDEEGGILEISVWDKD		
1b GB	(301)	ALRQQQQQMQQQSPRLSDLHRKPMQMKGTISIRLIEGRNLIAMDQNGFSDPYVKFKLGPQYKSKTIPTKLNQWREQDFDLHLYDEEGGILEISVWDKD		
		401		500
1b-2	(400)	IGRRDDFIGQCELELWKLREKTHKLELHLEEDKGTLVLVTLTATATVSISSVNLDDDPQRQHISRYS-----PLKSFNNKDVGIQVKILRAEG		
1b-7	(400)	IGRRDDFIGQCELELWKLREKTHKLELHLEEDKGTLVLVTLTATATVSISSVNLDDDPQRQHISRYS-----PLKSFNNKDVGIQVKILRAEG		
1b-9	(401)	IGRRDDFIGQCELELWKLREKTHKLELHLEEDKGTLVLVTLTATATVSISSVNLDDDPQRQHISRYS-----PLKSFNNKDVGIQVKILRAEG		
1b GB	(400)	IGRRDDFIGQCELELWKLREKTHKLELHLEEDKGTLVLVTLTATATVSISSVNLDDDPQRQHISRYS-----PLKSFNNKDVGIQVKILRAEG		
		501		600
1b-2	(500)	LTAADVTGKSDPFCAELCNDLQTHTVYKTLNPFENKVFVFNVDIHSVLEISVYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNICSSQKAYVLNKNELTGPTKGV		
1b-7	(496)	LTAADVTGKSDPFCAELCNDLQTHTVYKTLNPFENKVFVFNVDIHSVLEISVYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNICSSQKAYVLNKNELTGPTKGV		
1b-9	(497)	LTAADVTGKSDPFCAELCNDLQTHTVYKTLNPFENKVFVFNVDIHSVLEISVYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNICSSQKAYVLNKNELTGPTKGV		
1b GB	(496)	LTAADVTGKSDPFCAELCNDLQTHTVYKTLNPFENKVFVFNVDIHSVLEISVYDEDRDRSADFLGKVAIPLLNICSSQKAYVLNKNELTGPTKGV		
		601		700
1b-2	(600)	LQADVIFNAVRSALRTFVPAEQYIEEAKVSKQLLQNFNRRVKRCVFLINVGYIINSCFQWESPRRSLAFLIFVVVVNPFVYMLPLSLLLLIWN		
1b-7	(596)	LQADVIFNAVRSALRTFVPAEQYIEEAKVSKQLLQNFNRRVKRCVFLINVGYIINSCFQWESPRRSLAFLIFVVVVNPFVYMLPLSLLLLIWN		
1b-9	(597)	LQADVIFNAVRSALRTFVPAEQYIEEAKVSKQLLQNFNRRVKRCVFLINVGYIINSCFQWESPRRSLAFLIFVVVVNPFVYMLPLSLLLLIWN		
1b GB	(596)	LQADVIFNAVRSALRTFVPAEQYIEEAKVSKQLLQNFNRRVKRCVFLINVGYIINSCFQWESPRRSLAFLIFVVVVNPFVYMLPLSLLLLIWN		
		701		800
1b-2	(700)	YLRKASGKGTCEGNVEMDLELVDVEDSDKEDKDKSEKGFPLDKFYAQDVIITVQALDEVASFGERVKNTFNWVFLSWLAITVLCAGATITFYIFPL		
1b-7	(696)	YLRKASGKGTCEGNVEMDLELVDVEDSDKEDKDKSEKGFPLDKFYAQDVIITVQALDEVASFGERVKNTFNWVFLSWLAITVLCAGATITFYIFPL		
1b-9	(697)	YLRKASGKGTCEGNVEMDLELVDVEDSDKEDKDKSEKGFPLDKFYAQDVIITVQALDEVASFGERVKNTFNWVFLSWLAITVLCAGATITFYIFPL		
1b GB	(696)	YLRKASGKGTCEGNVEMDLELVDVEDSDKEDKDKSEKGFPLDKFYAQDVIITVQALDEVASFGERVKNTFNWVFLSWLAITVLCAGATITFYIFPL		
		801		863
1b-2	(800)	RYIVLVGINKFTKKLRAPYSINNELLDFLSRVPSDIQVMQYKELKADANQSPNKRKKNNG		

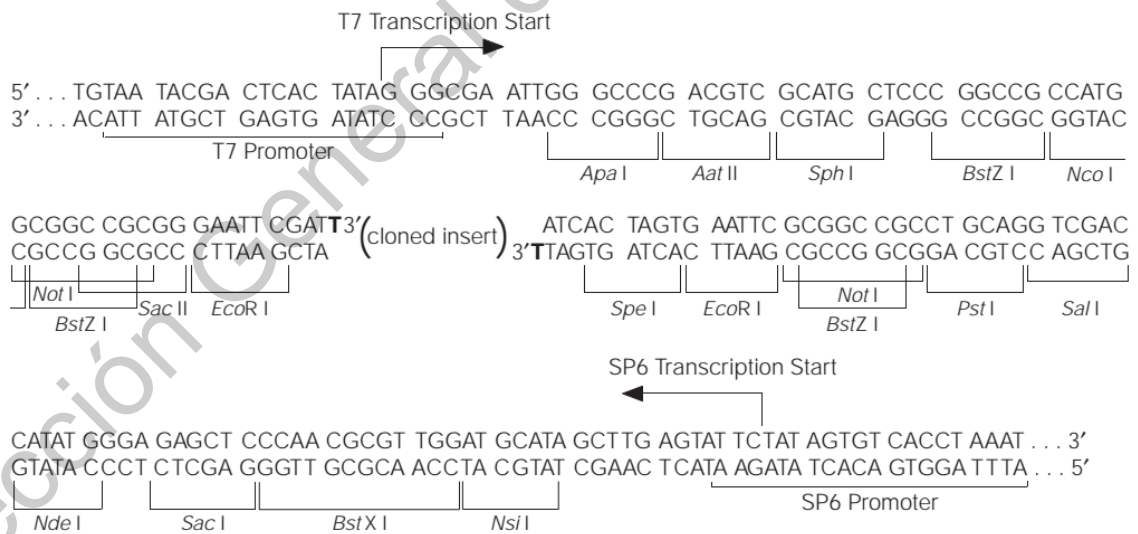
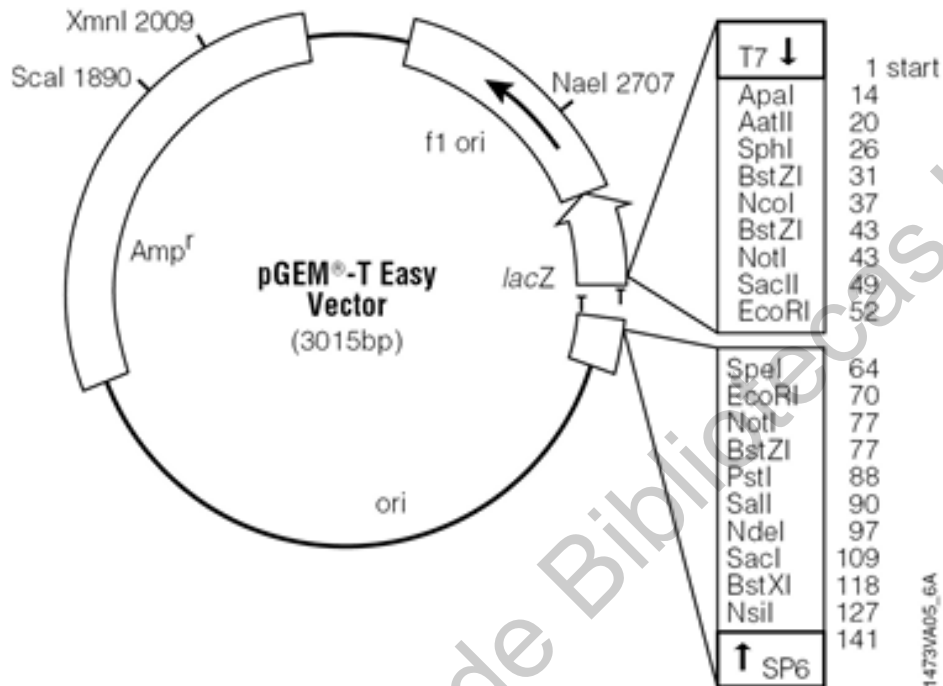
Mctp2a

	1			100
2a-2	(1)	MDP	PRKMWNSLNERAKFVNLKIGKKKKTKPKYRRSMSVPLDRFNPRAMMALQDESSTPSQASAF	ENTDGLGDIIDDTASETSSVAFSERFSVADVPVY
2a-4	(1)	MDP	PRKMWNSLNERAKFVNLKIGKKKKTKPKYRRSMSVPLDRFNPRAMMALQDESSTPSQASAF	ENTDGLGDIIDDTASETSSVAFSERFSVADVPVY
2a-10	(1)	MDP	PRKMWNSLNERAKFVNLKIGKKKKTKPKYRRSMSVPLDRFNPRAMMALQDESSTPSQASAF	ENTDGLGDIIDDTASETSSVAFSERFSVADVPVY
2a-GB	(1)	MDP	PRKMWNSLNERAKFVNLKIGKKKKTKPKYRRSMSVPLDRFNPRAMMALQDESSTPSQASAF	ENTDGLGDIIDDTASETSSVAFSERFSVADVPVY
			101	200
2a-2	(101)	CSP	PAPERSAPVDFP	SAETDKRQRATTWYFEDSDSVTGVTPSSAELQMTAGHAERRPTESSDKLVAALGRARALDDMSISSEEKAHWTHEPSSPLSMF
2a-4	(101)	CSP	PAPERSAPVDFP	SAETDKRQRATTWYFEDSDSVTGVTPSSAELQMTAGHAERRPTESSDKLVAALGRARALDDMSISSEEKAHWTHEPSSPLSMF
2a-10	(101)	CSP	PAPERSAPVDFP	SAETDKRQRATTWYFEDSDSVTGVTPSSAELQMTAGHAERRPTESSDKLVAALGRARALDDMSISSEEKAHWTHEPSSPLSMF
2a-GB	(101)	CSP	PAPERSAPVDFP	SAETDKRQRATTWYFEDSDSVTGVTPSSAELQMTAGHAERRPTESSDKLVAALGRARALDDMSISSEEKAHWTHEPSSPLSMF
			201	300
2a-2	(201)	VVGS	AELYDTPNETSDFDLSEHERNISGGLTESQSAAGLQKLYLLTINLKEGRNLVVRDRSGTSDPFVKFKLDGKHIYKSKVVNKNLNPTWNESFSLE	
2a-4	(201)	VVGS	AELYDTPNETSDFDLSEHERNISGGLTESQSAAGLQKLYLLTINLKEGRNLVVRDRSGTSDPFVKFKLDGKHIYKSKVVNKNLNPTWNESFSLE	
2a-10	(201)	VVGS	AELYDTPNETSDFDLSEHERNISGGLTESQSAAGLQKLYLLTINLKEGRNLVVRDRSGTSDPFVKFKLDGKHIYKSKVVNKNLNPTWNESFSLE	
2a-GB	(201)	VVGS	AELYDTPNETSDFDLSEHERNISGGLTESQSAAGLQKLYLLTINLKEGRNLVVRDRSGTSDPFVKFKLDGKHIYKSKVVNKNLNPTWNESFSLE	
			301	400
2a-2	(301)	VRD	LQTLHLKVYDRDRSDFMGSSSFFLSKLELDRMVLMTLSLEDNPNSEESDMGVIIEACL	SIREEPAKRNKLLRRKGSFNKGPI
2a-4	(301)	VRD	LQTLHLKVYDRDRSDFMGSSSFFLSKLELDRMVLMTLSLEDNPNSEESDMGVIIEACL	SIREEPAKRNKLLRRKGSFNKGPI
2a-10	(301)	VRD	LQTLHLKVYDRDRSDFMGSSSFFLSKLELDRMVLMTLSLEDNPNSEESDMGVIIEACL	SIREEPAKRNKLLRRKGSFNKGPI
2a-GB	(301)	VRD	LQTLHLKVYDRDRSDFMGSSSFFLSKLELDRMVLMTLSLEDNPNSEESDMGVIIEACL	SIREEPAKRNKLLRRKGSFNKGPI
			401	500
2a-2	(401)	SQV	WSGVYTVILVEGQDMP	CGQGDVYVRFRLGQDQVRSKSLCIKANPQWRESDFNFQDAQENLVVEVCCCKRGRKSEECGVLDL
2a-4	(401)	SQV	WSGVYTVILVEGQDMP	CGQGDVYVRFRLGQDQVRSKSLCIKANPQWRESDFNFQDAQENLVVEVCCCKRGRKSEECGVLDL
2a-10	(401)	SQV	WSGVYTVILVEGQDMP	CGQGDVYVRFRLGQDQVRSKSLCIKANPQWRESDFNFQDAQENLVVEVCCCKRGRKSEECGVLDL
2a-GB	(401)	SQV	WSGVYTVILVEGQDMP	CGQGDVYVRFRLGQDQVRSKSLCIKANPQWRESDFNFQDAQENLVVEVCCCKRGRKSEECGVLDL
			501	600
2a-2	(501)	TYE	LDQPKGLRFLVTLTPCSGASISDIQSAPLDNPTPEKMRQYRPMNILGDFKNVGLQVKLIRATDLPSTDISGKSDPFTLELNSKLOTHITCK	
2a-4	(501)	TYE	LDQPKGLRFLVTLTPCSGASISDIQSAPLDNPTPEKMRQYRPMNILGDFKNVGLQVKLIRATDLPSTDISGKSDPFTLELNSKLOTHITCK	
2a-10	(501)	TYE	LDQPKGLRFLVTLTPCSGASISDIQSAPLDNPTPEKMRQYRPMNILGDFKNVGLQVKLIRATDLPSTDISGKSDPFTLELNSKLOTHITCK	
2a-GB	(501)	TYE	LDQPKGLRFLVTLTPCSGASISDIQSAPLDNPTPEKMRQYRPMNILGDFKNVGLQVKLIRATDLPSTDISGKSDPFTLELNSKLOTHITCK	
			601	700
2a-2	(601)	TLN	PEWRTALTFPIRD	HQVVLVTVYHEDGDKAPDFLGKVAIPLLTISNGQQTIRMLKTNNLSRANKGSITLELKVLYNPIKAGIKTFQPKETMFAEDNF
2a-4	(601)	TLN	PEWRTALTFPIRD	HQVVLVTVYHEDGDKAPDFLGKVAIPLLTISNGQQTIRMLKTNNLSRANKGSITLELKVLYNPIKAGIKTFQPKETMFAEDNF
2a-10	(601)	TLN	PEWRTALTFPIRD	HQVVLVTVYHEDGDKAPDFLGKVAIPLLTISNGQQTIRMLKTNNLSRANKGSITLELKVLYNPIKAGIKTFQPKETMFAEDNF
2a-GB	(601)	TLN	PEWRTALTFPIRD	HQVVLVTVYHEDGDKAPDFLGKVAIPLLTISNGQQTIRMLKTNNLSRANKGSITLELKVLYNPIKAGIKTFQPKETMFAEDNF
			701	800
2a-2	(701)	KNK	KLARNIYVRVKISMAILYLQYIKSCFHENTQRSITAFILFVAVWLWELFMLPLFLLLLIGWNYFHITPGMASYSQDLEHMSVAEDEDDEDE	
2a-4	(701)	KNK	KLARNIYVRVKISMAILYLQYIKSCFHENTQRSITAFILFVAVWLWELFMLPLFLLLLIGWNYFHITPGMASYSQDLEHMSVAEDEDDEDE	
2a-10	(701)	KNK	KLARNIYVRVKISMAILYLQYIKSCFHENTQRSITAFILFVAVWLWELFMLPLFLLLLIGWNYFHITPGMASYSQDLEHMSVAEDEDDEDE	
2a-GB	(701)	KNK	KLARNIYVRVKISMAILYLQYIKSCFHENTQRSITAFILFVAVWLWELFMLPLFLLLLIGWNYFHITPGMASYSQDLEHMSVAEDEDDEDE	
			801	900
2a-2	(801)	SEK	RGLMEKIHMQEIVLTVQSTLDEVACIGERVKNTFNWVPLFSLACLVLVAIVGLYIT	RYIVLLWGVNKFTKKLNPNYAIENNEMDLKRVV

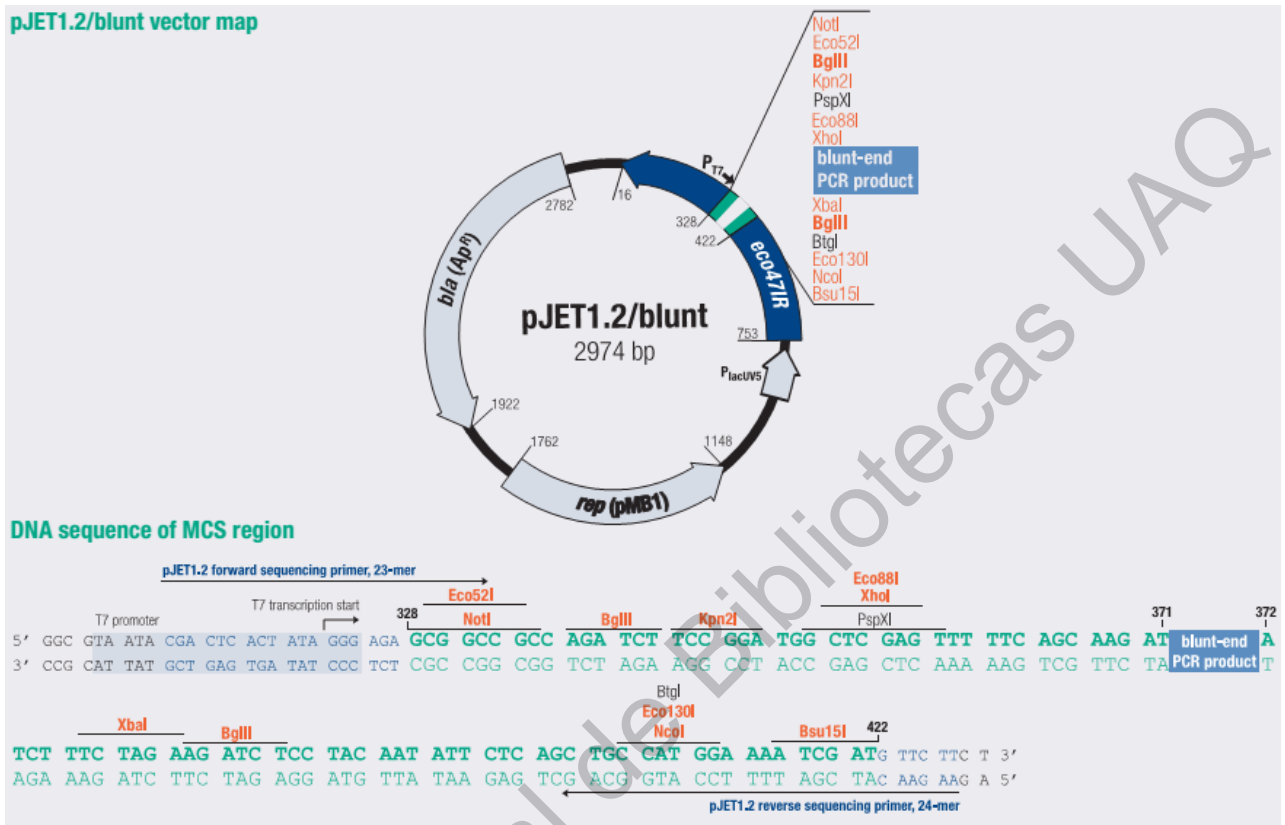
Mctp2b

	1			100																																																																																												
2b-2	(1)	M	RGF	FLFKSNYDKNDSGSIQDNEQNGILDIAE	PGVCENQRESQRTYLLTICLKEGRNLVIR	RCG	TS	DPYVVKVLDGKGMVYKSKVVLKLNLPVW																																																																																								
2b-4	(1)	M	RGF	FLFKSNYDKNDSGSIQDNEQNGILDIAE	PGVCENQRESQRTYLLTICLKEGRNLVIR	RCG	TS	DPYVVKVLDGKGMVYKSKVVLKLNLPVW																																																																																								
2b-6	(1)	M	RGF	FLFKSNYDKNDSGSIQDNEQNGILDIAE	PGVCENQRESQRTYLLTICLKEGRNLVIR	RCG	TS	DPYVVKVLDGKGMVYKSKVVLKLNLPVW																																																																																								
2b-GB	(1)	M	RGF	FLFKSNYDKNDSGSIQDNEQNGILDIAE	PGVCENQRESQRTYLLTICLKEGRNLVIR	RCG	TS	DPYVVKVLDGKGMVYKSKVVLKLNLPVW																																																																																								
				101				200																																																																																								
2b-2	(101)	ES	FT	PIRSL	EQTVFIKVFDRDLTSDDFMGSCSVGLDKLELEKTEMVPLDDPN	SLEEDMGFIAIDICVSMRGGKNNKQ		-----GNSNEYKRM																																																																																								
2b-4	(101)	ES	FT	PIRSL	EQTVFIKVFDRDLTSDDFMGSCSVGLDKLELEKTEMVPLDDPN	SLEEDMGFIAIDICVSMRGGKNNKQ		-----GNSNEYKRM																																																																																								
2b-6	(101)	ES	FT	PIRSL	EQTVFIKVFDRDLTSDDFMGSCSVGLDKLELEKTEMVPLDDPN	SLEEDMGFIAIDICVSMRGGKNNKQ		-----GNSNEYKRM																																																																																								
2b-GB	(101)	ES	FT	PIRSL	EQTVFIKVFDRDLTSDDFMGSCSVGLDKLELEKTEMVPLDDPN	SLEEDMGFIAIDICVSMRGGKNNKQ		-----GNSNEYKRM																																																																																								
				201				300																																																																																								
2b-2	(190)	SE	VN	KSQLMIGLYTITLVDGRDLKPKDQGGDL	ARFKLGDQPKFSK	SRSK	KVIT	EWRERFDFYQFPDASSLLEIEVVLKDGKSEESYGLSEINLSELP																																																																																								
2b-4	(190)	SE	VN	KSQLMIGLYTITLVDGRDLKPKDQGGDL	ARFKLGDQPKFSK	SRSK	KVIT	EWRERFDFYQFPDASSLLEIEVVLKDGKSEESYGLSEINLSELP																																																																																								
2b-6	(201)	SE	VN	KSQLMIGLYTITLVDGRDLKPKDQGGDL	ARFKLGDQPKFSK	SRSK	KVIT	EWRERFDFYQFPDASSLLEIEVVLKDGKSEESYGLSEINLSELP																																																																																								
2b-GB	(192)	-----	-----	-----	-----	SRSK	KVIT	EWRERFDFYQFPDASSLLEIEVVLKDGKSEESYGLSEINLSELP																																																																																								
				301				400																																																																																								
2b-2	(290)	NE	ST	LF	SCDLEPGRGKVFLITPKACTGASIS	DLITP	PLED	PEEKENILAKYSLKNI	VRDLRDVGLQVKVIKATDLISADLNKGSDDPFCVLELGN	SRLQ																																																																																						
2b-4	(290)	NE	ST	LF	SCDLEPGRGKVFLITPKACTGASIS	DLITP	PLED	PEEKENILAKYSLKNI	VRDLRDVGLQVKVIKATDLISADLNKGSDDPFCVLELGN	SRLQ																																																																																						
2b-6	(301)	NE	ST	LF	SCDLEPGRGKVFLITPKACTGASIS	DLITP	PLED	PEEKENILAKYSLKNI	VRDLRDVGLQVKVIKATDLISADLNKGSDDPFCVLELGN	SRLQ																																																																																						
2b-GB	(246)	NE	ST	LF	SCDLEPGRGKVFLITPKACTGASIS	DLITP	PLED	PEEKENILAKYSLKNI	VRDLRDVGLQVKVIKATDLISADLNKGSDDPFCVLELGN	SRLQ																																																																																						
				401				500																																																																																								
2b-2	(390)	TH	T	YK	TLN	PEW	NKVTF	FPVKDI	HEVLE	VTF	VED	GD	KAP	DF	L	G	V	A	I	P	L	V	S	A	C	Q	Q	O	F	I	C	P	L	R	K	E	N	L	T	S	M	S	K	G	A	V	I	L	E	L	F	N	P	I	K	A	S	I	I	T	F	T	P	R	E	Q																														
2b-4	(390)	TH	T	YK	TLN	PEW	NKVTF	FPVKDI	HEVLE	VTF	VED	GD	KAP	DF	L	G	V	A	I	P	L	V	S	A	C	Q	Q	O	F	I	C	P	L	R	K	E	N	L	T	S	M	S	K	G	A	V	I	L	E	L	F	N	P	I	K	A	S	I	I	T	F	T	P	R	E	Q																														
2b-6	(401)	TH	T	YK	TLN	PEW	NKVTF	FPVKDI	HEVLE	VTF	VED	GD	KAP	DF	L	G	V	A	I	P	L	V	S	A	C	Q	Q	O	F	I	C	P	L	R	K	E	N	L	T	S	M	S	K	G	A	V	I	L	E	L	F	N	P	I	K	A	S	I	I	T	F	T	P	R	E	Q																														
2b-GB	(346)	TH	T	YK	TLN	PEW	NKVTF	FPVKDI	HEVLE	VTF	VED	GD	KAP	DF	L	G	V	A	I	P	L	V	S	A	C	Q	Q	O	F	I	C	P	L	R	K	E	N	L	T	S	M	S	K	G	A	V	I	L	E	L	F	N	P	I	K	A	S	I	I	T	F	T	P	R	E	Q																														
				501				600																																																																																								
2b-2	(490)	F	L	E	D	N	P	K	F	S	K	I	L	S	R	N	I	G	R	V	R	N	L	F	R	A	V	S	Y	S	H	Q	F	I	T	S	C	F	T	W	E	S	V	R	R	S	I	T	A	F	L	F	L	L	A	V	W	Y	F	E	F	Y	M	L	P	L	F	V	L	L	I	S	W	N	Y	L	I	A	T	E	R	V	T	R	D	P	E	N	M	E	I	C	D	D	D	D
2b-4	(490)	F	L	E	D	N	P	K	F	S	K	I	L	S	R	N	I	G	R	V	R	N	L	F	R	A	V	S	Y	S	H	Q	F	I	T	S	C	F	T	W	E	S	V	R	R	S	I	T	A	F	L	F	L	L	A	V	W	Y	F	E	F	Y	M	L	P	L	F	V	L	L	I	S	W	N	Y	L	I	A	T	E	R	V	T	R	D	P	E	N	M	E	I	C	D	D	D	D
2b-6	(501)	F	L	E	D	N	P	K	F	S	K	I	L	S	R	N	I	G	R	V	R	N	L	F	R	A	V	S	Y	S	H	Q	F	I	T	S	C	F	T	W	E	S	V	R	R	S	I	T	A	F	L	F	L	L	A	V	W	Y	F	E	F	Y	M	L	P	L	F	V	L	L	I	S	W	N	Y	L	I	A	T	E	R	V	T	R	D	P	E	N	M	E	I	C	D	D	D	D
2b-GB	(446)	F	L	E	D	N	P	K	F	S	K	I	L	S	R	N	I	G	R	V	R	N	L	F	R	A	V	S	Y	S	H	Q	F	I	T	S	C	F	T	W	E	S	V	R	R	S	I	T	A	F	L	F	L	L	A	V	W	Y	F	E	F	Y	M	L	P	L	F	V	L	L	I	S	W	N	Y	L	I	A	T	E	R	V	T	R	D	P	E	N	M	E	I	C	D	D	D	D
				601				700																																																																																								
2b-2	(590)	D	E	K	S	E	K	G	L	M	E	K	I	H	M	V	Q	E	I	V	T	V	Q	N	L	E	E	A	S	L	G	E	R	I	K	N	T	F	N	W	S	V	P	L	S	K	L	A	L	M	I	F	I	M	A	T	V	I	T	Y	F	S	V	R	I	V	L	L	Y	G	I	H	R	F	T	K	L	R	N	P	Y	A	I	E	N	N	E	L	L	D	F	L				
2b-4	(590)	D	E	K	S	E	K	G	L	M	E	K	I	H	M	V	Q	E	I	V	T	V	Q	N	L	E	E	A	S	L	G	E	R	I	K	N	T	F	N	W	S	V	P	L	S	K	L	A	L	M	I	F	I	M	A	T	V	I	T	Y	F	S	V	R	I	V	L	L	Y	G	I	H	R	F	T	K	L	R	N	P	Y	A	I	E	N	N	E	L	L	D	F	L				
2b-6	(601)	D	E	K	S	E	K	G	L	M	E	K	I	H	M	V	Q	E	I	V	T	V	Q	N	L	E	E	A	S	L	G	E	R	I	K	N	T	F	N	W	S	V	P	L	S	K	L	A	L	M	I	F	I	M	A	T	V	I	T	Y	F	S	V	R	I	V	L	L	Y	G	I	H	R	F	T	K	L	R	N	P	Y	A	I	E	N	N	E	L	L	D	F	L				
2b-GB	(546)	D	E	K	S	E	K	G	L	M	E	K	I	H	M	V	Q	E	I	V	T	V	Q	N	L	E	E	A	S	L	G	E	R	I	K	N	T	F	N	W	S	V	P	L	S	K	L	A	L	M	I	F	I	M	A	T	V	I	T	Y	F	S	V	R	I	V	L	L	Y	G	I	H	R	F	T	K	L	R	N	P	Y	A	I	E	N	N	E	L	L	D	F	L				
				701				731																																																																																								
2b-2	(690)	S	R	V	P	S	D	I	Q	M	T	Q	Y	T	E	M	S	S	C	S	I	N	S	P	Y	R	K	R	S	S	E																																																																	
2b-4	(690)	S	R	V	P	S	D	I	Q	M	T	Q	Y	T	E	M	S	S	C	S	I	N	S	P	Y	R	K	R	S	S	E																																																																	
2b-6	(701)	S	R	V	P	S	D	I	Q	M	T	Q	Y	T	E	M	S	S	C	S	I	N	S	P	Y	R	K	R	S	S	E																																																																	
2b-GB	(646)	S	R	V	P	S	D	I	Q	M	T	Q	Y	T	E	M	S	S	C	S	I	N	S	P	Y	R	K	R	S	S	E																																																																	

Anexo 5. Mapa del plásmido pGEM-T Easy (Promega)



Anexo 6. Mapa del plásmido pJET2.1/blunt (Fermentas)





Research paper

Temporal and spatial expression of zebrafish *mctp* genes and evaluation of frameshift alleles of *mctp2b*

Angeles E. Espino-Saldaña^{a,c}, Karina Durán-Ríos^a, Eduardo Olivares-Hernandez^a, Roberto Rodríguez-Ortiz^b, Fausto Arellano-Carbajal^c, Ataulfo Martínez-Torres^{a,*}

^a Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Juriquilla, Querétaro, 76230, Mexico

^b CONACYT- Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Juriquilla, Querétaro, 76230, Mexico

^c Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales, Av. de las Ciencias S/N, Querétaro, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:

C2 domain
Calcium sensors
CRISPR/Cas9
Development

ABSTRACT

MCTPs (multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions) have been proposed as novel endoplasmic reticulum calcium sensors; however, their function remains largely unknown. Here we report the structure of the four *mctp* genes from zebrafish (*mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a* and *mctp2b*), their diversity, expression pattern during embryonic development and in adult tissue and the effect of knocking down the expression of *Mctp2b* by CRISPR/Cas9. The four *mctp* genes are expressed from early development and exhibit differential expression patterns but are found mainly in the nervous and muscular systems. *Mctp2b* tagged with fluorescent proteins and expressed in HEK-293 cells and neurons of the fish spinal cord localized mostly in the endoplasmic reticulum but also in lysosomes and late and recycling endosomes. Knocking down *mctp2b* expression impaired embryonic development, suggesting that the functional participation of this gene is relevant, at least during the early stages of development.

1. Introduction

Many proteins that bear the Ca²⁺-binding C2 domain are involved in membrane and vesicle trafficking, playing a central role in neuronal transmission. For example, in synaptotagmins, ferlins and extended-synaptotagmins in which phospholipid affinity increases upon Ca²⁺ binding, promoting the fusion of membrane vesicles (Cho and Stahelin, 2006; Shupliakov and Brodin, 2010). MCTPs are proteins with three C2 domains and two C-terminal transmembrane regions (TMRs) with some resemblance to other proteins involved in synaptic transmission. MCTPs bind Ca²⁺; however, phospholipid interactions do not occur, which sets them apart from other neurotransmission-related C2-bearing proteins (Shin et al., 2005). MCTPs have been found in the endoplasmic reticulum and intracellular vesicles in neurons, and evidence suggests that they are involved in presynaptic homeostatic plasticity in *Drosophila melanogaster* (Genç et al., 2017).

MCTPs are evolutionarily conserved from invertebrates such as

Caenorhabditis elegans and *D. melanogaster*, that only have one *mctp* gene, to mammals that have two genes (*MCTP1* and *MCTP2*) (Shin et al., 2005). These proteins are related to neuropsychiatric diseases; for example, a genome-wide analysis showed association of a single-nucleotide polymorphism (SNP) in *MCTP1* with bipolar disorder (Scott et al., 2009) and a second SNP in *MCTP2* with schizophrenia (Djurovic et al., 2009). A deletion in *MCTP2* causes a congenital disease in humans, giving rise to malformations in the aorta. This is consistent with experimental evidence showing that knocking down *Mctp2* expression in *Xenopus* with morpholinos develops a condition related to aortic coarctation (Lalani et al., 2013).

Few studies provide evidence for the function of MCTP. In *C. elegans*, an RNAi screening showed that suppression of *mctp* expression is lethal in 25% of the worms during embryonic development (Maeda et al., 2001). This report contrasts with recent findings that an *mctp1* knockout strain is viable but with a reduced number and size of lipid droplets, suggesting that *Mctp* is involved in the biogenesis of these

Abbreviations: hpe, hours post-electroporation; hpf, hours post fertilization; hpi, hours post-injection; hpt, hours post-transfection; indels, insertions and deletions; ISH, *In situ* hybridization; MCTP, proteins with three C2 domains and two C-terminal transmembrane regions; sgRNAs, single-guide RNAs; SNP, single-nucleotide polymorphism; TMR, transmembrane region

* Corresponding author.

E-mail address: ataulfo@unam.mx (A. Martínez-Torres).

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144371>

Received 6 September 2019; Received in revised form 11 January 2020; Accepted 13 January 2020

Available online 27 January 2020

0378-1119/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

storage depots. Another study showed that over-expression of MCTP1 in a PC12 cell culture inhibited endocytosis, secretory vesicle retrieval and cell migration. This suggests that MCTP1 might be involved in regulating endosome recycling in neurons (Qiu et al., 2015).

To gain some understanding of the role of MCTPs, in this work, we established the temporal and spatial expression pattern of the four zebrafish *mctp* genes. We identified the intracellular localization of these proteins in cell culture and in electroporated neurons of fish embryos *in vivo*. Finally, we knocked down the expression of *mctp2b* and determined the consequences of this manipulation in early development.

2. Materials and methods

2.1. Zebrafish maintenance

Zebrafish were raised in an Aquatic Habitats system in accordance with protocols approved by the Care and Use Committees of the Institute of Neurobiology, UNAM. A wild-type AB strain was used for all studies. Once the embryos reached the desired stage, they were dechorionated manually with watchmakers' forceps and anesthetized with 0.2% Tricaine.

2.2. Phylogenetic and synteny analysis

Sequences were obtained from the Ensembl database (<http://www.ensembl.org>) and Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Sequence alignments and phylogenetic tree were performed using Mega X software using the maximum likelihood method (Kumar et al., 2018). The map locations of the orthologous genes in zebrafish and human were obtained from Zebrafish genome view (GRCz11) and Human genome view (GRCh38, p13), respectively.

2.3. RNA extraction, cDNA synthesis, cloning and construction of DNA chimeras

Total RNA was obtained by a standard Trizol method (Thermo Fisher Scientific) followed by DNase I treatment and heat inactivation. RNA integrity was confirmed by gel electrophoresis and concentration was determined by spectrophotometry. RT-PCRs were performed using the SuperScript[®]III One-Step RT-PCR kit (Thermo Fisher Scientific). All primers are listed in [Supplementary Table 1](#). The entire coding sequences of *mctp* genes were amplified by RT-PCR from 24 hpf embryos and cloned into pGEM-T Easy Vector (Promega). Each *mctp* cDNA was fused to GFP or mCherry subcloning in pDNA3-LIC cloning vectors 6D or 6B, respectively (Addgene plasmid numbers #30127 and #30125).

2.4. Whole-mount *in situ* hybridization

In situ hybridization (ISH) was performed using digoxigenin-labeled antisense RNA probes specific to each *mctp* mRNA synthesized using the primers listed in [Supplementary Table 1](#), according to the standard protocol (Thisse and Thisse, 2008) with minor modification: manual dechorionation instead of using pronase; 50 ng of antisense DIG-labeled RNA probe in 200 μ l of buffer; and always using fresh fixed embryos. RNA sense probes were used as negative controls.

2.5. Cell culture and transfection

HEK-293 cells were grown in DMEM (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific). Cells were co-transfected at a 1:1 ratio in a 35 mm FluoroDish by using 4 μ g of total DNA plus 10 μ l of Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) according to the supplier's protocol and observed *in vivo* at 36 h post-transfection (hpt). The following organelle marker vectors were used: Sec61 β -mCherry for endoplasmic reticulum (ER), DsRed-

Rab7 for late endosomes, DsRed-Rab11 for recycling endosomes, Lamp1-RFP for lysosomes (Addgene plasmids #49155, #12661, #12679 and #1817 respectively) and Mem-CFP for cell membranes (Cat. 6918-1, CLONTECH Inc.).

2.6. Embryo electroporation and fixation

Electroporation was performed as described previously (Hoegler and Horne, 2010; Kera et al., 2010) with some modifications. In brief, manually dechorionated and anesthetized embryos at 24 hpf were positioned dorsally and trapped in 1% low melting point agarose. Then, embryos were microinjected with 1 μ g of DNA. Immediately after, electroporation was performed with handheld gold electrodes (1 mm separation, 1 mm thickness, -1 mm nail polish isolated). Five square pulses were applied using an ECM830 Square Wave Electroporation System (BTX[®]) with 10 V per 5 ms, and embryos were fixed in 4% paraformaldehyde after 24 h post-electroporation (hpe).

2.7. Confocal imaging and processing

Transfected HEK-293 cells were imaged under a laser scanning confocal microscope (Zeiss LSM-510 META) with 63X /1.4NA or 40X/ NA 1.35 oil immersion objectives. Electroporated embryos were imaged under a laser scanning confocal microscope (Zeiss LSM 780 DUO) with an LD Plan-Neofluar 40X/0,6NA Corr Ph2 M27 objective. Optical slices were set to 1 or 2 μ m. Image processing was performed using ImageJ software, and colocalization analysis was performed using the JACoP plugin (Bolte and Cordelières, 2006).

2.8. CRISPR/Cas9 mutagenesis and genotyping

Custom CRISPR single-guide RNAs (sgRNAs) specific for zebrafish *mctp2b* were designed using CRISPRscan (Moreno-Mateos et al., 2015) and constructed using the following oligonucleotides: GGGGTCGGGTGCAGGCTTT for guide 1, GGTGACCTGGAGCCGGGCCG for guide 2 and GGTTTGCTCGTTGTCTTGTA for guide 3. As a control, an sgRNA targeting the albino (*slc45a2*) gene was generated using the oligo GGGG AAGGTTGATTATGCAC. Cas9 mRNA was synthesized from the plasmid pT3TS-nCas9n (Addgene plasmid #46757) according to the standard protocol (Vejnar et al., 2016). Briefly, 1 nl of the mixture of sgRNAs (50 ng/ μ l) and Cas9 mRNA (100 ng/ μ l) was injected into 1-cell stage embryos. Around 100 embryos were injected per sgRNA per experiment. For genotyping, target sequences covering the corresponding sgRNA were PCR amplified from embryos at 24 hpf using the primers listed in [Supplementary Table 1](#). Amplicons were cloned and sequenced to corroborate mutagenesis.

3. Results

3.1. Molecular characterization of zebrafish *Mctps*

We found four putative *mctp* genes in the zebrafish genome: *mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a* and *mctp2b* located in chromosomes 5, 10, 18, and 7, respectively. We performed a comparative synteny analysis of the MCTP family in genomes from zebrafish and human ([Fig. 1A](#)). A conserved synteny in the *MCTP1* loci between human and zebrafish was found, since there are related genes upstream *MCTP1* and upstream both *mctp1a* in Chr. 5 and *mctp1b* in Chr. 10. In contrast, the *MCTP2* loci exhibit a low degree of conservation showing gene loss and shifts. Results showed some conservation between human *MCTP1* and zebrafish *mctp1a* in chromosome 18 but not with *mctp1b* in chromosome 7. However, *mctp1a* and *mctp1b* share an upstream gene in common that is absent in the *MCTP1* loci.

Based on these sequences, we amplified, cloned and fully sequenced 20 independent clones of *mctp* mRNAs. We found a high frequency of nucleotide changes, possibly SNPs (Butler et al., 2015). We also found

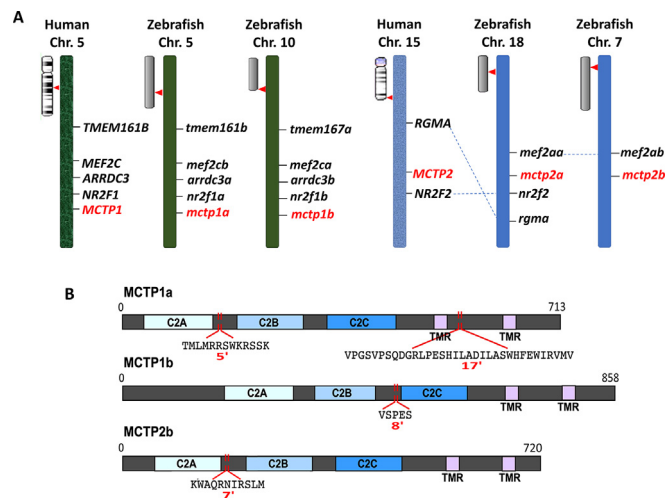


Fig. 1. (A) Synteny analysis of MCTP family genes in zebrafish and human. Human *MCTP1* is located in chromosome 5 (Chr.5) at ~95 Mb (human, GRCh38, p13); zebrafish *mctp1a* in chromosome 5 at ~50 Mb and *mctp1b* in chromosome 10 at ~44 Mb (zebrafish, GRCz11). Human *MCTP2* is located in chromosome 15 at ~94 Mb; zebrafish *mctp2a* in chromosome 18 at ~23 Mb and *mctp2b* in chromosome 7 at ~16 Mb. (B) Schematic representation of the zebrafish Mctp's that showed alternative splicing. The exon number is indicated in red and the amino acid sequence in uppercase. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

different alternatively spliced isoforms in three of the four genes (Fig. 1B). Two isoforms within three different sequences for Mctp1a (GenBank accession: MK532707, MK532708 and MK532709); two isoforms within three different sequences for Mctp1b (GenBank accession: MK532710, MK532711 and MK532712); two isoforms for Mctp2b (GenBank accession: MK532716, MK532717 and MK532718); Mctp2a did not evidence alternative splicing events, but we found variants with single nucleotide changes (GenBank accession: MK532713, MK532714 and MK532715). Analysis of the expected amino acid sequence predicted three C2 domains and two TMRs (Supplementary Fig. 1A). The Mctp1a and Mctp2b isoforms differ in the length and sequence of the linker between the C2A and C2B domains, whereas one of the Mctp1b isoforms has a longer linker between the C2B and C2C domains than the other Mctp1b isoform. The sequence identity between zebrafish and

human Mctp proteins is 46–76% and is higher in the predicted C2 domains, particularly the C2C domain (up to 91.45% identity). The Ca^{2+} binding sites are also conserved, suggesting a preserved function in zebrafish (red boxes in Supplementary Fig. 1A). Also, a phylogenetic tree was constructed using multiple alignments of amino-acid sequence to show the relationships of the zebrafish Mctp family members to each other and to those of human, rat, mouse, *Drosophila* and *C. elegans*; some relevant animal and invertebrate biological models are shown in Supplementary Fig. 1B.

3.2. Expression and distribution pattern of the *mctp* mRNA in zebrafish

To determine the expression of the zebrafish *mctp* mRNAs, we used RT-PCR on total RNA from adult tissue and from mixes of three embryos in the following zebrafish stages: 1-cell, gastrula, 16-somite, 21-somite, prim-5 and hatching. Specific primers for each *mctp* mRNA were designed to span an intron to prevent amplification from genomic DNA contamination. We observed the four *mctp* transcripts through development, as early as 1-cell stage and also in all analyzed adult tissues. Three RNA preparations from of each developmental stage and from each adult tissue were analyzed. Representative images and densitometry analysis are shown in Supplementary Fig. 2.

To determine the expression profiles of *mctp* transcripts during early development, we conducted ISH at different embryonic and larval stages (Fig. 2). At 1-cell stage, all *mctp* transcripts were expressed throughout the cell; however, *mctp2b* seemed to be more abundant. At gastrula, expression was uniform across the embryonic shield. At the 16 and 21-somite stages, the transcripts were observed mostly in the cells proximal to the yolk. At the prim-5 stage, higher expression was localized in the brain, across the forebrain, midbrain and hindbrain, particularly around the ventricles and in the retina (Fig. 2B), through the pronephric duct, and with less intensity, across the muscular system and notochord. Sense probes for each *mctp* mRNA were used as negative controls, and no signal was detected with any of the sense probes. Only *mctp2b* sense control is shown in Fig. 2.

3.3. Subcellular localization of Mctp proteins

In order to investigate the subcellular localization of Mctps, combinations of two of the four Mctp proteins tagged with GFP or mCherry were transiently co-expressed in HEK-293. We found that the four zebrafish Mctps show the same intracellular localization (Supplementary Fig. 3A). Pearson's coefficient was at least 0.8,

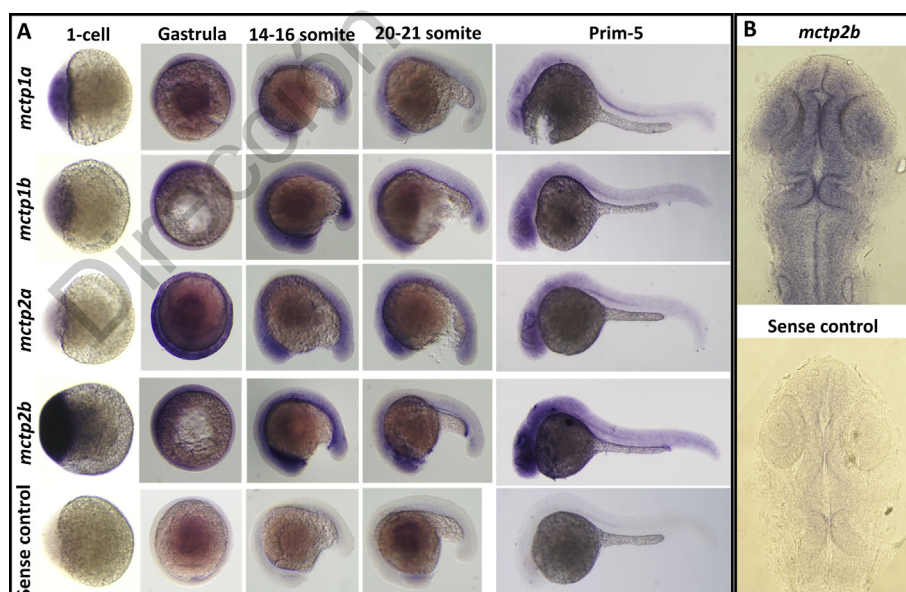


Fig. 2. (A) Spatiotemporal expression pattern of *mctp* genes in zebrafish embryos detected by ISH at the indicated stages. Sense probes for each gene were used as negative controls (only sense *mctp2b* is shown). N = 3 replicates with at least 15 embryos per stage. (B) Head (Dorsal view) of a prim-5 embryo showing the anti-sense *mctp2b* probe mark compared with its sense control.

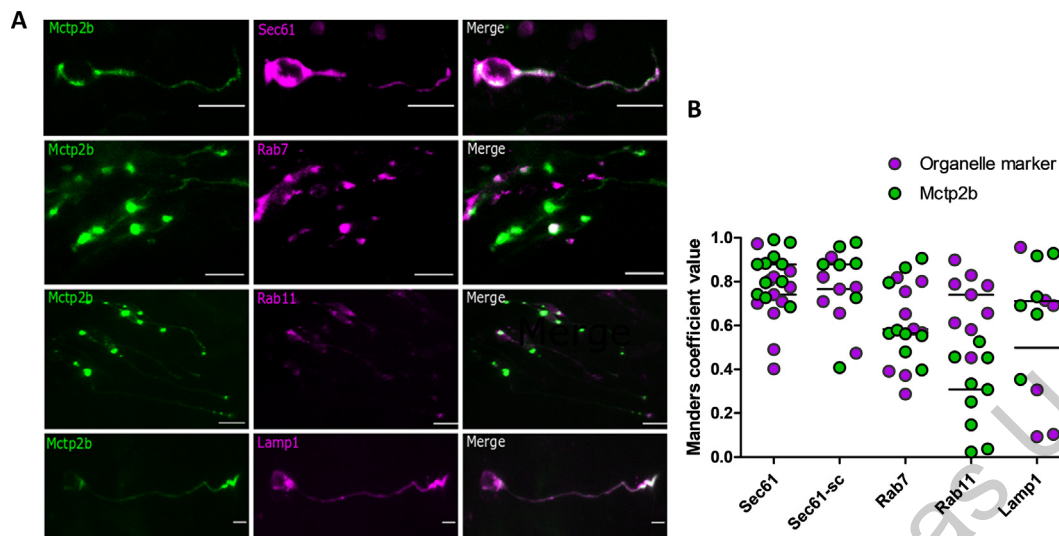


Fig. 3. (A) Cellular localization of Mctp proteins in neurons from the forebrain at 48 hpf. Confocal images from whole larvae co-electroporated with *mctp2b*-GFP (green) with the organelle markers (magenta) Sec61-mCherry (ER), DsRed-Rab7 (late endosomes), DsRed-Rab11 (recycling endosomes) and Lamp1-RFP (lysosomes). All images are slices projections edited with green LUT for Mctp2b and magenta LUT for organelle markers. Scale bar = 10 μ m, n = 5. (B) Manders' coefficients for Mctp2b organelle marker co-localization. Manders' coefficients were determined for each cell (n = 10); median and range are shown. Green = Mctp2b, Magenta = organelle marker. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

indicating significant co-localization (Supplementary Fig. 3B and Supplementary Table 2).

To examine in which organelles Mctps are localized, we co-transfected HEK-293 cells with Mctp2b tagged with GFP or mCherry and plasmids expressing fluorescent markers for ER, late endosomes, recycling endosomes, lysosomes and plasma cell membrane. We only tested Mctp2b because of the similar intracellular localization among the four Mctp proteins and because it is the most abundant transcript. As shown in Supplementary Fig. 4A, Mctp2b and the ER marker show the same distribution and localization; although Mctp2b also shows partial co-localization with lysosomes and recycling and late endosomes. In contrast, Mctp was not localized in the plasma membrane. Manders' coefficients are shown in Supplementary Fig. 4B and Pearson's coefficients are shown in Supplementary Table 3 (Manders et al., 1993, 1992).

To determine the subcellular localization of the Mctp proteins in zebrafish neurons, we co-electroporated embryos with Mctp2b chimeras and the organelle markers tested above. As shown in Fig. 3A, we found that both Mctp2b and ER co-localize in the perinuclear region and throughout the neuronal processes, suggesting that Mctp is localized mainly in the ER. Mctp2b shows partial localization in endosomes and lysosomes. Pearson's coefficient does not show a high correlation (Fig. 3B), but Manders' coefficients show a significant value (Manders et al., 1993, 1992), which is supported by Intensity Correlation Quotient (ICQ) values and the Costes randomization test (Bolte and Cordelieres, 2006; Costes et al., 2004; Dunn et al., 2011) (Supplementary Table 4).

3.4. Loss of *Mctp2b* leads to abnormal development

mctp2b showed the highest expression from the 1-cell stage and in the larval nervous and muscular systems; thus, we decided to investigate the effects of knocking down its expression. For that purpose, we used the CRISPR/Cas9 system to generate diverse frameshift alleles of *mctp2b* gene in 1-cell stage zebrafish embryos. We designed three sgRNAs targeting exons 2 or 4 (Fig. 4A) that disrupted the open reading frame, predictably generating either a small peptide lacking all the domains (guide 3) or a fragment of the protein containing only the C2A domain but unable to be embedded in membranes (guides 1 and 2) (Fig. 4B). We microinjected individual sgRNA mixed with Cas9 mRNA

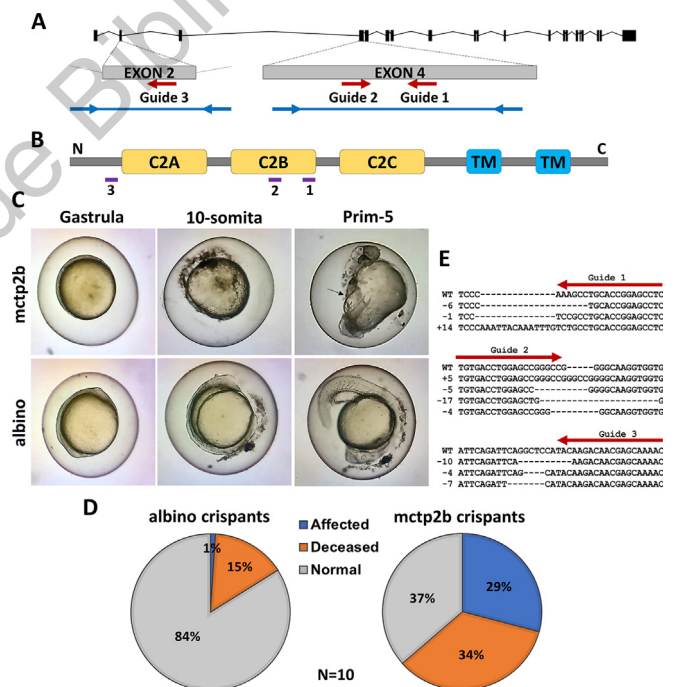


Fig. 4. Disruption of *mctp2b*. (A) Diagram of the zebrafish *mctp2b* gene showing the location of sgRNA targeting sites. The regions amplified by PCR for genotyping the CRISPR editions are shown in blue lines. (B) Schematic representation of the Mctp2b transcript indicating the position of relevant functional domains and the sites (purple lines) where the CRISPR editions disrupted the protein. (C) Phenotype of *mctp2b* crispants. (D) Indels found in the genomic DNA sequence of the sgRNA target sites in injected embryos. (E) Percent of normal phenotype, developmental defects (affected) and deceased in albino (control) and *mctp2b* crisphant embryos at 24 hpf. N = 10 independent experiments injecting around 100 embryos per sgRNA per experiment ($p < 0.001$, Fisher's exact test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

into 1-cell stage embryos. As a control, we also injected an sgRNA to target the *slc45a2* gene that generates an albino-like phenotype. Our results are summarized in Fig. 4C and D. At the gastrula stage, there was

a developmental delay in *mctp2b* crispants; the embryonic shield was thinner than that of albino crispants. At this stage, critical events that determine cell fate (internalization and germinal layer formation) were affected in the *mctp2b* crispants. At the 10-somite stage, there was a clear difference between the development of the *mctp2b* crispants and the albino crispants; the brain and optic primordium were not distinguishable, and somites were not properly formed. At the prim-5 stage 24 h post-injection (hpi), 34% of *mctp2b* crispants exhibited mortality, whereas 37% were morphologically normal, and 29% presented developmental defects: lack of symmetry and laterality (although they exhibited typical spontaneous contractions), irregular heartbeat, somite malformation, unrecognizable median fin fold, distinguishable but misshapen head and eyes. In contrast, most albino crispants developed normally and mortality was only at 15%. None of the affected *mctp2b* crispants survived at 48 hpi, whereas all of the albino crispants survived and exhibited normal development with different degrees of depigmentation (Supplementary Fig. 5). We confirmed gene editions in the injected embryos by DNA sequencing; these revealed various nucleotide insertions and deletions (indels) (Fig. 4E), most of them resulting in premature stop codons.

4. Discussion

Zebrafish have four *mctp* genes structurally similar to other vertebrates and invertebrates (Genç et al., 2017; Qiu et al., 2015; Shin et al., 2005). The protein sequence identity is 70% between *Mctp1a* and *Mctp1b* and 56% between *Mctp2a* and *Mctp2b*. They all have higher degrees of sequence conservation in the C2 domains and TMRs between them and other species (Supplementary Fig. 1). The study of synteny profile gave certain degree of conservativeness between human and zebrafish, suggesting that is evolutionary conserved and might share similar functions. Isoforms of human MCTP1 and MCTP2 proteins have been reported as a result of alternative splicing events; some of them possess only the second TMR (Shin et al., 2005). Length differences in the linker that separates the C2A and C2B domains have been also reported (Shin et al., 2005). Moreover, *mctp1* splicing in rat gives rise to three variants, two of them with differences in the length of the N-terminal sequence and an additional truncated protein lacking both TMRs (Qiu et al., 2015). In zebrafish, we did not find any truncated isoform lacking a TMR, but we found isoforms with differences in length and sequence in the linker between the C2A and C2B domains but also between C2B and C2C domains. These changes could result in subtle differences in the function of the protein variants; however, no apparent functional domains were detected in the alternative sequences.

We also determined the expression of *mctp* mRNAs in adult zebrafish tissues, and found their presence in all the explored tissues (heart, brain, eye, skin, muscle, kidney, liver and intestine). In a previous work, MCTP1 was detected in several organs including, brain, kidney, liver, heart, lung, skeletal muscle, testis, and spleen (Qiu et al., 2015).

In early stages, the four *mctp* mRNAs were found from the 1-cell stage and across all the analyzed stages of development (Fig. 2). Interestingly, at the 1-cell stage, *mctp2b* transcripts are noticeably more abundant than the other three *mctp* mRNAs, suggesting that *Mctp2b* protein could play an important role during the first cell divisions. At the prim-5 stage, higher expression is localized in the brain, throughout the forebrain, midbrain and hindbrain, particularly around the ventricles and in the retina (Fig. 2B); expression is also observed across the muscular system, pronephric ducts and the notochord but at lower levels. These results matched the finding that MCTP1 is widespread in the rat central nervous system and also highly detected in heart and skeletal muscle (Qiu et al., 2015). The temporal and spatial localization during development has not been explored in other vertebrates, but there is evidence that MCTP2 mRNA is present in the heart of mouse embryos especially during critical phases of primary heart tube maturation and morphogenesis (Lalani et al., 2013).

At the cellular level, MCTP has been localized in ER, dendrites, axon and presynaptic terminals of *D. melanogaster* motoneurons (Genç et al., 2017). MCTP1 was observed *in vitro* in neuronal/synaptic vesicles and partially in vesicles from both secretory and endocytic recycling pathways (Qiu et al., 2015). Intracellular localization of MCTP2 has not been explored. We found that the four zebrafish *Mctp* proteins have the same intracellular localization and are distributed in neurons across the ER and in lysosomes and endosomes. This suggests that they could have a role in the endocytic recycling pathway.

Mctp2b showed the largest distribution, as assessed by ISH, so we decided to disrupt the gene by using the CRISPR/Cas9 system. In about 30% of crispants, we found developmental defects during gastrula, a stage of fast cell division during which Ca^{2+} transients are essential for ooplasmic segregation (Leung CF, Webb SE, 1998). The partial survival rate of embryos may be explained by mosaicism, in which a fraction of cells expresses the *Mctp2b* protein allowing the embryo to develop until later stages albeit with evident defects.

In sum, we provide evidence for the expression and variability generated by alternative splicing of the four zebrafish *mctp* genes. We demonstrated that the four *Mctp* proteins share the same intracellular localization and tissue distribution in several early stages of development and in adult, although *mctp2b* mRNA is the most widely distributed. We do not yet have conclusive evidence of the role of *Mctps* in the cell but is clear that at least *Mctp2b* is functionally relevant for proper embryonic development.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We wish to acknowledge Elsa Nydia Hernández Ríos, Adriana Gonzalez, Carlos Sair Flores and Marina Ramírez for their technical assistance and Jessica Gonzalez Norris for editing the manuscript. This work was supported by CONACYT grants A1-S-7659 and A1-S-10450.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144371>.

References

- Bolte, S., Cordelières, F.P., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>.
- Butler, M.G., Iben, J.R., Marsden, K.C., Epstein, J.A., Granato, M., Weinstein, B.M., 2015. SNPfisher: Tools for probing genetic variation in laboratory-reared zebrafish. *Development* 142, 1542–1552. <https://doi.org/10.1242/dev.118786>.
- Cho, W., Stahelin, R., 2006. Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids* 1761, 838–849. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.06.014>.
- Costes, S.V., Daelemans, D., Cho, E.H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., Lockett, S., 2004. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys. J.* 86 (6), 3993–4003. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.038422>.
- Djurovic, S., Le Hellard, S., Kähler, A.K., Jönsson, E.G., Agartz, I., Steen, V.M., Hall, H., Wang, A.G., Rasmussen, H.B., Melle, I., Werge, T., Andreassen, O.A., 2009. Association of MCTP2 gene variants with schizophrenia in three independent samples of Scandinavian origin (SCOPE). *Psychiatry Res.* 168, 256–258. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2008.08.007>.
- Dunn, K.W., Kamocka, M.M., McDonald, J.H., 2011. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, 723–742. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010>.
- Genç, Ö., Dickman, D.K., Ma, W., Tong, A., Fetter, R.D., Davis, G.W., 2017. MCTP is an ER-resident calcium sensor that stabilizes synaptic transmission and homeostatic plasticity. *Elife* 6, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.22904>.
- Hoegler, K.J., Horne, J.H., 2010. Targeting the zebrafish optic tectum using *in vivo* electroporation. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010 (7). <https://doi.org/10.1101/pdb>.

- prot5463.
- Kera, S.A., Agerwala, S.M., Horne, J.H., 2010. The temporal resolution of *in vivo* electroporation in zebrafish: A method for time-resolved loss of function. *Zebrafish* 7, 97–108. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0620>.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Lalani, S.R., Ware, S.M., Wang, X., Zapata, G., Tian, Q., Franco, L.M., Jiang, Z., Bucayas, K., Scott, D.A., Campeau, P.M., Hanchard, N., Umaña, L., Cast, A., Patel, A., Cheung, S.W., McBride, K.L., Bray, M., Craig, Chinault A., Boggs, B.A., Huang, M., Baker, M.R., Hamilton, S., Towbin, J., Jefferies, J.L., Fernbach, S.D., Potocki, L., Belmont, J.W., 2013. MCTP2 is a dosage-sensitive gene required for cardiac outflow tract development. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4339–4348. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt283>.
- Leung, C.F., Webb, S.E., Miller, A.L., 1998. Calcium transients accompany ooplasmic segregation in zebrafish embryos. *Dev. Growth Differ.* 40, 313–326.
- Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M., Sugimoto, A., 2001. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr. Biol.* 11, 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00052-5).
- Manders, E.M.M., Stap, J., Brakenhoff, G.J., Vandriel, R., Aten, J.A., 1992. 3-dimensional replication patterns during the S-phase, analyzed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 103, 857–862.
- Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., Aten, J.A., 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.* 169, 375–382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x>.
- Moreno-Mateos, M.A., Vejnar, C.E., Beaudoin, J.D., Fernandez, J.P., Mis, E.K., Khokha, M.K., Giraldez, A.J., 2015. CRISPRscan: Designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat. Methods* 12, 982–988. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3543>.
- Qiu, L., Yu, H., Liang, F., 2015. Multiple C2 Domains Transmembrane protein 1 (MCTP1) is expressed in CNS neurons and possibly regulates cellular vesicle retrieval and oxidative stress. *J. Neurochem.* 1–16. <https://doi.org/10.1111/jnc.13251>.
- Scott, L.J., Muglia, P., Kong, X.Q., Guan, W., Flickinger, M., Upmanyu, R., Tozzi, F., Li, J.Z., Burmeister, M., Absher, D., Thompson, R.C., Francks, C., Meng, F., Antoniadis, A., Southwick, A.M., Schatzberg, A.F., Bunney, W.E., Barchas, J.D., Jones, E.G., Day, R., Matthews, K., McGuffin, P., Strauss, J.S., Kennedy, J.L., Middleton, L., Roses, A.D., Watson, S.J., Vincent, J.B., Myers, R.M., Farmer, A.E., Akil, H., Burns, D.K., Boehnke, M., 2009. Genome-wide association and meta-analysis of bipolar disorder in individuals of European ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7501–7506. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813386106>.
- Shin, O.-H., Han, W., Wang, Y., Sudhof, T.C., 2005. Evolutionarily conserved multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions (MCTPs) and unusual Ca²⁺ binding properties. *J. Biol. Chem.* 280, 1641–1651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407305200>.
- Shupliakov, O., Brodin, L., 2010. Recent insights into the building and cycling of synaptic vesicles. *Exp. Cell Res.* 316, 1344–1350. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.035>.
- Thisse, C., Thisse, B., 2008. High-resolution *in situ* hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protoc.* 3, 59–69. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.514>.
- Vejnar, C.E., Moreno-Mateos, M.A., Cifuentes, D., Bazzini, A.A., Giraldez, A.J., 2016. Optimized CRISPR–Cas9 system for genome editing in zebrafish. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016 (10). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot086850>.

REVIEW ARTICLE

Modeling Neuronal Diseases in Zebrafish in the Era of CRISPR

Angeles Edith Espino-Saldaña^{1,3}, Roberto Rodríguez-Ortiz², Elizabeth Pereida-Jaramillo¹ and Ataulfo Martínez-Torres^{1,*}

¹Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM Juriquilla, Querétaro, Qro CP76230, México; ²CONACYT - Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México. Querétaro, Qro., México; ³Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales, Av. de las Ciencias S/N, Querétaro, Mexico

Abstract: Background: *Danio rerio* is a powerful experimental model for studies in genetics and development. Recently, CRISPR technology has been applied in this species to mimic various human diseases, including those affecting the nervous system. Zebrafish offer multiple experimental advantages: external embryogenesis, rapid development, transparent embryos, short life cycle, and basic neurobiological processes shared with humans. This animal model, together with the CRISPR system, emerging imaging technologies, and novel behavioral approaches, lay the basis for a prominent future in neuropathology and will undoubtedly accelerate our understanding of brain function and its disorders.

ARTICLE HISTORY

Received: April 03, 2019
Revised: July 04, 2019
Accepted: September 29, 2019

DOI:
10.2174/1570159X17666191001145550

Objective: Gather relevant findings from studies that have used CRISPR technologies in zebrafish to explore basic neuronal function and model human diseases.

Method: We systematically reviewed the most recent literature about CRISPR technology applications for understanding brain function and neurological disorders in *D. rerio*. We highlighted the key role of CRISPR in driving forward our understanding of particular topics in neuroscience.

Results: We show specific advances in neurobiology when the CRISPR system has been applied in zebrafish and describe how CRISPR is accelerating our understanding of brain organization.

Conclusion: Today, CRISPR is the preferred method to modify genomes of practically any living organism. Despite the rapid development of CRISPR technologies to generate disease models in zebrafish, more efforts are needed to efficiently combine different disciplines to find the etiology and treatments for many brain diseases.

Keywords: Brain disease models, *Danio rerio*, genome engineering, zebrafish, optogenetics, CRISPR.

1. INTRODUCTION

Since the 1980s, zebrafish (*Danio rerio*) has quickly become a popular model in biological research to study genetics and developmental biology [1]. Since then, several techniques have made zebrafish one of the fastest-growing experimental model organisms, with great potential for new discoveries. Recently, the novel CRISPR/Cas system (clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein) has allowed the successful introduction of mutations to the genome or control gene expression in zebrafish. Here, we review the most recent studies about CRISPR technologies applied for understanding brain function and neurological disorders in *D. rerio*.

2. FEATURES AND ADVANTAGES OF THE ZEBRAFISH EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL

Several features make zebrafish an ideal system to perform studies in biology. A female can release up to 100–200 eggs that are externally fertilized. Embryos develop rapidly, and most organs are functional within a few days after fertilization [2]. Because the embryos are transparent during early embryogenesis, individual cells and processes can be visualized *in vivo*, making it easy to monitor the dynamics of gene expression in various tissues and organs without the need to sacrifice the experimental subjects. Zebrafish maturation takes only 2 ~ 3 months, which consequently saves time for generating transgenic lines. The zebrafish brain regenerates easily, allowing researchers to study mechanisms of neuroprotection and neurogenesis [3]. The organs of this species have been well-characterized, letting many fundamental questions about vertebrate biology to be addressed [4].

*Address correspondence to this author at the Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM Juriquilla, Querétaro, Qro CP76230, México; Tel/Fax: +52 442 238 1064; E-mail: ataulfo@unam.mx

Zebrafish and mammalian brains share broad anatomical and functional features, such as the presence and main functions of the cerebellum, diencephalon, amygdala, spinal cord, and enteric-autonomic nervous systems, although it is uncertain whether the zebrafish telencephalon is functionally equivalent to the mammalian telencephalon [5-10]. They share conserved neurotransmitter systems, such as GABA (γ -Aminobutyric acid), glutamate, dopamine, serotonin, noradrenaline, histamine, and acetylcholine [6]. Additionally, organogenesis in zebrafish is remarkably similar to that of humans [11]. These features make the zebrafish an excellent vertebrate model for studying human diseases, including neuronal disorders [12-15]. Furthermore, potential therapeutic drugs that target processes in various diseases have been discovered because chemical screening in zebrafish is straightforward and cost-effective [16, 17]. Using zebrafish larvae is considered by some researchers as more ethically acceptable than using rodents in biomedical research [18].

The current zebrafish genome assembly (GRCz11) has 25,592 coding genes and 6,599 non-coding genes resulting in 59,876 gene transcripts ("Zebrafish assembly and gene annotation" recovered from http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Annotation, last updated in April 2018). A comparison to the human reference genome shows that 71.4% of human genes have at least one obvious zebrafish ortholog [19]. The high number of gene transcripts compared to the coding genes derives mainly from alternative splicing events, which leads to large protein variability. Genomic analysis of human, mouse, and zebrafish suggested that gene duplication followed by exon structure divergence between paralog genes caused a significant reduction of alternative splicing [20].

Zebrafish have been successfully used to understand the biological activity of gene orthologs to human disease-related genes [14]. Out of all the human genes bearing morbidity descriptions listed in the Online Mendelian Inheritance in Man database, 82 % can be related to at least one zebrafish ortholog [19]. ZFIN, the Zebrafish Information Network (<http://www.zfin.org>), is the primary repository of information related to zebrafish genetics and genomics. ZFIN displays a variety of data types for each gene, such as sequence features, different available alleles, sequence targeting reagents including CRISPR guide RNA sequences; transgenics, phenotypes, expression, available antibodies, ontologies, homologues, and links to external databases, nomenclature, publications, and figure images.

3. MUTAGENESIS AND KNOCKDOWN IN ZEBRAFISH BEFORE CRISPR

Since the early 1990s, various protocols have been developed to allow successful gene editing and accurate control of gene expression of the zebrafish genome. First, chemical mutagenesis was used to perform random screens [21]. Shortly after, a method for generating transgenic fish using pseudotyped retroviruses was developed [22]. With this type of retrovirus, another large screen for developmental defects was achieved [23, 24] with the advantage that DNA integration events allowed all mutated genes to be systematically

identified. In the late 1990s, transposable elements were described to be active in the zebrafish genome; The Tol2 transposons, which were part of a procedure consisting of microinjecting single-cell embryos with the mRNA of the transposase and a number of vectors with specific features and applications [25]. Later, Sleeping Beauty and Ac/Ds transposons were also used [26, 27]. These genetic tools and techniques have made it possible to identify essential genes and their localization, introduce mutations to these genes, and generate a wide variety of knockin transgenic zebrafish lines, thereby providing multiple potential applications for functional genomic studies [28, 29]. An example of this technology in the fish genome is the introduction of an engineered TRPV4-ferritin chimera that allowed the magnetic control of neural function [30].

New technologies for targeted mutagenesis take advantage of genome-editing nucleases. These approaches allow scientists to generate mutations in specific genes or sites of the genome. In 2008, ZFNs (zinc finger nucleases) were demonstrated to be effective in zebrafish [31, 32]; this was the first demonstration of specifically targeted gene inactivation in this model. While ZFNs were effective tools for making targeted mutations, they required developing significant expertise to assemble them properly, or if commercially purchased, the cost was considerably high. In 2011, TALENs (Transcription activator-like effector nuclease) were adapted to zebrafish gene targeting [33]. The relatively modest cost of reagents compared with ZFN and ease of assembly made TALENs a more attractive alternative to ZFNs for large-scale targeted gene disruption [34]. Although this method has been proved to be effective, some TALEN pairs provide little to no mutagenic activity and their efficiency remains variable. These techniques are falling into disuse, yet recently published works still use them [35-37].

All the techniques described above were envisioned for the modification of the zebrafish genome. However, it is sometimes necessary only to transiently knockdown gene expression. In 2000, a new technique using antisense morpholinos oligonucleotides (MOs) was shown to be effective in zebrafish. MOs are modified oligonucleotides that inhibit the translation of target mRNA *in vivo*. They can be delivered efficiently by injecting them into the yolk of one-cell stage embryos [38]. This method became popular in zebrafish research because it was easy and effective. Unfortunately, MOs had major limitations and issues. Potential off-target or inexplicable phenotypes appeared, and rescue control experiments were occasionally an artifact. Nevertheless, knockdown approaches remain useful if proper control experiments are performed. MOs can also be designed to inhibit pre-mRNA splicing or block translation initiation. MOs are especially useful to knockdown multiple alleles and when large gene families are genetically redundant [39]. Interference RNA is another popular technique for gene knockdown, but in strong contrast to *Drosophila*, *C. elegans*, and mammalian cells, few successful applications of shRNA [40, 41] and iRNA [42] have been reported in zebrafish to silence gene expression. Despite concerted efforts in the field, progress in the use of RNAi technologies in zebrafish has been extremely slow.

4. CRISPR/Cas OVERVIEW

The CRISPR system has been the most revolutionary development in the biology of recent times. It was originally described as an adaptive immune system used by bacteria to defend themselves against invading viruses by recording and targeting their DNA sequences [43]. It was demonstrated that the CRISPR/Cas system is an efficient targeted mutagenesis tool for zebrafish [44] that allows targeting multiple genes simultaneously [45]. The use of the CRISPR/Cas system in zebrafish has proven to be so efficient and simple to use that it represented no less than a revolution in zebrafish research, making it possible to easily knockout any gene in the genome [4]. A single-guide RNA (sgRNA) includes a short sequence that is homologous to the DNA target followed by a “scaffold” sequence necessary for the Cas9-binding enzyme [46]. This is enough to program Cas9 to introduce double-strand breaks (DBS) in target DNA. These breaks are repaired by error-prone, non-homologous end-joining (NHEJ), which leads to nucleotide insertion and/or deletion (InDels) at the genomic target site resulting in in-frame amino acid deletions, insertions, or frameshift mutations leading to premature stop codons within the open reading frame (ORF) of the targeted gene. Ideally, the end result is a loss-of-function mutation within the targeted gene. To date there are several versions of the Cas9 enzyme from *Streptococcus pyogenes*, the most commonly used bacterium in genome engineering [47–49]. Cas9 has been modified to lose endonuclease activity while maintaining the ability to target specific DNA sequences. This modified enzyme called dCas9 can be fused to diverse effector domains, such as activators, repressors, or methylases, that can be used for targeted epigenome editing to specifically modify or control gene expression, or to introduce fluorescent proteins, thus providing a tool for visualizing chromosome structure or dynamics [50]. Likewise, nucleases from a variety of organisms have diverse characteristics such as a different PAM sequence or RNA—rather than DNA—targeting. An outline of these nuclease targets and functions is listed by Xu *et al.* and Wu *et al.* [51, 52].

4.1. Editing Zebrafish with the CRISPR System

The first use of CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis in zebrafish was demonstrated a few years ago [44]. Thenceforth, dozens of papers have been published describing the use of CRISPR in zebrafish as a tool to study developmental processes and model diseases. The CRISPR/Cas9 system was shown to be six times more efficient at generating germline mutations in zebrafish compared to ZFN and TALEN [53]. A zebrafish codon-optimized Cas9 was developed [45] and reported to increase mutagenesis efficiency [54]. A new tRNA-based multiplex sgRNA expression system has been developed in zebrafish to express multiple sgRNAs efficiently [55]; there is also a platform for generating somatic point mutations with germline transmission in the zebrafish [56, 57]. Recently, other nucleases have been optimized in zebrafish, such as Cas12a temperature-controlled genome editing. Additionally, there is a new approach that enables the direct, irreversible conversion of one target DNA base into another in a programmable manner, without requiring dsDNA backbone cleavage or a donor template [58].

The general procedure for targeted mutagenesis in zebrafish using the CRISPR system is as follows: First, sgRNAs targeting the specific gene or any other site in the genome are designed. Multiple options are available for sgRNA design such as CHOPCHOP [59] and CRISPRscan, which was created based on a large-scale analysis of sgRNA mutagenesis activity in zebrafish [60]. Second, single or multiple sgRNA guides are synthesized *in vitro* together with the mRNA encoding the Cas9 protein. Other Cas proteins can be used depending on the objective. Moreover, injecting Cas protein instead of Cas mRNA could improve mutagenesis efficiency [61]. Third, these sgRNAs together with the Cas mRNA or protein are injected into fertilized embryos at the one-cell stage [62, 63]. Injection dose should be standardized to improve efficiency and avoid phenotypes due to the toxic effect of the injection components. Microinjection efficiency can also improve using an automated microinjection system [62]. Each injected embryo grows as a mosaic founder fish (crispant) with various InDels in the somatic cells as the nucleases cleave the target sites over the course of multiple rounds of cell division in the developing embryos [44]. The phenotype and genotype can be analyzed within several hours or days after the injection. The phenotype should be analyzed in various crispant embryos taking into consideration that the number and localization of mutated cells will vary in each individual due to the range of severity in the phenotypes. Numerous techniques can be used for fast genotype screening such as TIDE (Tracking of Indels by Decomposition), HMA (heteroduplex mobility assay), or T7 endonuclease digestion [64–66]. The mutation is subsequently confirmed by PCR and sequencing. A ZEG device enables genotyping while keeping the embryos alive [67]. To avoid mosaicism and phenotype variability, a homozygotic mutant line can be produced by outcrossing mosaic crispants to wild-type and then inbred F1 until homozygous are found. If the homozygote is lethal, a heterozygous line can be maintained. Fig. 1 provides an overview of the main strategies for zebrafish genome engineering using the CRISPR system.

A detailed protocol for generating and genotyping mutants using CRISPR/Cas9 in zebrafish is described by Vejnar *et al.* [68] and Rafferty *et al.* [69], and a protocol using CRISPR/Cpf1 (CRISPR-associated endonuclease in *Prevotella* and *Francisella* 1) is included in a study by Fernandez *et al.* [58]. Also, a Cas9 transgenic zebrafish strain was recently constructed [70]. Compared with the traditional CRISPR injection method, this transgenic zebrafish has shown to significantly improve the efficiency of genome editing.

To generate transgenic zebrafish lines, techniques and protocols have been successfully established for exogenous DNA integration into the zebrafish genome using CRISPR [71–74]. This allows in-frame integration of fluorescent reporters, such as eGFP (enhanced green fluorescent protein), with a specific gene, as well as a precise integration of expression cassettes into the genome, thus avoiding overexpression due to the integration of many copies in the genome or integration in a zone where the chromatin could have a different pattern. Furthermore, tissue-specific gene disruption has been achieved by driving Cas9 expression with the Gal4/UAS system. In combination with Cre/loxP systems,

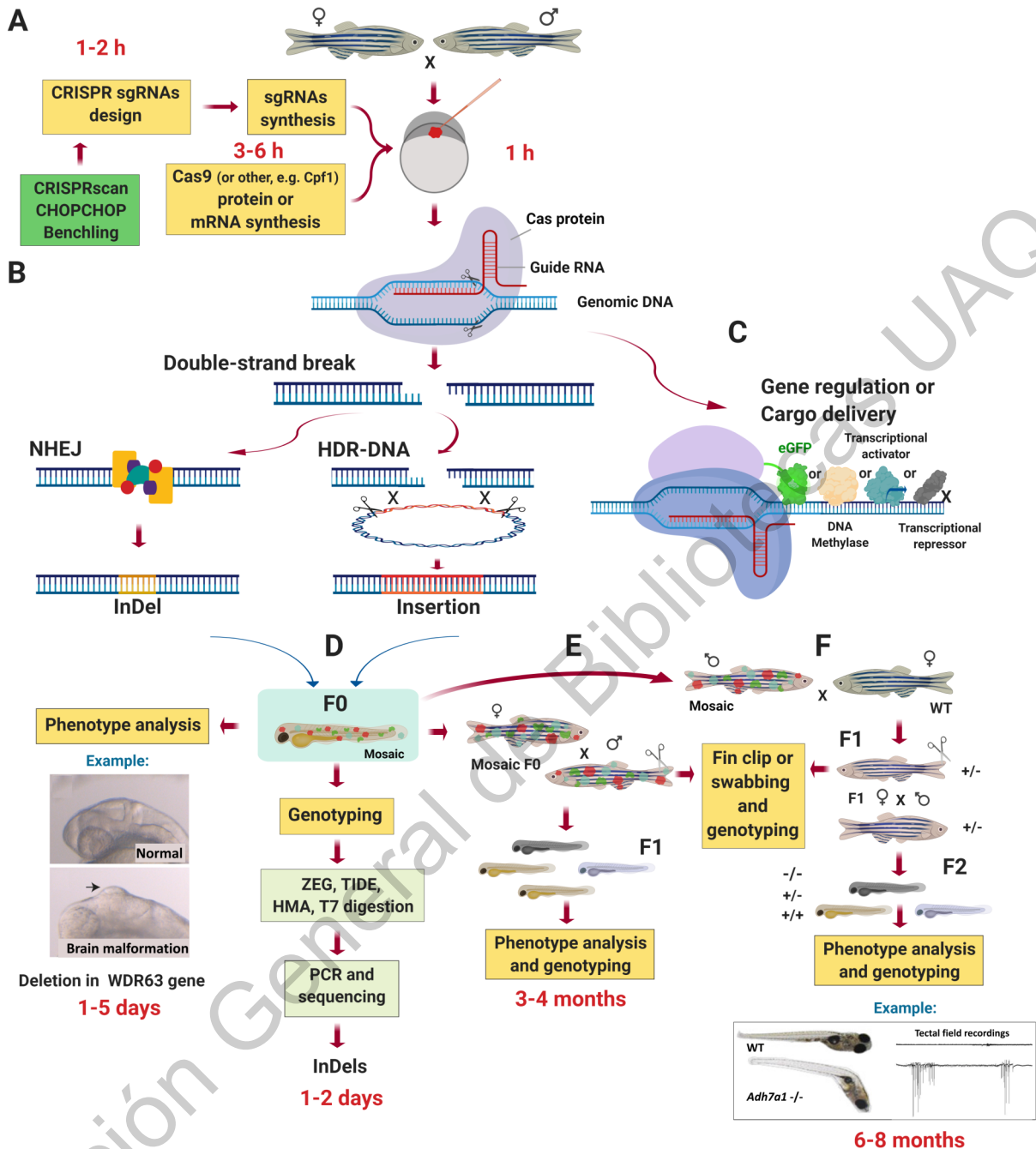


Fig. (1). Summary of the main strategies for zebrafish genome engineering using the CRISPR/Cas system. The typical time consumed in each procedure is indicated in red. A) sgRNA design using any of the available tools. *In vitro* synthesis of the sgRNAs and mRNA (or protein) from the Cas choice. Embryo microinjection at one-cell stage with a mix of single or multiple sgRNAs plus the following according to the purpose: for knockout, mRNA encoding Cas choice (or Cas protein); for knockin, mRNA encoding nuclease (or Cas protein) plus donor DNA; for gene regulation or cargo delivery, inactive dead Cas9 (dCas9) fused to an effector. Inside the cell, a complex is formed between the Cas protein, the sgRNA and the genomic DNA. B) The endonuclease generates a genomic DNA double-strand break, which is repaired by the endogenous DNA repair machinery by non-homologous end joining (NHEJ), causing insertions or deletions (InDels) that could disturb the open reading frame (knockout) or incorporate exogenous donor DNA into a homology-independent process at a chosen genomic locus (knockin). C) dCas9 can be used fused to an effector such as transcriptional repressors, activators, DNA methylases, or fluorescent proteins. In this case, the complex, instead of breaking the genomic DNA, allows gene regulation or target visualization. D) Phenotypes can be in the injected embryos after 1 to 5 days. Genotype screening can be performed in a portion of the mosaic F0 by a quick procedure such as TIDE (Tracking of Indels by Decomposition), HMA (heteroduplex mobility assay), or T7 endonuclease digestion, and then confirmed by PCR and sequencing. To keep the genotyped embryos alive, a ZEG device can be used instead of using the whole embryo for the analysis [67]. For a clear example of this procedure, see [101]. E) To avoid phenotype variability due to mosaicism, F1 can be analyzed in addition to the injected embryos (mosaics). F) To produce a mutant line, founder fish are outcrossed to wild type and then F1 inbred until homozygous are found. Genotyping is performed by fin-clip or skin swabbing [129]. If the homozygote is lethal, a heterozygous line can be maintained. For an example of this procedure, see [82].

a versatile tool was established to genetically label mutant cell clones, enabling their phenotypic analysis [47].

4.2. Knockdown versus Knockout

Since the CRISPR/Cas system has become the golden tool for studying gene function and generating genetic disease models, the use of MOs is gradually falling into disuse, and knockdown versus knockout approaches are being debated. This is due to the discrepancies found in several studies such as a study in which a screen of more than 20 zebrafish mutant lines half failed to recapitulate published MO-induced phenotypes [75]. In this study also compared morphant defects published in ZFIN with the mutant phenotypes from the Sanger Zebrafish Mutation Project and found differences in approximately 80% of the phenotypes. More studies with differences in the phenotype are continuously published; for instance, disruption of *fus* using CRISPR does not induce amyotrophic lateral sclerosis (ALS) as previously reported using MOs and similar to mouse *Fus* knockout [76]. Some researchers consider that the use of MOs should be avoided or limited [77, 78]. Nevertheless, MOs are still useful for a number of purposes, particularly to complement the limitations of knockout studies. For instance, Cerebellar Atrophy with Spinal Motor Neuronopathy was correlated with variants in *XOSC9* by using both CRISPR and MOs methods [79]. In loss-of-function studies, some aspects should be considered for using CRISPR or MOs and other knockdown approaches [80]: MOs can exert unnoticeable off-target effects; transcriptional adaptation specific mutations can lead to genetic compensation [81]; mutant progeny from heterozygous parents can carry sufficient wild-type maternal mRNA to maintain normal gene function during the first stages of development; partial knockdown by MOs can result in the complete retention of normal physiological function if the targeted protein has a high affinity for its substrate or high catalytic efficiency [82]. In conclusion, both knockdown and knockout approaches are useful and complementary to elucidate the function of specific genes and understand many diseases.

5. CRISPR APPLICATIONS IN NEURAL DISEASES

Animal modeling of human brain disorders has been extensively exploited. Murine models are most commonly used to investigate the basic concepts of brain function. As previously mentioned, zebrafish have recently gained popularity as a model for studying the vertebrate brain. Below, we describe the latest applications of CRISPR/Cas9 technology for examining the brain, its fundamental structures and connectivity, and associated diseases.

5.1. Morpholinos and CRISPR/Cas9

Before the CRISPR/Cas9 system, the use of MOs in zebrafish was the most accessible and widespread way to study the (partial) loss of function of different genes involved in brain diseases or related to the structure and function of neural cells. Now, in the era of CRISPR, it is easy to generate knockout mutants to corroborate and expand the findings observed with MOs. An example of the contrasting results between MOs and CRISPRs is the outcomes of suppressing the expression of the *brfl* gene, whose mutations in humans

give rise to the cerebellar-facial-skeletal syndrome. Splice blocking MOs effectively silenced the expression of both copies of the *brfl* gene (*brfla* and *brflb*) in zebrafish but resulted in no evident phenotypes; in contrast, CRISPR/Cas9 induced a mutation of *brflb*, resulting in F0s at 3 days post fertilization (dpf) with symptoms similar to those presented in the human pathology. Another example is the phenotypes derived from suppressing the expression of the gene *kif15*, which codes for a member of the kinesin family. Kinesins are proteins involved in the transport of cargo along axons. MOs effectively suppress the expression of *kif15* (formerly reported as Kinesin-12) but induce extended mosaicism of the larvae, giving rise to diverse phenotypes, in particular to a different rate of growing axons with a reduced number of branches [83]. In contrast, *kif15* mutations generated by CRISPR do not present mosaicism (studied in F2 and F3); their axonal growth is accelerated, and branching is consistently reduced in embryos between 29- and 31-hours post-fertilization (hpf). However, the results are more homogeneous than those of MOs. In addition, the CRISPR approach also allows researchers to compare the phenotypes of homo and heterozygous mutants [84].

MOs and CRISPR-induced changes in gene expression may have different outcomes in the establishment and development of neural circuits. One case is the neural cell adhesion protein Contactin2, which is encoded by the gene *cntn2*, a glycoprotein important for neuronal migration, axon fasciculation, and the establishment of sensorimotor circuits. In this example, MOs induced axonal growth defects that are not observed when the *cntn2* gene is removed by CRISPR. Other defects, such as delayed neuronal migration and defasciculation visualized at 48 hpf, are induced by both strategies, but it is clear that MOs may also lead to changes due to mistargeting [85].

Other studies combine observations of mutants obtained by mutagenesis screens, MOs, and CRISPR/Cas9. That is the case of the zebrafish loss-of-function model of the Transactive Response DNA-binding protein [86]. This is a model for ALS, a neurodegenerative, genetically heterogeneous disease with monogenic forms [87]. Upon comparing existing zebrafish *tardbp* mutants containing a point mutation (c660C>T) with *tardbpl* morphants and the *tardbpl* loss-of-function crispants, the point mutants did not exhibit an evident phenotype because of the compensatory role of the splice variant *tardbpl*. The splice variant *tardbpl* morphants (in the *tardbp*^{-/-} background) and the loss-of-function *tardbpl* crispants showed severe morphological defects as early as 2 dpf, such as shorter body length and eye diameter and enlarged pericardial area, reduced life span, impaired locomotor function, decreased frequency of miniature end plate currents and perturbations in neuromuscular junction architecture. Thus, using and combining the observations of each mutant may reveal the role of specific genes and their variants in different pathologies. In a similar case, fifteen different alleles of Nodal-related protein (Ndr2) have been generated by chemical mutagenesis, radiation, and TALEN (<http://www.zfin.org>; *ndr2* gene information). Using CRISPR/Cas9 to target different regions in all three exons of *ndr2* gave rise to mutants at 3 dpf; these mutants showed cyclopia and phenotypes similar to those observed in hu-

mans: holoprosencephaly and heterotaxy [88]. There are two zebrafish *spastin* isoforms, ATG1 and ATG2, due to alternative translational start sites [89]. When MOs were used to independently knockdown both isoforms, fish showed two different phenotypes: 1) ATG1 mutants, which had curved tails; and 2) ATG2 mutants, which had small eyes. Both phenotypes presented locomotion defects and consequently reduced swimming speed, which appeared to be more severe in the ATG2 morphant. In contrast, CRISPR/Cas9 mutants targeting the second ATG codon prevented the synthesis of both *spastin* isoforms and disclosed its role in two separate developmental signaling pathways, one for motor circuit wiring and a second for locomotion studied larvae at 72 in hpf [89]. These mutants outcrossed with fluorescent lines revealed several anatomical defects such as incorrectly developed axons. Zebrafish *shank3b* is one of the two ortholog alleles of human SHANK3, whose deficiency has been related to autism spectrum disorder (ASD). More than a dozen Shank3 mutant mice exist, but they are not suitable for use in high-throughput drug screening analysis. Previous transient zebrafish knockdowns generated by MOs for both *shank3* alleles have been reported, but developmental and behavioral studies were limited to 5 dpf [90]. Using CRISPR to genome engineer a *shank3b* loss of function mutant that was stably transmitted displayed autism-like behavioral characteristics such as impaired locomotor activity and abnormal repetitive movements, as well as impaired social preference behaviors observed at 2, 5, and 7 dpf. Shank3b deficiency caused partial lethality during early development and defective and delayed neurodevelopment in larvae. The knockout *shank3b*^{-/-} was crossed with the transgenic line that expressed a red fluorescent protein in neurons. The fluorescent protein allowed to observe that the deficiency of this gene alters the number of neurons from the early stages of development, which was not possible to detect in mice [91]. Reduced levels of Homer1, the postsynaptic scaffolding protein, and synaptophysin, a protein located in synaptic vesicles, were also found, suggesting a potential role of Shank3 in presynaptic function [91].

5.2. Rare Diseases

Rare diseases are those that affect fewer than 1 in 2,000 people. Sometimes rare diseases are called orphan diseases because drug companies are not interested in developing drugs for their treatment. Zebrafish is a promising model for studying this kind of pathologies. One of these rare diseases is glycine encephalopathy (GE), a recessive genetic disease caused by mutations in the glycine cleavage system (glycine decarboxylase, aminomethyltransferase, hydrogen carrier protein, and dihydrolipoamide dehydrogenase). Mutations were found in the glycine decarboxylase gene in 72% of GE cases. Severe GE symptoms are heterogeneous and include severe hypotonia, myoclonic jerks, lethargy, and apnea, whereas attenuated GE symptoms are treatable seizures, spasticity, chorea, and developmental delay that can lead to intellectual disability. The zebrafish *gldc* mutants generated with CRISPR/Cas9 recapitulated GE on a molecular level and also presented a motor phenotype reminiscent of severe GE symptoms [92]. Although a transient imbalance was found in cell proliferation in the brain of the mutants, con-

firmed by transgenic lines expressing fluorescent reporters, the main brain networks were not affected, suggesting that GE is mainly caused by metabolic defects. Remarkably, the motor dysfunctions in the mutant larvae can be rescued by pharmacologically or genetically counterbalancing the level of glycine at the synapse, suggesting that this is a valuable model to test possible treatments for this rare disease [92]. In another case, NCAPG2 variants in two unrelated pediatric individuals with overlapping neurodevelopmental syndromic features were identified by whole-exome sequencing. NGCAP2 encodes a member of the condensin II complex, necessary for the condensation of chromosomes prior to cell division. A sole NCAPG2 ortholog was identified in the zebrafish genome (46% identity, 64% similarity). Consistent with human expression data, *ngcap2* is expressed almost ubiquitously, and predominant expression is in the developing brain and spinal cord of zebrafish larvae [93]. Injection of MOs induced a reduction in head size, whereas CRISPR/Cas9 mutants showed a significant reduction in the anterior brain. The different phenotypes can be explained because MOs have a transient knockdown effect, whereas CRISPR/Cas9 F0 crispants are considered as genetic mosaics. TUNEL and PH3 staining revealed increased cell death in both *ngcap2* morphants and CRISPR F0 mutants. Furthermore, *ngcap2* F0 mutants and morphants showed a significant increase in cell proliferation in the head [93].

Retinal function disorders have also been approached in zebrafish. Retinitis pigmentosa is a genetic disorder caused by the degeneration of rod cells. In mammals, the disease involves multiple genes including those that code for rhodopsins, essential proteins of the visual pathway. Mutations of zebrafish *rho1-1* loci induced by CRISPR/Cas offer a model for exploring disorders that mimic human diseases. The transgenic line Xops:EGFP outcrossed with *rho1-1* CRISPR/Cas9 mutants showed that rod cells exhibited cell death and rhodopsin retention in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus but did not reach the plasma membrane [94].

5.2.1. Monogenetic Epilepsies

More examples of human pathology modeling are within the field of monogenetic epilepsies. The syntaxin-binding protein 1, STXBP1 homologs in zebrafish (*Stxbp1a* and *Stxbp1b*), both homozygous mutants were characterized, which interestingly showed different features. The *stxb1a* CRISPR-induced mutant contains a 4-base pair deletion in exon 8 and is predicted to cause a premature stop codon. The *stxb1a* mutant exhibited a profound lack of movement, low electrical brain activity, low heart rate, decreased glucose and mitochondrial metabolism, and early lethality. The *stxb1b* homozygous mutant allele is a 12-base pair deletion that causes loss of the predicted start codon. The *stxb1b* mutant had spontaneous seizures and reduced locomotor activity response to a movement-inducing “dark-flash” visual stimulus, despite showing a normal metabolism, heart rate, survival, and baseline locomotor activity [95].

In 2017, two independent groups reported that the zebrafish *aldh7a1* null mutant recapitulates the characteristics of pyridoxine-dependent epilepsy (PDE) caused by variants of

the gene *ALDH7A1* [82, 96]. Two homozygous mutants were generated using CRISPR/Cas9. In the first, a 5-bp deletion mutant in the zebrafish *aldh7a1* gene resulted in a premature stop codon; in the second, a 5-nucleotide insertion introduced a stop codon at position 50 of the translated protein sequence. In both studies, the mutants showed a spontaneous rapid increase in locomotion and a rapid circling swim behavior followed by seizure-like locomotor behaviors as early as 8 dpf [96] or 10 dpf [82], which resulted in death shortly after a seizure. Also, electroencephalographic recordings revealed large-amplitude spike discharges.

More recently, a report showed that the biallelic pathogenic variants of PLPBP caused a novel form of vitamin B6-dependent epilepsy. To explore the pathophysiology of the disease, the PLPBP deficiency model generated by CRISPR/Cas9 was used in a series of behavioral, biochemical, and electrophysiological studies, which showed seizure activity by 10 dpf and early death by 16 dpf. Treating the larvae with pyridoxine improved the epileptic phenotype and extended the lifespan. Thus, this model may be useful for drug discovery [97].

5.3. Brain Development

The function of the NADPH oxidase (Nox) genes of zebrafish (*nox1*, *nox2/cybb*, *nox5*, and *duox*) was addressed by inducing CRISPR/Cas9 mutations in each of the four *nox* genes. Between 48 and 96 hpf, the *nox2/cybb* chimeric crispants displayed optic nerve thinning and decreased optic tectum innervation, while the homozygous mutants showed significant ganglion cell layer expansion and mistargeted retinal axons in the optic tectum [98]. Thus, *nox* genes are relevant and have specific roles for the accurate connection between axons of retinal ganglion neurons and the optic tectum.

In other studies, it was found that the function of the *rfx4* gene, which encodes for a winged-helix transcription factor, is dispensable for forebrain morphogenesis but is required for forebrain formation. To elucidate *rfx4* function in zebrafish, two mutant alleles were made by CRISPR/Cas9, resulting in a truncated, non-functional protein [99]. Another gene implicated in neurogenesis in the neural tube is *prdm12b*. Using CRISPR/Cas9 to generate two fish lines carrying frameshift mutations in *prdm12b*, authors revealed that *eng1b* expression was suppressed in V1 interneurons, leading to defective Mauthner cell-dependent locomotion and embryonic lethality [100].

A customized DNA array analyzed genomic data from 66 fetuses with different brain malformations and neural tube defects and disclosed that in a sample with occipital encephalocele, an in-frame deletion in the gene that encodes for the protein WDR63 interrupted the third and fourth WD40 repeat domains. The *wdr63* gene mutation induced by CRISPR/Cas in zebrafish led to abnormal crispant embryos with body and brain malformations (40-60%) and sac-like brain protrusions (7-9%) similar to those seen in encephalocele [101]. Recently, a genome-wide linkage analysis combined with whole-genome sequencing demonstrated that human autosomal recessive primary microcephaly is caused

by a mutation in the microtubule-associated protein 11 (MAP11, previously termed C7orf43). Homozygous zebrafish *map11* CRISPR/Cas9 knockout mutants recapitulated microcephaly (determined by body-head ratios) and showed decreased neuronal proliferation (determined by phosphohistone-H3 staining) [102]. Finally, a delay in retinal neurogenesis was observed upon interleukin 7 receptor (*il7r*) deletion, causing delayed myelination and revealing the regulatory role of *il7r* in this process. The homozygous mutants also showed microphthalmia with a reduced number of cones and rods and downregulation of genes, such as *rho* and *arr3a*, involved in the pathogenesis of retinitis pigmentosa [103].

5.4. Behavior

Frequently, non-stereotyped behavior reflects altered brain function due to aberrant neuronal activity. An approximation to determine the effect of specific loss-of-function genes is to select genes expressed exclusively in the brain; several examples in the literature followed this approach in zebrafish. One is the Histamine receptor H3 (*Hrh3*) gene knockout, a CRISPR mutant with a non-sense mutation that results in a loss of 5 to 7 transmembrane domains, which showed locomotor and social behavior impairments in larvae at 5 dpf. *Hrh3* signaling regulates reactions to light:dark transitions, with *hrh3* knockout showing a faster adaptation to darkness. The mutant also has reduced levels of dopamine and serotonin, suggesting that *Hrh3* is important in the modulation of other monoamine systems [104].

Another example is zebrafish *pitpnc1a*, which belongs to a family of lipid transporters of the phosphatidylinositol transfer protein (PITP). PITPs are enriched in the brain, but their functional role in neuronal signaling pathways remains elusive. The zebrafish *pitpnc1a* null mutants have a 5-base pair deletion in exon 2 that gives rise to a truncated protein lacking two key inositol binding residues. *Pitpnc1* western blot does not detect the protein, indicating that the allele is functionally null. The zebrafish *pitpnc1a* null mutant is a brain-specific ortholog of the human long isoform *pitpnc1a*. By *in situ* hybridization, *pitpnc1a* mRNAs were detected in several regions of the developing central nervous system at 24 and 48 hpf. In larvae at 5 dpf, the expression was exclusively and strongly detected throughout the brain, particularly in the dorsal telencephalon. The homozygous *pitpnc1a*^{-/-} mutant appears visually indistinguishable from wild-type siblings and is viable and fertile. However, it is also hyperactive across the day:night cycle and exhibits increased neuronal activity [105]. Interestingly, the human PITPNC1 gene resides within a copy number variant associated with a syndromic intellectual disability caused by the neighboring gene *PSMD12*. The CRISPR/Cas9 *psmd12* loss-of-function model exhibited microcephaly, decreased convolution of the renal tubes, and abnormal craniofacial morphology, recapitulating the human phenotypes observed in patients. F0 crispants were used to visualize the axonal tracts in the brain including the optic tecta, which were significantly smaller than in wild-type larvae at 3dpf [106]. Additional molecular characterization is needed to elucidate the implications of *Psmd12* in this neurodevelopmental syndrome.

5.5. Other Applications

There is also growing interest in using zebrafish to study proteins involved in basic genome organization, dynamics, and expression, whose mutations indirectly affect the function of the nervous system. Such is the case of the studies on the function of the retinoblastoma protein RB1. The gene that codes this protein is mutated in different classes of cancer because RB1 is a tumor suppressor; thus, when the gene is mutated, the progression of the cell cycle changes, leading to tumors and cancer. RB1 mutants generated by CRISPR (heterozygous) or TALEN (genetic mosaic) in zebrafish developed tumors at 4-5 months according to the essential functional role of RB1; but this approach also allowed researchers to identify more than 170 chromatin regulators differentially expressed in RB1 tumors, including *rbbp4* and *hdac1* [36]. CRISPR/Cas heterozygous mutants of *rbbp4* are lethal between 5-10 dpf and show severe microcephaly and microphthalmia, whereas *hdac1* homozygous mutants show reduced body size, curved trunk, microcephaly, and coloboma in the retina and are lethal after 3 dpf. The requirements for *rbbp4* and *hdac1* in regulating neural progenitor proliferation and survival might contribute to oncogenesis after *rb1* loss in the zebrafish *rb1* brain tumor model [36].

Zebrafish were used as a model to study how general anesthesia causes loss of consciousness after local lesioning of locus coeruleus neurons *via* two-photon laser-based ablation or genetic depletion of norepinephrine in mutants of the dopamine-beta-hydroxylase (*dbh*) gene generated by CRISPR/Cas9. Propofol and etomidate modulate firing of these neurons by inhibiting presynaptic excitatory inputs and inducing GABA-A receptor hyperpolarization in larvae between 5 and 7 dpf [107].

In other studies, from an enhancer-trap screen, an unannotated gene named *ubtor* was identified in zebrafish. *In situ* hybridization showed *ubtor* transcripts in the brain and spinal cord. To examine the function of *ubtor*, the gene was disrupted by CRISPR/Cas9 provoking higher mTOR activity and aggravated neoplasia [108]. Other experimental approximations can also be done using zebrafish and the CRISPR system, such as the characterization of potential transcriptional enhancers, like in the ZEB2 (Zinc finger E-box-binding homeobox 2) locus [109]. ZEB2 is a key developmental regulator of the central nervous system. The use of CRISPR in HEK-293 cells to delete endogenous enhancers proved that distal transcriptional enhancers and trans-acting elements govern the regulation of ZEB2 expression during neuronal development [109]. On the other hand, it is well known that endocrinological components, such as thyroid hormones, influence brain development through their roles in neurogenesis and myelination. These hormones act *via* specific receptors (THRs); however, *thr* zebrafish crisprants do not show changes in expression levels of genes involved in myelination (*mbp*, *mpz*, *olig2*, and *plp*), suggesting that their function may not be directly related to the process of myelination during zebrafish early development [110].

Glial cells of zebrafish have also been studied using CRISPR/Cas as a tool. A microglia transcriptome disclosed 20 putative microglia regulators, and researchers found a dramatic decrease in neutral red-positive NR+ (nicotinamide

riboside) cells when interleukin 34 (*il34*) was targeted using CRISPR/Cas9; however, microglial proliferative capacity was not affected. A stable frameshift (premature stop codon at exon 5) homozygous mutant of the *il34* receptors, *csfla*, and *csflb* (colony-stimulating factor 1 receptor), did not show reduced microglia numbers, suggesting a genetic compensation by other ligands [111]. A graphical overview of the genes mentioned in this section is presented in Fig. 2. The genes and associated diseases and phenotypes mentioned in this section are summarized in Table 1.

Despite the rapid development of genome editing technologies, specifically CRISPR/Cas9, to generate disease models in zebrafish, more efforts are needed to efficiently combine different disciplines to find both the etiology of and treatments for many brain diseases.

5.6. Improving the CRISPR System using Zebrafish

The use of CRISPR/Cas9 has been mostly restricted to knockout specific genes in zebrafish, but recent efforts have been made to expand the CRISPR toolbox in this model. For example, the injection of multiple guide RNAs to induce mutations in two different genes (*osgep* and *tprkb*) at the same time improved the efficiency of the system [112]. These genes are two of the five that code for the KEOPS complex, a series of proteins that regulate post-transcriptional modification of tRNAs, telomere length and genome maintenance, and whose mutations in humans lead to brain abnormalities and developmental delays. By knocking out the zebrafish *osgep* and *tprkb* genes with CRISPR/Cas9, homozygous mutant larvae analyzed at 4 dpf recapitulated part of the phenotype found in humans and resulted in early lethality [113].

CRISPR/Cas9 can also be used to visualize and disrupt target gene expression. Through the years there have been many reports of a number of transgenic fishes induced to express fluorescent proteins with diverse expression patterns. Important observations of brain organization and development have been revealed using these transgenic fish, which were mostly generated by non-specific incorporation of the transgene into the genome. Determining the insertion site of the transgene is laborious; however, the utility of these transgenic lines has been broadened by replacing the gene coding for the fluorescent protein by the Gal4/UAS expression system, which allows precise, inducible, and controlled gene expression [114, 115]. This gene integration strategy was performed by CRISPR/Cas9, and its applications include determining gene expression patterns to knocking in genes.

6. CRISPR AS A TOOL TO UNDERSTAND BRAIN FUNCTION

6.1. Optical Tools

The transparency of zebrafish allows the use of fluorescent proteins to monitor neural activity *in vivo*. A variety of optical tools are currently available and can be used in combination with the CRISPR/Cas system. Classically, fluorescent proteins have been used for optical screening of gene expression to determine expression patterns during development or as tools to study disease models and development

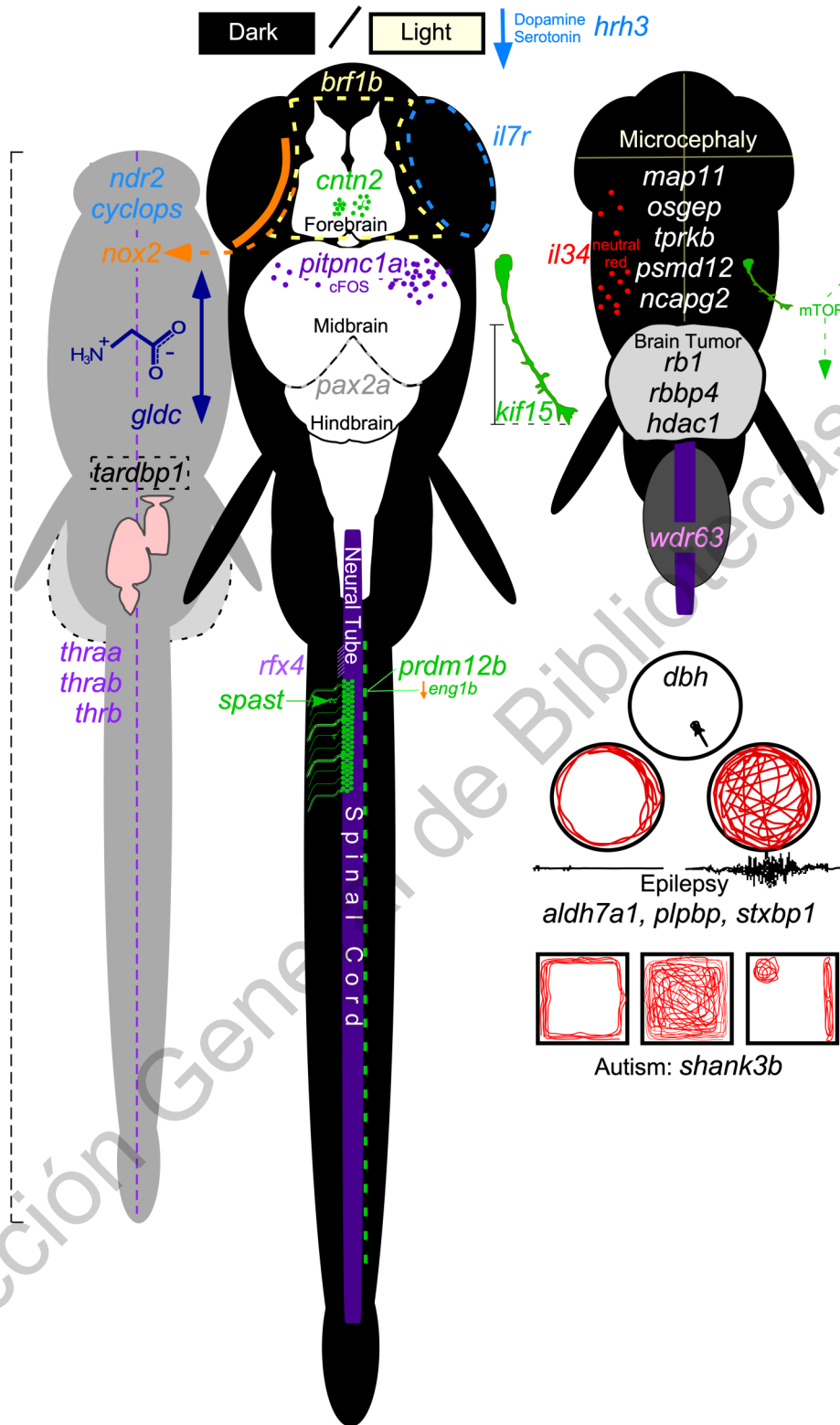


Fig. (2). Graphical representation of the genes related to neurobiology (*in italics*) edited by CRISPR/Cas to date and their associated phenotype in zebrafish. All genes are also listed in Table 1 with the corresponding reference. The main image in black illustrates the complete zebrafish (emphasizing the brain and spinal cord); genes related to the loss of midbrain-hindbrain boundaries, like *pax2a* or the optic tectum innervation (*nox2*); and genes related to neural tube formation like *rfx4*, *spast*, and *prdm12b*, among others, are included. Small zebrafish black head mainly represents the genes that produce microcephaly. A grey zebrafish shadow is a cyclops fish produced by *ndr2/cyclops* that includes glycine encephalopathy (*gldc*) and the morphological defects caused by disruption in *tardbp1*. Circles and squares with zebrafish larvae trajectories (in red) represent larvae motility with anesthesia (*dbh*) or the epileptic or autism phenotype.

Table 1. Gene targeted by CRISPR/Cas9, the neural disease or phenotype studied and the corresponding reference.

Gene Targeted	Disease/phenotype Studied	Refs.
<i>aldh7a1</i>	Pyridoxine-dependent epilepsy (PDE)	[82, 96]
<i>brf1b</i>	Cerebellar-facial-skeletal syndrome	[130]
<i>cntn2</i>	Migration (defects?) of facial branchiomotor neurons	[85]
<i>Dbh</i>	Genetic depletion of norepinephrine	[107]
<i>Gldc</i>	Glycine encephalopathy	[92]
<i>hrh3</i>	Responses to changes in the environment and decreased levels of dopamine and serotonin	[104]
<i>il7r</i>	Delay in myelination and microphthalmia	[103]
<i>il34</i>	Microglia number reduction	[111]
<i>kif15</i>	Axon regeneration	[84]
<i>map11</i>	Microcephaly and decreased neuronal proliferation	[102]
<i>ncapg2</i>	Microcephaly. Reduction in the size of the optic tecta and cerebellar hypoplasia	[93]
<i>ndr2</i>	Loss of the medial floor plate, severe deficits in ventral forebrain development and cyclopia	[88]
<i>nox2</i>	Optic nerve thinning and decreased optic tectum innervation	[98]
<i>osgep, tprkb</i>	Microcephaly and reduced survival	[113, 112]
<i>pax2a</i>	Loss of the midbrain-hindbrain boundary	[115]
<i>pitpnc1a</i>	Aberrant neuronal activity and increased wakefulness across the day-night cycle	[105]
<i>plpbp</i>	Epilepsy	[97]
<i>prdm12b</i>	Lack of <i>eng1b</i> -expressing V1 interneurons	[100]
<i>psmd12</i>	Microcephaly, decreased convolution of the renal tubes, and abnormal craniofacial morphology	[106]
<i>rb1, rbbp4, hdac1</i>	Brain tumors	[36]
<i>rfx4</i>	Role in forming midlines in the caudal neural tube	[99]
<i>shank3b</i>	Autism	[91]
<i>Spast</i>	Motor neuron and locomotion defects	[89]
<i>stxbp1</i>	Epilepsy. Spontaneous seizures and reduced locomotor activity	[95]
<i>tardbp1</i>	Morphological defects, early lethality, reduced locomotor function, aberrant quantal transmission and perturbed synapse architecture at the Neuromuscular Junctions	[86]
<i>thraa, thrab, thrb</i>	Loss of symmetry and laterality	[110]
<i>Ubtor</i>	Effects on Neurodevelopment. Cellular growth regulation and mTOR signaling	[108]
<i>wdr63</i>	Encephalocele and neural tube defects	[131]
<i>zeb2</i>	Transcriptional enhancers during neuronal development	[109]

[116]. Confocal and light-sheet microscopy made it possible to time-lapse imaging *in vivo* and track the impact of mutations on neuronal functions after injury [84].

Ionic sensors are frequently used in neurosciences to indicate neuronal activity. Genetically encoded calcium indicators (GECIs) have revolutionized the field because they can simultaneously record large numbers of neurons in the live brain [117, 118]. An example of the power of this approach

is the simultaneous recording of neuronal activity in live embryos engineered with the CRISPR system to both create a transgenic fish expressing a calcium sensor under the endogenous *slc6a2* promoter (NET, the norepinephrine transporter) (Fig. 3A), thus targeting the expression to the noradrenergic system in the brain, and monitor the activity in the *locus coeruleus*, an important region implicated in diseases like Parkinson's, Alzheimer's and autism [119]. In this

imaging techniques and CRISPR transgenic zebrafish lines with fluorescent reporters.

Optogenetic tools allow the quick modification and control of many brain gene functions in vertebrates. These tools combined with the CRISPR/Cas system could help to understand neurodegenerative diseases. Moreover, they have the potential of controlling and monitoring the expression of several genes at the same time, and of enhancing the understanding of complex gene networks, especially considering that many cellular responses depend on complex signaling cascades [123, 124]. Genetically encoded voltage indicators (GEVIs) have been employed to achieve fast and simultaneous detection of membrane potential in neurons. These indicators report fast activity in correlation with action potential and present high brightness and less cellular damage compared to GECIs, thus improving neural activity recordings [125]. However, they have been used in a few physiological conditions [126-128]. The CRISPR/Cas system could facilitate the use of GEVIs in zebrafish to characterize functional connectomes *in vivo*, allowing researchers to understand neurological processes and diseases.

CRISPR is routinely used to generate knockouts in specific genes. Interestingly, CRISPR can generate knockins and precise genome editions, which will enable scientists to reproduce the mutations equivalent to those in patients to set up personalized medicine. Genome editing with the CRISPR system and derived technologies will undoubtedly accelerate the development of neurosciences using zebrafish and other animal models to finally translate to benefit humans.

LIST OF ABBREVIATIONS

ALS	=	Amyotrophic lateral sclerosis
ASD	=	Autism spectrum disorder
CIB1	=	Cryptochrome interacting basic helix-loop helix 1
CRISPR/Cas	=	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein
CRY2	=	Cryptochrome 2
<i>Dbh</i>	=	Dopamine-beta-hydroxylase
DBS	=	Double-strand breaks
dpf	=	Days post fertilization
eGFP	=	Enhanced green fluorescent protein
GABA	=	γ -Aminobutyric acid
GE	=	Glycine encephalopathy
GECIs	=	Genetically encoded calcium indicators
GEVIs	=	Genetically encoded voltage indicators
HMA	=	Heteroduplex mobility assay
HSP	=	Cause hereditary spastic paraplegia
InDels	=	Insertions and/or deletions
MOs	=	Morpholinos

NET	=	Norepinephrine transporter
NHEJ	=	Non-homologous end-joining
Nox	=	NADPH oxidase
NR	=	Nicotinamide riboside
ORF	=	Open reading frame
PDE	=	Pyridoxine-dependent epilepsy
PHYB-PIF	=	Phytochrome B system
PITP	=	Phosphatidylinositol transfer protein
sgRNA	=	Single-guide RNA
TAEL	=	(TA4-EL222) system
TALENs	=	Transcription activator-like effector nucleases
TIDE	=	Tracking of indels by decomposition
ViBE-Z	=	Virtual brain explorer for zebrafish
ZEB2	=	Zinc finger E-box-binding homeobox 2
ZFNs	=	Zinc finger nucleases

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by grants from CONACYT to AMT (A1-S-7659) and to LRRO (A1-S-10450). The authors thank LCC Jessica González Norris for proofreading the English version of this manuscript.

REFERENCES

- [1] Walker, C.; Streisinger, G. Induction of Mutations by gamma-Rays in Pregonial Germ Cells of Zebrafish Embryos. *Genetics*, **1983**, *103*(1), 125-136. [PMID: 17246099]
- [2] Kimmel, C.B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S.R.; Ullmann, B.; Schilling, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, **1995**, *203*(3), 253-310. [<http://dx.doi.org/10.1002/aja.1002030302>] [PMID: 8589427]
- [3] Dorsemans, A-C.; Soulé, S.; Weger, M.; Bourdon, E.; Lefebvre d'Helencourt, C.; Meilhac, O.; Diotel, N. Impaired constitutive and regenerative neurogenesis in adult hyperglycemic zebrafish. *J. Comp. Neurol.*, **2017**, *525*(3), 442-458. [<http://dx.doi.org/10.1002/cne.24065>] [PMID: 27339277]
- [4] Varshney, G.K.; Sood, R.; Burgess, S.M. Understanding and Editing the Zebrafish Genome. *Adv. Genet.*, **2015**, *92*, 1-52. [<http://dx.doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.09.002>] [PMID: 26639914]
- [5] Mueller, T.; Wullmann, M.F.; Guo, S. Early teleostean basal ganglia development visualized by zebrafish *Dlx2a*, *Lhx6*, *Lhx7*, *Tbr2* (*eomesa*), and *GAD67* gene expression. *J. Comp. Neurol.*, **2008**, *507*(2), 1245-1257.

- [6] [\[http://dx.doi.org/10.1002/cne.21604\]](http://dx.doi.org/10.1002/cne.21604) [PMID: 18181142] Schmidt, R.; Strähle, U.; Scholpp, S.; Altman, J.; Das, G.; Altman, J.; Lois, C.; Alvarez-Buylla, A.; Gage, F.; Coates, P. Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. *Neural Dev.*, **2013**, *8*(1), 3. [<http://dx.doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>] [PMID: 23433260]
- [7] Randlett, O.; Wee, C.L.; Naumann, E.A.; Nnaemeka, O.; Schoppik, D.; Fitzgerald, J.E.; Portugues, R.; Lacoste, A.M.B.; Riegler, C.; Engert, F.; Schier, A.F. Whole-brain activity mapping onto a zebrafish brain atlas. *Nat. Methods*, **2015**, *12*(11), 1039-1046. [<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3581>] [PMID: 26778924]
- [8] Hildebrand, D.G.C.; Cicconet, M.; Torres, R.M.; Choi, W.; Quan, T.M.; Moon, J.; Wetzel, A.W.; Scott Champion, A.; Graham, B.J.; Randlett, O.; Plummer, G.S.; Portugues, R.; Bianco, I.H.; Saalfeld, S.; Baden, A.D.; Lillaney, K.; Burns, R.; Vogelstein, J.T.; Schier, A.F.; Lee, W.A.; Jeong, W.K.; Lichtman, J.W.; Engert, F. Whole-brain serial-section electron microscopy in larval zebrafish. *Nature*, **2017**, *545*(7654), 345-349. [<http://dx.doi.org/10.1038/nature22356>] [PMID: 28489821]
- [9] Cordero-maldonado, M.L.; Perathoner, S.; Van Der Kolk, K.; Bolland, R.; Heins-marroquin, U.; Spaink, H.P.; Meijer, A.H.; Crawford, A.D.; De Sonneville, J.; Nauheim, B. *Deep Learning Image Recognition Enables Efficient Genome Editing in Zebrafish by Automated Injections*; No. Mlcm, **2018**, pp. 1-18.
- [10] Perathoner, S.; Cordero-Maldonado, M.L.; Crawford, A.D. Potential of zebrafish as a model for exploring the role of the amygdala in emotional memory and motivational behavior. *J. Neurosci. Res.*, **2016**, *94*(6), 445-462. [<http://dx.doi.org/10.1002/jnr.23712>] [PMID: 26833658]
- [11] Blader, P.; Strähle, U. Zebrafish developmental genetics and central nervous system development. *Hum. Mol. Genet.*, **2000**, *9*(6), 945-951. [<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/9.6.945>] [PMID: 10767318]
- [12] Ota, S.; Kawahara, A. Zebrafish: a model vertebrate suitable for the analysis of human genetic disorders. *Congenit. Anom. (Kyoto)*, **2014**, *54*(1), 8-11. [<http://dx.doi.org/10.1111/cga.12040>] [PMID: 24279334]
- [13] Sakai, C.; Ijaz, S.; Hoffman, E.J. Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders: Past, Present, and Future. *Front. Mol. Neurosci.*, **2018**, *11*, 294. [<http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2018.00294>] [PMID: 30210288]
- [14] Fontana, B.D.; Mezzomo, N.J.; Kalueff, A.V.; Rosenberg, D.B. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. *Exp. Neurol.*, **2018**, *299*(Pt A), 157-171. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.004>] [PMID: 28987462]
- [15] Kalueff, A.V.; Stewart, A.M.; Gerlai, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2014**, *35*(2), 63-75. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>] [PMID: 24412421]
- [16] Wiley, D.S.; Redfield, S.E.; Zon, L.I. Chemical screening in zebrafish for novel biological and therapeutic discovery. *Methods Cell Biol.*, **2017**, *138*, 651-679. [<http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.10.004>] [PMID: 28129862]
- [17] MacRae, C.A.; Peterson, R.T. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2015**, *14*(10), 721-731. [<http://dx.doi.org/10.1038/nrd4627>] [PMID: 26361349]
- [18] Avey, M.T.; Fenwick, N.; Griffin, G. The use of systematic reviews and reporting guidelines to advance the implementation of the 3Rs. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, **2015**, *54*(2), 153-162. [PMID: 25836961]
- [19] Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J.E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; McLaren, S.; Sealy, I.; Caccamo, M.; Churcher, C.; Scott, C.; Barrett, J.C.; Koch, R.; Rauch, G.J.; White, S.; Chow, W.; Kilian, B.; Quintais, L.T.; Guerra-Assunção, J.A.; Zhou, Y.; Gu, Y.; Yen, J.; Vogel, J.H.; Eyre, T.; Redmond, S.; Banerjee, R.; Chi, J.; Fu, B.; Langley, E.; Maguire, S.F.; Laird, G.K.; Lloyd, D.; Kenyon, E.; Donaldson, S.; Sehra, H.; Almeida-King, J.; Loveland, J.; Trevanion, S.; Jones, M.; Quail, M.; Willey, D.; Hunt, A.; Burton, J.; Sims, S.; McLay, K.; Plumb, B.; Davis, J.; Clee, C.; Oliver, K.; Clark, R.; Riddle, C.; Elliot, D.; Threadgold, G.; Harden, G.; Ware, D.; Begum, S.; Mortimore, B.; Kerry, G.; Heath, P.; Phillimore, B.; Tracey, A.; Corby, N.; Dunn, M.; Johnson, C.; Wood, J.; Clark, S.; Pelan, S.; Griffiths, G.; Smith, M.; Glithero, R.; Howden, P.; Barker, N.; Lloyd, C.; Stevens, C.; Harley, J.; Holt, K.; Panagiotidis, G.; Lovell, J.; Beasley, H.; Henderson, C.; Gordon, D.; Auger, K.; Wright, D.; Collins, J.; Raisen, C.; Dyer, L.; Leung, K.; Robertson, L.; Ambridge, K.; Leongamornlert, D.; McGuire, S.; Gilderthorp, R.; Griffiths, C.; Manthravadi, D.; Nichol, S.; Barker, G.; Whitehead, S.; Kay, M.; Brown, J.; Murnane, C.; Gray, E.; Humphries, M.; Sycamore, N.; Barker, D.; Saunders, D.; Wallis, J.; Babbage, A.; Hammond, S.; Mashreghi-Mohammadi, M.; Barr, L.; Martin, S.; Wray, P.; Ellington, A.; Matthews, N.; Ellwood, M.; Woodmansey, R.; Clark, G.; Cooper, J.; Tromans, A.; Grafham, D.; Skuce, C.; Pandian, R.; Andrews, R.; Harrison, E.; Kimberley, A.; Garnett, J.; Fosker, N.; Hall, R.; Garner, P.; Kelly, D.; Bird, C.; Palmer, S.; Gehring, I.; Berger, A.; Dooley, C.M.; Ersan-Urün, Z.; Eser, C.; Geiger, H.; Geisler, M.; Karotki, L.; Kim, A.; Konantz, J.; Konantz, M.; Oberländer, M.; Rudolph-Geiger, S.; Teucke, M.; Lanz, C.; Raddatz, G.; Osoegawa, K.; Zhu, B.; Rapp, A.; Widaa, S.; Langford, C.; Yang, F.; Schuster, S.C.; Carter, N.P.; Harrow, J.; Ning, Z.; Herrero, J.; Searle, S.M.; Enright, A.; Geisler, R.; Plasterk, R.H.; Lee, C.; Westerfield, M.; de Jong, P.J.; Zon, L.I.; Postlethwait, J.H.; Nüsslein-Volhard, C.; Hubbard, T.J.; Roest Crollius, H.; Rogers, J.; Stemple, D.L. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, **2013**, *496*(7446), 498-503. [<http://dx.doi.org/10.1038/nature12111>] [PMID: 23594743]
- [20] Lambert, M.J.; Cochran, W.O.; Wilde, B.M.; Olsen, K.G.; Cooper, C.D. Evidence for widespread subfunctionalization of splice forms in vertebrate genomes. *Genome Res.*, **2015**, *25*(5), 624-632. [<http://dx.doi.org/10.1101/gr.184473.114>] [PMID: 25792610]
- [21] Haffter, P.; Granato, M.; Brand, M.; Mullins, M.C.; Hamerschmidt, M.; Kane, D.A.; Odenthal, J.; van Eeden, F.J.; Jiang, Y.J.; Heisenberg, C.P.; Kelsh, R.N.; Furutani-Seiki, M.; Vogelsang, E.; Beuchle, D.; Schach, U.; Fabian, C.; Nüsslein-Volhard, C. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, **1996**, *123*, 1-36. [PMID: 9007226]
- [22] Lin, S.; Gaiano, N.; Culp, P.; Burns, J.C.; Friedmann, T.; Yee, J.K.; Hopkins, N. Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science*, **1994**, *265*(5172), 666-669. [<http://dx.doi.org/10.1126/science.8036514>] [PMID: 8036514]
- [23] Amsterdam, A.; Burgess, S.; Golling, G.; Chen, W.; Sun, Z.; Townsend, K.; Farrington, S.; Haldi, M.; Hopkins, N. A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev.*, **1999**, *13*(20), 2713-2724. [<http://dx.doi.org/10.1101/gad.13.20.2713>] [PMID: 10541557]
- [24] Golling, G.; Amsterdam, A.; Sun, Z.; Antonelli, M.; Maldonado, E.; Chen, W.; Burgess, S.; Haldi, M.; Artzt, K.; Farrington, S.; Lin, S.Y.; Nissen, R.M.; Hopkins, N. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat. Genet.*, **2002**, *31*(2), 135-140. [<http://dx.doi.org/10.1038/ng896>] [PMID: 12006978]
- [25] Kawakami, K.; Koga, A.; Hori, H.; Shima, A. Excision of the tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene*, **1998**, *225*(1-2), 17-22. [[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00537-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00537-X)] [PMID: 9931412]
- [26] Davidison, A.E.; Balciunas, D.; Mohn, D.; Shaffer, J.; Hermanson, S.; Sivasubbu, S.; Cliff, M.P.; Hackett, P.B.; Ekker, S.C. Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *Dev. Biol.*, **2003**, *263*(2), 191-202. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.07.013>] [PMID: 14597195]
- [27] Emelyanov, A.; Gao, Y.; Naqvi, N.I.; Parinov, S. Trans-kingdom transposition of the maize dissociation element. *Genetics*, **2006**, *174*(3), 1095-1104. [<http://dx.doi.org/10.1534/genetics.106.061184>] [PMID: 16951067]
- [28] Bergamin, G.; Cieri, D.; Vazza, G.; Argenton, F.; Mostacciolo, M.L.; Argenton, F. Zebrafish Tg(hb9:MTS-Kaede): a new *in vivo* tool for studying the axonal movement of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **2016**, *1860*(6), 1247-1255. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.007>] [PMID: 26968460]
- [29] Ni, J.; Wangenstein, K.J.; Nelsen, D.; Balciunas, D.; Skuster, K.J.; Urban, M.D.; Ekker, S.C. Active recombinant Tol2 transposase for

- gene transfer and gene discovery applications. *Mob. DNA*, **2016**, 7, 6.
[http://dx.doi.org/10.1186/s13100-016-0062-z] [PMID: 27042235]
- [30] Wheeler, M.A.; Smith, C.J.; Ottolini, M.; Barker, B.S.; Purohit, A.M.; Grippo, R.M.; Gaykema, R.P.; Spano, A.J.; Beenhakker, M.P.; Kucenas, S.; Patel, M.K.; Deppmann, C.D.; Güler, A.D. Genetically targeted magnetic control of the nervous system. *Nat. Neurosci.*, **2016**, 19(5), 756-761.
[http://dx.doi.org/10.1038/nn.4265] [PMID: 26950006]
- [31] Doyon, Y.; McCammon, J.M.; Miller, J.C.; Faraji, F.; Ngo, C.; Katibah, G.E.; Amora, R.; Hocking, T.D.; Zhang, L.; Rebar, E.J.; Gregory, P.D.; Urmov, F.D.; Amacher, S.L. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.*, **2008**, 26(6), 702-708.
[http://dx.doi.org/10.1038/nbt1409] [PMID: 18500334]
- [32] Meng, X.; Noyes, M.B.; Zhu, L.J.; Lawson, N.D.; Wolfe, S.A. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.*, **2008**, 26(6), 695-701.
[http://dx.doi.org/10.1038/nbt1398] [PMID: 18500337]
- [33] Huang, P.; Xiao, A.; Zhou, M.; Zhu, Z.; Lin, S.; Zhang, B. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat. Biotechnol.*, **2011**, 29(8), 699-700.
[http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1939] [PMID: 21822242]
- [34] Bedell, V.M.; Wang, Y.; Campbell, J.M.; Poshusta, T.L.; Starker, C.G.; Krug, R.G., II; Tan, W.; Penheiter, S.G.; Ma, A.C.; Leung, A.Y.H.; Fahrenkrug, S.C.; Carlson, D.F.; Voytas, D.F.; Clark, K.J.; Essner, J.J.; Ekker, S.C. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, **2012**, 491(7422), 114-118.
[http://dx.doi.org/10.1038/nature11537] [PMID: 23000899]
- [35] Kise, R.; Okasato, R.; Kano, K.; Inoue, A.; Kawahara, A.; Aoki, J. Identification and biochemical characterization of a second zebrafish autotaxin gene. *J. Biochem.*, **2019**, 165(3), 269-275.
[http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvy114] [PMID: 30629186]
- [36] Schultz, L.E.; Haltom, J.A.; Almeida, M.P.; Wierson, W.A.; Solin, S.L.; Weiss, T.J.; Helmer, J.A.; Sandquist, E.J.; Shive, H.R.; McGrail, M. Epigenetic regulators Rbbp4 and Hdac1 are overexpressed in a zebrafish model of RB1 embryonal brain tumor, and are required for neural progenitor survival and proliferation. *Dis. Model. Mech.*, **2018**, 11(6), dmm034124.
[http://dx.doi.org/10.1242/dmm.034124] [PMID: 29914980]
- [37] Audira, G.; Sarasamma, S.; Chen, J.-R.; Juniardi, S.; Sampurna, B.P.; Liang, S.-T.; Lai, Y.-H.; Lin, G.-M.; Hsieh, M.-C.; Hsiao, C.-D. Zebrafish Mutants Carrying Leptin a (lepa) Gene Deficiency Display Obesity, Anxiety, Less Aggression and Fear, and Circadian Rhythm and Color Preference Dysregulation. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 19(12), 4038.
[http://dx.doi.org/10.3390/ijms19124038] [PMID: 30551684]
- [38] Nasevicius, A.; Ekker, S.C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet.*, **2000**, 26(2), 216-220.
[http://dx.doi.org/10.1038/79951] [PMID: 11017081]
- [39] Flynt, A.S.; Rao, M.; Patton, J.G. Blocking Zebrafish MicroRNAs with Morpholinos. *Methods Mol. Biol.*, **2017**, 1565, 59-78.
[http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6817-6_6] [PMID: 28364234]
- [40] De Rienzo, G.; Gutzman, J.H.; Sive, H. Efficient shRNA-mediated inhibition of gene expression in zebrafish. *Zebrafish*, **2012**, 9(3), 97-107.
[http://dx.doi.org/10.1089/zeb.2012.0770] [PMID: 22788660]
- [41] Dong, Z.; Peng, J.; Guo, S. Stable gene silencing in zebrafish with spatiotemporally targetable RNA interference. *Genetics*, **2013**, 193(4), 1065-1071.
[http://dx.doi.org/10.1534/genetics.112.147892] [PMID: 23378068]
- [42] Andrews, O.E.; Cha, D.J.; Wei, C.; Patton, J.G. RNAi-mediated gene silencing in zebrafish triggered by convergent transcription. *Sci. Rep.*, **2014**, 4, 5222.
[http://dx.doi.org/10.1038/srep05222] [PMID: 24909225]
- [43] Marraffini, L.A.; Sontheimer, E.J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Genet.*, **2010**, 11(3), 181-190.
[http://dx.doi.org/10.1038/nrg2749] [PMID: 20125085]
- [44] Hwang, W.Y.; Fu, Y.; Reyon, D.; Maeder, M.L.; Tsai, S.Q.; Sander, J.D.; Peterson, R.T.; Yeh, J.-R.J.; Joung, J.K. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.*, **2013**, 31(3), 227-229.
[http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2501] [PMID: 23360964]
- [45] Jao, L.-E.; Wente, S.R.; Chen, W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, 110(34), 13904-13909.
[http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1308335110] [PMID: 23918387]
- [46] Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J. A.; Charpentier, E. *A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity*, *Science (80-.)*, **2012**, 337, 6096.
[http://dx.doi.org/10.1126/science.1225829]
- [47] Di Donato, V.; De Santis, F.; Auer, T.O.; Testa, N.; Sánchez-Iranzo, H.; Mercader, N.; Concordet, J.-P.; Del Bene, F. 2C-Cas9: a versatile tool for clonal analysis of gene function. *Genome Res.*, **2016**, 26(5), 681-692.
[http://dx.doi.org/10.1101/gr.196170.115] [PMID: 26957310]
- [48] Cho, S.W.; Kim, S.; Kim, J.M.; Kim, J.-S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.*, **2013**, 31(3), 230-232.
[http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2507] [PMID: 23360966]
- [49] Kleinstiver, B.P.; Prew, M.S.; Tsai, S.Q.; Topkar, V.V.; Nguyen, N.T.; Zheng, Z.; Gonzales, A.P.W.; Li, Z.; Peterson, R.T.; Yeh, J.-R.J.; Aryee, M.J.; Joung, J.K. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, **2015**, 523(7561), 481-485.
[http://dx.doi.org/10.1038/nature14592] [PMID: 26098369]
- [50] Xu, X.; Qi, L.S. A CRISPR-dCas Toolbox for Genetic Engineering and Synthetic Biology. *J. Mol. Biol.*, **2019**, 431(1), 34-47.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.037] [PMID: 29958882]
- [51] Wu, W.; Yang, Y.; Lei, H. Progress in the application of CRISPR: From gene to base editing. *Med. Res. Rev.*, **2019**, 39(2), 665-683.
[http://dx.doi.org/10.1002/med.21537] [PMID: 30171624]
- [52] Cai, M.; Han, L.; Liu, L.; He, F.; Chu, W.; Zhang, J.; Tian, Z.; Du, S. *Defective Sarcomere Assembly in Smyd1a and Smyd1b Zebrafish Mutants*, *FASEB J.*, **2019**, fj.201801578R.
[http://dx.doi.org/10.1096/fj.201801578R]
- [53] Varshney, G. K.; Pei, W.; Lafave, M. C.; Idol, J.; Xu, L.; Gallardo, V.; Carrington, B.; Bishop, K.; Jones, M.; Li, M. *High-Throughput Gene Targeting and Phenotyping in Zebrafish Using CRISPR / Cas9*, **2015**, 1030-1042.
[http://dx.doi.org/10.1101/gr.186379.114.Freely]
- [54] Liu, D.; Wang, Z.; Xiao, A.; Zhang, Y.; Li, W.; Zu, Y.; Yao, S.; Lin, S.; Zhang, B. Efficient gene targeting in zebrafish mediated by a zebrafish-codon-optimized cas9 and evaluation of off-targeting effect. *J. Genet. Genomics*, **2014**, 41(1), 43-46.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.jgg.2013.11.004] [PMID: 24480746]
- [55] Shiraki, T.; Kawakami, K. A tRNA-based multiplex sgRNA expression system in zebrafish and its application to generation of transgenic albino fish. *Sci. Rep.*, **2018**, 8(1), 13366.
[http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-31476-5] [PMID: 30190522]
- [56] Zhang, Y.; Zhang, Z.; Ge, W. An efficient platform for generating somatic point mutations with germline transmission in the zebrafish by CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *J. Biol. Chem.*, **2018**, 293(17), 6611-6622.
[http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA117.001080] [PMID: 29500194]
- [57] Prykhodzhiy, S.V.; Fuller, C.; Steele, S.L.; Veinotte, C.J.; Razaghi, B.; Robitaille, J.M.; McMaster, C.R.; Shlien, A.; Malkin, D.; Berman, J.N. Optimized knock-in of point mutations in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Nucleic Acids Res.*, **2018**, 46(17), e102.
[http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky512] [PMID: 29905858]
- [58] Fernandez, J.P.; Vejnár, C.E.; Giraldez, A.J.; Rouet, R.; Moreno-Mateos, M.A. Optimized CRISPR-Cpf1 system for genome editing in zebrafish. *Methods*, **2018**, 150(March), 11-18.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.jmeth.2018.06.014] [PMID: 29964176]
- [59] Labun, K.; Montague, T.G.; Gagnon, J.A.; Thyme, S.B.; Valen, E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res.*, **2016**, 44(W1), W272-6.
[http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw398] [PMID: 27185894]
- [60] Moreno-Mateos, M.A.; Vejnár, C.E.; Beaudoin, J.D.; Fernandez, J.P.; Mis, E.K.; Khokha, M.K.; Giraldez, A.J. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting *in vivo*. *Nat. Methods*, **2015**, 12(10), 982-988.
[http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3543] [PMID: 26322839]
- [61] Gagnon, J.A.; Valen, E.; Thyme, S.B.; Huang, P.; Akhmetova, L.; Pauli, A.; Montague, T.G.; Zimmerman, S.; Richter, C.; Schier,

- A.F. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS One*, **2014**, 9(5), e98186. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098186] [PMID: 24873830]
- [62] Zhao, Y.; Sun, H.; Sha, X.; Gu, L.; Zhan, Z.; Li, W.; Zhao, Y.; Sun, H.; Sha, X.; Gu, L. A Review of Automated Microinjection of Zebrafish Embryos. *Micromachines [Internet]*, **2018**, 10(1), 7. Http://Www.Mdpi.Com/2072-666X/10/1/7ew. [http://dx.doi.org/10.3390/mi10010007]
- [63] Pei, W.; Burgess, S.M. Microinjection in Zebrafish for Genome Editing and Functional Studies. *Methods Mol. Biol.*, **2019**, 1874, 459-474. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-8831-0_26] [PMID: 30353530]
- [64] D'Agostino, Y.; Locascio, A.; Ristoratore, F.; Sordino, P.; Spagnuolo, A.; Borra, M.; D'Aniello, S. A Rapid and Cheap Methodology for CRISPR/Cas9 Zebrafish Mutant Screening. *Mol. Biotechnol.*, **2015**, ... [http://dx.doi.org/10.1007/s12033-015-9905-y] [PMID: 26676479]
- [65] Foster, S.D.; Glover, S.R.; Turner, A.N.; Chatti, K.; Challa, A.K. A mixing heteroduplex mobility assay (mHMA) to genotype homozygous mutants with small indels generated by CRISPR-Cas9 nucleases. *MethodsX*, **2018**, 6, 1-5. [http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2018.11.017] [PMID: 30591915]
- [66] Brinkman, E.K.; Chen, T.; Amendola, M.; van Steensel, B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.*, **2014**, 42(22), e168-e168. [http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku936] [PMID: 25300484]
- [67] Lambert, C.J.; Freshner, B.C.; Chung, A.; Stevenson, T.J.; Bowles, D.M.; Samuel, R.; Gale, B.K.; Bonkowski, J.L. An automated system for rapid cellular extraction from live zebrafish embryos and larvae: Development and application to genotyping. *PLoS One*, **2018**, 13(3), e0193180. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0193180] [PMID: 29543903]
- [68] Vejnar, C. E.; Moreno-Mateos, M. A.; Cifuentes, D.; Bazzini, A. A.; Giraldez, A. J. Optimized CRISPR-Cas9 System for Genome Editing in Zebrafish. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2016**, 10, pdb.prot086850. [http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot086850]
- [69] Rafferty, S.A.; Quinn, T.A. A beginner's guide to understanding and implementing the genetic modification of zebrafish. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **2018**, 138, 3-19. [http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.005] [PMID: 30032905]
- [70] Yang, Z.; Chen, S.; Xue, S.; Li, X.; Sun, Z.; Yang, Y.; Hu, X.; Geng, T.; Cui, H. Generation of Cas9 transgenic zebrafish and their application in establishing an ERV-deficient animal model. *Biotechnol. Lett.*, **2018**, 40(11-12), 1507-1518. [http://dx.doi.org/10.1007/s10529-018-2605-5] [PMID: 30244429]
- [71] Li, Jia; Zhang, Baibing; Bu, Jiwen; Du, J. Intron-Based Genomic Editing: A Highly Efficient Method for Generating Knockin Zebrafish. *Oncotarget*, **2015**, 7-10. [http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.4547] [PMID: 25740433]
- [72] Hisano, Y.; Sakuma, T.; Nakade, S.; Ohga, R.; Ota, S.; Okamoto, H.; Yamamoto, T.; Kawahara, A. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Sci. Rep.*, **2015**, 5, 8841. [http://dx.doi.org/10.1038/srep08841] [PMID: 25740433]
- [73] Simone, B.W.; Martínez-Gálvez, G.; WareJoncas, Z.; Ekker, S.C. Fishing for understanding: Unlocking the zebrafish gene editor's toolbox. *Methods*, **2018**, 150(July), 3-10. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.07.012] [PMID: 30076892]
- [74] Albadi, S.; Del Bene, F.; Revenu, C. Genome editing using CRISPR/Cas9-based knock-in approaches in zebrafish. *Methods*, **2017**, 121-122, 77-85. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.03.005] [PMID: 28300641]
- [75] Kok, F.O.; Shin, M.; Ni, C-W.; Gupta, A.; Grosse, A.S.; van Impel, A.; Kirchmaier, B.C.; Peterson-Maduro, J.; Kourkoulis, G.; Male, I.; DeSantis, D.F.; Sheppard-Tindell, S.; Ebarasi, L.; Betsholtz, C.; Schulte-Merker, S.; Wolfe, S.A.; Lawson, N.D. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev. Cell*, **2015**, 32(1), 97-108. [http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.018] [PMID: 25533206]
- [76] Lebedeva, S.; de Jesus Domingues, A.M.; Butter, F.; Ketting, R.F. Characterization of genetic loss-of-function of Fus in zebrafish. *RNA Biol.*, **2017**, 14(1), 29-35. [http://dx.doi.org/10.1080/15476286.2016.1256532] [PMID: 27898262]
- [77] Stainier, D.Y.R.; Raz, E.; Lawson, N.D.; Ekker, S.C.; Burdine, R.D.; Eisen, J.S.; Ingham, P.W.; Schulte-Merker, S.; Yelon, D.; Weinstein, B.M.; Mullins, M.C.; Wilson, S.W.; Ramakrishnan, L.; Amacher, S.L.; Neuhauss, S.C.F.; Meng, A.; Mochizuki, N.; Panula, P.; Moens, C.B. Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genet.*, **2017**, 13(10), e1007000. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1007000] [PMID: 29049395]
- [78] Lawson, N.D. Reverse Genetics in Zebrafish: Mutants, Morphants, and Moving Forward. *Trends Cell Biol.*, **2016**, 26(2), 77-79. [http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.11.005] [PMID: 26739910]
- [79] Burns, D.T.; Donkervoort, S.; Müller, J.S.; Knierim, E.; Bharucha-Goebel, D.; Faqeh, E.A.; Bell, S.K.; AlFaifi, A.Y.; Monies, D.; Millan, F.; Retterer, K.; Dyack, S.; MacKay, S.; Morales-Gonzalez, S.; Giunta, M.; Munro, B.; Hudson, G.; Scavina, M.; Baker, L.; Massini, T.C.; Lek, M.; Hu, Y.; Ezzo, D.; AlKuraya, F.S.; Kang, P.B.; Griffin, H.; Foley, A.R.; Schuelke, M.; Horvath, R.; Bönne-mann, C.G. Variants in EXOSC9 Disrupt the RNA Exosome and Result in Cerebellar Atrophy with Spinal Motor Neuronopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, **2018**, 102(5), 858-873. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.011] [PMID: 29727687]
- [80] Zimmer, A.M.; Pan, Y.K.; Chandrapalan, T.; Kwong, R.W.M.; Perry, S.F. Loss-of-function approaches in comparative physiology: is there a future for knockdown experiments in the era of genome editing? *J. Exp. Biol.*, **2019**, 222(Pt 7), jeb175737. [http://dx.doi.org/10.1242/jeb.175737] [PMID: 30948498]
- [81] El-Brolosy, M.A.; Stainier, D.Y.R. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet.*, **2017**, 13(7), e1006780. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1006780] [PMID: 28704371]
- [82] Pena, I. A.; Roussel, Y.; Daniel, K.; Mongeon, K.; Johnstone, D.; Mendes, H. W.; Bosma, M.; Saxena, V.; Lepage, N.; Chakraborty, P. Pyridoxine-Dependent Epilepsy in Zebrafish Caused by Aldh7a1 Deficiency. *Genetics*, **2017**, 207(4). [http://dx.doi.org/10.1534/genetics.117.300137]
- [83] Xu, M.; Liu, D.; Dong, Z.; Wang, X.; Wang, X.; Liu, Y.; Baas, P.W.; Liu, M. Kinesin-12 influences axonal growth during zebrafish neural development. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **2014**, 71(10), 555-563. [http://dx.doi.org/10.1002/cm.21193] [PMID: 25250533]
- [84] Dong, Z.; Wu, S.; Zhu, C.; Wang, X.; Li, Y.; Chen, X.; Liu, D.; Qiang, L.; Baas, P.W.; Liu, M. CRISPR/Cas9-Mediated Kif15 Mutations Accelerate Axonal Outgrowth during Neuronal Development and Regeneration in Zebrafish. *Traffic*, **2018**, (February), 1-11. [http://dx.doi.org/10.1111/tra.12621] [PMID: 30411440]
- [85] Gurung, S.; Asante, E.; Hummel, D.; Williams, A.; Feldman-Schultz, O.; Halloran, M.C.; Sittaramane, V.; Chandrasekhar, A. Distinct roles for the cell adhesion molecule Contactin2 in the development and function of neural circuits in zebrafish. *Mech. Dev.*, **2018**, 152, 1-12. [http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2018.05.005] [PMID: 29777776]
- [86] Bose, P.; Armstrong, G. A. B.; Drapeau, P. /Journal/Jn by \${individualUser.GivenNames} \${individualUser.Surname} (132.248.142.040) on December 6; 2018.
- [87] Volk, A. E.; Weishaupt, J. H.; Andersen, P. M.; Ludolph, A. C.; Kubisch, C. Current Knowledge and Recent Insights into the Genetic Basis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *medizinische Genet*, **2018**, 30(2), 252-258. [http://dx.doi.org/10.1007/s11825-018-0185-3]
- [88] Turner, A.N.; Andersen, R.S.; Bookout, I.E.; Brashear, L.N.; Davis, J.C.; Gahan, D.M.; Davis, J.C.; Gotham, J.P.; Hijaz, B.A.; Kaushik, A.S.; McGill, J.B.; Miller, V.L.; Moseley, Z.P.; Nowell, C.L.; Patel, R.K.; Rodgers, M.C.; Patel, R.K.; Shihab, Y.A.; Walker, A.P.; Glover, S.R.; Foster, S.D.; Challa, A.K. Analysis of

- novel domain-specific mutations in the zebrafish *ndr2/cyclops* gene generated using CRISPR-Cas9 RNPs. *J. Genet.*, **2018**, 97(5), 1315-1325.
[http://dx.doi.org/10.1007/s12041-018-1033-6] [PMID: 30555080]
- [89] Jardin, N.; Giudicelli, F.; Ten Martin, D.; Vitrac, A.; De Gois, S.; Allison, R.; Houart, C.; Reid, E.; Hazan, J.; Fassier, C. BMP- and neuropilin 1-mediated motor axon navigation relies on spastin alternative translation. *Development*, **2018**, 145(17), dev162701.
[http://dx.doi.org/10.1242/dev.162701] [PMID: 30082270]
- [90] Kozol, R.A.; Cukier, H.N.; Zou, B.; Mayo, V.; De Rubeis, S.; Cai, G.; Griswold, A.J.; Whitehead, P.L.; Haines, J.L.; Gilbert, J.R.; Cuccaro, M.L.; Martin, E.R.; Baker, J.D.; Buxbaum, J.D.; Pericak-Vance, M.A.; Dallman, J.E. Two knockdown models of the autism genes SYNGAP1 and SHANK3 in zebrafish produce similar behavioral phenotypes associated with embryonic disruptions of brain morphogenesis. *Hum. Mol. Genet.*, **2015**, 24(14), 4006-4023.
[http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddv138] [PMID: 25882707]
- [91] Liu, C.X.; Li, C.Y.; Hu, C.C.; Wang, Y.; Lin, J.; Jiang, Y.H.; Li, Q.; Xu, X. CRISPR/Cas9-induced *shank3b* mutant zebrafish display autism-like behaviors. *Mol. Autism*, **2018**, 9(1), 23.
[http://dx.doi.org/10.1186/s13229-018-0204-x] [PMID: 29619162]
- [92] Riché, R.; Drapeau, P.; Samarut, É. *Glycine Decarboxylase Deficiency-Induced Motor Dysfunction in Zebrafish Is Rescued by Counterbalancing Glycine Synaptic Level Graphical Abstract*, **2018**.
[http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.124642]
- [93] Khan, T.N.; Khan, K.; Sadeghpour, A.; Reynolds, H.; Perilla, Y.; McDonald, M.T.; Gallentine, W.B.; Baig, S.M.; Davis, E.E.; Katsanis, N. Mutations in NCAPG2 Cause a Severe Neurodevelopmental Syndrome that Expands the Phenotypic Spectrum of Condensinopathies. *Am. J. Hum. Genet.*, **2019**, 104(1), 94-111.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.11.017] [PMID: 30609410]
- [94] Zelinka, C.P.; Sotolongo-Lopez, M.; Fadool, J.M. Targeted disruption of the endogenous zebrafish *rhodopsin* locus as models of rapid rod photoreceptor degeneration. *Mol. Vis.*, **2018**, 24, 587-602. [PMID: 30210230]
- [95] Grone, B.P.; Marchese, M.; Hamling, K.R.; Kumar, M.G.; Krasniak, C.S.; Sicca, F.; Santorelli, F.M.; Patel, M.; Baraban, S.C. Epilepsy, Behavioral Abnormalities, and Physiological Comorbidities in Syntaxin-Binding Protein 1 (STXBP1) Mutant Zebrafish. *PLoS One*, **2016**, 11(3), e0151148.
[http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0151148] [PMID: 26963117]
- [96] Zabinyakov, N.; Bullivant, G.; Cao, F.; Fernandez Ojeda, M.; Jia, Z.P.; Wen, X.Y.; Dowling, J.J.; Salomons, G.S.; Mercimek-Andrews, S. Characterization of the first knock-out *aldh7a1* zebrafish model for pyridoxine-dependent epilepsy using CRISPR-Cas9 technology. *PLoS One*, **2017**, 12(10), e0186645.
[http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0186645] [PMID: 29053735]
- [97] Johnstone, D.L.; Al-Shekaili, H.H.; Tarailo-Graovac, M.; Wolf, N.I.; Ivy, A.S.; Demarest, S.; Roussel, Y.; Ciapaite, J.; van Roermund, C.W.T.; Kernohan, K.D.; Kosuta, C.; Ban, K.; Ito, Y.; McBride, S.; Al-Thihli, K.; Abdelrahim, R.A.; Koul, R.; Al Futaisi, A.; Haaxma, C.A.; Olson, H.; Sigurdardottir, L.Y.; Arnold, G.L.; Gerkes, E.H.; Boon, M.; Heiner-Fokkema, M.R.; Noble, S.; Bosma, M.; Jans, J.; Koolen, D.A.; Kamsteeg, E.J.; Drögemöller, B.; Ross, C.J.; Majewski, J.; Cho, M.T.; Begtrup, A.; Wasserman, W.W.; Bui, T.; Brimble, E.; Violante, S.; Houten, S.M.; Wevers, R.A.; van Faassen, M.; Kema, I.P.; Lepage, N.; Lines, M.A.; Dymment, D.A.; Wanders, R.J.A.; Verhoeven-Duif, N.; Ekker, M.; Boycott, K.M.; Friedman, J.M.; Pena, I.A.; van Karnebeek, C.D.M. PLPHP deficiency: clinical, genetic, biochemical, and mechanistic insights. *Brain*, **2019**, 142(3), 542-559.
[http://dx.doi.org/10.1093/brain/awy346] [PMID: 30668673]
- [98] Weaver, C.J.; Terzi, A.; Roeder, H.; Gurol, T.; Deng, Q.; Leung, Y.F.; Suter, D.M. *nox2/cybb* Deficiency Affects Zebrafish Retinotectal Connectivity. *J. Neurosci.*, **2018**, 38(26), 5854-5871.
[http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1483-16.2018] [PMID: 29793976]
- [99] Sedykh, I.; Keller, A.N.; Yoon, B.; Roberson, L.; Moskvina, O.V.; Grinblat, Y. Zebrafish Rfx4 controls dorsal and ventral midline formation in the neural tube. *Dev. Dyn.*, **2018**, 247(4), 650-659.
[http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.24613] [PMID: 29243319]
- [100] Yildiz, O.; Downes, G. B.; Sagerström, C. G. *Zebrafish Prdm12b Acts Independently of Nkx6.1 Repression to Promote Eng1b Expression in the Neural Tube P1 Domain*, **2019**, p. 1-19.
- [101] Hofmeister, W.; Pettersson, M.; Kurtoglu, D.; Armenio, M.; Eisfeldt, J.; Papadogiannakis, N.; Gustavsson, P.; Lindstrand, A. Targeted copy number screening highlights an intragenic deletion of WDR63 as the likely cause of human occipital encephalocele and abnormal CNS development in zebrafish. *Hum. Mutat.*, **2018**, 39(4), 495-505.
[http://dx.doi.org/10.1002/humu.23388] [PMID: 29285825]
- [102] Perez, Y.; Bar-Yaacov, R.; Kadir, R.; Wormser, O.; Shelef, I.; Birk, O.S.; Flusser, H.; Birnbaum, R.Y. Mutations in the microtubule-associated protein MAP11 (C7orf43) cause microcephaly in humans and zebrafish. *Brain*, **2019**, 142(3), 574-585.
[http://dx.doi.org/10.1093/brain/awz004] [PMID: 30715179]
- [103] Cai, S.; Chen, Y.; Shang, Y.; Cui, J.; Li, Z.; Li, Y. Knockout of zebrafish interleukin 7 receptor (IL7R) by the CRISPR/Cas9 system delays retinal neurodevelopment. *Cell Death Dis.*, **2018**, 9(3), 273.
[http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0337-z] [PMID: 29449560]
- [104] Puttonen, H.A.J.; Sundvik, M.; Semanova, S.; Shirai, Y.; Chen, Y.C.; Panula, P. Knockout of histamine receptor H3 alters adaptation to sudden darkness and monoamine levels in the zebrafish. *Acta Physiol. (Oxf.)*, **2018**, 222(3).
[http://dx.doi.org/10.1111/apha.12981] [PMID: 29044927]
- [105] Ashlin, T.G.; Blunson, N.J.; Ghosh, M.; Cockcroft, S.; Rihel, J. *Pitpnc1a* Regulates Zebrafish Sleep and Wake Behavior through Modulation of Insulin-like Growth Factor Signaling. *Cell Rep.*, **2018**, 24(6), 1389-1396.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.012] [PMID: 30089250]
- [106] Kürty, S.; Besnard, T.; Ebstein, F.; Khan, T.N.; Gambin, T.; Douglas, J.; Bacino, C.A.; Craigen, W.J.; Sanders, S.J.; Lehmann, A.; Latypova, X.; Khan, K.; Pacault, M.; Sacharow, S.; Glaser, K.; Bieth, E.; Perrin-Sabourin, L.; Jacquemont, M.L.; Cho, M.T.; Roeder, E.; Denommé-Pichon, A.S.; Monaghan, K.G.; Yuan, B.; Xia, F.; Simon, S.; Bonneau, D.; Parent, P.; Gilbert-Dussardier, B.; Odent, S.; Toutain, A.; Pasquier, L.; Barbouth, D.; Shaw, C.A.; Patel, A.; Smith, J.L.; Bi, W.; Schmitt, S.; Deb, W.; Nizon, M.; Mercier, S.; Vincent, M.; Rooryck, C.; Malan, V.; Briceno, I.; Gómez, A.; Nugent, K.M.; Gibson, J.B.; Cogné, B.; Lupski, J.R.; Stessman, H.A.F.; Eichler, E.E.; Retterer, K.; Yang, Y.; Redon, R.; Katsanis, N.; Rosenfeld, J.A.; Kloetzle, P.M.; Guzio, C.; Béziau, S.; Stankiewicz, P.; Isidor, B. De Novo Disruption of the Proteasome Regulatory Subunit PSMD12 Causes a Syndromic Neurodevelopmental Disorder. *Am. J. Hum. Genet.*, **2017**, 100(2), 352-363.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.003] [PMID: 28132691]
- [107] Du, W.J.; Zhang, R.W.; Li, J.; Zhang, B.B.; Peng, X.L.; Cao, S.; Yuan, J.; Yuan, C.D.; Yu, T.; Du, J.L. The Locus Coeruleus Modulates Intravenous General Anesthesia of Zebrafish via a Cooperative Mechanism. *Cell Rep.*, **2018**, 24(12), 3146-3155.e3.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.046] [PMID: 30231998]
- [108] Zhang, H.; Zhang, Q.; Gao, G.; Wang, X.; Wang, T.; Kong, Z.; Wang, G.; Zhang, C.; Wang, Y.; Peng, G. UBTOR/KIAA1024 regulates neurite outgrowth and neoplasia through mTOR signaling. *PLoS Genet.*, **2018**, 14(8), e1007583.
[http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1007583] [PMID: 30080879]
- [109] Bar Yaacov, R.; Eshel, R.; Farhi, E.; Shemulovich, F.; Kaplan, T.; Birnbaum, R.Y. Functional Characterization of the ZEB2 Regulatory Landscape. *Hum. Mol. Genet.*, **2018**, ...
[http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddy440] [PMID: 30590588]
- [110] Lazcano, I.; Rodríguez-Ortiz, R.; Villalobos, P.; Martínez-Torres, A.; Solís-Sainz, J.C.; Orozco, A. Knock-Down of Specific Thyroid Hormone Receptor Isoforms Impairs Body Plan Development in Zebrafish. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **2019**, 10(March), 156.
[http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2019.00156] [PMID: 30930855]
- [111] Kuil, L.E.; Oosterhof, N.; Geurts, S.N.; van der Linde, H.C.; Meijering, E.; van Ham, T.J. Reverse genetic screen reveals that *Il134* facilitates yolk sac macrophage distribution and seeding of the brain. *Dis. Model. Mech.*, **2019**, 12(3), dmm037762.
[http://dx.doi.org/10.1242/dmm.037762] [PMID: 30765415]
- [112] Jobst-Schwan, T.; Schmidt, J.M.; Schneider, R.; Hoogstraten, C.A.; Ullmann, J.F.P.; Schapiro, D.; Majumdar, A.J.; Kolb, A.; Eddy, K.; Shril, S.; Braun, D.A.; Poduri, A.; Hildebrandt, F. Acute multi-gRNA knockdown of KEOPS complex genes reproduces the mi-

- crocephaly phenotype of the stable knockout zebrafish model. *PLoS One*, **2018**, *13*(1), e0191503. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0191503] [PMID: 29346415]
- [113] Braun, D.A.; Rao, J.; Mollet, G.; Schapiro, D.; Daugeron, M.-C.; Tan, W.; Gribouval, O.; Boyer, O.; Revy, P.; Jobst-Schwan, T.; Schmidt, J.M.; Lawson, J.A.; Schanze, D.; Ashraf, S.; Ullmann, J.F.P.; Hoogstraten, C.A.; Boddaert, N.; Collinet, B.; Martin, G.; Liger, D.; Lovric, S.; Furlano, M.; Guerrero, I.C.; Sanchez-Ferras, O.; Hu, J.F.; Boschat, A.C.; Sanquer, S.; Menten, B.; Vergult, S.; De Rucker, N.; Airik, M.; Hermle, T.; Shril, S.; Widmeier, E.; Gee, H.Y.; Choi, W.I.; Sadowski, C.E.; Pabst, W.L.; Warejko, J.K.; Daga, A.; Basta, T.; Matejas, V.; Scharmann, K.; Kienast, S.D.; Behnam, B.; Beeson, B.; Begtrup, A.; Bruce, M.; Ch'ng, G.S.; Lin, S.P.; Chang, J.H.; Chen, C.H.; Cho, M.T.; Gaffney, P.M.; Gipson, P.E.; Hsu, C.H.; Kari, J.A.; Ke, Y.Y.; Kiraly-Borri, C.; Lai, W.M.; Lemyre, E.; Littlejohn, R.O.; Masri, A.; Moghtaderi, M.; Nakamura, K.; Ozaltin, F.; Praet, M.; Prasad, C.; Prytula, A.; Roeder, E.R.; Rump, P.; Schnur, R.E.; Shihara, T.; Sinha, M.D.; Soliman, N.A.; Soullami, K.; Sweetser, D.A.; Tsai, W.H.; Tsai, J.D.; Topaloglu, R.; Vester, U.; Viskochil, D.H.; Vatanavicharn, N.; Waxler, J.L.; Wierenga, K.J.; Wolf, M.T.F.; Wong, S.N.; Leidel, S.A.; Truglio, G.; Dedon, P.C.; Poduri, A.; Mane, S.; Lifton, R.P.; Bouchard, M.; Kannu, P.; Chitayat, D.; Magen, D.; Callewaert, B.; van Tilbeurgh, H.; Zenker, M.; Antignac, C.; Hildebrandt, F. Mutations in KEOPS-complex genes cause nephrotic syndrome with primary microcephaly. *Nat. Genet.*, **2017**, *49*(10), 1529-1538. [http://dx.doi.org/10.1038/ng.3933] [PMID: 28805828]
- [114] Kimura, Y.; Hisano, Y.; Kawahara, A.; Higashijima, S. Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Sci. Rep.*, **2014**, *4*, 6545. [http://dx.doi.org/10.1038/srep06545] [PMID: 25293390]
- [115] Ota, S.; Taimatsu, K.; Yanagi, K.; Namiki, T.; Ohga, R.; Higashijima, S.I.; Kawahara, A.; Jinek, M.; Cong, L.; Mali, P. Functional visualization and disruption of targeted genes using CRISPR/Cas9-mediated eGFP reporter integration in zebrafish. *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 34991. [http://dx.doi.org/10.1038/srep34991] [PMID: 27725766]
- [116] Wu, R.S.; Lam, I.I.; Clay, H.; Duong, D.N.; Deo, R.C.; Coughlin, S.R. A Rapid Method for Directed Gene Knockout for Screening in G0 Zebrafish. *Dev. Cell*, **2018**, *46*(1), 112-125.e4. [http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.003] [PMID: 29974860]
- [117] Chen, T.W.; Wardill, T.J.; Sun, Y.; Pulver, S.R.; Renninger, S.L.; Baohan, A.; Schreiter, E.R.; Kerr, R.A.; Orger, M.B.; Jayaraman, V.; Looger, L.L.; Svoboda, K.; Kim, D.S. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, **2013**, *499*(7458), 295-300. [http://dx.doi.org/10.1038/nature12354] [PMID: 23868258]
- [118] Ahrens, M.B.; Orger, M.B.; Robson, D.N.; Li, J.M.; Keller, P.J. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat. Methods*, **2013**, *10*(5), 413-420. [http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2434] [PMID: 23524393]
- [119] Farrar, M.J.; Kolkman, K.E.; Fetcho, J.R. Features of the structure, development, and activity of the zebrafish noradrenergic system explored in new CRISPR transgenic lines. *J. Comp. Neurol.*, **2018**, *526*(15), 2493-2508. [http://dx.doi.org/10.1002/cne.24508] [PMID: 30070695]
- [120] Motta-Mena, L.B.; Reade, A.; Mallory, M.J.; Glantz, S.; Weiner, O.D.; Lynch, K.W.; Gardner, K.H. An optogenetic gene expression system with rapid activation and deactivation kinetics. *Nat. Chem. Biol.*, **2014**, *10*(3), 196-202. [http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1430] [PMID: 24413462]
- [121] Buckley, C.E.; Moore, R.E.; Reade, A.; Goldberg, A.R.; Weiner, O.D.; Clarke, J.D.W. Reversible Optogenetic Control of Subcellular Protein Localization in a Live Vertebrate Embryo. *Dev. Cell*, **2016**, *36*(1), 117-126. [http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2015.12.011] [PMID: 26766447]
- [122] Reade, A.; Motta-Mena, L.B.; Gardner, K.H.; Stainier, D.Y.; Weiner, O.D.; Woo, S. TAEL: a zebrafish-optimized optogenetic gene expression system with fine spatial and temporal control. *Development*, **2017**, *144*(2), 345-355. [http://dx.doi.org/10.1242/dev.139238] [PMID: 27993986]
- [123] Putri, R.R.; Chen, L. Spatiotemporal control of zebrafish (*Danio rerio*) gene expression using a light-activated CRISPR activation system. *Gene*, **2018**, *677*(July), 273-279. [http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2018.07.077] [PMID: 30077009]
- [124] Nihongaki, Y.; Yamamoto, S.; Kawano, F.; Suzuki, H.; Sato, M. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system. *Chem. Biol.*, **2015**, *22*(2), 169-174. [http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.12.011] [PMID: 25619936]
- [125] Yang, H.H.; St-Pierre, F. Genetically Encoded Voltage Indicators: Opportunities and Challenges. *J. Neurosci.*, **2016**, *36*(39), 9977-9989. [http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1095-16.2016] [PMID: 27683896]
- [126] Kibat, C.; Krishnan, S.; Ramaswamy, M.; Baker, B.J.; Jesuthasan, S. Imaging voltage in zebrafish as a route to characterizing a vertebrate functional connectome: promises and pitfalls of genetically encoded indicators. *J. Neurogenet.*, **2016**, *30*(2), 80-88. [http://dx.doi.org/10.1080/01677063.2016.1180384] [PMID: 27328843]
- [127] Benedetti, L.; Ghilardi, A.; Prosperi, L.; Francolini, M.; Del Giacco, L. *Biosensing Motor Neuron Membrane Potential in Live Zebrafish Embryos*; No. June, **2017**, pp. 1-8.
- [128] Miyazawa, H.; Okumura, K.; Hiyoshi, K.; Maruyama, K.; Kakinuma, H.; Amo, R.; Okamoto, H.; Yamasu, K.; Tsuda, S. Optical interrogation of neuronal circuitry in zebrafish using genetically encoded voltage indicators. *Sci. Rep.*, **2018**, *8*(1), 6048. [http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23906-1] [PMID: 29662090]
- [129] Breacker, C.; Barber, I.; Norton, W.H.J.; McDearmid, J.R.; Tilley, C.A. A Low-Cost Method of Skin Swabbing for the Collection of DNA Samples from Small Laboratory Fish. *Zebrafish*, **2017**, *14*(1), 35-41. [http://dx.doi.org/10.1089/zeb.2016.1348] [PMID: 27788059]
- [130] Borck, G.; Hög, F.; Dentici, M.L.; Tan, P.L.; Sowada, N.; Medeira, A.; Gueneau, L.; Thiele, H.; Kousi, M.; Lepri, F.; Wenzek, L.; Blumenthal, I.; Radicioni, A.; Schwarzenberg, T.L.; Mandriani, B.; Fischetto, R.; Morris-Rosendahl, D.J.; Altmüller, J.; Reymond, A.; Nürnberg, P.; Merla, G.; Dallapiccola, B.; Katsanis, N.; Cramer, P.; Kubisch, C. BRF1 mutations alter RNA polymerase III-dependent transcription and cause neurodevelopmental anomalies. *Genome Res.*, **2015**, *25*(2), 155-166. [http://dx.doi.org/10.1101/gr.176925.114] [PMID: 25561519]
- [131] Hofmeister, W.; Pettersson, M.; Kurtoglu, D.; Armenio, M.; Einfeldt, J.; Papadogiannakis, N.; Gustavsson, P.; Lindstrand, A. Targeted copy number screening highlights an intragenic deletion of WDR63 as the likely cause of human occipital encephalocele and abnormal CNS development in zebrafish. *Hum. Mutat.*, **2018**, *39*(4), 495-505. [http://dx.doi.org/10.1002/humu.23388] [PMID: 29285825]

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.