

Universidad de Castilla-La Mancha
Facultad de Medicina de Albacete
Dpto. de Ciencias y Tecnología Agroforestal y Genética

Programa de doctorado Ciencias de la Salud



**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *MYOC* EN EL PEZ
CEBRA: IMPLICACIONES EN LA DETERMINACIÓN
SEXUAL Y EN ALTERACIONES OCULARES**

Raquel Atienzar Aroca

Directores:

Prof. Dr. Julio Escribano Martínez

Prof. Dr. José Daniel Aroca Aguilar

Memoria para optar al grado de doctora

Albacete, 2022



Facultad de Medicina

Albacete, 15 de junio de 2022

D. Julio Escribano Martinez, Doctor en CC. Biológicas y Catedrático de Universidad del área de conocimiento de Genética en la Universidad de Castilla-La Mancha

CERTIFICA:

Que Doña Raquel Atienzar Aroca, graduada en Química por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: “Análisis funcional del gen *myoc* en el pez cebra: implicaciones en la determinación sexual y en alteraciones oculares” para optar al grado de doctora.

Revisada la presente memoria, considero que reúne los requisitos necesarios para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente.

Fdo: Prof. Dr. Julio Escribano Martínez
Catedrático de Genética
Área de Genética. Facultad de Medicina
Universidad de Castilla-La Mancha
Avda. de Almansa, 14, 02008 Albacete
Tel: 967 599200, ext: 2928
Email: julio.escribano@uclm.es



Facultad de Medicina

Albacete, 15 de junio de 2022

D. José Daniel Aroca Aguilar, Doctor por la Universidad de Castilla-La Mancha y Profesor Titular del área de conocimiento de Genética

CERTIFICA:

Que Doña Raquel Atienzar Aroca, graduada en Química por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: “Análisis funcional del gen *myoc* en el pez cebra: implicaciones en la determinación sexual y en alteraciones oculares” para optar al grado de doctora.

Revisada la presente memoria, considero que reúne los requisitos necesarios para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente.

Fdo: Prof. Dr. José Daniel Aroca Aguilar
Profesor Titular de Universidad
Área de Genética. Facultad de Medicina
Universidad de Castilla-La Mancha
Avda. de Almansa, 14, 02008 Albacete
Tel: 967 599200, ext: 2993
Email: josedaniel.aroca@uclm.es



Facultad de Medicina

Financiación

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación procedente del "Instituto de Salud Carlos III/Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)" a través de una red temática de investigación (PI19/00208 y RD16/0008/0019, OFTARED) y de un contrato de la Universidad de Castilla-La Mancha (Ref.: 2020-PREDUCLM-16605).



Unión Europea

Fondo Europeo
de Desarrollo Regional



AGRADECIMIENTOS

Después de todos estos años, hemos llegado al final. Mentiría si dijese que ha sido una etapa fácil y un camino de rosas, pero todos sabemos que, si fuese así, no sería una tesis doctoral. Que esto tenga final no significa que se vaya a olvidar, porque hay momentos que nunca se van y este es uno de ellos.

Me gustaría empezar agradeciendo este trabajo a mis directores de tesis, Julio y Dani. Gracias por darme la oportunidad de formar parte del grupo, por confiar en mí y por hacerme sentir una más desde el principio. Admiro el gran equipo que hacéis juntos. Julio, gracias por tu excelente trabajo, constancia, dedicación y bondad. Gracias por compartir tus conocimientos conmigo. Dani, gracias por tu paciencia, por formarme y por estar ahí tanto en lo profesional como en lo personal.

Dicen que “la Mancha engancha”, y no les falta razón. Una de las mejores cosas que me llevo de Albacete y de toda esta experiencia son los grandísimos compañeros de trabajo que he tenido, aunque para mí, más que compañeros, ya son familia.

María José, gracias por el excelente trabajo que haces siempre, por tu ayuda y por amenizar los días buenos y no tan buenos. Ha sido un placer trabajar contigo todos estos años. Sin duda, eres la mejor. Juanma, contigo siempre ha sido fácil trabajar. Tienes ese humor que te hace especial y que cuando no estás, se echa de menos. Mi maestro en el laboratorio, gracias por enseñarme tantas cosas y por escucharme cuando lo he necesitado. Susana, gracias por todo lo bueno que me has aportado. Mi apoyo incondicional en mis mejores y peores momentos. Mi compañera, amiga y hermana dentro del laboratorio y fuera de él. Carmen, gracias por la inocencia y alegría que transmites siempre, que te hace tan especial. Ángel, gracias por todo el tiempo compartido, por tu disposición, por aportarme infinitas cosas buenas, por ser un gran apoyo y por no dejar que me venga abajo. Has hecho que mi último año sea inolvidable. Claudio, aunque llegaste el último, no me olvidó de ti, compañerito. Admiro tu alegría y buen humor. Gracias por tu manera de ver las cosas. Samuel, Jesús, José Ramón, Rosa, Alex, gracias por vuestro aporte a esta etapa y por los momentos que me habéis hecho pasar.

Los ratos del café siempre han sido más amenos con vosotros. Carlos Garrido, gracias por ayudarme a avanzar y a no rendirme. Mejoras el estado de ánimo de las personas sin pedir nada a cambio. Carlos de Cabo, gracias por tu amabilidad y tu buen humor. Ha sido un placer coincidir contigo.

Me gustaría agradecer a todos mis amigos de la Universidad de Valencia, en la que estudié Química y con la que he compartido una etapa importante de mi vida. Gracias por todos los buenos momentos y por sacarme una sonrisa que, a veces, es difícil. Siempre he pensado que Química no era la carrera de mi vida, pero lo cierto es que de ella me he llevado a dos de las personas más importantes a día de hoy. Una de ellas es Ana, mi mejor amiga. Gracias por hacerlo todo tan fácil, contigo puedo ser yo misma siendo como quiero ser. Gracias por tu amistad, por el corazón que tienes y por creer siempre en mí. Eres mi persona favorita. Ismael, gracias por la alegría y tranquilidad que desprendes. Gracias por haber estado siempre que he necesitado contar contigo y por esta portada tan especial.

Los que han estado conmigo durante este camino saben lo duro que ha sido. A pesar de todo, siempre las he tenido a ellas, "Las pepis". Creo que no podría tener un mejor grupo de amigas. Ellas, de vinos a deshoras, pero también de croquetas. De cervezas bien frías en una terraza al sol charlando y arreglando el mundo. Dicen que los amigos son la familia que uno elige, y yo estoy muy orgullosa de haberlas elegido a ellas. Gracias al resto de mis amigos, "los chicos" por complementarnos tan bien, por todos los buenos momentos y por la amistad tan bonita y forjada que tenemos para toda la vida.

Xiomy, Maime, Miriam, Yasmine, gracias por hacer la convivencia tan fácil y hacerme sentir como en casa.

Escribir esto no es fácil, y despedirme de ti menos. Rocío, gracias por todo lo que me aportas a diario y por estar conmigo siempre en las buenas y en las no tan buenas. Eres esa amiga que te dice "hoy salimos un ratito de tranquilis" y termina siendo una noche para recordar. Gracias por ser mi familia y mi hogar. Somos y seremos siempre un pack. Te quiero infinito amiga.

Javi, has estado presente en toda mi tesis doctoral y eres el que más ha vivido conmigo las alegrías y las penas. Eres el mejor compañero de vida. Gracias por proponerme abrazos y planazos cuando todo se venía abajo. Gracias por creer siempre en mí y por sacar mi mejor versión. Amparo, Enrique, gracias por acogerme y hacerme sentir como una hija. Kike, gracias por el diseño de esta portada, eres un crack.

Finalmente, me gustaría dedicarle esta tesis a mi familia. Si hay algo que tengo claro es que soy quien soy gracias a ellos. A mi tía Mari, por ser mi segunda madre, es un orgullo ser tu sobrina. A mis primos Jorge y Sergio, por ser como mis hermanos. Jose Luis, gracias por compartir tantos

años conmigo y estar siempre a mi disposición. Virtudes, gracias por tu alegría y positividad. Al resto de mis primos y tíos, sois la mejor familia que una podría tener. Mamá, gracias por apoyarme incondicionalmente en todas mis decisiones y por enseñarme que con esfuerzo todo se consigue. Gracias por mostrarme siempre el lado bueno de las cosas y por ser el pilar de mi vida. Sandra, de pequeñas odiabas que te imitara en todo, pero, aun hoy, quiero hacerlo. Eres mi ejemplo a seguir. Adri, gracias por las risas sin fin. Espero que puedas aprender de mí la mitad de todo lo que he aprendido yo de ti. Papá, gracias por estar a mi lado, por quererme como lo haces y apoyarme. A mis abuelos, Antonio y los que ya no están, los que regalan los abrazos más acogedores, las muestras de cariño más sinceras y las palabras más reconfortantes.

¡GRACIAS!

Índice

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	11
2.1 El gen <i>myoc</i>	13
2.1.1 Estructura y localización cromosómica.....	13
2.1.2 Expresión del gen.....	14
2.1.3 Mutaciones e implicación de MYOC en glaucoma	15
2.2 La proteína miocilina.....	15
2.2.1 Características generales	16
2.2.2 Localización en tejidos oculares.....	19
2.2.3 Localización en tejidos no oculares.....	20
2.2.4 Localización subcelular	20
2.2.5 Procesamiento proteolítico	21
2.2.6 Función biológica	22
2.2.7 Patogenicidad de las formas mutantes de miocilina	23
2.2.8 Estudio de la función de miocilina en modelos animales	24
2.3 El pez cebra como modelo animal	24
2.3.1 Características generales del pez cebra.....	24
2.3.2 El pez cebra como modelo genético de patologías humanas.....	28
2.3.3 Uso del sistema CRISPR/Cas9 para la edición genómica en pez cebra	30
2.3.4 Generación de peces <i>knock-out</i> por CRISPR/Cas9.....	32
2.3.5 Transgénesis mediada por transposones.....	33
3. JUSTIFICACIÓN	37
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
5.1 Estabulación, mantenimiento y reproducción de las líneas de peces cebra.....	47
5.1.1 Obtención de una línea de pez cebra por fertilización <i>in vitro</i>	47
5.2 Generación de las líneas de pez cebra <i>knock-out</i> y transgénica de <i>myoc</i>	49
5.2.1 Obtención de la línea KO <i>myoc</i> mediante CRISPR/Cas9.....	49
5.2.2 Generación de la línea transgénica de <i>myoc</i> mediante transgénesis dirigida por el transposón Tol2.....	50
5.3 Caracterización molecular de las líneas de pez cebra.....	51
5.3.1 Extracción de ADN genómico	51
5.3.2 Amplificación de ADN genómico mediante PCR	51
5.3.3 Electroforesis en geles de agarosa.....	52
5.3.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	53
5.3.5 Secuenciación Sanger	53

5.3.6	Extracción de ARNm	54
5.3.7	Síntesis de ADNc	54
5.3.8	Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real	55
5.3.9	Identificación del lugar de inserción cromosómica del transgén.....	56
5.4	Estudio del patrón de expresión de miocilina en pez cebra	59
5.4.1	Análisis de la expresión mediante inmunohistoquímica fluorescente de embriones completos (<i>in toto</i>)	59
5.4.2	Preparación de las secciones histológicas de pez cebra	59
5.4.3	Análisis de la expresión en tejido de pez cebra mediante inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia	60
5.5	Caracterización fenotípica de las líneas KO y transgénica de <i>myoc</i>	61
5.5.1	Tinción de hematoxilina-eosina.....	61
5.5.2	Tinción de Rojo Sirio	61
5.5.3	Estudio de la apoptosis celular mediante el ensayo TUNEL.....	62
5.5.4	Ensayo de la respuesta visual	62
5.6	Estudio transcriptómico de las líneas establecidas.....	63
5.7	Análisis estadístico.....	64
6.	RESULTADOS.....	65
6.1	Generación y caracterización de la línea KO para <i>myoc</i> mediante el sistema CRISPR/Cas9.....	67
6.1.1	Ortología del gen <i>myoc</i> en pez cebra	67
6.1.2	Establecimiento de la línea <i>knock-out</i> para <i>myoc</i>	70
6.1.3	Confirmación mediante qRT-PCR de la pérdida funcional del gen	72
6.1.4	Estudio del patrón de expresión de miocilina en pez cebra	73
6.1.5	Caracterización fenotípica de la línea KO para <i>myoc</i>	81
6.1.6	Estudio transcriptómico de peces cebra <i>knock-out</i> para <i>myoc</i>	88
6.2	Generación y caracterización de una línea de pez cebra transgénica para el gen <i>myoc</i> 92	
6.2.1	Generación de una línea con sobreexpresión constitutiva de <i>myoc</i> mediante transgénesis mediada por el transposón Tol2	92
6.2.2	Identificación del lugar de inserción del ADN transgénico	94
6.2.3	Confirmación mediante qRT-PCR de la sobreexpresión de <i>myoc</i> en la línea transgénica	96
6.2.4	Caracterización fenotípica de la línea transgénica de pez cebra	97
6.2.5	Caracterización inmunohistoquímica de la expresión de miocilina en los peces cebra transgénicos.....	107
6.2.6	Análisis de la apoptosis mediante el ensayo TUNEL	111
6.2.7	Estudio de la activación glial y de la proliferación celular en la retina.....	114
6.2.8	Análisis de la función visual de los peces transgénicos para <i>myoc</i>	118
6.2.9	Estudio transcriptómico de los peces transgénicos para <i>myoc</i>	119

6.2.10	Confirmación de los fenotipos oculares en una nueva generación de peces cebras transgénicos para <i>myoc</i>	125
6.2.11	Estudio de proliferación celular en peces transgénicos adultos	133
7.	DISCUSIÓN	135
7.1	Generación y establecimiento de la línea KO para <i>myoc</i>	137
7.1.1	Establecimiento de la línea <i>knock-out</i> para <i>myoc</i>	137
7.1.2	Caracterización del patrón de expresión de la proteína miocilina en el pez cebra	138
7.1.3	Caracterización fenotípica de los peces <i>knock-out</i> para <i>myoc</i>	139
7.1.4	Estudio transcriptómico de los peces KO para <i>myoc</i>	141
7.2	Generación y establecimiento de una línea transgénica para <i>myoc</i>	144
7.2.1	Establecimiento de la línea transgénica para <i>myoc</i>	144
7.2.2	Caracterización fenotípica de los peces transgénicos de <i>myoc</i>	145
7.2.3	Estudio del patrón de expresión de miocilina en la línea transgénica	148
7.2.4	Estudio de la función visual de los peces transgénicos mayores	149
7.2.5	Muerte y proliferación celular en tejidos oculares de los peces transgénicos ..	149
7.2.6	Estudio transcriptómico de los peces transgénicos adultos	150
7.3	Novedades y limitaciones del estudio e investigaciones futuras	155
8.	CONCLUSIONES	159
9.	BIBLIOGRAFÍA	163
10.	Anexo I. Resultados suplementarios	189
10.1	Figuras suplementarias	191
10.2	Tablas suplementarias	208
11.	Anexo II. Resumen de la producción científica	235
11.1	Publicaciones en revistas científicas	237
	Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral	237
	Otras publicaciones	237
11.2	Comunicaciones a congresos	238
	Comunicaciones relacionadas con la tesis doctoral	238
	Otras comunicaciones	239
12.	Anexo III. Publicaciones	243

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico	EPC	Epitelio corneal
ADNc	ADN codificante	ESC	Estroma corneal
Ac	Anticuerpo	FBS	Suero fetal bovino
ARN	Ácido ribonucleico	GPAA	Glaucoma primario de ángulo abierto
ARNcr	ARN crispr	HDR	Reparación directa por homología
ARNm	ARN mensajero	hpf	Horas post fecundación
ARNsg	ARN guía	IgG	Inmunoglobulina G
ARNtracr	ARNcr transactivador	Kb	kilobases
CCG	Capa de células ganglionares	kDa	kiloDaltons
CF	Capa de fotorreceptores	L	Lente
CL	Cápsula de la lente	LA	Ligamento anular
CNE	Capa nuclear externa	NMD	<i>Nonsense Mediated Decay</i>
CNI	Capa nuclear interna	NGS	Secuenciación de nueva generación
CPE	Capa plexiforme externa	NHEJ	Unión de extremos no homólogos
CPI	Capa plexiforme interna	pb	Pares de bases
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol	PB	Tampón fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
dNTPs	desoxirribonucleótidos	pi	Punto isoeléctrico
DPBS	Tampón fosfato salino de Dubelcco	PIO	Presión intraocular
Dpf	Días post fecundación	PTU	Feniltiourea
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
ENC	Endotelio corneal	SDS	Dodecilsulfato sódico
ENU	N-etil-N-nitrosourea	Tris	Tris(hidroximetil) aminoetano

1. RESUMEN

El gen *MYOC* es conocido principalmente por ser el primer gen implicado en glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA). El glaucoma es un conjunto de neuropatías ópticas caracterizadas por la muerte apoptótica progresiva de los axones de las células ganglionares de la retina, que pueden provocar una grave reducción del campo visual y ceguera. El gen *MYOC* consta de tres exones y codifica una glicoproteína de 504 aminoácidos llamada miocilina, con un peso molecular de 55-57 KDa y con una función biológica poco conocida. En el ojo, esta proteína está presente en el humor acuoso y en la matriz extracelular de la red trabecular.

El glaucoma producido por mutaciones en el gen *MYOC* se caracteriza, generalmente, por un desarrollo juvenil y un gran aumento de la presión intraocular (PIO). Se cree que las variantes patogénicas conducen a una ganancia de función tóxica debido al plegamiento anómalo y la agregación intracelular de la proteína mutante. La mayoría de las mutaciones de *MYOC* que se han identificado en pacientes con GPAA están localizadas en su dominio olfactomedina carboxilo terminal, que está muy conservado filogenéticamente. A pesar de conocerse la participación del gen *MYOC* en esta patología desde hace más de 20 años, tanto el mecanismo patogénico como su función normal son todavía desconocidos. Así pues, el objetivo general de este trabajo fue analizar en profundidad la función fisiológica de este gen utilizando el pez cebra como modelo animal.

Para ello, en primer lugar, se desarrolló una línea *knock-out* (KO) de *myoc* en el pez cebra mediante edición genómica con el sistema CRISPR/Cas9. Dicha línea es portadora de una variante que consistía en una deleción de 4 nucleótidos e inserción de 14 (c.236_239delinsAAAGGGGAAGGGGA), provocando un desplazamiento de la pauta de lectura y una pérdida de función de la proteína mutante debido a un codón prematuro de terminación p.(V75EfsX60). El análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) mostró una reducción significativa del 80% de la expresión del ARN mensajero (ARNm) de *myoc* en los peces homocigotos con respecto a los silvestres (WT, *wild type*). El análisis de expresión de miocilina mediante inmunohistoquímica fluorescente "*in toto*" de embriones silvestres completos a las 96 horas post-fecundación (hpf) mostró la presencia de la proteína en estructuras oculares del segmento anterior y en los músculos caudales. En adultos también se detectó en diferentes tejidos oculares y no oculares tales como músculo faríngeo, intestino, ovario y testículos. No se identificaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas en los peces cebra homocigotos, no obstante, el fenotipo observado en esta línea fue la ausencia de hembras entre los animales adultos. El análisis transcriptómico de los peces KO de *myoc* mostró una expresión alterada de

genes clave en la determinación del sexo masculino, indicando que miocilina es necesaria para la diferenciación de los ovarios en el pez cebra.

Para continuar explorando su función, se generó mediante transgénesis mediada por el transposón Tol2 una línea de pez cebra Tg(actb1:myoc-2A-mCherry) que sobreexpresaba constitutivamente miocilina. Los ensayos de qRT-PCR mostraron un incremento de aproximadamente cuatro veces del ARNm de *myoc* en los embriones de pez cebra transgénicos (144 hpf) en comparación con los silvestres. Casi el 60% de los peces transgénicos de 2 años desarrollaron ojos agrandados con graves anomalías asimétricas y variables del segmento anterior, crecimiento displásico de la retina e hipertrofia del nervio óptico. El análisis de peces transgénicos de la generación F4, aunque no mostró alteraciones oculares significativas en larvas, confirmó la aparición de alteraciones oculares variables (sobrecrecimiento del iris y un engrosamiento del estroma corneal) a partir de los 13 meses de edad. La inmunohistoquímica de peces transgénicos de 2 años reveló una mayor presencia de miocilina en la mayoría de los tejidos oculares alterados, así como signos de gliosis retiniana y expansión de las células ganglionares y las fibras nerviosas, lo que indica que estas células contribuyeron a la displasia de la retina. Además, el ensayo TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling*) mostró evidencias de apoptosis en las células ganglionares de la retina y en la capa externa del epitelio de la córnea, indicando la existencia de muerte celular. En todos los peces cebra transgénicos de 2 años se demostró la existencia de un deterioro visual. El análisis transcriptómico de los ojos transgénicos con alteraciones de estos peces mostró una expresión alterada de genes implicados en las vías relacionadas con el cristalino, músculos y matriz extracelular, entre otros procesos, mientras que el análisis de los ojos aparentemente normales mostró genes diferencialmente expresados implicados en metabolismo lipídico, sistema inmune y adhesión celular.

En resumen, los resultados de este trabajo muestran que el pez cebra proporciona una nueva y potente herramienta para investigar la función de miocilina, aportando información sobre sus propiedades biológicas. Los estudios realizados apoyan la función de miocilina como una proteína matricelular que podría jugar un papel en la determinación del sexo del pez cebra, así como en la morfología del segmento anterior ocular y de la retina a través de la modulación de la organización de la matriz extracelular y la proliferación celular.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El gen *myoc*

El término glaucoma engloba un grupo de neuropatías progresivas y heterogéneas cuya característica común es la ceguera debido a la muerte de las células ganglionares de la retina. En general, constituyen la segunda causa principal de ceguera en los países desarrollados y la principal en los individuos afroamericanos (Leske, 1983; Sheffield et al., 1993). Se estima que alrededor de 70 millones de personas en todo el mundo están afectadas por esta patología (Tham et al., 2014). La forma más prevalente es el glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA), patología genéticamente heterogénea con un patrón de herencia complejo.

En 1993, *GLC1A* fue identificado como el primer *locus* asociado a glaucoma juvenil, ubicado entre las posiciones cromosómicas 1q21 y 1q31 (Quigley et al., 2002). Este hallazgo se realizó mediante análisis de ligamiento y resultó ser un hito en el estudio de la genética del glaucoma. Estudiaron una familia de 5 generaciones de 59 individuos, de los cuales 30 estaban afectados por glaucoma juvenil. Se investigaron más de 90 marcadores genéticos de tipo microsatélite distribuidos por todo el genoma humano. Estudios posteriores realizados con otras familias permitieron reducir la longitud de la región crítica hasta menos de 2,5 millones de nucleótidos (Graff et al., 1995; Johnson et al., 1996; Morissette et al., 1995; Richards et al., 1998; Sheffield et al., 1993; Sunden et al., 1996; Wiggs et al., 1994). Finalmente, en 1997 el grupo del profesor Edwin Stone redujo más aun la región de ligamiento en familias con glaucoma juvenil, localizando tres genes (*APT1LG1*, *TXGP1* y *TIGR*) en la región de mayor ligamiento. La identificación de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) en una genoteca de ADNc del cuerpo ciliar humano (Escribano et al., 1995) facilitó la identificación de mutaciones en el gen *TIGR* (Trabecular Meshwork Inducible Glucocorticoid Response) que segregaban con la enfermedad en las familias afectadas con glaucoma juvenil (Stone et al., 1997). Un cambio de nomenclatura llevó a la redenominación de *TIGR* como *MYOC* (Kubota et al., 1997).

2.1.1 Estructura y localización cromosómica

El gen *MYOC* se localiza en el brazo largo del cromosoma 1, concretamente en el *locus* 1q24.3, y tiene una longitud de 17,25 kb. Está compuesto por tres exones separados por dos intrones que codifican los dominios funcionales de miocilina (**Figura 1**). El gen produce dos transcritos cuyo tamaño oscila entre 1,8- 2,0 kb. El transcrito más pequeño es menos abundante y corresponde a

un sitio de terminación poliA alternativo ubicado en la posición 1792 en el ADNc del gen (Adam et al., 1997a; Borrás et al., 2002; Ortego et al., 1997a).

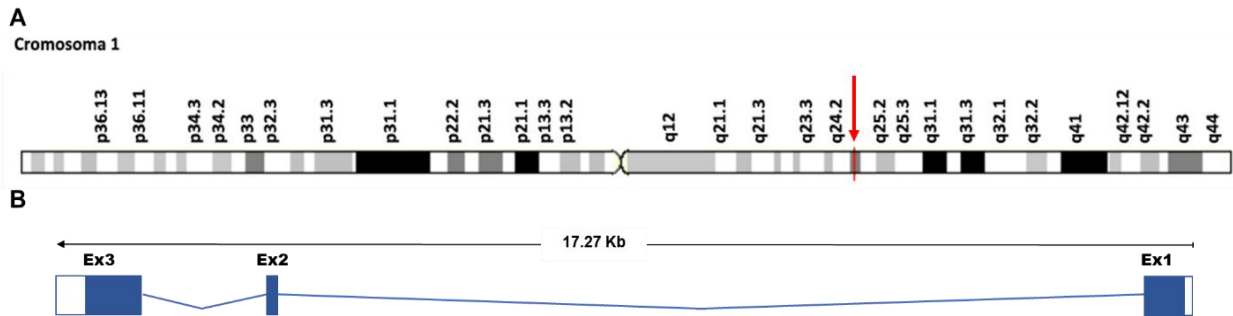


Figura 1. Esquema del gen *MYOC*. (A) Localización cromosómica y (B) estructura del gen. Esquema obtenido de *Genecards* (<http://www.genecards.org/>).

Tras localizar y analizar la región promotora del gen *MYOC*, se identificó una caja TATA y varios sitios potenciales de unión de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1 y AP-2 (Adam et al., 1997a; Fingert et al., 1998; Polansky et al., 1997), incluyendo también múltiples secuencias consenso de elementos de respuesta a glucocorticoides.

2.1.2 Expresión del gen

El gen *MYOC* se expresa en una gran variedad de tejidos oculares y no oculares. Los niveles de expresión más elevados se detectan en tejidos oculares como la malla trabecular, el cuerpo ciliar y el iris (Adam et al., 1997a; Escribano et al., 1995; Huang et al., 2000; Kubota et al., 1997; Ortego & Coca-Prados, 1997). Los análisis de expresión de ARNm mediante qRT-PCR han demostrado que la mayoría de los tejidos del ojo expresan ARNm de *MYOC*. En el nervio óptico, se ha detectado expresión del ARNm en astrocitos, células perivasculares y células del músculo liso (Ricard et al., 2001). En la red trabecular, se ha detectado en cultivos de explantes de tejidos, pero no en cultivos primarios (Tamm et al., 1999). También, se ha demostrado mediante experimentos de hibridación *in situ*, que las células de la red trabecular de las regiones uveal, corneoescleral y juxtacanalicular expresan ARNm de *MYOC* en cantidades similares (Huang et al., 2000; Swiderski et al., 2000; Takahashi et al., 2000; Wang & Johnson, 2000). Además, se han descrito niveles de expresión variables en células endoteliales del canal de Schlemm (Swiderski et al., 2000; Wang & Johnson, 2000).

En tejidos extraoculares, los análisis de transferencia Northern ha detectado ARNm de *myoc* abundante en diversos tejidos como el corazón, el músculo esquelético, el estómago, la tiroides, la tráquea, la médula ósea, el timo, la próstata, el intestino delgado, y colon (Fingert et al., 1998; Kubota et al., 1997; Ortego et al., 1997a). En menor abundancia, los transcritos fueron

detectables en pulmón, páncreas, testículo, ovario, médula espinal, ganglio linfático y glándula suprarrenal. Además, estudios realizados recientemente en nuestro laboratorio han descrito mediante qRT-PCR la expresión de *MYOC* en órganos linfoides, revelando la expresión del ARNm en linfocitos T y leucocitos circulantes en sangre (Abu-Amero et al., 2012; Aroca-Aguilar et al., 2018). Estudios de transferencia Western han detectado fragmentos de 30 KDa de la región C-terminal de *MYOC* en el timo (Aroca-Aguilar et al., 2018; Mena et al., 2011) y en el hígado. En ratón el patrón de expresión es similar al descrito en humanos (Ahmed et al., 2001; Swiderski et al., 1999; Taguchi et al., 2000).

2.1.3 Mutaciones e implicación de *MYOC* en glaucoma

Las mutaciones del gen *MYOC* presentan asociación con el GPAA. Aproximadamente del 2% al 4% de estos pacientes son portadores de una mutación en este gen, que presenta una alta heterogeneidad alélica. Esto explica que muchas de las variantes actúen como factores causales o predisponentes de la enfermedad (Fingert et al., 1999). La mayor parte de las mutaciones patogénicas descritas se presentan en heterocigosis y se localizan en la región codificante, predominantemente en el tercer exón, que codifica un dominio de 250 aminoácidos homólogo a olfactomedina (Adam et al., 1997b; Campos-Mollo et al., 2007; Fingert et al., 1999; ORTEGO et al., 1997b). En 1997 se identificaron las 3 primeras mutaciones en el gen *MYOC*. Posteriormente diferentes grupos de investigación han identificado más de 80 mutaciones en este gen en pacientes con glaucoma juvenil pertenecientes a distintas poblaciones y grupos étnicos, como la población asiática o caucásica (Adam et al., 1997b; Allingham et al., 1998; Angius et al., 1998; Brézin et al., 1998; Campos-Mollo et al., 2007; Damji et al., 1999; Hewitt et al., 2008; Hogewind et al., 2007; Ishikawa et al., 2004; Kee & Ahn, 1997; Kennan et al., 1998; Lam et al., 2000; López-Martínez et al., 2007; Mansergh et al., 1998; Pang et al., 2002; Richards et al., 1998; Stoilova et al., 1997; Suzuki et al., 1997; Wiggs et al., 1998; Yoon et al., 1999). Hasta la fecha, se han identificado 329 variantes del gen *MYOC*, las cuales se encuentran recogidas en la base de datos “*myocilin allele-specific glaucoma phenotype database*” (Hewitt et al., 2008).

2.2 La proteína miocilina

El gen *MYOC* codifica una glicoproteína de secreción llamada inicialmente TIGR (*Trabecular Meshwork inducible Glucocorticoid Response*). La proteína se descubrió durante estudios realizados por el Dr. Polansky en los que ésta se sobreexpresó en cultivos de células de malla trabecular humana tratadas con dexametasona (Polansky, 1993; Polansky et al., 1997). El ADNc fue clonado de manera paralela e independiente por dos grupos de investigación a partir de una

genoteca de sustracción de ADNc de cuerpo ciliar humano y de retina humana (Escribano et al., 1995; Ortego et al., 1997a). Como la región N-terminal de la proteína TIGR comparte aproximadamente el 25% de identidad con miosina, la proteína se renombró con el nombre miocilina (MYOC) en 1997 (Kubota et al., 1997).

2.2.1 Características generales

La proteína miocilina consta de 504 aminoácidos, tiene un peso molecular esperado de aproximadamente 55-57 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de aproximadamente 5,2 (Kubota et al., 1997; Ortego et al., 1997a). Mediante las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) y transferencia Western, se ha detectado una banda principal de alrededor de 55-57 kDa con la mayoría de los anticuerpos disponibles contra miocilina generados por diferentes investigadores (Caballero et al., 2000; Clark, Steely, et al., 2001; Huang et al., 2000; Karali et al., 2000; Nguyen et al., 1998; Stamer et al., 1998; Ueda et al., 2000). Mediante electroforesis bidimensional se detectan varias isoformas con un peso molecular similar (55-57 kDa) y un pI de 5,2-5,3 (Clark, Steely, et al., 2001; Karali et al., 2000; Nguyen et al., 1998; Polansky et al., 1997). Estas isoformas parecen proceder de las diferencias en el procesamiento post-traduccional en el retículo endoplásmico. También se han identificado productos truncados de miocilina. La escisión de la proteína mediante un corte endoproteolítico entre los aminoácidos Arg²²⁶ e Ile²²⁷, posiblemente por la proteasa calpaína II, produce un fragmento N-terminal de 23 kDa y un fragmento C-terminal de 35 kDa (Aroca-Aguilar et al., 2005; Sánchez-Sánchez et al., 2007). Mediante estudios de comparación de secuencias se ha descrito que la proteína presenta un diseño modular compuesto por tres dominios diferentes: un dominio de miosina en la región N-terminal, un dominio de unión central o de unión entre los dos extremos y uno similar a la olfactomedina (OLF) en la región C-terminal (**Figura 2A**).

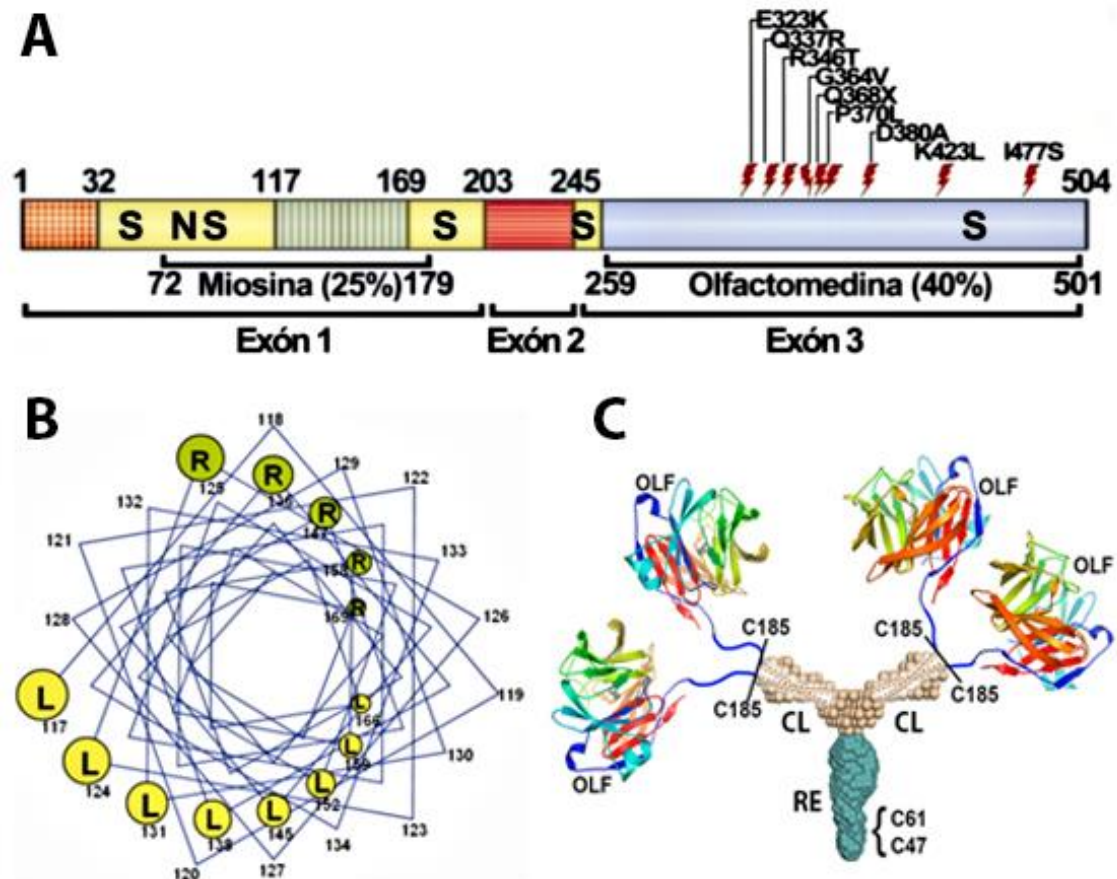


Figura 2. Estructura de la proteína miocilina humana. (A) Esquema de la cadena polipeptídica donde se muestran las regiones codificadas por cada uno de los exones, los dominios estructurales principales y la localización de algunas mutaciones encontradas en pacientes con GPAA. Textura naranja: péptido señal. Textura verde: cremallera de leucinas. Textura roja: dominio central de unión entre los dos extremos. Textura azul: dominio olfactomedina C-terminal. S: residuos de cisteína potencialmente implicados en la formación de puentes disulfuro; N: sitio de N-glicosilación. Entre paréntesis se indica el porcentaje de similitud en las regiones de miosina y olfactomedina. Los números de la parte superior e inferior indican la posición de los aminoácidos en la cadena polipeptídica. Las mutaciones asociadas con glaucoma se localizan en el dominio olfactomedina. Figura basada en (Ortego et al., 1997a) modificada por (Aguilar, 2009). (B) Estructura helicoidal de la cremallera de leucinas de la región N-terminal de la proteína. Se muestra la predicción de la estructura en la región de la cadena polipeptídica comprendida entre los aminoácidos 117-169. Se muestran los residuos de leucina (L) y arginina (R). Modificado por (Ortego et al., 1997a). (C) Estructura cuaternaria de la proteína. La estructura consiste en un dímero de dímeros en forma de Y, los cuales se forman a través de las cremalleras de leucina (CL). El dímero de dímeros se establece mediante la región enrollada helicoidalmente (RE) de los dominios N-terminales (Lieberman & Ma, 2021).

La región N-terminal contiene un motivo típico de cremallera de leucinas, formado por ocho residuos de leucina espaciados uniformemente cada siete residuos entre los aminoácidos 117-169 (Figura 2B). Además, existen cinco residuos de arginina, cargados positivamente. El plegamiento helicoidal de esta región determina la aparición de una estructura cilíndrica con una cara apolar y otra cargada positivamente, que participa en la auto-agregación de la proteína.

Estudios previos han demostrado que las cremalleras dimerizan formando hélices α paralelas que se enrollan entre sí mediante interacciones hidrofóbicas que se ejercen entre las cadenas laterales de leucina (Alber, 1992). Las cremalleras de leucina se encuentran en una amplia variedad de proteínas y tienen la capacidad de formar complejos homo y heteroméricos, lo que hace que estos motivos sean importantes en la regulación de la función de las proteínas. Además, este dominio muestra una similitud de secuencia de aminoácidos (20-28%) con otras proteínas como la familia de ezrina/radixina/moesina, implicadas en el establecimiento de interconexiones entre filamentos de actina y la membrana plasmática. También presenta similitud con la familia de proteínas contráctiles como miosina y de músculo liso y factores de transcripción sin dominio básico de unión al ADN (Ortego et al., 1997a). La región N-terminal contiene el péptido señal entre los aminoácidos 1-32.

El dominio central de unión es codificado por el exón 2 (aa 202-244) (**Figura 2A**), posee una estructura flexible, intrínsecamente desordenada (Lieberman & Ma, 2021), que conecta la región N-terminal con la C-terminal y donde la calpaína II corta la cadena polipeptídica (Aroca-Aguilar et al., 2005; Sánchez-Sánchez et al., 2007).

El dominio C-terminal es codificado por el exón 3 (**Figura 2A**). Presenta una estructura terciaria compleja con abundantes hojas β plegadas y un puente disulfuro que conecta los residuos de cisteína 245 y 433 (Nagy et al., 2003) (Lieberman & Ma, 2021) (**Figura 2C**). Además, tiene un 40% de identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína olfactomedina (Ortego et al., 1997a), una proteína cuya función no es bien conocida, identificada originalmente como un componente principal de la capa mucosa que rodea las dendritas quimiosensoriales de las neuronas olfativas en las ranas (Snyder et al., 1991; Yokoe & Anholt, 1993).

El péptido señal es necesario para la secreción de la proteína (Shepard et al., 2003) y su eliminación en el retículo endoplásmico produce una molécula extracelular con un peso molecular teórico de 53 kDa, aunque el análisis electroforético de la proteína muestra dos bandas entorno a los 55 kDa debidas a diferentes estados de glicosilación (Caballero & Borrás, 2001; Caballero et al., 2000; Clark, Steely, et al., 2001; Shepard et al., 2003). Se ha identificado una secuencia consenso de N-glicosilación en los aminoácidos 57-59 (Asn-Glu-Ser) (Nguyen et al., 1998). Otros estudios predijeron también varios sitios de O-glicosilación, sitios de fosforilación y un sitio de unión de ácido hialurónico (Adam et al., 1997b; Fingert et al., 1998; Nguyen et al., 1998; Polansky et al., 1997), sin evidencia experimental que respalde un papel funcional de estos

sitios. Investigaciones recientes han propuesto que miocilina forma una estructura cuaternaria consistente en un dímero de dímeros en forma de Y (**Figura 2C**) (Lieberman & Ma, 2021).

2.2.2 Localización en tejidos oculares

Los análisis de inmunodetección mediante transferencia Western para detectar la presencia de miocilina en tejidos oculares han mostrado resultados similares a los obtenidos mediante el análisis de la expresión de ARNm mediante transferencia Northern.

En la parte anterior del ojo, se ha detectado miocilina en el iris, concretamente en las células del músculo liso, así como las células del estroma y en las endoteliales vasculares de los vasos del iris. También se ha descrito la presencia intracelular de miocilina en las células del músculo ciliar y del epitelio ciliar no pigmentado (Karali et al., 2000) y se ha demostrado la colocalización de miocilina con colágeno de tipo IV en la lámina basal del epitelio ciliar (Lindsey et al., 2001).

La proteína ha sido identificada en las células endoteliales de la malla trabecular que cubren las laminillas uveales y corneoesclerales, así como en la matriz extracelular del trabéculo cribiforme o yuxtacanalicular (Karali et al., 2000). Mediante ensayos inmunohistoquímicos de doble tinción, la proteína detectada en el trabéculo cribiforme mostró colocalización con fibronectina, fibrilina, glicoproteínas asociadas a microfibrillas, colágeno tipo VI y decorina (Tawara et al., 2000; Ueda et al., 2000).

Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha detectado miocilina en células del epitelio corneal, en queratocitos, en citoplasma de células endoteliales corneales así como en células epiteliales del cristalino (Karali et al., 2000).

La proteína miocilina se ha identificado como un componente sustancial del humor acuoso humano y bovino (Aroca-Aguilar et al., 2005; Fautsch & Johnson, 2001; Jacobson et al., 2001; Rao et al., 2000; Russell et al., 2001). Mediante técnicas de cromatografía de filtración en gel, se ha demostrado que la proteína no está presente de forma monomérica en humor acuoso, sino que se encuentra formando diferentes complejos cuyo peso molecular puede variar entre 120-180 KDa (Fautsch & Johnson, 2001) o bien son mayores de 250 KDa (Russell et al., 2001), según los autores.

En la parte posterior del ojo, se ha detectado la proteína en humor vitreo mediante ensayos de inmunohistoquímica. También se ha demostrado la presencia de la proteína en todas las capas retinianas, tales como la capa de fibras nerviosas, la capa nuclear externa e interna y la región de los segmentos externos de los fotorreceptores (Karali et al., 2000). Asimismo, se han obtenido señales positivas en los axones de células ganglionares del nervio óptico y en la lámina cribosa humana y de mamíferos no humanos (Clark, Kawase, et al., 2001; Karali et al., 2000; Noda et al., 2000; Ricard et al., 2001).

2.2.3 Localización en tejidos no oculares

Hasta la fecha, no se dispone de mucha información acerca de la localización celular y tisular de la proteína en órganos extraoculares donde se ha descrito la expresión del gen *MYOC*. Debido a la asociación del gen con glaucoma, numerosas investigaciones se han centrado en caracterizar la expresión de la proteína en estructuras oculares. No obstante, diversos estudios han confirmado que también se expresa en varios tejidos fuera del ojo, tales como músculo esquelético y corazón (Fingert et al., 1998; Nguyen et al., 1998; Ortego & Coca-Prados, 1997). Se ha detectado su expresión en glándula mamaria, intestino delgado, timo, próstata, testículos, colon, estomago, tiroides, tráquea, médula ósea y cerebro de tejidos humanos, rata y ratón (Abderrahim et al., 1998; Adam et al., 1997b; Ahmed et al., 2001; Fingert et al., 1998; Swiderski et al., 1999; Taguchi et al., 2000; Tomarev et al., 1998). También se ha detectado miocilina en las células de Schwann y en la vaina de mielina de los nervios periféricos (Ohlmann et al., 2003; Tamm, 2002), podocitos renales y las células mesangiales (Goldwich et al., 2005) y discos intervertebrales (Gruber et al., 2006). Estudios recientes en nuestro laboratorio han demostrado por transferencia Western la presencia de la proteína en plasma sanguíneo, hígado y órganos linfoides como timo y ganglio linfático (Aroca-Aguilar et al., 2018).

2.2.4 Localización subcelular

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína miocilina contiene un péptido señal en el dominio N-terminal, indicativo de que es secretada por la célula. Este tipo de proteínas generalmente se sintetizan, pliegan y procesan a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi antes de la exposición al medio extracelular (Hebert & Molinari, 2007; Mellman & Warren, 2000; Nickel, 2003; Ponnambalam & Baldwin, 2003). Por lo tanto, no es llamativo que se haya encontrado miocilina en una variedad de orgánulos asociados con la vía secretora. Diversos estudios inmunohistoquímicos llevados a cabo en células trabeculares humanas han localizado miocilina en vesículas intracelulares perinucleares (Clark, Kawase, et al., 2001; Lütjen-Drecoll et

al., 1998; Merts et al., 1999; O'Brien et al., 2000; Polansky et al., 2000; Stamer et al., 1998). Se ha observado también un patrón similar en células en cultivo de lámina cribosa y astrocitos (Clark, Steely, et al., 2001). Se ha detectado colocalización en la tinción vesicular de miocilina de células trabeculares con quinesina, una proteína motora de microtúbulos implicada en el transporte vesicular (Clark, Kawase, et al., 2001).

Estudios posteriores mostraron que miocilina tiene localización mitocondrial (Sakai et al., 2007; Ueda et al., 2000; Wentz-Hunter et al., 2003; Wentz-Hunter et al., 2002), asociada con las membranas internas y externas y el espacio intermembrana (Sakai et al., 2007). Algunos estudios han localizado la presencia de miocilina en microtúbulos (Merts et al., 1999). No obstante, investigaciones posteriores no han podido confirmar este hallazgo (Clark, Kawase, et al., 2001; O'Brien et al., 2000; Ueda et al., 2000).

Miocilina también se asocia con vesículas similares a exosomas (Hardy et al., 2005; Stamer et al., 2006), pequeñas microvesículas que se liberan al compartimento extracelular (Keller et al., 2006). Esto sugiere que, además de la vía secretora tradicional, miocilina también puede utilizar un mecanismo alternativo para ser liberada de la célula.

La diversidad de anticuerpos disponibles policlonales y monoclonales que reconocen diversos epítopos de miocilina podrían explicar las aparentes contradicciones de los resultados descritos debido a la posible reacción cruzada con otras proteínas.

2.2.5 Procesamiento proteolítico

Estudios previos, entre ellos los realizados en nuestro grupo de investigación, han sugerido que la proteína sufre una escisión proteolítica realizada por calpaína II (Sánchez-Sánchez et al., 2007) entre los aminoácidos Glu²¹⁴-Leu²¹⁵ (Aroca-Aguilar et al., 2008; Goldwich et al., 2003) o entre Arg²²⁶-Ile²²⁷ (Aroca-Aguilar et al., 2005). Se originarían así dos fragmentos de diferente tamaño, uno de 20 KDa que contiene el motivo de cremallera de leucinas localizado en la mitad del dominio N-terminal y otro de 35 KDa que contiene el dominio olfactomedina situado en la mitad del dominio C-terminal (**Figura 3**) (Aroca-Aguilar et al., 2005). El fragmento de 35 KDa es secretado con la proteína completa. Los fragmentos N-terminales pueden degradarse intracelularmente durante el procesamiento proteolítico o pueden interactuar con otras proteínas intracelulares (Sánchez-Sánchez et al., 2007). Se han detectado fragmentos de miocilina de la región C-terminal

en malla trabecular y humor acuoso, indicando que el procesamiento endoproteolítico de la proteína es un proceso fisiológico que también ocurre *in vivo* (Aroca-Aguilar et al., 2005).

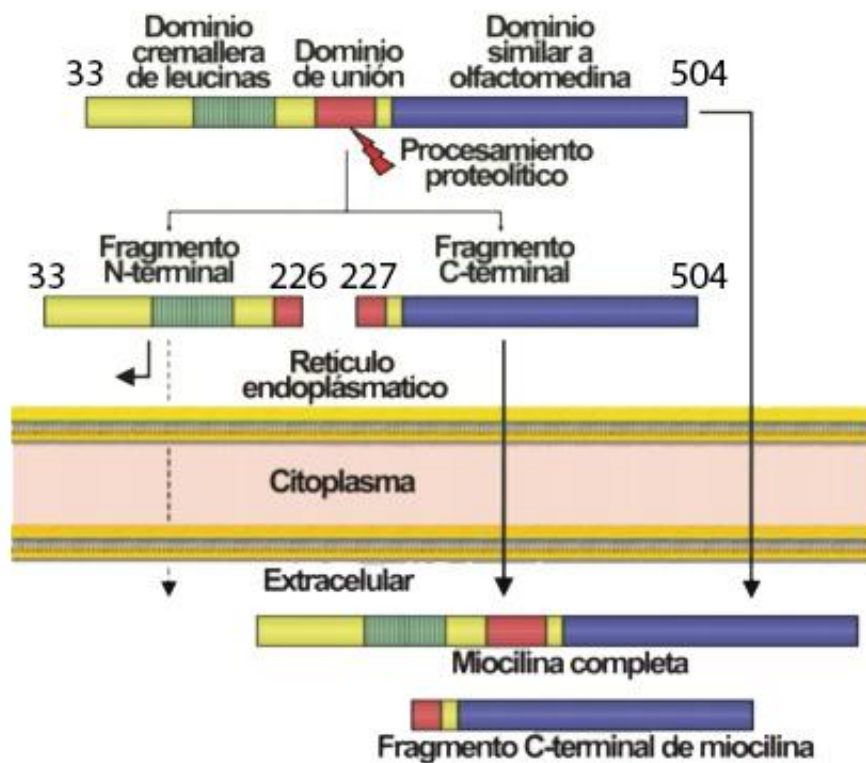


Figura 3. Esquema del procesamiento proteolítico intracelular de miocilina. El fragmento N-terminal sería retenido mayoritariamente en el espacio intracelular, mientras que el C-terminal sería secretado al medio extracelular junto con la forma completa de la proteína. En el medio extracelular pueden estar presentes tanto la proteína completa como el fragmento C-terminal de miocilina (Aguilar, 2009).

2.2.6 Función biológica

A pesar de haber sido estudiada durante décadas, actualmente no se conoce con exactitud la función normal de miocilina, aunque numerosos estudios indican que es una proteína matricelular con efectos en la adhesión celular. Las proteínas matricelulares son una familia de proteínas no estructurales asociadas a la matriz extracelular que regulan diversos procesos biológicos en situaciones normales y patológicas (Bornstein, 1995; Bornstein & Sage, 2002).

En este sentido, se ha comprobado que la sobreexpresión de miocilina en las células de la malla trabecular reduce la adhesión celular, dando como resultado una mayor activación de cAMP / PKA e inhibición de la proteína Rho quinasa (Shen et al., 2008a). La pérdida de fibras de estrés de actina y adherencias focales parecen comprometer la unión celular a la matriz extracelular. Por otra parte, la adición de miocilina exógena a una matriz de fibronectina provoca una menor

adhesión de fibroblastos humanos, sugiriendo que miocilina interfiere con la comunicación entre la célula y la matriz extracelular (Peters et al., 2005).

Como se ha mencionado anteriormente, otros estudios sugieren que miocilina puede influir en la función de las mitocondrias. La sobreexpresión de miocilina en las células de la malla trabecular reduce la respiración mitocondrial, sensibilizando potencialmente a las células y desencadenando eventos apoptóticos (Sakai et al., 2007).

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia de miocilina en plasma y tejidos linfoides y leucocitos, indicando un posible papel de la proteína en la adhesión de leucocitos y proporcionando nueva información sobre su posible función como proteína matricelular sanguínea. (Aroca-Aguilar et al., 2018).

Recientemente, se ha demostrado que miocilina interactúa con dominios ricos en cisteína de varios receptores *frizzled* (familia de proteínas de receptores acoplados a proteínas G) y proteínas secretadas relacionadas con *frizzled*, así como WIF-1, un factor inhibidor de Wnt (Kwon, Lee, Ji, Rubin, & Tomarev, 2009), lo que indica que podría jugar un papel en la vía de señalización de la vía Wnt. Las vías de señalización de Wnt son un grupo de vías de transducción de señales formadas por proteínas que transfieren las señales del exterior de una célula a través de sus receptores de superficie hasta su interior. Éstas regulan procesos de proliferación, supervivencia, polaridad, migración y diferenciación, así como el mantenimiento de las células madre de diversos linajes durante el desarrollo embrionario y la homeostasis de los tejidos (Komiya & Habas, 2008).

Miocilina puede modificar la organización del citoesqueleto de actina, estimulando la formación de fibras de estrés, lo que puede ser esencial para la contractilidad de la red trabecular y la regulación de la presión intraocular (Kwon, Lee, Ji, Rubin, & Tomarev, 2009). Se ha sugerido que miocilina puede servir como modulador de la señalización de Wnt y que otros miembros de la familia o proteínas Wnt pueden compensar la ausencia de miocilina al realizar sus funciones (Kwon, Lee, Ji, Rubin, & Tomarev, 2009).

2.2.7 Patogenicidad de las formas mutantes de miocilina

La mayoría de los trabajos realizados en este campo indican que las mutaciones en miocilina causan una ganancia de función tóxica para la proteína (Kim et al., 2001; Lam et al., 2000). Estudios recientes han sugerido una base molecular para este mecanismo, de manera que las mutaciones en el dominio olfactomedina promueven la agregación tóxica de miocilina en

agregados amiloides (Donegan et al., 2012; Hill et al., 2014). Se sabe que esta estructura no nativa es casi imposible de disgregar, lo que probablemente explique por qué, a diferencia de otras proteínas, la miocilina mutante no puede ser procesada de manera eficiente por la maquinaria de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) conduciendo a la activación de las vías de estrés del retículo y a la muerte de las células de la malla trabecular.

2.2.8 Estudio de la función de miocilina en modelos animales

Otro enfoque para mejorar la comprensión de la función de las proteínas es el uso de modelos animales. Éstos son una herramienta fundamental para el estudio de procesos biológicos básicos, la patogénesis de enfermedades y el estudio de nuevas terapias.

La ausencia de expresión de los productos génicos silvestres constituyen una poderosa herramienta para identificar las vías biológicas en las que están implicados los genes correspondientes (Prelich, 2012). Algunos estudios anteriores han generado modelos *knock-out* de ratón para intentar comprender mejor la función normal de *myoc* (Kim et al., 2001). También se ha utilizado el sistema CRISPR/Cas9 para alterar tanto el gen como su función en células de malla trabecular humanas y de ratón en un modelo de ratón de GPAA (Jain et al., 2017).

La sobreexpresión de genes en modelos animales también constituye un buen enfoque para investigar la función de los mismos. Se han generado varias líneas transgénicas de *myoc* en ratón. Una de ellas, expresa 1,8 kB del ADNc humano de *MYOC* bajo el control de un promotor específico del cristalino (β -cristalina 1) (Koch et al., 2014; Zillig et al., 2005). Otra, expresa altos niveles de miocilina en tejidos oculares, similar a los inducidos por el uso de corticosteroides (Gould et al., 2004). Si bien los ratones y las ratas han sido el pilar de la investigación durante muchos años, actualmente se están empleando otros tipos de modelos animales como el pez cebra, cuya utilidad será analizada en profundidad a continuación.

2.3 El pez cebra como modelo animal

2.3.1 Características generales del pez cebra

El pez cebra (*Danio rerio*) es un teleosteo tropical de agua dulce originario del sudeste asiático y perteneciente a la familia *Cyprinidae*. Generalmente, en su hábitat natural se encuentra cerca del fondo de aguas poco profundas para minimizar el ataque de los depredadores. Las características morfológicas del pez cebra se muestran en la **Figura 4**.

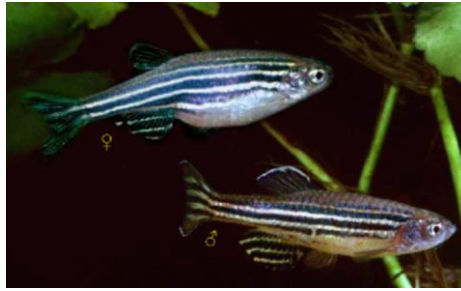


Figura 4. Imagen del pez cebra. En la parte superior se observa a la hembra, caracterizada por ser más robusta, con el vientre más abultado y líneas laterales de color plateado. En la parte inferior se observa al macho, con una forma más alargada y alternando las bandas azules con doradas. Imagen de (Baumann, 2008).

La idea de establecer el pez cebra como modelo animal para estudiar la genética del desarrollo embrionario surgió de George Streisinger (Grunwald & Eisen, 2002), que comenzó a trabajar con el pez a finales de la década de 1960. El objetivo de este investigador era aplicar los análisis mutacionales que ya se conocían en procariotas e invertebrados en un organismo vertebrado. El uso de ratones transgénicos ha demostrado ser sumamente valioso para describir la función de genes críticos para la formación de estructuras oculares. No obstante, su uso es limitado cuando se trata del estudio de enfermedades que conllevan complejas interacciones genéticas (Kur et al., 2011). En los últimos 20 años, el pez cebra se ha convertido en un modelo atractivo para estudios genéticos, así como para el estudio de los fenotipos asociados al glaucoma (Bibliowicz et al., 2011).

Existen diversas razones que explican su popularidad en investigación. En primer lugar, es un animal altamente prolífico y una pareja de peces adultos es capaz de producir cientos de huevos fecundados con una periodicidad semanal, siendo posible mantener un número considerable de peces en el laboratorio. Las condiciones de mantenimiento son relativamente sencillas, tolerando un amplio rango de temperatura de agua, condiciones de salinidad y pH. Por otro lado, presenta un rápido desarrollo y suele alcanzar la madurez sexual a partir de los tres meses de edad (**Figura 5**), por lo que se pueden establecer líneas mutantes más rápidamente que con otras especies animales. La fertilización es externa, de tal forma que los huevos depositados por la hembra son fecundados *a posteriori* por el macho. Tanto el huevo como el embrión son transparentes, facilitando la visualización de la organogénesis mediante técnicas de microscopía. El desarrollo embrionario en el pez cebra es rápido y la mayoría de los órganos, como el cerebro, el corazón, el hígado, el intestino y el ojo se desarrollan en 24 h produciendo órganos funcionales dentro de

la primera semana (Chhetri et al., 2014). Entre los 2 y 3 días post-fecundación (dpf), el embrión eclosiona del huevo y a los 5 días las larvas comienzan a buscar alimento, demostrando que su sistema visual es ya funcional (**Figura 5**).

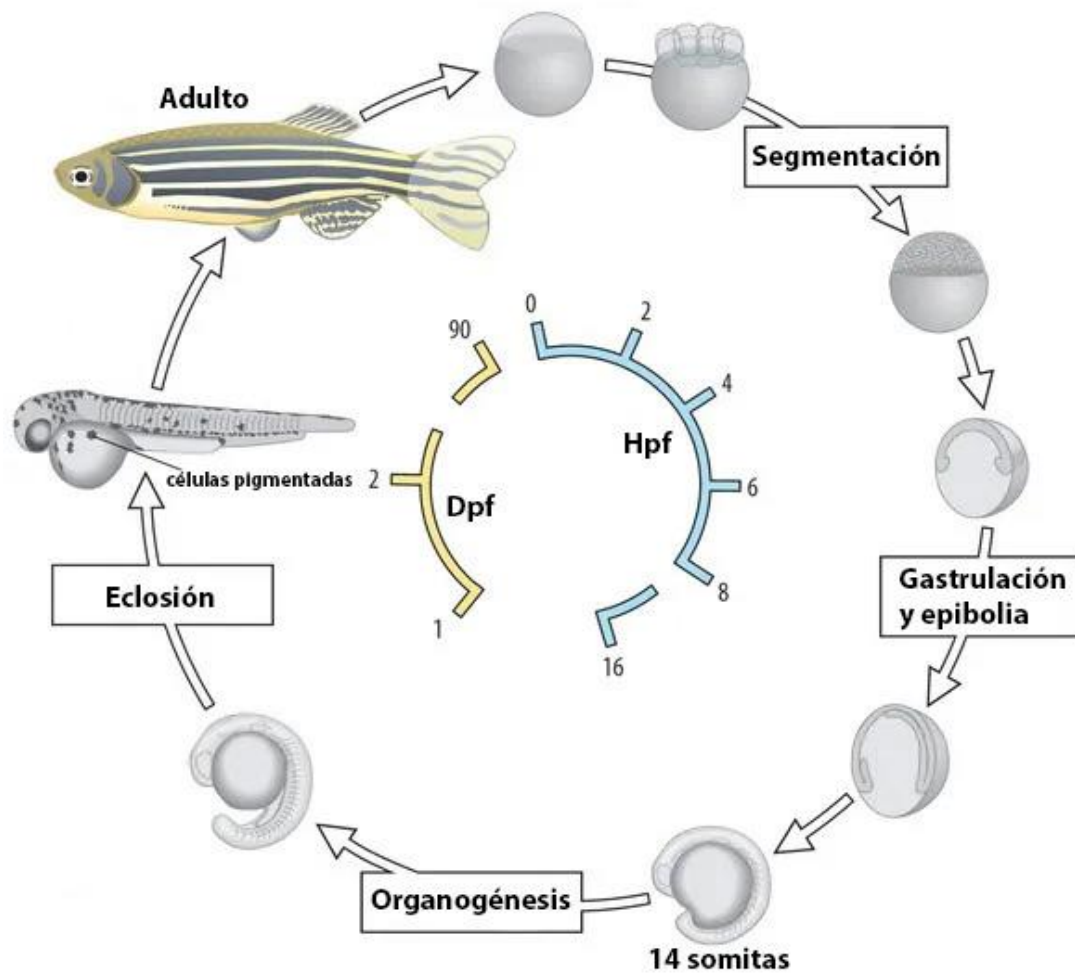


Figura 5. Desarrollo embrionario del pez cebra. A las 0,25 hpf se observa el embrión en estado de una sola célula adherida al vitelo. A las 2 hpf el embrión posee 64 células que continuarán dividiéndose hasta formar la blástula. Las células comienzan a migrar del polo animal hacia el polo ventral formando la gástrula (6 hpf). A las 16 hpf se forman las somitas (14 somitas) y a las 24 hpf, el corazón ya comienza a latir. El estado larvario comienza a las 72 hpf. Durante este periodo, el pez comienza a nadar y a alimentarse hasta que alcanza la madurez sexual a los 3 meses (Kimmel et al., 1995). Figura adaptada de (Ramcharran, 2016). Hpf: horas post-fecundación; dpf: días post-fecundación.

El desarrollo externo de los embriones de pez cebra ofrece la oportunidad de diversas manipulaciones desde el momento de la fecundación, contando con una serie de técnicas de modificación genética desarrolladas específicamente para el mismo.

Una de las ventajas más importantes del pez como modelo de estudio en nuestro campo es la similitud tanto en morfología, fisiología, expresión génica y función al ojo humano (Bibliowicz et al., 2011). Esta semejanza se mantiene desde el desarrollo embrionario hasta la etapa adulta, hecho que sugiere que los genes que regulan el desarrollo y la homeostasis ocular se encuentran muy conservados.

La ultraestructura del ojo del pez cebra es similar a los seres humanos, pero presenta algunas diferencias importantes. La lente en los ojos de pez cebra es esferoide, mientras que en el ojo humano es elipsoide. Por otro lado, el ojo humano tiene un área especializada dentro de la retina responsable de la visión de gran agudeza, como es el caso de la mácula, ausente en el ojo del pez cebra (**Figura 6A**). En el pez no existen los músculos del iris ni los procesos ciliares. Además, la vía del flujo de humor acuoso en el pez cebra es vectorial, se produce mayoritariamente en la parte dorsal del ángulo, concretamente en el epitelio ciliar, y la vía de drenaje está en la parte ventral del ángulo (Chhetri et al., 2014; Gray et al., 2009; Soules & Link, 2005). Otra de las diferencias existentes en relación con el ángulo iridocorneal, es la presencia del ligamento anular. Éste es un tejido con forma de anillo situado entre la córnea y el iris, ocupa gran parte del ángulo iridocorneal y recorre circunferencialmente toda la cámara anterior. La arquitectura de la retina del pez cebra es bastante similar a la retina humana (**Figura 6B**). Posee cuatro subtipos de fotorreceptores dispuestos en un patrón de mosaico organizado y, debido a la naturaleza diurna del pez cebra, es rico en conos similar a la mácula humana, lo que da como resultado una visión en color con una densidad de conos cercana a los humanos. Según los cuatro tipos de conos del pez cebra, su visión es tetracromática. Por el contrario, el ojo humano carece de conos sensibles a los rayos UV y, por lo tanto, solo tiene visión tricromática (Fleisch & Neuhaus, 2006).

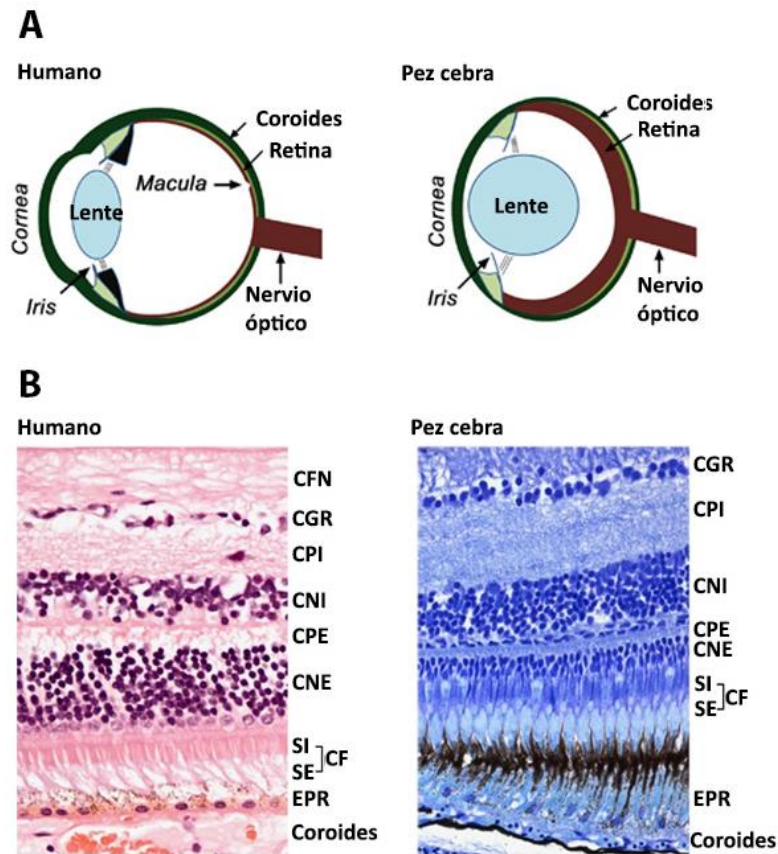


Figura 6. Comparación morfológica del ojo humano y el pez cebra. (A) Se muestra un esquema de los ojos de ambas especies, dónde se observa que éstos difieren principalmente en la forma de la lente y en el espacio entre el cristalino y la retina (Chhetri et al., 2014). (B) En la parte inferior se muestra la similitud en cortes histológicos entre la retina humana y de pez cebra (Richardson et al., 2017). EPR: epitelio pigmentario de la retina; CF: capa fotorreceptora; CFN: capa de fibras nerviosa; CGR: capa ganglionar de la retina; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; SE: segmentos externos; SI: segmentos internos.

2.3.2 El pez cebra como modelo genético de patologías humanas

El uso del modelo de pez cebra en investigación se origina, no solo por las similitudes anatómicas de las estructuras oculares, sino por la facilidad que presenta para la manipulación genética y experimental. Inicialmente, los ensayos genéticos a gran escala comenzaron en la década de los 90 exponiendo a los peces al agente mutagénico etilnitrosourea (ENU) y facilitaron el aislamiento de más de 2000 mutaciones que afectan a los primeros 5 días del desarrollo del pez cebra (Grunwald & Streisinger, 1992). En el espectro de fenotipos mutantes obtenidos se incluyeron múltiples defectos oculares (Malicki et al., 1996). También se han utilizado otras técnicas como la mutagénesis insercional al azar mediante retrovirus (Amsterdam et al., 2011). La utilidad del pez cebra se incrementó aún más tras la finalización del proyecto de secuenciación de su genoma

(Howe et al., 2013b). Éste incluye ortólogos (71%) para la mayoría de los genes humanos y un alto grado de conservación de las propiedades funcionales de muchas de las proteínas codificadas. Con frecuencia, el pez cebra tiene dos genes ortólogos para los genes humanos que se mapean en segmentos cromosómicos duplicados como consecuencia de una duplicación genómica ancestral ocurrida en la radiación de los teleósteos. Por lo general, el destino del gen duplicado es la pérdida de función, no obstante, pueden conservarse varias copias funcionales. El pez cebra tiene un número cromosómico similar al humano (25 y 23 pares, respectivamente). Estos factores, además de la versatilidad de la manipulación genética del pez cebra, lo convierten en un organismo modelo destacado para los análisis mutacionales sistemáticos en el estudio de las enfermedades humanas.

Estas características han posibilitado el desarrollo de numerosas técnicas de manipulación genética del pez cebra. Entre ellas se encuentra la inhibición específica de la expresión génica mediante el uso de oligonucleótidos antisentido morfolino-modificados (morfolinos). Los morfolinos son oligonucleótidos con una longitud aproximada de 25 bases nitrogenadas, unidas a anillos de morfolina (en lugar de ribosa o desoxirribosa) y a grupos de fosfordiamidato sin carga (en lugar de los grupos fosfodiéster) (Summerton, Stein, et al., 1997). Éstos son resistentes a las nucleasas y pueden unirse con gran afinidad y especificidad a los ARNm complementarios impidiendo transitoriamente su traducción. Los morfolinos fueron desarrollados por primera vez por el Dr. James Summerton en 1997 (Summerton, Weller, et al., 1997) como una manera de inhibir transitoriamente la traducción de los transcritos de ARN *in vivo*. Esto permitió observar por primera vez el efecto del bloqueo de la expresión de un gen determinado en embriones en edades tempranas de desarrollo (Nasevicius & Ekker, 2000). Sin embargo, esta técnica presenta ciertas limitaciones, como su restricción al estudio de procesos que únicamente se centran en las primeras etapas del desarrollo embrionario.

Desde hace algunos años, se han desarrollado diferentes técnicas para generar peces mutantes basadas en el uso de nucleasas y en la introducción de cortes en el ADN de modo *locus*-específico (**Figura 7**). Inicialmente, se utilizaron metodologías como el TILLING (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) (Wienholds et al., 2003), con la que se pueden crear peces con mutaciones genéticas heredables pero aleatorias. Posteriormente se utilizaron nucleasas específicas de secuencias, en las que se emplean enzimas que incluyen dominios estructurales de interacción con secuencias específicas del ADN genómico, capaces de producir cortes dirigidos. Ejemplos de esto son el sistema ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*) (Doyon et al., 2008; Meng et al., 2008) o TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*, o nucleasas similares a activadores de la

transcripción) (Huang et al., 2011; Sander et al., 2011). Tanto las ZFNs como las TALENs cuentan con un dominio endonucleasa común derivado de la enzima de restricción *FokI*, pero difieren en el dominio de unión al ADN que presentan. Las ZFNs emplean dedos de zinc, mientras que las TALENs utilizan TALEs (*Transcription Activator-Like Effector*) o efectores tipo TAL. Actualmente, la técnica más extendida en el pez cebra para alterar la función de genes es el sistema CRISPR/Cas9 que, a diferencia de las ZFNs y las TALENs que requieren proteínas más complejas para modificar el sitio diana del ADN, solo requiere la síntesis de una guía de ARN específica.

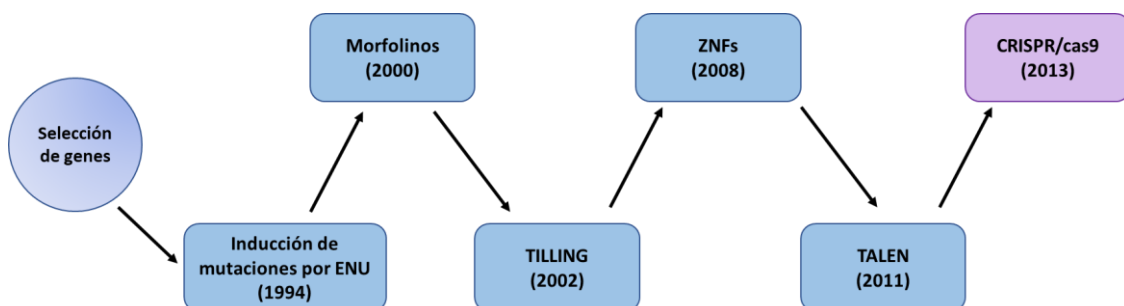


Figura 7. Esquema de la evolución cronológica de las técnicas de manipulación genética utilizadas en el pez cebra.

2.3.3 Uso del sistema CRISPR/Cas9 para la edición genómica en pez cebra

Una de las estrategias clásicas para estudiar la función de un gen es inactivarlo y analizar las consecuencias fenotípicas. La tecnología CRISPR, basada en una endonucleasa específica cuya actividad es dirigida por una molécula de ARN pequeña, ha sido la última en incorporarse a las herramientas de edición genómica y ha supuesto una revolución debido a su flexibilidad y fácil diseño. Los sistemas CRISPR/Cas9 (*C*lustered *R*egularly *I*nterspaced *S*hort *P*alindromic *R*epeats) derivan del sistema propio inmune adaptativo de arqueas y bacterias, cuyos genomas tienen una serie de repeticiones palindrómicas cortas (23-50 pb), agrupadas y regularmente interespaciadas por secuencias de origen viral o plasmídico (17-84 pb) (secuencias espaciadoras), adquiridas durante infecciones pasadas. En la mayoría de los casos, el *locus* CRISPR está situado en el cromosoma principal, pero también puede localizarse en plásmidos o megaplásmidos (Plagens et al., 2015). Próximo al *locus* CRISPR aparecen un grupo de genes conocidos como genes cas, que codifican las proteínas Cas (*C*RISPR *a*ssociated), y juntos actúan como maquinaria de defensa frente a bacteriófagos y plásmidos (Marraffini & Sontheimer, 2010). A partir del *locus* CRISPR se generan transcritos primarios de cadena larga, posteriormente procesados en un conjunto de

ARN cortos, llamados ARN CRISPR (ARNcr), que presentan una repetición conservada y una secuencia espaciadora variable complementaria al ácido nucleico invasor. Esta serie de secuencias palindrómicas se detectaron por primera vez en *Escherichia coli* en 1987 (Ishino et al., 1987), pero su naturaleza no fue descifrada hasta poco más de una década después (Jansen et al., 2002; Mojica et al., 2005; Mojica et al., 2000). Se han definido tres tipos de sistemas CRISPR/Cas9 (Haft et al., 2005; Makarova et al., 2011). El primer sistema en ser adaptado a células eucariotas y también, el más extendido, es el sistema tipo II CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (Cong et al., 2013).

Uno de los componentes del sistema CRISPR es la Cas9, una endonucleasa de ADN guiada por ARN que pertenece a la familia de proteínas Cas (Hwang et al., 2013). Cas9 forma un complejo con dos moléculas pequeñas de ARN, el ARN CRISPR transactivador (ARNtracr) y ARNcr, que juntas forman el ARN guía (ARNg, *RNA guide*). Este guía a la endonucleasa Cas9 para escindir el ADN diana. Próximo al protoespaciador, se encuentra el "motivo adyacente protoespaciador" (PAM, *Protospacer adjacent motif*), secuencia corta de ADN aguas arriba del sitio de unión del ARNcr. Tras el emparejamiento de bases entre el dominio "espaciador" de 20 nucleótidos del complejo ARNcr:ARNtracr y la hebra de ADN diana, Cas9 crea un corte en la molécula de ADN de doble cadena. La ruptura representa una lesión del ADN que activa la reparación endógena y que puede ocurrir a través de dos mecanismos distintos: unión de extremos no homólogos (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*) y reparación dirigida por homología (HDR, *Homology Directed Repair*) (Schmid & Haass, 2013) (**Figura 8**). La unión de extremos no homólogos da como resultado pequeñas mutaciones tales como inserciones o deleciones, que pueden originar un cambio en la pauta de lectura, con la aparición generalmente de codones prematuros de terminación en la nueva pauta de lectura que originaría la degradación del ARNm mutante mediante el mecanismo NMD (*Non-sense Mediated Decay*) o una proteína trunca no funcional (Jinek et al., 2012; Kirchner & Schneider, 2015) (Wang et al., 2016). En cualquier caso, el resultado sería la pérdida de función del gen, como punto de partida para obtener un animal *knock-out*. Es la vía de reparación de ADN predominante (Chang et al., 2017; Her & Bunting, 2018) y se da en todas las fases del ciclo celular. Por otro lado, la reparación HDR permite el intercambio de ADN entre secuencias idénticas o similares. A diferencia de la NHEJ, este mecanismo de reparación se restringe a las fases S y G2 del ciclo celular (Mao et al., 2008; Rothkamm et al., 2003; Takata et al., 1998) dado que, para la reparación, requiere la actuación de la cromátida hermana de aquella en la que se ha producido el daño como molde (Branzei & Foiani, 2008). Este mecanismo es capaz de resultar en cualquier tipo de mutación deseada mediante la sustitución de la secuencia diana por un molde de reparación sintetizado con las modificaciones pertinentes (Cong & Zhang, 2015).

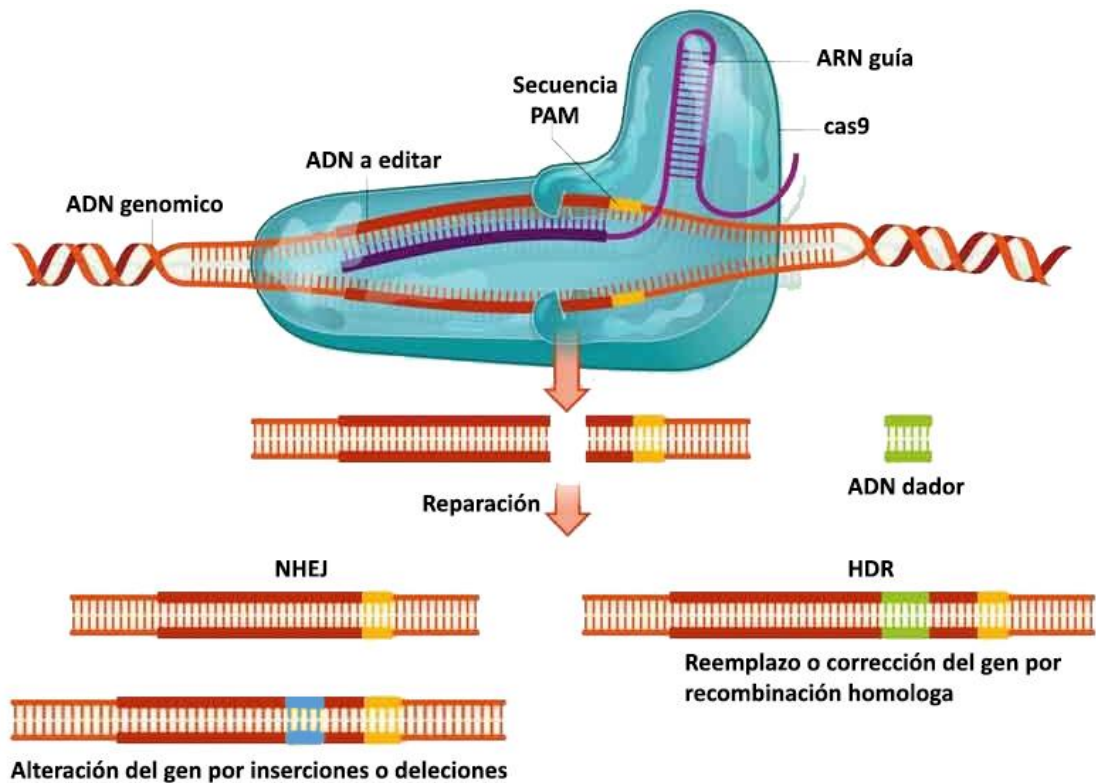


Figura 8. Esquema del proceso de modificación genómica mediante el sistema CRISPR/Cas9. La proteína Cas9, unida al ARNg, corta la cadena de ADN. Se muestran las dos vías de reparación. La vía NHEJ genera mutaciones como deleciones o inserciones, mientras que con la vía HDR la rotura se reparará utilizando el ADN de la cromátida hermana como molde o de un ADN externo para crear inserciones precisas o sustituciones. Figura adaptada de (Tu et al., 2015).

La técnica CRISPR / Cas9 se ha utilizado de manera eficiente para lograr la eliminación de genes diana en el pez cebra con tasas de mutagénesis altas (75-99%) (Jao et al., 2013). Los primeros en demostrar que el sistema CRISPR/Cas9 podía adaptarse al modelo del pez cebra para producir mutaciones de inserción/delección en sitios específicos fueron Hwang y colaboradores con frecuencias de mutación entre el 24% y el 59% en 8 de los 10 genes probados (Hwang et al., 2013).

2.3.4 Generación de peces *knock-out* por CRISPR/Cas9

CRISPR / Cas9 se ha convertido en una de las técnicas más extendidas en pez cebra para la generación de líneas *knock-out*. Existen dos estrategias posibles para la generación de peces cebra homocigotos mutantes, pudiendo generarse un *knock-out* transitorio o estable. Para esta segunda opción, después de la microinyección las larvas de la generación F0 (mosaicos genéticos) se dejan crecer hasta la madurez sexual y se cruzan para generar heterocigotos de la generación F1 portadores de mutaciones, que posteriormente se cruzan para obtener mutantes homocigotos en la generación F2. Un primer *knock-out* estable isogénico puede obtenerse en

unos 6 meses y permite obtener cientos de larvas F2 (homocigotas, heterocigotas y silvestres), que pueden utilizarse para probar una hipótesis de investigación.

Un aspecto importante a tener en cuenta del sistema CRISPR/Cas9 son las mutaciones no deseadas en lugares del genoma fuera del sitio objetivo (*off-targets*) (Hsu et al., 2013). Estos *off-targets* pueden alterar la función o la regulación de genes no objetivo, por lo que, para eliminarlos, se realizan un mínimo de 2 cruces con peces silvestre y así generar las líneas mutantes.

2.3.5 Transgénesis mediada por transposones

Otra de las técnicas de análisis genético es la transgénesis, utilizada en una gran variedad de aplicaciones de investigación que van desde el estudio de la expresión génica hasta la creación de modelos animales de enfermedades humanas. Las herramientas transgénicas han permitido la observación detallada de tipos celulares específicos mediante la expresión de genes marcadores fluorescentes (Wada et al., 2005; Xiao et al., 2005).

La primera línea germinal de pez cebra transgénico fue obtenida hace más de 30 años por Stuart y colaboradores (Stuart et al., 1988). Con esta técnica, la secuencia se inserta en un vector de clonación o expresión mediante el uso de enzimas de restricción, se purifica y luego se microinyecta en el citoplasma de embriones en fase de una célula. Sin embargo, este enfoque requiere mucho tiempo y no es relativamente eficiente. Los vectores retrovirales también han sido utilizados con éxito para la generación de peces transgénicos, especialmente para la mutagénesis por inserción en el genoma (Gaiano et al., 1996; Lin et al., 1994). No obstante, esta técnica presenta como inconveniente que solo pueden producirse inserciones de tamaño pequeño y su aplicación en el laboratorio es muy compleja.

Para mejorar aún más la rapidez y la facilidad de generar peces cebra transgénicos, varios investigadores recurrieron a los elementos transponibles (Davidson et al., 2003; Kawakami et al., 1998). Un transposón es una secuencia de ADN que tiene la propiedad de moverse en diferentes partes del genoma. Actualmente, la transgénesis mediada por el transposón Tol2 es uno de los sistemas más utilizados en la producción de líneas transgénicas estables debido a su alta eficiencia (Hamlet et al., 2006; Kawakami, 2005, 2007). El transposón Tol2 se identificó por primera vez a partir del genoma del pez Medaka (*Orizias latipes*), un pequeño teleosteo de agua dulce

(Kawakami, 2007; Kawakami et al., 2004a). La secuencia de Tol2 es similar a la de los transposones de la familia hAT (hobo/Ac/Tam3) (Koga et al., 1996), superfamilia de transposones de ADN , o elementos transponibles de clase II , que son comunes en los genomas de plantas, animales y hongos (Arensburger et al., 2011; Kempken & Windhofer, 2001). Estudios realizados por Kawakami y colaboradores demostraron que el elemento Tol2 era activo en pez cebra (Kawakami et al., 1998). Con esta técnica, se microinyecta en embriones de pez cebra un plásmido donante junto con el ARNm de la transposasa. A continuación, la transposasa cataliza la escisión de la construcción del transposón del plásmido donante, llevando a la integración estable en el genoma (**Figura 9**). El ARNm inyectado y la proteína transposasa se degradan gradualmente y, una vez finalizada la actividad de la transposasa, las inserciones Tol2 se vuelven estables. Tol2 se integra como una sola copia a través de un mecanismo de “cortar y pegar”, sin causar ningún reordenamiento o modificación en el sitio de destino. La única excepción es la creación de una duplicación de 8 pares de bases siempre adyacentes a los elementos Tol2 integrados (Kawakami et al., 2000). Utilizando una construcción Tol2 co-inyectada junto con el ARNm de la transposasa, las tasas de transmisión del transgén en la línea germinal alcanzan el 50% (Kawakami et al., 2004b). Además, el uso del sistema de transposones Tol2 tiende a evitar los efectos de silenciamiento de genes que pueden producirse con otras técnicas (Kawakami, 2005).

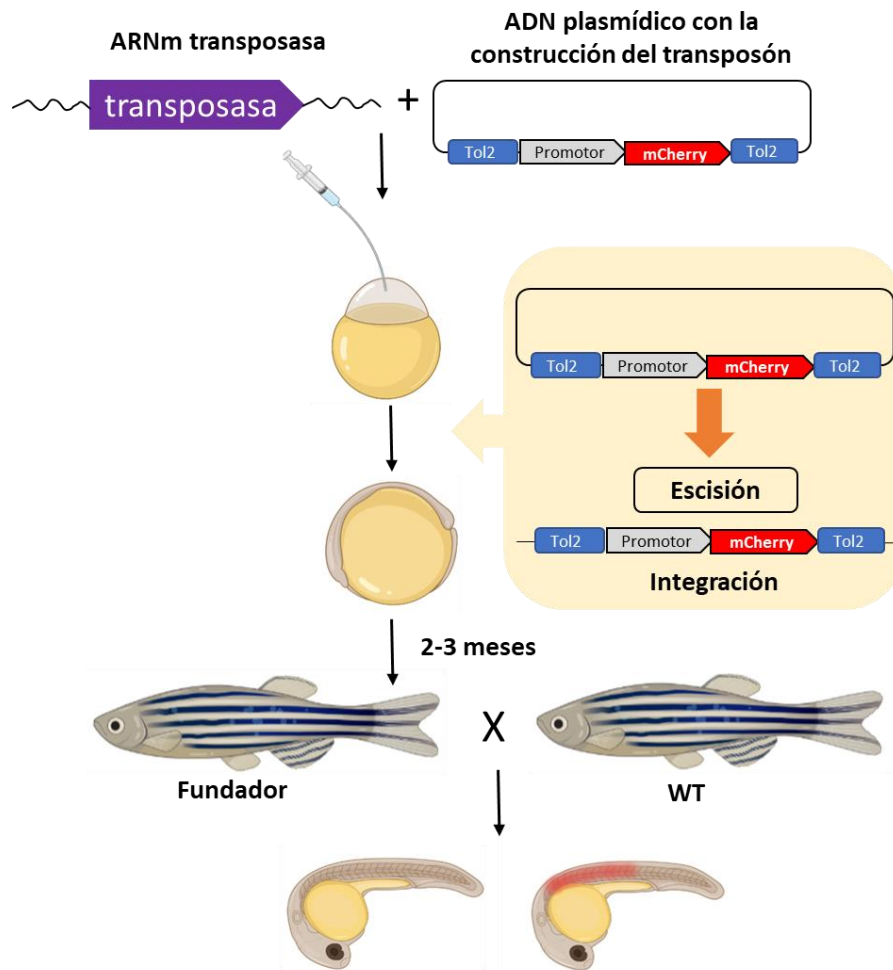


Figura 9. Transgénesis en pez cebra. El ARNm de transposasa y el plásmido donante junto con la construcción Tol2, un promotor y el gen que codifica la proteína fluorescente roja (mCherry) se co-inyectan conjuntamente en embriones pez cebra. En el embrión, la transposasa cataliza primero la escisión del fragmento flanqueado por los sitios Tol2 en la construcción y luego su integración dentro del genoma del pez cebra (Kawakami et al., 1998). Las inserciones de Tol2 creadas en células germinales se transmiten a la generación F1. Las células germinales del pez inyectado son mosaicos y, al cruzar el pez inyectado (fundador) con peces silvestres, se obtienen peces no transgénicos y peces transgénicos heterocigotos para la inserción Tol2. WT: silvestre. Figura adaptada de (Kawakami, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

MYOC fue identificado hace más de 20 años como el primer gen implicado en glaucoma juvenil, un tipo de GPAA de herencia autosómica dominante. A pesar del tiempo transcurrido desde ese momento, todavía no se conoce con exactitud el mecanismo patogénico por el que las mutaciones producen la enfermedad ni la función biológica de la proteína. Por tanto, ambas cuestiones representan problemas científicos de gran interés tanto básico como aplicado.

Si bien los ratones y las ratas han sido el pilar de la investigación durante muchos años, actualmente se están empleando otros tipos de modelos animales. En los últimos años, el pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en un modelo atractivo para estudios genéticos debido a su rápido desarrollo, la facilidad en el manejo y el alto grado de homología entre su genoma y el del humano.

Además, en los últimos años se han ido desarrollando técnicas de edición genómica como el CRISPR/Cas9 o la transgénesis mediada por transposones. Éstas han facilitado la creación de animales *knock-out*, donde se suprime la expresión del gen de interés, o animales transgénicos, donde éste se sobreexpresa. Estas técnicas son ampliamente utilizadas para el análisis fenotípico en el pez cebra (Irion et al., 2014). El gen *myoc* ha sido estudiado en modelos de ratón, generando líneas KO (Jain et al., 2017; Kim et al., 2001) así como líneas transgénicas que sobreexpresan tanto la miocilina silvestre como la mutante (Gould et al., 2004; Koch et al., 2014; Zillig et al., 2005). No obstante, aunque estos modelos han aportado información importante sobre las propiedades estructurales de miocilina, no han proporcionado la pista definitiva para dilucidar su función normal.

Con todo lo mencionado, el interés en realizar la tesis doctoral en este campo es mejorar nuestro conocimiento sobre la función biológica de miocilina utilizando el pez cebra como modelo animal y la edición genómica basada en el empleo del sistema CRISPR/Cas9 y la transgénesis mediada por el transposón Tol2. Esta aproximación permitirá determinar y caracterizar los efectos fenotípicos de la pérdida de función y/o la sobreexpresión de este gen.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En las dos últimas décadas, la investigación sobre la proteína miocilina ha permitido conocer su estructura y su expresión. No obstante, tanto su función normal como su mecanismo patogénico todavía son parcialmente desconocidos. Así pues, la hipótesis de este trabajo de investigación es que el uso del pez cebra como modelo animal, ya sea mediante la supresión o la sobreexpresión del gen *myoc*, permitirán mejorar la comprensión de la función biológica de la proteína miocilina.

Los objetivos principales de este trabajo son:

1. Generar una línea *knock-out* para el gen *myoc* en el pez cebra mediante el sistema CRISPR/Cas9 y estudiar los efectos fenotípicos que produce la pérdida de función del gen.
2. Generar una línea transgénica para el gen *myoc* en el pez cebra mediante transgénesis dirigida por el transposón Tol2 y analizar los efectos fenotípicos que produce la sobreexpresión del gen.
3. Estudiar mediante análisis transcrictpómicos los patrones de genes diferencialmente expresados en las líneas de pez cebra generadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estabulación, mantenimiento y reproducción de las líneas de peces cebra

Los ensayos de este estudio se realizaron con la cepa AB de pez cebrá (*Danio rerio*) obtenida del ZIRC (*Zebrafish International Resource Center*). La estabulación y procedimientos se aprobaron y se llevaron a cabo según la normativa establecida, el proyecto fue supervisado por el Comité de Investigación Animal de la Universidad de Castilla-La Mancha y aprobado por la Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (número de aprobación PR-2015-04-10). Los animales adultos se mantuvieron en cubetas de estabulación (*racks*) en condiciones controladas, a 28 °C con un ciclo de 14 h de luz/10 h de oscuridad y fueron alimentados con una dieta estándar según los protocolos establecidos (Westerfield, 2000). Los embriones de pez cebrá se criaron a 28 °C en medio E3 (5 mM NaCl; 0,17 mM KCl; 0,33 mM CaCl₂; 0,33 mM MgSO₄ y 0,0001 % de azul de metileno, pH 7,2). Los peces adultos y las larvas se anestesiaron con metanosulfonato de triclaína al 0,04% y al 0,02% (MS222, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) respectivamente, y se inmovilizaron en una solución de metilcelulosa al 3% para poder analizarlos y fotografiarlos. Para la realización de los cruces, la tarde de antes los peces se trasladaron a peceras de cruce o parideras mantenidas a 28 °C en un incubador con ciclo de iluminación sincronizado con la de los *racks*. Estas cubetas se caracterizan por permitir la recogida de los huevos al quedar depositados en el fondo separados por una cámara. Se introducían grupos de tres animales (dos machos y una hembra) por paridera. A la mañana siguiente, se sacaban del incubador dado que el estímulo luminoso y el cambio de temperatura inducen la puesta. Tras la recogida de los huevos, éstos se analizaron bajo una lupa binocular para eliminar los no fecundados o los infectados por hongos. Los embriones se separaron en grupos de 50 en placas Petri con medio E3 y se dejaron crecer durante 5 días. Una vez alcanzada esa edad, las larvas se trasladaron y crecieron en el animalario.

5.1.1 Obtención de una línea de pez cebrá por fertilización *in vitro*

Debido a la edad de algunos peces y a la dificultad de fecundación de manera natural, algunas de las líneas se obtuvieron por el método de fertilización *in vitro* mediante la disección de testículos de peces macho adultos. El día anterior a la realización del procedimiento, se separaron los peces por sexo. A la mañana siguiente, se sacrificó un pez adulto macho en una disolución con exceso de triclaína (MS222, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A continuación, se secó bien la zona urogenital y se inmovilizó el pez en una esponja. Con la ayuda de unas tijeras, se diseccionó el pez tal y como se muestra en la **Figura 10 A**. Se retiraron las aletas anales, pélvica y pectoral, se cortó la piel y el músculo subyacente comenzando desde la zona ventral hasta el opérculo y

posteriormente a lo largo del costado del pez hacia la aleta anal de nuevo, retirando finalmente la piel con cuidado para no dañar los órganos (**Figura 10 B**).

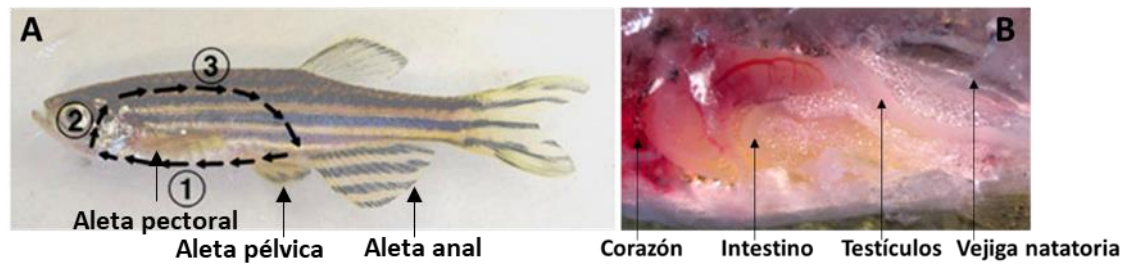


Figura 10. (A) Esquema del sentido de disección del pez adulto macho. (B) Disección del pez adulto macho y los órganos.

Con la ayuda de unas pinzas, se retiraron los testículos (**Figura 10 B**) y se colocaron en una placa Petri con solución de Hanks (HBSS, *Hanks balanced salt solution*) [NaCl 0,14 M; KCl 0,005 M; CaCl₂ 0,001 M; MgSO₄-7H₂O 0,0004 M; MgCl₂-6H₂O 0,0005 M; Na₂HPO₄-2H₂O 0,0003 M; KH₂PO₄ 0,0004 M; D-Glucosa 0,006 M; NaHCO₃ 0,004 M] con un volumen proporcional al peso de los testículos (10 µl HBSS/ µg tejido). Los testículos se disgregaron para liberar los espermatozoides en disolución y se conservaron en frío (4 °C) hasta 90 min. A continuación, se procedió a la extracción de los huevos de las hembras. Para ello, en primer lugar, se anestesió el animal en una disolución de triclaína al 0,04% (MS222, Sigma-Aldrich) y se secó bien la zona urogenital. Se colocó en una placa Petri en posición lateral y seguidamente, con suavidad y firmeza para no dañar a la hembra, se extrajeron los huevos realizando movimientos en diagonal desde la zona media de la columna vertebral hasta la zona urogenital. Una vez extraídos los huevos, se comprobó visualmente la calidad de los mismos para realizar la fertilización. Los huevos viables son de color amarillento y translúcido, mientras que los inviables son blancos y acuosos. A continuación, se adicionó a cada puesta 100 µl de la suspensión de espermatozoides en HBSS y, seguidamente, 750 µl de agua de peces y se incubaron conjuntamente durante 2 min, produciéndose en este paso la fertilización. Finalmente, se adicionó agua de peces hasta llenar la placa y se dejaron crecer en el incubador durante 5 días. Una vez alcanzada esa edad, las larvas se trasladaron y crecieron en el animalario.

5.2 Generación de las líneas de pez cebra *knock-out* y transgénica de *myoc*

5.2.1 Obtención de la línea KO *myoc* mediante CRISPR/Cas9

Diseño y síntesis de ARNg

La selección de la diana y el diseño del ARN guía (ARNg) se realizaron utilizando el programa personalizado *Alt-R CRISPR-Cas9 guide RNA* (https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM, Integrated DNA Technologies, (IDT)). Las uniones potenciales en lugares no deseados del genoma (*off-target*) y la mayor efectividad (*on-target*) del ARNcr se evaluó con la herramienta *CRISPR-Cas9 guide RNA design checker* (https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE, IDT). El ARNg se componía de un ARNtracr y de un ARNcr dirigido al exón 1 de *myoc* (*myocE1g1* 5'-GGTTGCTCGTCTCGTAGGAGGG-3') que se compraron a IDT (*Integrated DNA Technologies*).

Microinyección en embriones de pez cebra

Las microinyecciones en los embriones de pez cebra se realizaron a partir de complejos ribonucleoprotéicos (Cas9+ARNg). Para su obtención, se mezclaron en primer lugar el ARNcr (36 ng/μL) y el ARNtracr (67 ng/μL), la mezcla se incubó 5 min a 95 °C y se enfrió a temperatura ambiente para permitir su hibridación. A continuación, se mezcló la proteína Cas9 (*Alt-R® CRISPR-Cas9* a 250 ng/μL, *Integrated DNA Technologies*) con el complejo ARNtracr/ARNcr y se incubó durante 10 min a 37 °C. Todas las microinyecciones fueron llevadas a cabo bajo un estereomicroscopio Nikon DS-Ri2 usando como soporte un portaobjetos sobre una placa Petri con medio E3. Se inyectaron aproximadamente 3 nl del complejo Cas9/ ARNtracr/ARNsg en el polo animal de los embriones en fase de una célula (50-250 embriones/experimento) utilizando un microinyector Femtojet 5247 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Como control negativo, se inyectaron embriones con el complejo ribonucleoproteico Cas9/ARNtracr y sin ARNcr. Los embriones inyectados fueron crecidos en una placa Petri con medio E3 y mantenidos a 28°C.

Establecimiento de la línea homocigota mutante

Para la obtención de la línea homocigota con la que se llevaron a cabo los experimentos, se realizaron en primer lugar endocruces de peces heterocigotos de la generación F2 como se ha descrito anteriormente. En cada puesta se esperaba un porcentaje mendeliano de un 25 % de animales silvestres, un 25 % animales homocigotos y un 50 % animales heterocigotos. Una vez alcanzada la edad adulta, la descendencia F3 se genotipó y se realizaron cruces de animales

heterocigotos con homocigotos mutantes, esperando así un 50% de animales heterocigotos y un 50% de homocigotos mutantes. Finalmente, a los dos meses de edad la descendencia se genotipó y se seleccionaron los peces homocigotos mutantes para establecer la línea F4.

5.2.2 Generación de la línea transgénica de *myoc* mediante transgénesis dirigida por el transposón Tol2

La línea transgénica de *myoc*, con la que se han realizado los ensayos en esta tesis, fue generada por los doctores Jesús Ferre Fernández, José Daniel Aroca Aguilar y Julio Escribano.

Los vectores de entrada y la construcción bicistrónica para generar la línea transgénica de pez cebra, que expresa las proteínas miocilina y mCherry bajo el promotor constitutivo del gen de la β -actina, se obtuvieron utilizando el sistema *MultiSite Gateway* (Invitrogen) y los plásmidos del kit Tol2 (Kwan et al., 2007) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se amplificó un clon de ADNc que codifica la proteína miocilina de pez cebra (Bioscience, ref: IRBOP991C0979D) usando los siguientes cebadores: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCCCAACATGTGGTTTTAGC-3' y 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTCCTGCTTGCCAAGTCTCA-3'. Estos dos oligonucleótidos contenían las secuencias de cebadores adaptadoras *attB1* y *attB2*, respectivamente, subrayadas en las secuencias de nucleótidos anteriores. El producto de la PCR se clonó por recombinación en el vector pDONR221 que contiene el sitio attP (Invitrogen), utilizando la clonasa BP (11789100, Invitrogen). El ADN recombinante se transformó en células competentes *One Shot Mach1* (Invitrogen) y las células transformadas se cultivaron en presencia de kanamicina para obtener el plásmido central de entrada (pME, *plasmid Medium-Entry*) que contiene el ADNc de *myoc* del pez cebra. El plásmido de entrada del extremo 5' p5E- β -actina2 (p5E, *plasmid 5'-Entry*), que contiene 5,3kb del promotor β -actina2, junto con el plásmido central pME-*myoc*, y el de entrada correspondiente al extremo 3' p3E-P2A-mCherry (p3E, *plasmid 3'-Entry*), que contiene el péptido viral P2A y el ADNc que codifica la proteína fluorescente mCherry, se recombinaron y clonaron en el vector de destino pDestTol2pA, utilizando la clonasa LR (10134992, Invitrogen). Se transformaron células competentes con el ADN recombinante y se cultivaron en presencia de ampicilina para obtener el plásmido que contiene la construcción completa flanqueada por los sitios de recombinación Tol2. Nos gustaría agradecer al Dr. Steve W. Wilson y al Dr. Leonardo E. Valdivia del "*University College of London*" por el clon de ADNc de *myoc* del pez cebra y los plásmidos del kit Tol2. También nos gustaría agradecer los conocimientos que compartieron con nosotros y su ayuda para elaborar la construcción de miocilina.

Microinyección y selección de larvas con patrones fluorescentes de interés

La microinyección de embriones se llevó a cabo empleando 15 pg del plásmido bicistrónico y 300 pg del ARN de la transposasa Tol2 sintetizado *in vitro* con la modificación (*capping*) de su extremo 5' (Ambion) (Kawakami et al., 2004a). Una vez realizada la microinyección, los embriones se mantuvieron en el incubador y, para seleccionar aquellos que habían incorporado el transgén en su genoma, se observó la fluorescencia emitida por mCherry a las 24 y 72 hpf utilizando un microscopio Nikon SMZ18. Los embriones con expresión de mCherry se dejaron crecer hasta la edad adulta para obtener los peces fundadores F0 portadores del transgén bicistrónico en la línea germinal.

5.3 Caracterización molecular de las líneas de pez cebra

5.3.1 Extracción de ADN genómico

El ADN genómico (ADNg) se extrajo de embriones enteros de pez cebra (24, 96 y 144 hpf) y a partir de una biopsia de la aleta caudal de larvas (144 hpf) o de peces cebra adultos (>2 meses). Para el corte de la cola, se anestesiaron los peces en una disolución de triclaína (MS-222 SIGMA, 400 mg triclaína; 2,1 ml Tris 1M, pH 9) al 1X y se seccionó el tercio distal de la aleta caudal con la ayuda de un bisturí estéril. El pez se depositó en un vaso de precipitados con agua de peces (60 mg/l de sales marinas en agua destilada) para su recuperación. El ADNg se extrajo mediante el método de *HOT SHOT* (Meeker et al., 2007). Las muestras de tejido se incubaron con 10 µl de tampón de lisis alcalino (25 mM NaOH, 0,2 mM Na₂EDTA, pH 12) a 95 °C durante 30 min y finalmente se añadieron 10 µl de tampón de neutralización (40 mM TrisHCl, pH 5).

5.3.2 Amplificación de ADN genómico mediante PCR

Para caracterizar la mutación, se amplificó el exón 1 de *myoc* mediante PCR en un termociclador (BIORAD C100, BIORAD). Las condiciones de amplificación empleadas (temperatura de hibridación, tiempo de extensión y número de ciclos) para las amplificaciones vienen recogidas en la **Tabla 1**. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl utilizando como molde 50-100 ng de ADNg; 2,5 µl de tampón de reacción 10X [75 mM Tris HCl (pH 9.0), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄]; 200 µM de cada dNTP; 1 µl de cada cebador (10 pmol/µl) y 0,5 U de ADN Taq-polimerasa (Biotools), completándose hasta 25 µl con H₂O miliQ esteril. Los cebadores utilizados para las distintas PCRs se diseñaron con la herramienta *IDT PrimerQuest* (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>, *Integrated DNA Technologies*) o *Primer3*

(Rozen & Skaletsky, 2000) y se muestran en la **Tabla 1**. La localización de los cebadores diseñados se muestra en la **Figura 11**. El producto de la amplificación se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

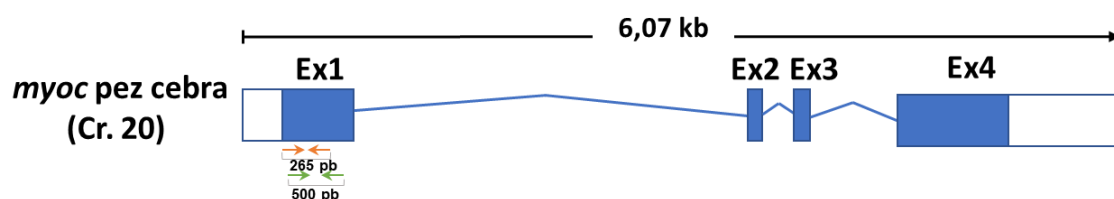


Figura 11. Localización de los cebadores utilizados para la amplificación de las regiones mediante PCR en el gen *myoc*. Se muestran los 4 exones del gen *myoc* de pez cebra (rectángulos azules: regiones traducidas; rectángulos blancos: regiones no traducidas) y las distintas parejas de cebadores utilizadas. Flechas naranjas: pareja de cebadores *myocE1fw3* y *myocE1rv3* descritos en la **Tabla 1**; flechas verdes: pareja de cebadores *myocFwE2* y *myocRvE2*. Ésta última se utilizó también para la secuenciación Sanger. kb: kilobases.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores y condiciones de la reacción utilizados para la PCR del gen *myoc*.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)	Temperatura hibridación (°C) / tiempo extensión (s)	Nº ciclos
<i>myocE1fw2</i>	CACCCCAACATGTGGTTTTAGCAGT	500	66/ 30	35
<i>myocE1rv2</i>	GATCCCGGTCTGAAGCTGTTGTC			
<i>myocE1fw3</i>	GGTCGCTGTCAGTACACCTTTAT	265	66/ 30	34
<i>myocE1rv3</i>	GCACTCCTGAACTTGTCTGTCT			

5.3.3 Electroforesis en gels de agarosa

Para realizar la electroforesis, se prepararon gels de agarosa (SIGMA) al 0,8 o 1% (p/v) en tampón TAE [Tris acetato 20 mM, Na₂EDTA 1mM (Millipore)]. Para la detección de los ácidos nucleicos en el gel, se empleó bromuro de etidio al 0,005% (v/v) (Fluka). Las electroforesis se llevaron a cabo a una diferencia de potencial de 80V durante 30 min. Para la preparación de las muestras antes de cargarlas en el gel, se empleó tampón de carga “DNA Gel Loading Dye (6X)” (R0611, Thermo Scientific). Los marcadores de pesos moleculares fueron “GeneRuler 100 pb plus” y “GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder” (SM0243, Thermo) (SM1334, Thermo). Finalmente, el gel se iluminó con una lámpara de luz ultravioleta y las imágenes se registraron mediante el sistema de fotodocumentación (UVP MultiDoc-It Gel Visualizer, Analytikjena). Esta técnica se empleó tanto para analizar la amplificación de ADN mediante PCR como para visualizar la integridad de las muestras de ADNg, ARN y ADNc.

5.3.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Uno de los métodos de genotipado fue la electroforesis en geles de poliacrilamida. Se prepararon geles con una concentración final del 8% (p/v) mezclando 2 ml de acrilamida (A0385, Pancreac), 2 ml de tampón TBE 5X (100 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,3), 100 µl de persulfato de amonio (PSA) (A3678-100G, SIGMA) y 10 µl de TEMED (17919, Pierce) en agua destilada. La electroforesis se realizó con el sistema *Mini-PROTEAN III Gel Electrophoresis System* (Bio-Rad) a temperatura ambiente, utilizando el tampón TBE 1X a un voltaje constante de 150 V durante 90 min. Después de la electroforesis, el gel se tiñó durante 10 min en una solución de bromuro de etidio de 0,5 µg/l (46067, Fluka) y se realizaron dos lavados de 5 min agua destilada. Para la detección de los ácidos nucleicos en el gel éste se iluminó con luz UV como se ha descrito anteriormente.

5.3.5 Secuenciación Sanger

Antes de la reacción de secuenciación, se eliminaron mediante filtración los cebadores libres y los dNTPS no incorporados durante la PCR usando el kit *MultiScreen HTS PCR* (Millipore). Este sistema elimina los reactivos mediante exclusión por tamaño molecular y retiene las moléculas del ADN amplificado, que son de mayor tamaño. La fracción retenida se resuspendió en agua destilada. Las reacciones de secuenciación se prepararon en un volumen final de 7 µl, utilizando 100 ng del producto amplificado, 1 µl del cebador correspondiente (10 pmoles/µl) y 2 µl de la mezcla de secuenciación (*BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1, Applied Biosystems*). Los cebadores de secuenciación utilizados se muestran en la **Tabla 1** (pareja *myocE1fw2- myocE1rv2*). Las condiciones de amplificación utilizadas consistieron en un primer paso de desnaturalización durante 1 min y un ciclo de amplificación repetido 65 veces que constaba de una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 20 s, seguida de una hibridación a 50 °C durante 13 s y una etapa de extensión durante 4 s.

Tras la reacción de secuenciación, se eliminaron los restos de cebadores y dNTPs mediante el kit de purificación *Montage Seq* (Millipore) y el producto de la reacción se analizó mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático de ADN *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). La identificación de las mutaciones se realizó mediante visualización de las secuencias, utilizando el programa *Chromas Pro v1.34* (Technelysium Pty Ltd.)

5.3.6 Extracción de ARNm

El ARN se aisló de grupos de 50 larvas de 96 y 144 hpf, de peces cebra machos adultos (2,5 meses) silvestres y homocigotos y de músculo y ojos de peces silvestres y transgénicos para *myoc* (2 años). A cada muestra se adicionaron 400 µl de trizol (mezcla de tiocianato de guanidinio y fenol cloroformo, SIGMA®). Una vez homogenizada la mezcla, se añadieron de nuevo 400 µl de trizol y se incubaron las muestras 5 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, se adicionó cloroformo en una proporción 1:5 (cloroformo:trizol) y se agitó vigorosamente. A continuación, las muestras se incubaron 15 min a temperatura ambiente y se centrifugaron otros 15 min a 12000 g a 4 °C. Se recogió la fase acuosa y se añadieron 400 µl de isopropanol, se agitaron las muestras durante 10 s y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Después, se centrifugaron 10 min a 12000 g a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se añadieron 800 µl de una disolución de etanol al 75% (v/v). Se centrifugaron 5 min a 7500 g a 4 °C y se eliminó el etanol. El precipitado de ARN se dejó secar 5 min y a continuación se adicionaron 50 µl de H₂O tratada con dietilpircarbonato (DEPC). Finalmente, el ARN se purificó mediante el kit *RNeasy Minikit* (#74104, Qiagen) y se trató con DNasa I libre de RNasa según las instrucciones del fabricante. Una vez finalizado el proceso, se cuantificaron las muestras mediante espectrofotometría (NanoDrop®) obteniéndose ratios de absorbancias 260/280 entre 1.9 y 2. Finalmente, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1 % (p/v) para comprobar la integridad de la molécula aislada. El ARN se congeló a -80 °C hasta su posterior uso.

5.3.7 Síntesis de ADNc

El ARN purificado se utilizó para la síntesis de ADNc utilizando el kit "*RevertAid First Strand cDNA Synthesis*" (K1622, Thermo Scientific™). En un tubo de PCR se preparó una mezcla de reacción consistente en 0,5 ng de Oligo DT y 1 ng de ARN completada hasta 12 µl de volumen final con agua tratada con DEPC. La mezcla se incubó a 70 °C en el termociclador durante 5 min. Se preparó una mezcla que contenía tampón de reacción (250 mM tris-HCl pH 8,3; 250 mM KCl; 20 mM MgCl₂ y 50 mM DTT), inhibidor de ribonucleasas (20 U/µl, Thermo Scientific™), dNTPs 10 mM (2,5 mM dATP; 2,5 dTTP; 2,5 mM dCTP; 2,5 mM dGTP) y retrotranscriptasa (200 U/µl, Thermo Scientific™) y se adicionaron 8 µl a cada tubo. La mezcla se incubó a 42 °C durante 1 h y posteriormente a 70 °C durante 5 min. Finalmente se cuantificó y se evaluó la pureza del ADNc obtenido por espectrofotometría (NanoDrop®) y se guardó a -80 °C hasta su uso.

5.3.8 Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real

El análisis de la expresión del ARNm de *myoc* y del resto de genes se realizó mediante qRT-PCR por triplicado utilizando 2 ng de ADNc y una concentración 200 nM de los cebadores 5' y 3' en un volumen de reacción final de 10 μ l, utilizando 5 μ l de Power SYBR Green PCR Master Mix (4385612, Thermo-Fisher Scientific) como agente intercalante. Se diseñaron cebadores específicos para cada gen utilizando los programas IDT *primer-quest* y *primer3*. Los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 2**. Para normalizar la expresión de los diferentes genes, se amplificó el ARNm del gen *ef1a* en tejidos de pez. Este gen presenta una expresión constitutiva, permitiendo calcular la expresión relativa de los genes analizados. Las condiciones de la reacción incluyeron un paso de desnaturalización inicial a 95 ° C durante 10 min, seguido de 40 ciclos que consistían en 15 s de desnaturalización a 95 ° C durante 60 s y un paso combinado de hibridación y extensión a 60 ° C durante 40 s. Se obtuvieron los productos de la PCR y se analizaron sus curvas de fusión en un termociclador de PCR a tiempo real 7500 (Thermo-Fisher Scientific). El umbral de ciclo (Ct) de cada muestra se obtuvo con el software 7500 v2.0.1 (*Applied Biosystems*). Para calcular la expresión relativa de cada gen se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Se omitió el ADNc en el control negativo de la qRT-PCR. Se utilizaron los resultados de la qRT-PCR de tres experimentos independientes realizados por triplicado para calcular los valores medios de expresión en cada muestra.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de qRT-PCR

Gen	Cebador <i>forward</i> (5'-3')	Cebador <i>reverse</i> (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)
<i>amh</i>	GACCTTGAGGAGCCTCGTTT	GTACTIONTTGCTCTGAGGCAGG	128
<i>angpt3</i>	TCACAAGAGGCCAGAAAACCAG	CTCCCTCTCTGGATGACAGT	119
<i>apoa1a</i>	CTCCAGGAGTACTCCGCT	GGCACAACTTTGGACTTGGT	129
<i>apoea</i>	AGGAGAGAGCCCAGAAGTT	GCTCCTCTGTGTATTCAAGTGAC	105
<i>arhgef40</i>	CCGTCTGAACTCTGCCTTT	GTTGGGTCGATTCTGTCTGAT	106
<i>bfsp2</i>	GCCGAGACAGAATCGATCA	CCTCCAGCTTTCCGATAACA	118
<i>cav2</i>	GAGGTTCCAGGACAGAGATCCTA	AGCATGACTACCAATCCAACT	120
<i>ccdc24</i>	TGTTGCTGCTCACTCTGAGG	TGTTGCCAGTGCATAACTT	105
<i>col7a1l</i>	GTCAGTGTGTTGGTCATCGG	TGGATGGGAGGTCTGCAAAA	118
<i>col28a1a</i>	AGTAGGACCTCAGACACCAA	GTTTCAGCGAGTTGTCTAGGG	98
⁽¹⁾ <i>ctnnbip1</i>	CTGTCGGGATGTGACCCCGG	CTCCTGACGCACCGCTCTCC	106
<i>crybgx</i>	CGACTGGACCTGACCTCTGA	CCCCTGGAAGTTGTCTATGTT	120
<i>cyp11a1</i>	TCCTGTAGCAATGAGTCTTCC	GATGATCACGACCCATAGCA	116
<i>dkk1a</i>	CCTGTCAAACCACAGCAGA	GTCAGCACCGGCTTACAGAT	126
⁽¹⁾ <i>dmrt1</i>	TGCCCAGGTGGCGTTACGG	CGGGTGATGGCGGTCCTGAG	149
⁽¹⁾ <i>dvl3a</i>	TGCCCATCCCTGCCGAAAGG	TGACCACCCCAAAGTCATCGTCC	108
<i>ef1α</i>	CTGGAGGCCAGCTCAAACAT	ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC	87
<i>gabrd</i>	GAGCAGGAATGCATGCTAGA	CCATGGATGAGCTTCTGACTT	92
<i>grik3</i>	AGTATGTGACGCGCAGGAA	CCCAGGATAGCAATGGTGA	124
<i>irg1l</i>	CAGAGCGTACAGCCAAAGAA	CCCAACTCCAATGCTGTCTAA	81
⁽¹⁾ <i>lef1</i>	CGAGGGAGACCCGCACAAGG	GGGACTGTCTAGCTGCGTCGTG	146
<i>myoc</i>	CAAAAAGACAACAGTTCAGACC	GACCACAGCCGTCAACTC	149
<i>nefmb</i>	CGAAATGGGAAATGGCTCGT	TCCAGCAGTTTCTGTAAGCG	100
<i>ociad2</i>	TCCAAGCGATTTGGGTATTT	TGGTCCCAGTTTGTGTTGA	117
<i>opn1mw1</i>	ACTTTTGATACCCGTCACC	TCACTTCCCTCTCAGCCTTC	120
<i>plpp4</i>	CCCGCATCTGTGACTACAAA	GTGGCAGTCTATGTGCAGGA	122
<i>rpe65a</i>	GGATCCAATATGGACTGCTT	AATGTACTCTCTGGGTGTTTC	87
<i>stAR</i>	AGTGGAAACCCCAATGTCAAG	TCTTGGGCCTACCACATTC	110
⁽¹⁾ <i>sycp3</i>	AGCGGATCTGACGAAGACACGAG	ATGTCCGCACCAAATCTTCCAGC	149
⁽²⁾ <i>tuba7l</i>	CACACTGCTCTCTGGACTTTG	GGTGCCCAAGGATGTCAAC	159
<i>vangl2</i>	CCCAGTCTACAATCCTGCTTTA	GACTGACCCGTCGAGTTATTAG	120

⁽¹⁾(Sreenivasan et al., 2014a)

⁽²⁾(Hosseini et al., 2019)

5.3.9 Identificación del lugar de inserción cromosómica del transgén

Obtención y purificación de ADN genómico

Para la obtención de ADN genómico se realizaron cruces de peces silvestres con peces transgénicos de *myoc* como se ha descrito anteriormente. Los embriones se dejaron crecer en placas Petri con medio E3 a 28°C y se separaron según la fluorescencia a las 144 hpf. Las muestras consistieron en agrupaciones de 30 embriones de cada genotipo, que posteriormente se congelaron, se extrajo el ADN y se purificó mediante el kit *Wizard® SV Genomic DNA Purification*

System (A2360, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el ADN, se cuantificó y se evaluó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Digestión y ligación.

Terminada la purificación del ADN_g, se digirió con la enzima *A*/*ul* (ER0011, ThermoFisher Scientific) dado que sus dianas de restricción en las secuencias Tol2 producen fragmentos pequeños (Kawakami et al., 2004a). Para el proceso de digestión, se utilizaron 0,8 µg de ADN_g como molde. Se digirieron en paralelo tanto las muestras transgénicas como las de los animales silvestres como control. Las digestiones se realizaron durante 16 h a 37 °C y sus componentes se detallan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Componentes de la digestión del ADN_g con la enzima *A*/*ul*

Componente	Vol. (µl)/tubo
Enzima <i>A</i> / <i>ul</i>	2
Tampón Tango 10X	5
ADN _g purificado	40
H ₂ O libre de nucleasas	3
Vol. _{total}	50

El resultado de la digestión se analizó con una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v). A continuación, se fabricó el molde para la PCR anidada mediante un proceso de autoligación, utilizando 25 ng de producto de la digestión. Los componentes de la reacción se detallan en la **Tabla 4**. La mezcla se incubó toda la noche a 16 °C.

Tabla 4. Componentes de la reacción de la ligación

Componente	Vol. (µl)/tubo
ADN digerido con <i>A</i> / <i>ul</i>	2
Tampón T4 10X	5
Ligasa T4	1
H ₂ O libre de nucleasas	42
Vol. _{total}	50

Amplificación por PCR anidada

La PCR anidada es una modificación de la PCR convencional diseñada para mejorar la sensibilidad y la especificidad (van Pelt-Verkuil et al., 2008). Este tipo de PCR implica el uso de dos parejas de cebadores y dos reacciones de PCR consecutivas, de manera que los amplicones resultantes de

la primera reacción de PCR se utilizan como molde para un segundo paso de amplificación. El ADN autoligado se usó como molde para la PCR anidada. Se realizaron dos rondas de PCR anidada para cada uno de los extremos del transposón 3' y 5'. Los cebadores y las condiciones utilizadas se detallan en la **Tabla 5** (Kawakami et al., 2004a). Los productos de la segunda ronda de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Los amplicones específicos obtenidos fueron aislados y purificados usando el kit de purificación de ácidos nucleicos *GeJET Gel Extraction Kit* (K0702, *Thermo Scientific*) y su secuencia de nucleótidos fue determinada mediante el método Sanger por la empresa *Stab Vida*. Para confirmar el lugar exacto de inserción, se diseñaron diferentes cebadores localizados en la región de inserción identificada en el cromosoma 11 (contig_5' –contig_3'). Los fragmentos amplificados con estos cebadores fueron secuenciados y analizados como se describe en el siguiente apartado.

Tabla 5. Cebadores utilizados en la PCR anidada

Cebador	Secuencia (5'→3')*	Temperatura de hibridación (°C)/ tiempo de extensión (s)	Nº ciclos
Tol2-5'/f1 *(PCR1)	AGTACTTTTTACTCCTTACA	48/30	30
Tol2-5'/r1 *(PCR1)	GATTTTTAATTGTAAGCAAG	48/30	30
Tol2-5'/f2 *(PCR2)	TACAGTCAAAAAGTACT	48/30	30
Tol2-5'/r2 *(PCR2)	AAGTAAAGTAAAAATCC	48/30	30
Tol2-3'/f1 *(PCR1)	TTTACTCAAGTAAGATTCTAG	48/30	30
Tol2-3'/r1 *(PCR1)	CTCCATTAAAATTGTAAGTGA	48/30	30
Tol2-3'/f2 *(PCR2)	ACTTGTAAGTCAAGTCAAGTGA	48/30	30
Tol2-3'/r2 *(PCR2)	GCAAGAAAGAAAAGTCAAGTGA	48/30	30
contig_5'_zf	GATTAATTTTGGCGTTATGAG	49/30	30
contig_3'_zf	TGACATTTAAGGTGATAGAAC	49/30	30

*(Kawakami et al., 2004a)

Localización del lugar de la inserción

Las secuencias obtenidas, fueron alineadas con el genoma del pez cebra mediante la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los lugares de inserción fueron confirmados por la localización en la posición genómica de las secuencias procedentes de los extremos del transgén.

5.4 Estudio del patrón de expresión de miocilina en pez cebra

5.4.1 Análisis de la expresión mediante inmunohistoquímica fluorescente de embriones completos (*in toto*)

Los embriones de 96 hpf se trataron antes de las 24 hpf con feniltiourea (PTU) para inhibir la pigmentación. A continuación, se fijaron toda la noche a 4 °C con una solución que contenía sacarosa al 4%, paraformaldehído (PFA) al 2% y 10 mM PBS Dulbecco (BE17-517Q, Lonza) (DPBS), pH 7,3. Tras la fijación, los embriones se deshidrataron con lavados de 5 min en soluciones de graduación creciente de metanol en tampón DPBS-Tween (25% metanol + 75% DPBS-Tween, 50% metanol + 50% DPBS-Tween, 75% metanol + 25% DPBS-% metanol). Una vez deshidratados, se almacenaron a -20 °C al menos 16h. Posteriormente, los embriones se rehidrataron y se permeabilizaron con una solución de proteinasa K durante 30 min. Se trataron con una solución de bloqueo (SB) [10% suero fetal bovino (FBS), 1 % dimetilsulfóxido (DMSO) y 0,8% tritón X-100 en DPBS] durante 1h a temperatura ambiente. Una vez bloqueados, los embriones se incubaron con un anticuerpo primario obtenido en gallina (IgY) dirigido contra el péptido N-terminal de la proteína miocilina humana (Anti-TNT) diluido 1:50 en la solución bloqueante a 4 °C durante toda la noche. A continuación, realizaron tres lavados de 5 min y se incubaron de nuevo con un anticuerpo secundario anti-IgY de gallina producido en cabra y marcado con el fluoróforo Cy2 (1:1000) (703-225-155, Jackson ImmunoResearch). Finalmente, se lavaron en DPBS-Tr 0,8%, se sumergieron en una disolución 1:1000 de DAPI (D8417, Sigma-Aldrich) 5 min para visualizar los núcleos. Se montaron en agarosa de bajo punto de fusión (1%) (8050, Pronadisa) con *Fluoroshield Medium* (F6182, Sigma-Aldrich) y se visualizaron en un microscopio confocal LSM710. La fluorescencia emitida por el DAPI, el anticuerpo conjugado con Cy2 y la autofluorescencia del embrión se registró a las siguientes longitudes de onda de excitación y emisión: 411-464 nm, 490-518 nm y 553-677 nm, respectivamente. Se capturaron secciones que abarcaban todo el embrión y se obtuvieron proyecciones de máxima intensidad y cortes transversales de las imágenes confocales con el software ZEN (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

5.4.2 Preparación de las secciones histológicas de pez cebra

Inclusión y fijación

Para la obtención de las secciones histológicas, los embriones de pez cebra y las cabezas de los peces adultos se fijaron durante toda la noche en PFA al 4 % y se crioprotegieron en una solución de 30% de sacarosa/DPBS 0,1 M a 4 °C durante dos días. A continuación, los embriones y las

cabezas de pez cebra se incluyeron en gelatina porcina al 10% con sacarosa al 15% y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso.

Corte de las secciones

Para la realización de los cortes en el criostato, se atemperó la muestra durante 30 min a -20 °C. Tanto la temperatura del bloque con la muestra como la de la cámara fue de -25 °C. Se obtuvieron criosecciones seriadas (10 µm para los embriones y 14 µm los peces cebra alevines y adultos) en un criostato Leica CM3050 S (Leica Ltd) y se almacenaron a -80 °C para su uso posterior.

5.4.3 Análisis de la expresión en tejido de pez cebra mediante inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia

La inmunohistoquímica de fluorescencia se realizó en secciones histológicas de embriones de 6 dpf, peces juveniles de 28 dpf, o peces adultos (5, 7, 13 y 24 meses). Las secciones fueron tratadas con una solución de inmunobloqueo [10% de suero bovino fetal (FBS), 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 1% de Triton X-100 en DPBS] a temperatura ambiente durante 1 h. Una vez bloqueadas, se incubaron con diferentes anticuerpos primarios, dependiendo de la proteína que se quisiera detectar, durante toda la noche y posteriormente se hizo una segunda incubación durante 1h con un anticuerpo secundario específico a 4 °C. Las características de los anticuerpos utilizados y las diluciones quedan recogidas en la **Tabla 6**. Las secciones se montaron con medio de montaje fluorescente Fluoroshield y se sellaron con Cytoseal para ser visualizadas en un microscopio confocal LSM710 como se ha descrito anteriormente. En el caso de la detección de miocilina, la especificidad del anticuerpo se evaluó mediante la incubación de las secciones con el anticuerpo preinmune-TNT y con un ensayo competitivo utilizando el péptido antigénico en una proporción molar de 1:10 (anticuerpo: péptido). En el resto, como control negativo, las secciones se incubaron únicamente con los respectivos anticuerpos secundarios. La proteína mCherry se detectó directamente mediante la emisión de fluorescencia (λ excitación = 587 nm; λ emisión= 610 nm).

Tabla 6. Anticuerpos y condiciones de trabajo utilizadas para los ensayos de inmunodetección (Ac: anticuerpo).

Anticuerpo	Detección	Dilución Ac 1º	Casa comercial	Anticuerpo secundario	Dilución Ac 2º
Anti-TNT	Miocilina	1:150	(Aroca-Aguilar et al., 2018)	Cy2 IgY antipollo	1:1000
Anti-vasa	Células germinales	1:200	GeneTex	Cy2 igG anti-conejo	1:1000
Anti ki-67	Proliferación celular	1:150	GeneTex	Cy2 igG anti-conejo	1:1000
Anti-GFAP	Activación Glia Müller	1:100	Santa Cruz Biotechnology	Cy2 igG anti-ratón	1:1000
Anti-Brn3a	Células ganglionares	1:500	Santa Cruz Biotechnology	Alexa 555 anti-conejo	1:1000
Anti-calretinina	Células ganglionares y bipolares	1:500	SWANT	Alexa 633 anti-cabra	1:1000

5.5 Caracterización fenotípica de las líneas KO y transgénica de *myoc*

5.5.1 Tinción de hematoxilina-eosina

Las secciones de tejido, previamente atemperadas y lavadas en DPBS 0,1 M (pH 7,4), se sumergieron en una solución comercial de hematoxilina de Harris (HHS80, Sigma-Aldrich) durante 3 min. A continuación, se lavaron con agua durante 15 min y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (15%, 30%, 50%, 70% y 90%). Una vez deshidratadas, se tiñeron con una solución alcohólica de eosina (HT1101116-500ML, Sigma-Aldrich) durante 2 min. Posteriormente, las muestras se trataron de nuevo con concentraciones crecientes de etanol (90 y 100%) antes de un último lavado con xilol a temperatura ambiente. Por último, los portaobjetos se montaron empleando el medio de montaje *Cytoseal* (8311-4, Thermo Scientific).

5.5.2 Tinción de Rojo Sirio

Las secciones de tejido, previamente atemperadas y lavadas en agua corriente, se sumergieron en una disolución de PicroRojo-Sirio [0,5g Sirius Red (365548-5G, Sigma Aldrich) + 500 ml de una disolución saturada de ácido pícrico (197378, SIGMA)] durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo, se lavaron dos veces en agua acidificada con ácido acético al 0,5% durante 10 min. Finalmente, las secciones se montaron con medio de montaje *Cytoseal* (8311-4, Thermo Scientific).

5.5.3 Estudio de la apoptosis celular mediante el ensayo TUNEL

La muerte celular apoptótica se evaluó mediante el ensayo TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) usando un kit de detección de muerte celular (11684795910, Roche Diagnostics). Previamente, las secciones de gónadas de peces juveniles y de cabezas de peces adultos se atemperaron. Como control positivo, se incubaron en hielo las secciones de tejido de pez silvestre durante 2 min con la solución permeabilizadora (0,1% Tritón-X100, 0,1% citrato de sodio) seguida de una incubación con una solución de DNasal (3 U/ml de DNasal, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mg/ml FBS) durante 10 min. A continuación, se permeabilizaron el resto de las secciones y se lavaron con DPBS en agitación suave. Una vez lavados, los cortes se incubaron con la mezcla del kit (90% *Label Solution* y 10% *Enzyme Solution*), seguido de tres lavados en DPBS y una incubación con DAPI (10 mg/ml) durante 2 min para teñir los núcleos. Finalmente, las secciones se montaron y se visualizaron como se ha descrito anteriormente.

5.5.4 Ensayo de la respuesta visual

Para evaluar la visión de las diferentes líneas establecidas, se realizó un ensayo de función visual. Esta prueba se basa en el hecho de que los peces son animales sociales (Oliveira, 2013), por lo que los adultos tienden a estar con individuos de su misma especie. Este ensayo consta de dos etapas: en la primera o de habituación, el pez de estudio se deja solo en un lado del tanque para explorar el nuevo entorno. La segunda o fase o de interacción, comienza con la introducción del estímulo social que consiste en uno, o generalmente dos, pequeños grupos de peces (Ogi et al., 2021). El ensayo se llevó a cabo en una pecera grande separada por una placa de metacrilato con una pequeña ventana, que permitía al pez de estudio ver a los otros peces. En una parte del tanque, se introdujeron quince peces cebra silvestres. En la otra parte, se introdujeron peces para evaluar su función visual tal y como se muestra en la **Figura 12**. La temperatura del agua se mantuvo constante a 27 grados. Se dejaron 30 min de aclimatación para cada pez, y se midió el tiempo que los peces estuvieron cerca de la ventana durante 1 min por triplicado. Durante la prueba, los peces se dejan nadar y deambular libremente mientras sus movimientos se graban en video con una cámara y se rastrea usando el software *Tracker (Open Source Physics)*. Todos los experimentos se realizaron por la mañana en las mismas condiciones de luz y temperatura.

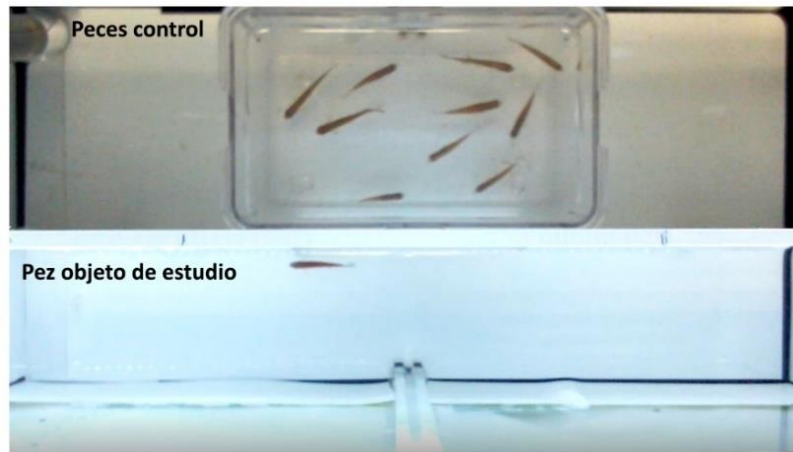


Figura 12. Montaje para evaluar la respuesta visual de los peces cebra mutantes. En la parte superior de la pecera, se introducen los peces control. En la parte inferior, el pez objeto de estudio.

5.6 Estudio transcriptómico de las líneas establecidas

El ARN se aisló de grupos de tres peces cebra machos adultos (2,5 meses) o de ojos de peces de 2 años utilizando el kit *RNeasy Minikit* (74104, Qiagen) y se trató con DNasa I libre de RNasa según las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría UV-VIS empleando un espectrofotómetro para pequeños volúmenes (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific). Las muestras de ARN se enviaron por duplicado a la empresa Macrogen (Seul, Corea del Sur) para su secuenciación masiva. Las bibliotecas se generaron utilizando el kit de preparación de muestras *TruSeq Stranded mRNA LT* (Illumina) que captura tanto el ARN codificante como múltiples formas de ARN no codificante que están poliadeniladas. La secuenciación se realizó en un sistema *NovaSeq 6000* (Illumina) y se utilizó *Trimmomatic* 0.38 (Bolger et al., 2014) para eliminar las secuencias adaptadoras de los extremos y las bases con calidad inferior a tres. Para mapear las lecturas de la secuencia en el genoma de referencia del pez cebra (GRCz11) se utilizó el alineador *HISAT2* (Kim et al., 2015). Para cada muestra, se calcularon los perfiles de expresión como recuento de lecturas frente a un valor de normalización. El análisis de genes diferencialmente expresados (DEG, *Differentially Expressed Genes*) de las líneas de pez cebra *knock-out* o transgénica de *myoc* frente al pez silvestre se realizó utilizando lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas (RPKM, *Reads Per Kilobase Million*). Los genes con una diferencia de expresión (FC, *fold change*) $\geq 2,0$ y un valor $p < 0,05$ en las comparaciones posibles de las dos réplicas biológicas (KO1 vs WT1, KO1 vs WT2, KO2 vs WT1 y KO2 vs WT2, Tg/+AO vs +/+1, Tg/+AO vs +/+2, Tg/+WT-L vs +/+1, Tg/+WT-L vs +/+2) se consideraron expresados diferencialmente (DEGs, *Differentially Expressed Genes*). El análisis de

enriquecimiento genético funcional de los DEGs se realizó utilizando las bases de datos GO (<http://geneontology.org/>) (Botstein et al., 2000), KEGG (<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) (Kanehisa & Goto, 2000) usando la herramienta g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>) (Reimand et al., 2016), *ShinyGO* (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) (Ge et al., 2020) y *Epistemic AI* (Koo et al., 2022).

5.7 Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron mediante las pruebas t de *Student* o ANOVA de una vía. El análisis estadístico de los datos se realizó con el software *SigmaPlot 12.0* (Systat Software Inc.).

6. RESULTADOS

6.1 Generación y caracterización de la línea KO para *myoc* mediante el sistema CRISPR/Cas9

6.1.1 Ortología del gen *myoc* en pez cebra

Para comprender mejor la función biológica de *MYOC in vivo*, se utilizó el pez cebra como modelo animal de estudio. En primer lugar, se procedió a la búsqueda de genes ortólogos y se analizó la conservación del gen entre ambas especies. El gen *MYOC* humano consta de tres exones y está localizado en el brazo largo del cromosoma 1, mientras que su ortólogo *myoc* del pez cebra tiene cuatro exones y está localizado en el cromosoma 20 (**Figura 13 A**). Además, la comparación de las secuencias de ADN mostró similitud de secuencia, con un 37,2% de identidad de nucleótidos en las regiones codificantes de los genes de ambas especies. Las proteínas correspondientes presentan dominios de olfactomedina conservados con un 45% de identidad de secuencia de aminoácidos (**Figura 13 B, Figura 14 A**) no obstante, las alfa-hélices superenrolladas o helicoides enrollados N-terminales presentes en la proteína humana no se predijeron en miocilina de pez cebra.

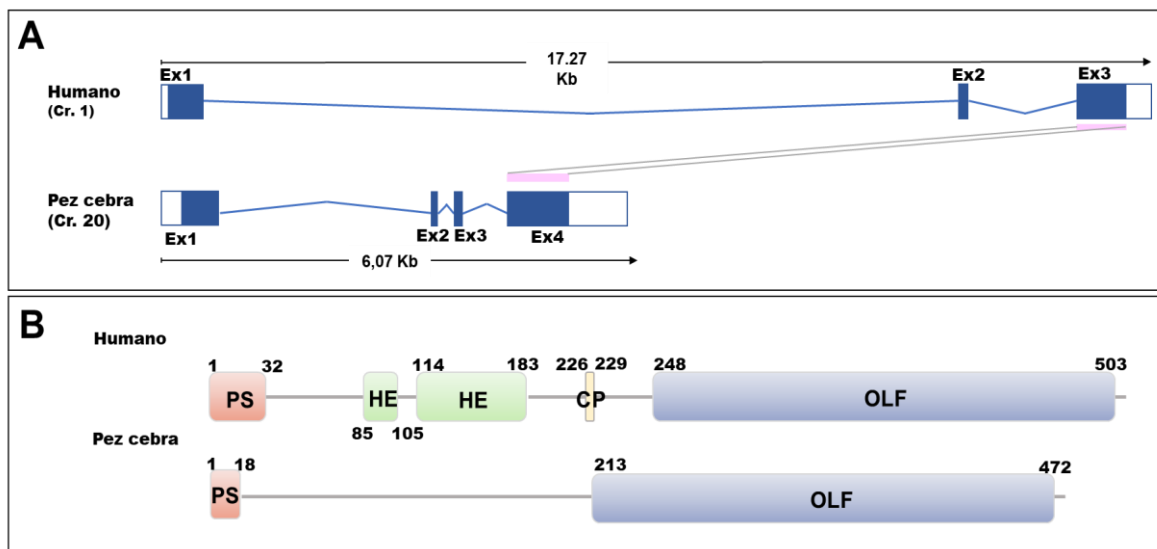


Figura 13. Conservación de la estructura génica y de la organización de los dominios proteicos de miocilina humana y del pez cebra. **(A)** Alineación genómica de los genes *MYOC* humanos (ENSG00000034971) y del pez cebra (ENSDARG00000021789). Para la obtención de la imagen se utilizó la herramienta "Ensembl region comparison tool". Los rectángulos rosas representan exones conservados. **(B)** Comparación de los dominios de la proteína miocilina humana y de pez cebra. Los dominios estructurales se indican según la base de datos UniProt (A0A0S2Z421 y Q5F0G5, para los dominios de humano y pez cebra, respectivamente; <https://www.uniprot.org/uniprot>). Los números corresponden a las posiciones de los aminoácidos. PS: péptido señal; HE: helicoides enrollados; OLF: dominio de la olfactomedina; CP: sitio de corte proteolítico.

Mediante la herramienta *AlphaFold Protein Structure Database*, un sistema de inteligencia artificial, se predijo la estructura tridimensional de la proteína humana (**Figura 14 B**) y de pez cebra (**Figura 14 C**) a partir de la secuencia de aminoácidos. Como se puede observar, la estructura de las proteínas es bastante similar, indicando que está muy conservada.

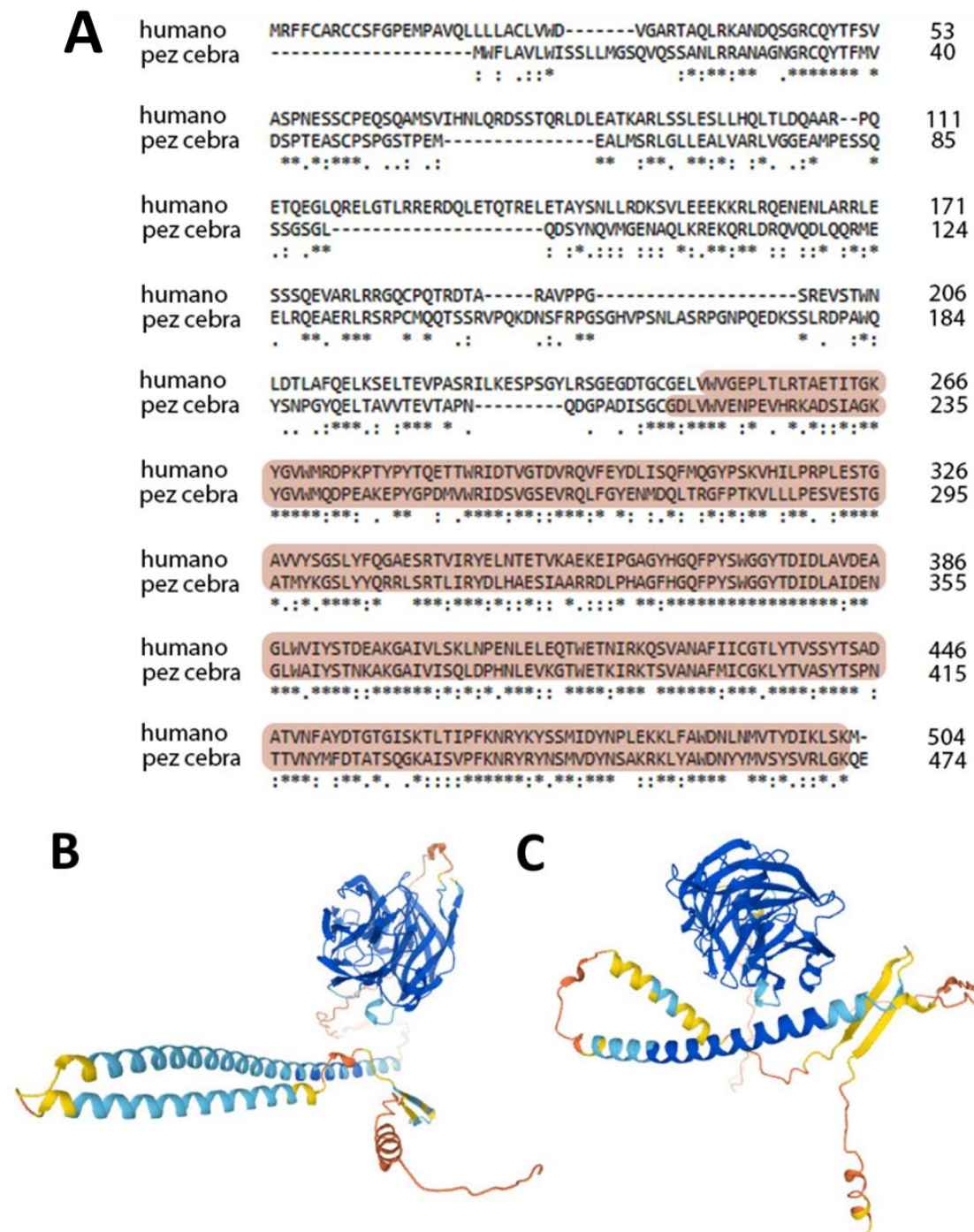


Figura 14. Comparación de la proteína miocilina humana y del pez cebra. (A) Secuencia de aminoácidos de miocilina. El alineamiento de las proteínas humana (número de acceso UniProt A0A0S2Z421) y de pez cebra (número de acceso UniProt Q5F0G5) se realizó con *ClustalW* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) (Thompson et al., 1994). Los asteriscos indican las posiciones en las que todos los aminoácidos son idénticos, dos puntos verticales muestran aminoácidos con propiedades químicas similares y un punto denota posiciones de aminoácidos con una similitud química débil. Sombreado de color salmón: dominios similares a olfactomedina. **Estructura tridimensional de las proteínas humana (B) y de pez cebra (C).** Dicha estructura se ha obtenido con la base de datos *AlphaFold Protein Structure Database* (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). Predicción actualizada por última vez el 9 de diciembre de 2021 con *AlphaFold Monomer v2.0*. Los

colores indican el nivel de confianza del modelo ofreciendo una puntuación de confianza por residuo (pLDDT, *predicted local distance difference test score*). Azul oscuro: muy alta (pLDDT>90); Azul cian: alta (90 > pLDDT > 70); amarillo: bajo (70 > pLDDT > 50); naranja: muy baja (pLDDT < 50).

Todos estos datos sugieren que el pez cebra es un buen modelo animal para estudiar el papel del gen *myoc* y así comprender mejor su función biológica.

6.1.2 Establecimiento de la línea *knock-out* para *myoc*

Para comenzar el estudio, se inactivó el gen *myoc* en el pez cebra utilizando el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9. En primer lugar, se diseñó un ARN CRISPR (ARNcr) complementario de una secuencia diana localizada en el exón 1 de *myoc* (**Figura 15 A**). El complejo ribonucleoproteico (RNP), formado por la unión de dos tipos de ARN (ARNcr/ARNtracr) y la proteína Cas9, fue microinyectado en el vitelo de embriones de pez cebra silvestres de tipo AB en la fase de una sola célula (**Figura 15 B**). Los embriones de la generación F0 que transmitían mutaciones somáticas, se criaron hasta la edad adulta. La secuenciación mediante el método Sanger identificó peces mosaicos mutantes que transmitían una variante de tipo *indel* (inserción/delección), resultado de una inserción de 14 nucleótidos y una delección de 4, resultando en una inserción neta de 10 nucleótidos (c.236_239delinsAAAGGGGAAGGGA). La predicción de la traducción de la secuencia mutante muestra que originaría un desplazamiento de la pauta de lectura con un codón de terminación prematuro en la nueva pauta de lectura p.(V75EfsX60) (**Figura 16 A**). Estos peces fundadores fueron cruzados con peces silvestres AB para obtener la generación heterocigota F1 (**Figura 15 B**).

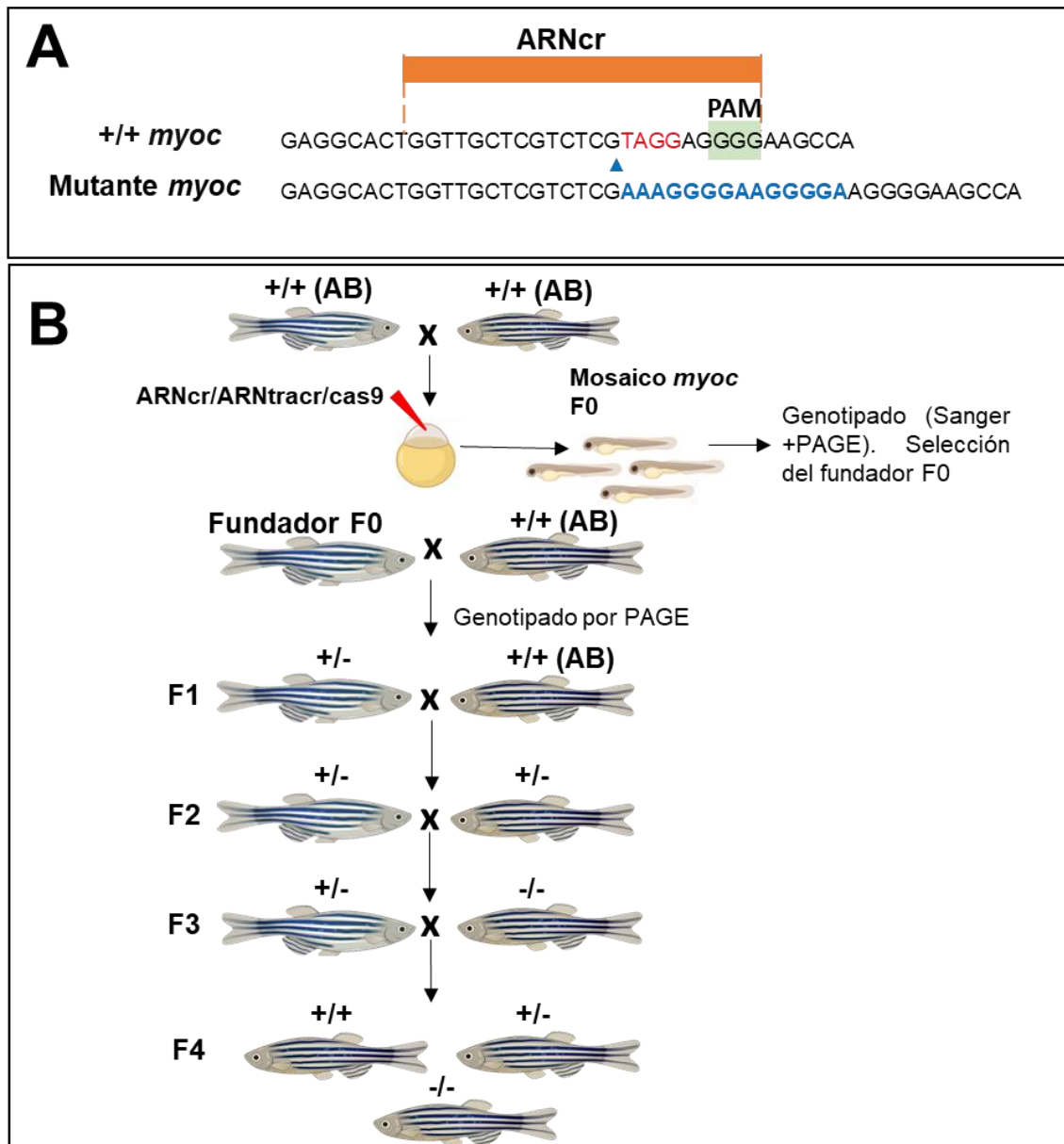


Figura 15. Generación de una línea de pez cebra *knock-out* para el gen *myoc* mediante el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9. (A) Localización de la secuencia diana del ARNcr localizada en el exón 1 de *myoc*. La secuencia PAM se indica sobre fondo verde. Las letras rojas y azules de la secuencia inferior indican, respectivamente, los nucleótidos eliminados e insertados identificados en el fundador utilizado para establecer la línea KO. (B) Procedimiento empleado para establecer la línea KO *myoc*. Los animales de la generación F0 se criaron hasta la edad adulta, se cruzaron con peces cebra silvestres AB y la descendencia se genotipó mediante gel de poliacrilamida (PAGE) y secuenciación Sanger para identificar peces que transmitían deleciones de *myoc* (fundadores F0). Se utilizó la herramienta *Biorender* para crear este esquema. +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

La generación F1 se genotipó a partir de tejido de la aleta caudal mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 16 A) y secuenciación Sanger (Figura 16 B) para detectar la presencia de deleciones de *myoc* en la línea germinal. Al tratarse de peces heterocigotos, aquellos que tenían

alguna mutación presentaban dos bandas de distinto tamaño, una de 275 pb correspondiente al mutante y otra de menor tamaño (265 pb) correspondiente al alelo silvestre (**Figura 16 A**).

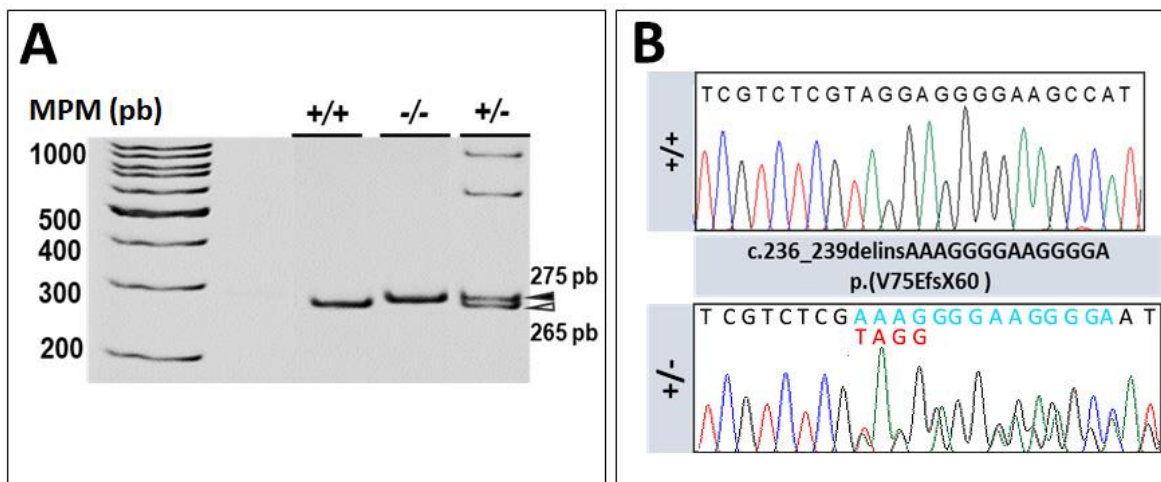


Figura 16. Caracterización molecular de la línea de pez cebra *knock-out* de *myoc*. (A) Genotipado de los peces F1 utilizando PAGE al 8%. Se muestra el análisis de tres animales representativos. MPM: marcador de pesos moleculares; pb: pares de bases; punta de flecha blanca: alelo silvestre (265 pb); punta de flecha negra: alelo mutante (275 pb). (B) Secuenciación Sanger de la mutación *myoc* seleccionada. Las letras azules y rojas indican los nucleótidos insertados (14 pb) y eliminados (4 pb), respectivamente. +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

Los animales heterocigotos mutantes de la generación F1 se volvieron a cruzar con peces silvestres para eliminar posibles mutaciones en lugares del genoma no deseados (*off-targets*), obteniendo así la generación F2. Finalmente, los peces homocigotos mutantes de la generación F3 se obtuvieron a partir de un endocruce de peces heterocigotos de la F2, siendo genotipados mediante PAGE al llegar a la madurez sexual.

6.1.3 Confirmación mediante qRT-PCR de la pérdida funcional del gen

Para confirmar que la mutación c.236_239delinsAAAGGGGAAGGGGA identificada producía la pérdida de función del gen, se analizó la expresión del ARNm de *myoc* mediante qRT-PCR en tres grupos de 15 embriones de 144 hpf con los diferentes genotipos (silvestre, heterocigoto y homocigoto). Dado que la mutación produce un desplazamiento de la pauta de lectura en el primer exón, se esperaba que la cantidad de ARNm se redujese drásticamente por la actuación del sistema NMD (*Nonsense Mediated Decay*) (Hug et al., 2016). Se observó una reducción significativa de los niveles de ARNm en las larvas heterocigotas mutantes del 50 % y de un 80 % en las homocigotas mutantes con respecto al valor de expresión del grupo silvestre (**Figura 17**). Estos resultados apoyan que la mutación generada en los animales *knock-out* produce una pérdida de función del gen y también de la proteína.

A pesar de que existe un nivel bajo de ARNm mutante residual, éste daría lugar a una proteína no funcional ya que contiene solo 75 aminoácidos normales, seguidos de una secuencia de 59 aminoácidos codificados por la nueva pauta de lectura, faltándole la mayor parte de los dominios funcionales de miocilina, entre los que se encuentra el dominio olfactomedina.

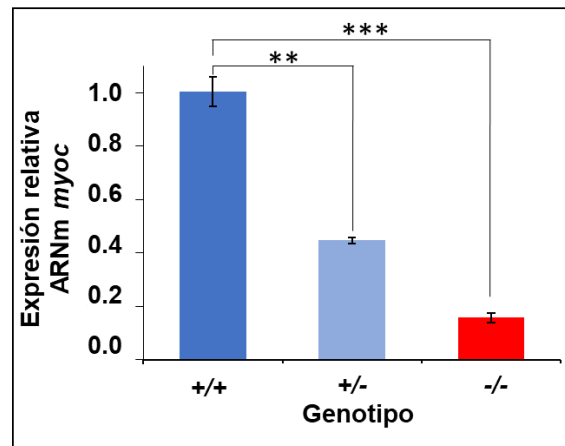


Figura 17. Cuantificación de la expresión de ARNm de *myoc* en embriones de la línea de pez cebra *knock-out* para *myoc*. Se midieron los niveles de ARNm en grupos de 15 larvas de pez cebra de la generación F3 (144 hpf) mediante qRT-PCR. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos respecto a las larvas de control silvestres. Los valores representan la media de tres experimentos diferentes. La cuantificación relativa del ARNm de *myoc* en relación con el ARNm del gen constitutivo *ef1α* se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Los asteriscos indican significación estadística en comparación con los animales silvestres. (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,001$. +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

6.1.4 Estudio del patrón de expresión de miocilina en pez cebra

Expresión de miocilina durante desarrollo embrionario

Con la finalidad de caracterizar el patrón de expresión de miocilina en el pez cebra y confirmar que la mutación descrita produce un defecto funcional en el gen, se realizaron varios ensayos.

En primer lugar, se llevaron a cabo análisis de inmunohistoquímica *in toto* en embriones completos de 96 hpf. Para ello, se utilizó un anticuerpo anti-miocilina obtenido en gallina (IgY) dirigido contra el péptido N-terminal de la proteína humana (anti-TNT). Además, se aprovechó la línea de pez cebra KO como un control negativo para evaluar la especificidad de las señales y así, confirmar la obtención de la línea homocigota mutante. Posteriormente, se analizaron las preparaciones mediante microscopía confocal como se ha descrito en materiales y métodos.

La reconstrucción tridimensional confocal de los embriones mostró un marcaje positivo en el epitelio del cristalino y en los espacios intercelulares tanto en la superficie externa de la copa

óptica como en los tejidos periorbitales dorso-posteriores y ventrales, correspondiente al mesénquima periorbital (Figura 18 A-C).

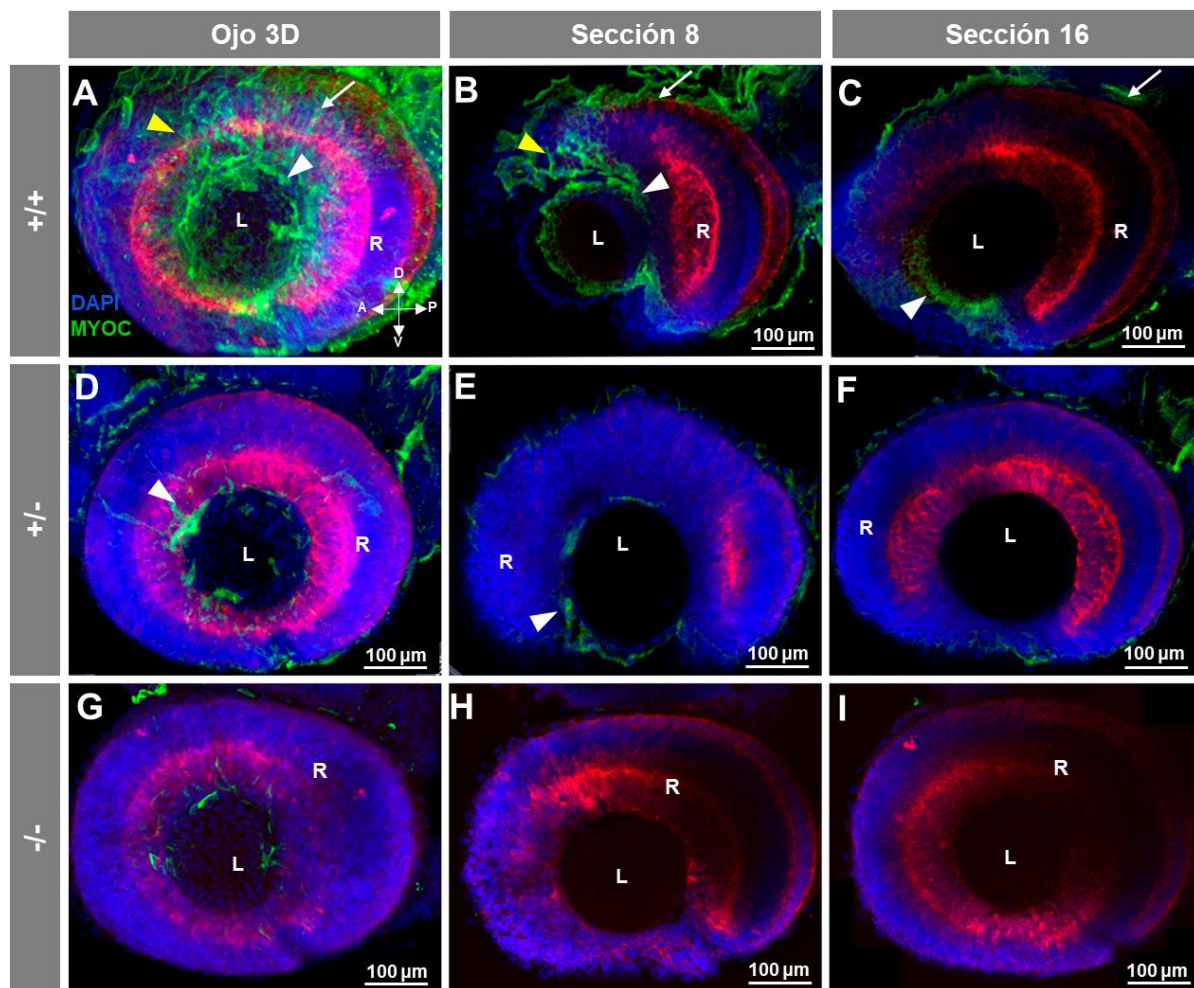


Figura 18. Detección inmunohistoquímica fluorescente de miocilina en ojos de embriones de pez cebra (96hpf). Los embriones silvestres (A-C), heterocigotos (D-F) y homocigotos (G-I) mutantes de miocilina se incubaron con un anticuerpo primario anti-miocilina obtenido en gallina (IgY) (TNT) y un anticuerpo secundario anti-IgY de cabra conjugado con Cy2. Reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de microscopía confocal escaneadas en z (A, D y G) del ojo. Se seleccionaron las secciones ópticas (92 μm) 8 (B, E y H) y 16 (C, F e I), de la superficie ocular exterior, a partir de la composición de imágenes 3D para mostrar la localización precisa de la señal verde en la superficie externa e interna de la copa óptica (flechas blancas y puntas de flecha amarillas, respectivamente), epitelio del cristalino (punta de flecha blanca) y tejidos periorbitales dorso-posterior y ventral (puntas de flecha amarillas) (A-C). Rojo: autofluorescencia tisular. La cruz indica la posición de los ejes embrionarios (D: dorsal; P: posterior; V: ventral; A: anterior). La imagen es representativa del resultado observado en 10 embriones. L: lente. R: retina. +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

El inmunomarcaje observado estaba ausente en los embriones incubados con el anticuerpo preinmune utilizado como control negativo, apoyando así la especificidad de la señal observada (Figura suplementaria 1).

También se detectó inmunomarcaje positivo en el espacio extracelular de la superficie vitelina (Figura 19 A-C) y en el tejido muscular caudal (Figura 20 A-C).

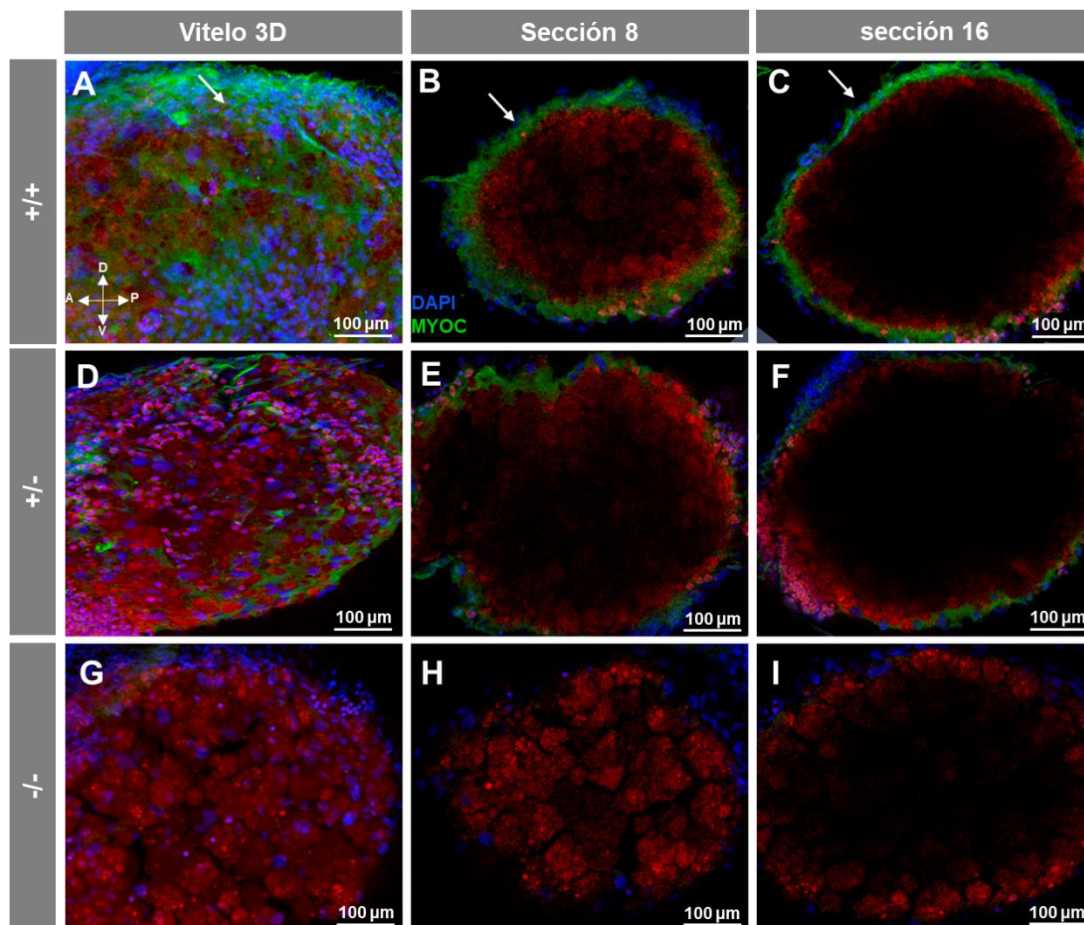


Figura 19. Detección de miocilina mediante inmunohistoquímica fluorescente en el vitelo de las larvas de pez cebra (96hpf). Los embriones silvestres (A-C), heterocigotos (D-F) y homocigotos *knock-out* para *myoc* (G-I) se incubaron con un anticuerpo primario anti-miocilina obtenido en gallina (IgY) (TNT). Reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de microscopía confocal del vitelo escaneadas en el eje z (A, D y G). Se seleccionaron las secciones (92 µm) 8 (B, E y H) y 16 (C, F e I), a partir de las imágenes 3D para mostrar la localización precisa de la señal verde entre la superficie del vitelo (flechas) (A-C). Señales rojas: autofluorescencia tisular. La cruz indica la posición de los ejes embrionarios (D: dorsal; P: posterior; V: ventral; A: anterior). La imagen es representativa del resultado observado en 10 embriones. +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

Estas señales se redujeron en los embriones heterocigotos *knock-out* (Figura 18 D-F, Figura 19 D-F y Figura 20 D-F) y fueron indetectables en los embriones homocigotos KO (Figura 18 G-I, Figura 19 G-I y Figura 20 G-I) lo que apoya su especificidad. El hecho de que se reduzca la expresión proteica en comparación con los peces silvestres nos confirma de nuevo que el genotipo produce un defecto funcional en el gen. La ausencia de señales verdes en las secciones del control negativo

que se incubaron con el anticuerpo preinmune también apoyó la especificidad de las señales (Figura suplementaria 1).

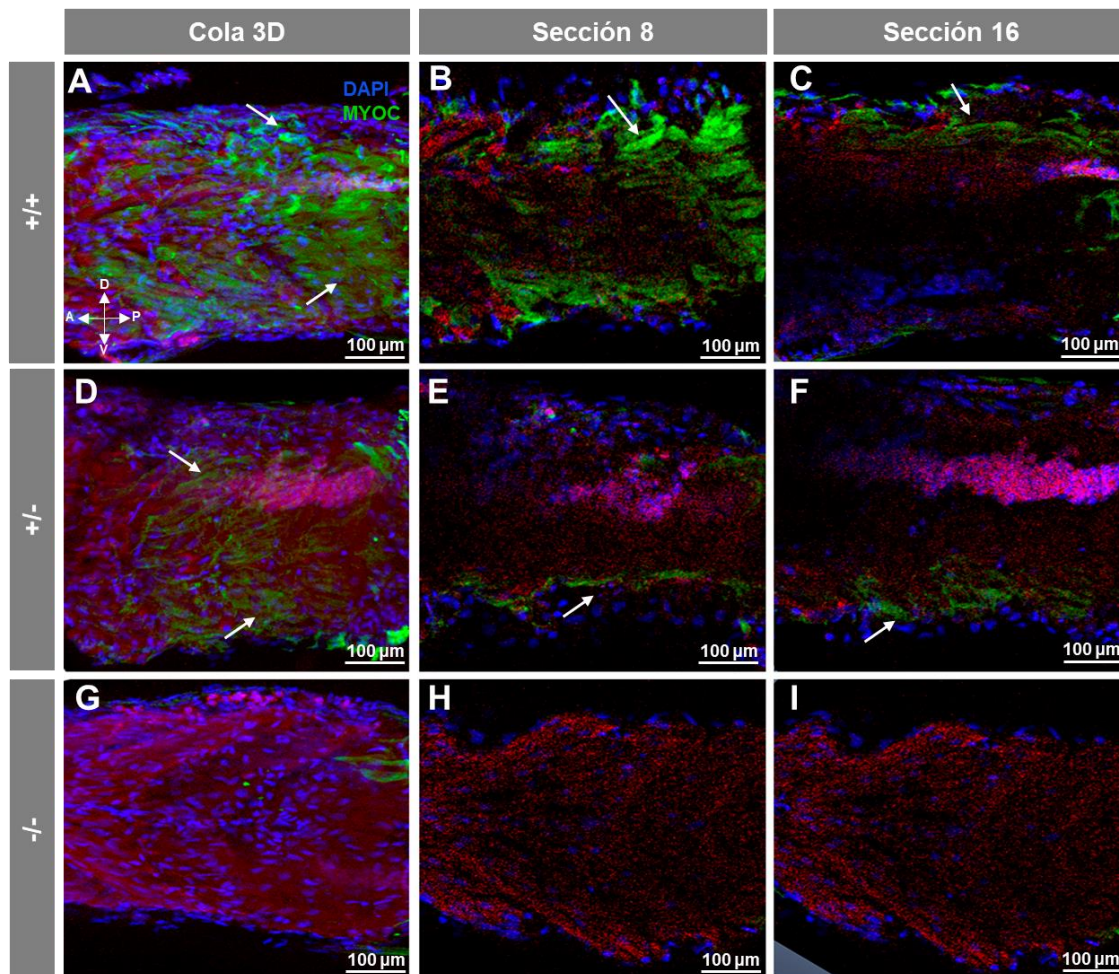


Figura 20. Detección inmunohistoquímica fluorescente de miocilina en colas de embriones de pez cebra (96hpf). Los embriones silvestres (A-C), heterocigotos (D-F) y homocigotos (G-I) mutantes de *myoc* fueron incubados con un anticuerpo primario anti-miocilina obtenido en gallina (IgY) (TNT). Reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de microscopía confocal de la región caudal escaneadas en el eje z (A, D y G). Se seleccionaron las secciones (92 μm) 8 (B, E y H) y 16 (C, F e I) de la composición de imágenes 3D para mostrar la localización precisa de la señal verde en la piel de la cola (flecha) (A-C). Señales rojas: autofluorescencia tisular. La cruz indica la posición de los ejes embrionarios (D: dorsal; P: posterior; V: ventral; A: anterior). La imagen es representativa del resultado observado en diez embriones. +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

Estos datos corroboran los resultados obtenidos en la qRT-PCR confirmando que se había generado una línea *knock-out* para *myoc* en pez cebra. Además, demuestran que existe una expresión de la proteína miocilina en ojo y en músculo durante el desarrollo embrionario temprano en peces silvestres.

Estudio del patrón de expresión de miocilina en peces cebra adultos

Una vez caracterizado el patrón de expresión en larvas, se procedió a analizar la presencia de la proteína en tejidos oculares de peces cebra adultos mediante análisis inmunohistoquímico de secciones histológicas. Para ello, las cabezas se incluyeron en gelatina y se cortaron en un criostato hasta obtener secciones de 14 μm de grosor. A continuación, éstas se incubaron con el anticuerpo primario anti-TNT y un anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Cy2. Los resultados de los análisis mostraron la presencia de la proteína en epitelio ciliar no pigmentado, vasos sanguíneos y estroma del iris (**Figura 21 A**, puntas de flecha blanca), así como en epitelio corneal (**Figura 21 B**) y células ganglionares de la retina (**Figura 21 C y D**). Estas señales estaban ausentes en peces cebra homocigotos mutantes (**Figura 21 E-G**) así como en las muestras tratadas con el anticuerpo preinmune o bloqueadas con el péptido antigénico (**Figura suplementaria 2**), apoyando así su especificidad.

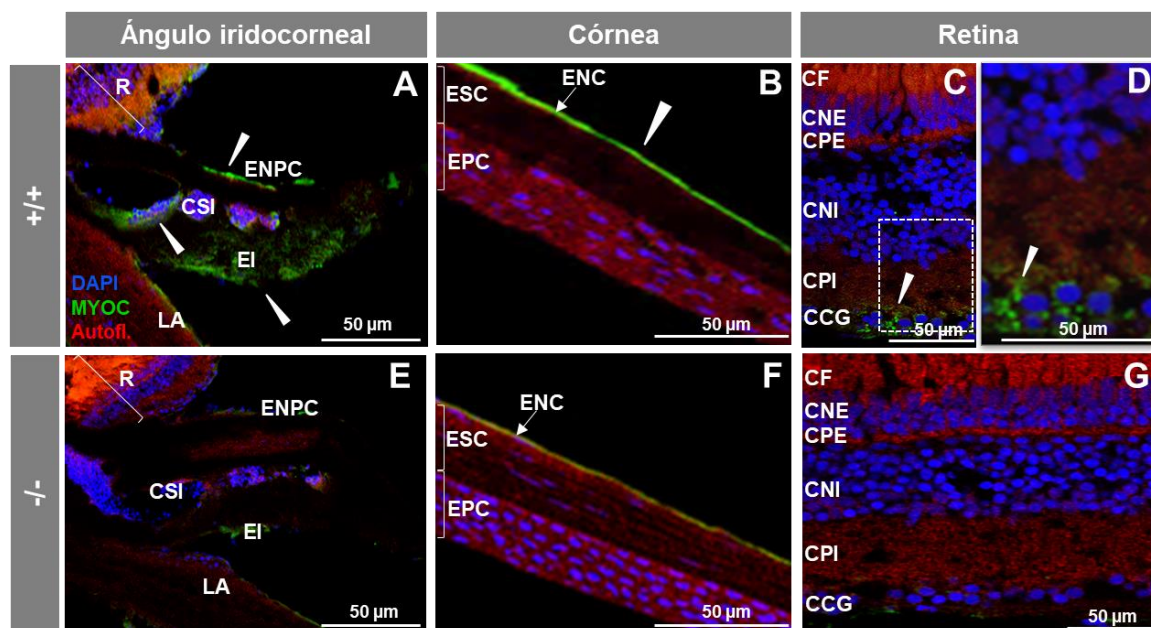


Figura 21. Detección de miocilina mediante inmunohistoquímica en estructuras oculares del pez cebra adulto. Inmunohistoquímica fluorescente de secciones del ángulo dorsal iridocorneal (A y E), córnea (B y F) y retina (C, D y G) (14 μm) de peces cebra adultos (7 meses) silvestres y KO para *myoc*. Las muestras se incubaron con un anticuerpo primario anti-miocilina (TNT) (señales verdes). LA: ligamento anular. EPNC: epitelio no pigmentado ciliar; CSI: células sanguíneas del iris; EI: estroma del iris. EPC: epitelio de la córnea; ESC: estroma de la córnea; ENC: endotelio de la córnea; CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; CF: capa fotorreceptora; R: retina; +/+ : silvestre; -/- : KO *myoc*. +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

Tras analizar la expresión de la proteína en los tejidos oculares, se procedió a estudiar la posible expresión en tejidos no oculares dado que no se había analizado previamente en pez cebra. Para

ello, el cuerpo de los peces adultos se fijó, se incluyó en gelatina y se obtuvieron criosecciones como se ha descrito anteriormente. Se seleccionaron tejidos representativos como músculo esquelético (músculo faríngeo) y porciones de los aparatos digestivo (bulbo intestinal e intestino medio) y reproductor (testículos y ovarios). El inmunoanálisis de las secciones reveló la presencia de miocilina en la periferia de las fibras musculares faríngeas (**Figura 22 A y B**). En el bulbo intestinal se observó inmunomarcaje en la cara apical de enterocitos (**Figura 22 C y D**). En cambio, las células epiteliales del intestino medio se tiñeron intracelularmente mostrando una tinción distintiva del borde en cepillo (**Figura 22 E y F**, flechas blancas). Estas señales estaban casi ausentes en los peces homocigotos KO para *myoc* (**Figura 22 G-L**) y en los controles negativos adicionales, que consistieron en la incubación de las preparaciones histológicas con el anticuerpo preinmune y el ensayo competitivo con el péptido antigénico (**Figura suplementaria 3**).

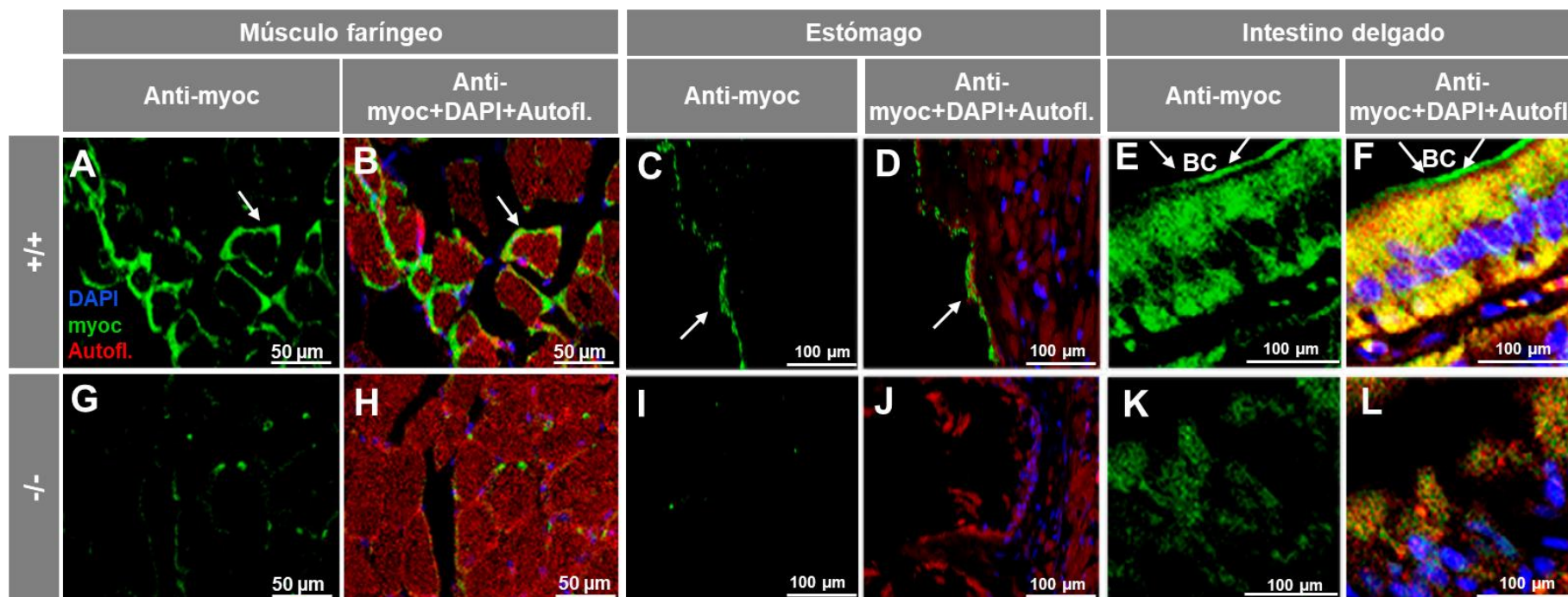


Figura 22. Análisis de la expresión de miocilina en tejidos no oculares del pez cebra adulto. Las secciones de tejido de pez cebra (14 μm) adulto silvestre (7 meses) y homocigotos de *myoc* se incubaron con un anticuerpo primario anti-miocilina obtenido en gallina (IgY) (TNT). Flechas: expresión de miocilina en la periferia de las fibras musculares faríngeas (A y B), la cara apical de los enterocitos en el bulbo intestinal (C-D e I-J) y en el borde en cepillo de las células epiteliales en el intestino medio (E-F y K-L). BC: borde en cepillo. Las imágenes son representativas del resultado observado en tres secciones de tejido de tres animales diferentes. +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

A continuación, se procedió a analizar la expresión en el aparato reproductor. Se observó un marcaje positivo en el epitelio folicular del ovario y en gránulos corticales de ovocitos vitelogénicos (**Figura 23 A y B**, flechas amarillas y blancas respectivamente), así como en epitelio seminífero, pero aparentemente no en esperma (**Figura 23 C y D**). Como se describirá posteriormente, la ausencia de hembras homocigotas mutantes impidió su uso como controles negativos. No obstante, el inmunomarcaje estuvo ausente en testículos de los animales *knock-out* (**Figura 23 E y F**) y se redujo significativamente en los cortes histológicos de ovarios de peces cebra silvestres que fueron tratados con anticuerpo preinmune o bloqueadas con péptido antigénico (**Figura suplementaria 4**) lo que indica la especificidad de la señal observada.

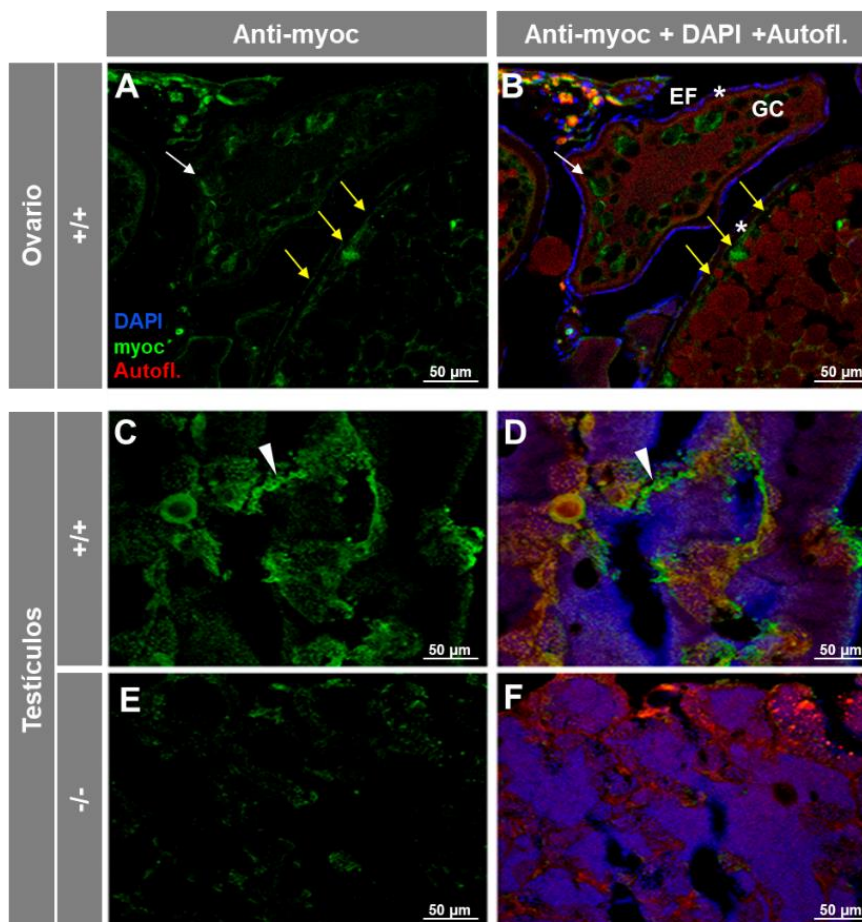


Figura 23. Detección inmunohistoquímica de miocilina en aparato reproductor de pez cebra adulto. Las secciones de tejido (14 μm) de ovario (A y B) de peces cebra adultos (7 meses) silvestres y de testículo de peces silvestres (C y D) y homocigotos KO para el gen *myoc* (E y F) se incubaron con un anticuerpo primario anti-TNT (señales verdes). Flecha blanca: inmunomarcaje de gránulos corticales; flechas amarillas; marcaje de epitelio folicular; puntas de flecha blancas; inmunomarcaje en epitelio seminífero. Las imágenes son representativas del resultado obtenido en tres secciones de tejido de tres animales diferentes. GC: gránulos corticales; EF: epitelio folicular; *: Corona radiata; +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

6.1.5 Caracterización fenotípica de la línea KO para *myoc*

Caracterización fenotípica ocular en secciones histológicas transversales

Dada la relación entre *myoc* y el glaucoma, el análisis fenotípico se centró en los ojos. Para ello, en primer lugar, se procedió a la caracterización fenotípica macroscópica de embriones de 96 hpf y de adultos de 7 meses. Se anestesiaron tanto las larvas como los peces adultos con la correspondiente concentración de tricafina y se fotografiaron.

El análisis morfológico externo de peces cebras heterocigotos y homocigotos KO para *myoc*, tanto en estado embrionario como adulto, no reveló ninguna diferencia significativa en los ojos en comparación con peces silvestres (**Figura 24**).

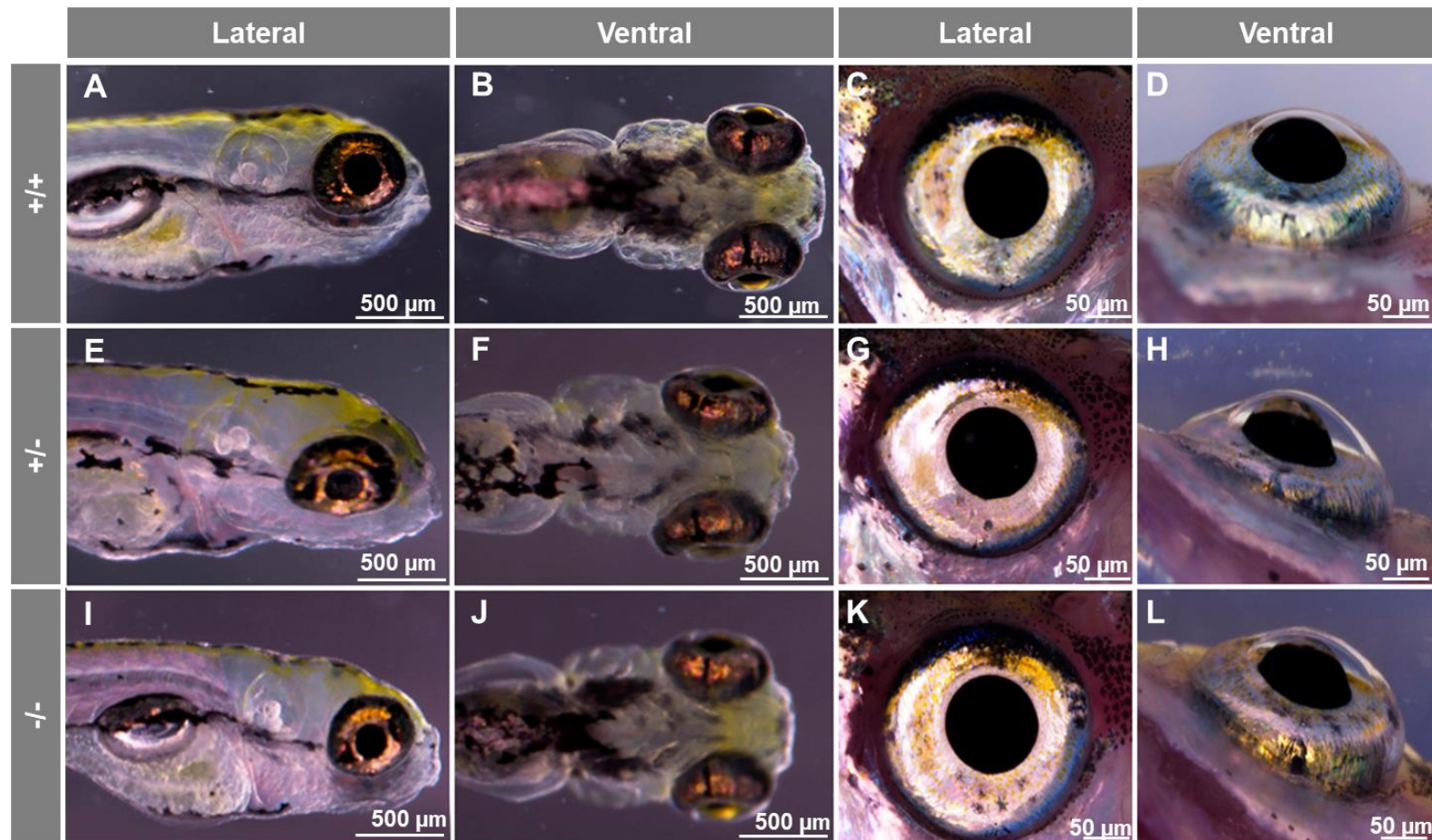


Figura 24. Fenotipos macroscópicos de cabezas y ojos en embriones y peces cebra adultos. Los mutantes heterocigotos para *myoc* se cruzaron con la finalidad de obtener los tres genotipos. La descendencia se genotipó mediante PAGE y se observó a las 96 hpf utilizando un microscopio Nikon SMZ18 (A, B, E, F, I y J). Una parte de la progenie fue criada hasta la edad adulta (7 meses), genotipada y fotografiada (C, D, G, H, K y L). Las imágenes son representativas de diez individuos de cada etapa. +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

Para estudiar con más detalle las posibles alteraciones a nivel microscópico en la línea KO, se realizaron análisis histológicos de cortes transversales de la cabeza de animales con distinto genotipo (+/+, +/- y -/-) y edad. Para ello, se obtuvieron criocortes de 10 o de 14 μm (larvas o adultos respectivamente) y se tiñeron con hematoxilina eosina. La comparación de secciones de tejido teñidas entre embriones de pez cebra silvestres y homocigotos no mostró diferencias significativas en estructuras de la cabeza ni en los ojos (**Figura 25**).

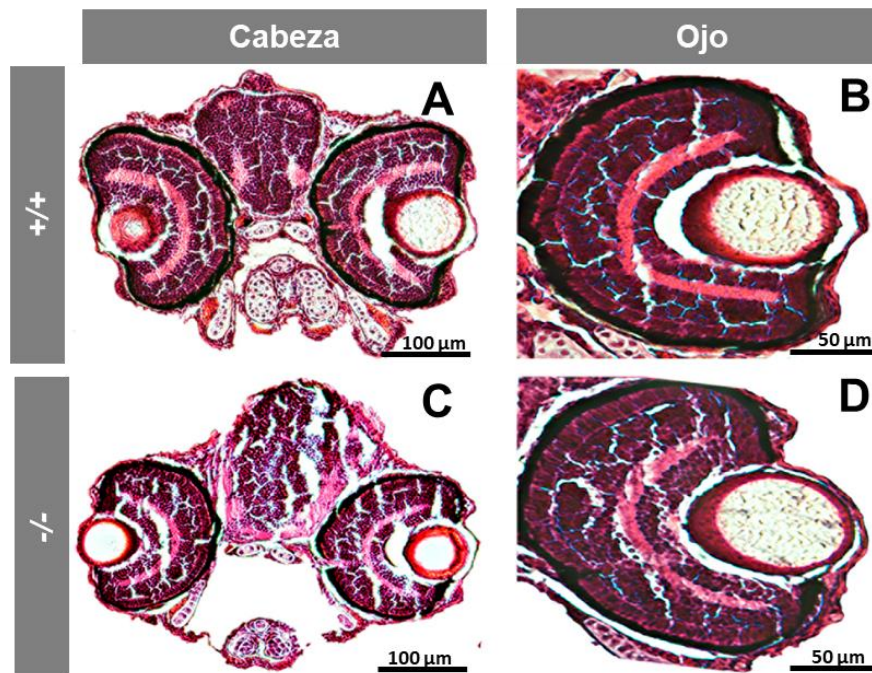


Figura 25. Fenotipos microscópicos de cabezas y ojos en embriones mutantes de *myoc* (96 hpf). Se muestran las secciones de tejidos de cabeza (A y C) y ojo (B y D) teñidas con hematoxilina-eosina de peces silvestres (A y B) y homocigotos mutantes para *myoc* (C y D). Las imágenes son representativas de tres individuos de cada genotipo. +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

En los animales adultos (7 meses), nos centramos en analizar la posible existencia de alteraciones en aquellas estructuras donde se detectó la proteína miocilina mediante inmunohistoquímica. Se observaron en detalle el ángulo iridocorneal en las regiones dorsal y ventral, las estructuras de producción y drenaje de humor acuoso en peces cebra, respectivamente, y la retina. Las estructuras del segmento anterior dorsal y ventral de los peces cebra adultos homocigotos mutantes (**Figura 26 D-F**) fueron similares a las de los animales silvestres (**Figura 26 A-C**). No se observaron alteraciones evidentes en la retina y en el resto de las estructuras, aunque aparentemente, se observó un mayor plegamiento en el margen ciliar de la retina en peces cebra mutantes (**Figura 26 D y E**, flecha) en comparación con animales silvestres (**Figura 26 A y B**).

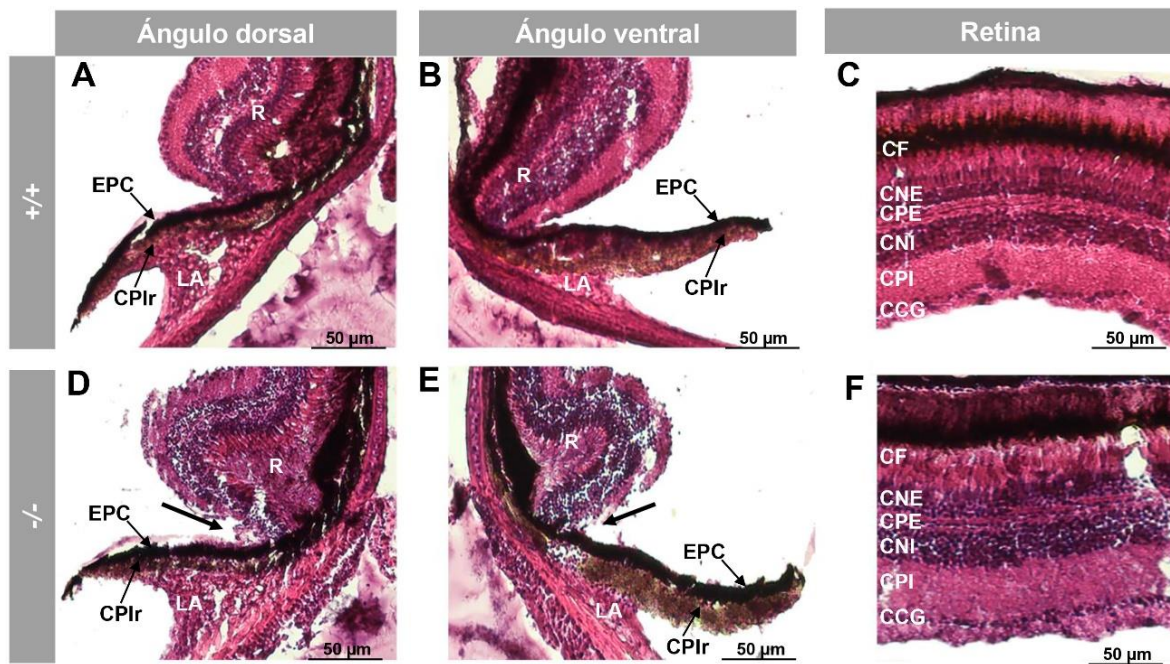


Figura 26. Histología del segmento anterior ocular y de la retina de peces cebra mutantes para el gen *myoc* adulto. Las secciones de tejido de los peces silvestres (A-C) y los homocigotos mutantes para *myoc* (D-F) se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las imágenes son representativas de tres individuos de cada genotipo. CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; IPE: epitelio pigmentario del iris; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; EPC: epitelio pigmentado ciliar; LA: ligamento anular; CPIr: células pigmentarias del iris; R: retina; +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

Estos datos muestran que, en nuestras condiciones experimentales, los peces cebra KO para *myoc* no presentan ningún fenotipo ocular aparente tanto macroscópico como microscópico en comparación con peces silvestres.

No obstante, una observación inesperada fue que, a lo largo del proceso de obtención de las diferentes generaciones, observamos una ausencia constante de hembras entre los peces homocigotos mutantes. Para confirmar esta observación, se realizaron un total de ocho cruces diferentes de hermanos heterocigotos de tres generaciones consecutivas (F3 a F5). La descendencia de cada cruce se creció hasta la edad adulta (3 meses), se genotipó mediante PAGE y se calculó la proporción de machos y hembras correspondiente a cada genotipo basándose en las características externas, tales como la forma del cuerpo, la coloración de la aleta anal y la presencia o ausencia de papila genital (Parichy et al., 2009). Observamos una disminución significativa de la proporción de hembras que se correlacionaba con el genotipo KO, es decir, aproximadamente un 41% de los animales silvestres (+/+) eran hembras, mientras que este porcentaje se reducía a un 25% en los peces heterocigotos (+/-) y a un 0% en los homocigotos (-/-) (Figura 27 A). Como control para evaluar una posible letalidad limitada al sexo femenino y

asociada al alelo homocigoto mutante, se analizó el genotipo y las proporciones de supervivencia en la descendencia de los endocruces de heterocigotos. Las proporciones genotípicas no difirieron significativamente de los valores mendelianos esperados (+/+ 25%, +/- 50% y -/- 25%, $p > 0,05$) (**Figura 27 B**) y la supervivencia a las 24 y 96 hpf fue similar a la de los embriones que se obtuvieron de progenitores silvestres ($p < 0,05$) (**Figura 27 C**).

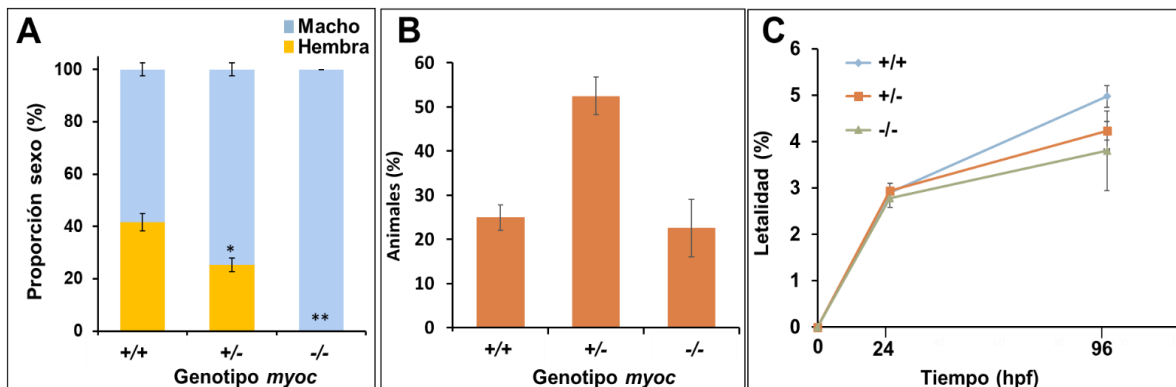


Figura 27. Ausencia de hembras entre los peces cebra KO para *myoc*. Se realizaron ocho endocruces de peces heterocigotos de *myoc* y se seleccionaron al azar 30-35 embriones por cruce ($n = 256$), se criaron hasta la edad adulta y se genotiparon mediante PAGE. Se calculó la proporción de sexos en función del genotipo para el gen *myoc* (**A**). Proporciones de genotipos observadas (**B**) y supervivencia de los embriones (**C**). Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). Los asteriscos indican significación estadística en comparación con el silvestre. (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$; +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

Estos datos permiten descartar que la proporción de sexos observada en estos animales esté sesgada por la letalidad dependiente del sexo asociada con la pérdida de función total o parcial del gen *myoc*.

Para analizar también la fertilidad de los machos KO de *myoc*, se cruzaron 11 machos homocigotos hermanos seleccionados al azar con hembras silvestres, todos ellos fecundaron los huevos tras el desove (datos no mostrados). Estos datos confirman la fertilidad de los peces y descarta errores en la clasificación del sexo, indicando el posible papel clave que podría desempeñar la proteína miocilina en la determinación del sexo en el pez cebra.

*Estudio de la gónada inmadura de la línea homocigota para *myoc**

Para estudiar en profundidad el desarrollo de las gónadas de la línea homocigota KO y ver si existían diferencias con peces silvestres, se realizaron dos ensayos. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo anti-vasa. La proteína vasa interviene en

el desarrollo de las células germinales y de las gónadas, así como en la regulación del ciclo celular meiótico, por lo que se decidió analizar su expresión para evaluar el desarrollo de las gónadas del pez cebra *KO*. Para ello, se emplearon secciones consecutivas, numeradas de la 1 a la 4, de gónadas juveniles (28 dpf) de ocho individuos (cuatro silvestres y cuatro homocigotos). La inmunotinción de vasa confirmó la presencia de gónada juvenil en la parte ventral de la vejiga natatoria y sobre el intestino tanto de los animales silvestres (+/+) (**Figura 28 A y B**) como de los homocigotos *KO* (**Figura 28 E y F**). La inmunodetección de miocilina en secciones de tejido consecutivas reveló algunas células positivas en gónadas juveniles silvestres (**Figura 28 C**, flechas). Como se esperaba, no se observó señal de miocilina en el tejido gonadal de animales homocigotos *KO* (**Figura 28 G**) indicando que la señal era específica.

Dado que la apoptosis de los ovocitos participa en el mecanismo de diferenciación testicular y ovárica en la transición entre las etapas larvaria y juvenil de pez cebra (Ye et al., 2019) se estudió la apoptosis gonadal en animales *KO* utilizando un ensayo TUNEL en una de las secciones de tejido (**Figura 28 D y H**, Sección 4). No se observaron células positivas en ninguna de las gónadas de los cuatro individuos silvestres (**Figura 28 D**) lo que indica que probablemente correspondían a hembras juveniles. Por el contrario, el tejido germinal de los animales *KO* mostró células primordiales germinales TUNEL-positivas, caracterizadas por núcleos grandes y redondos (**Figura 28 H**, flechas). Las pequeñas células nucleadas que se localizaban en la pared intestinal externa también eran positivas a la tinción TUNEL (**Figura 28 H**, cabezas de flechas). La ausencia de marcaje en los respectivos controles negativos (secciones de tejido cuatro a seis) apoyó la especificidad de los resultados (**Figura suplementaria 5**).

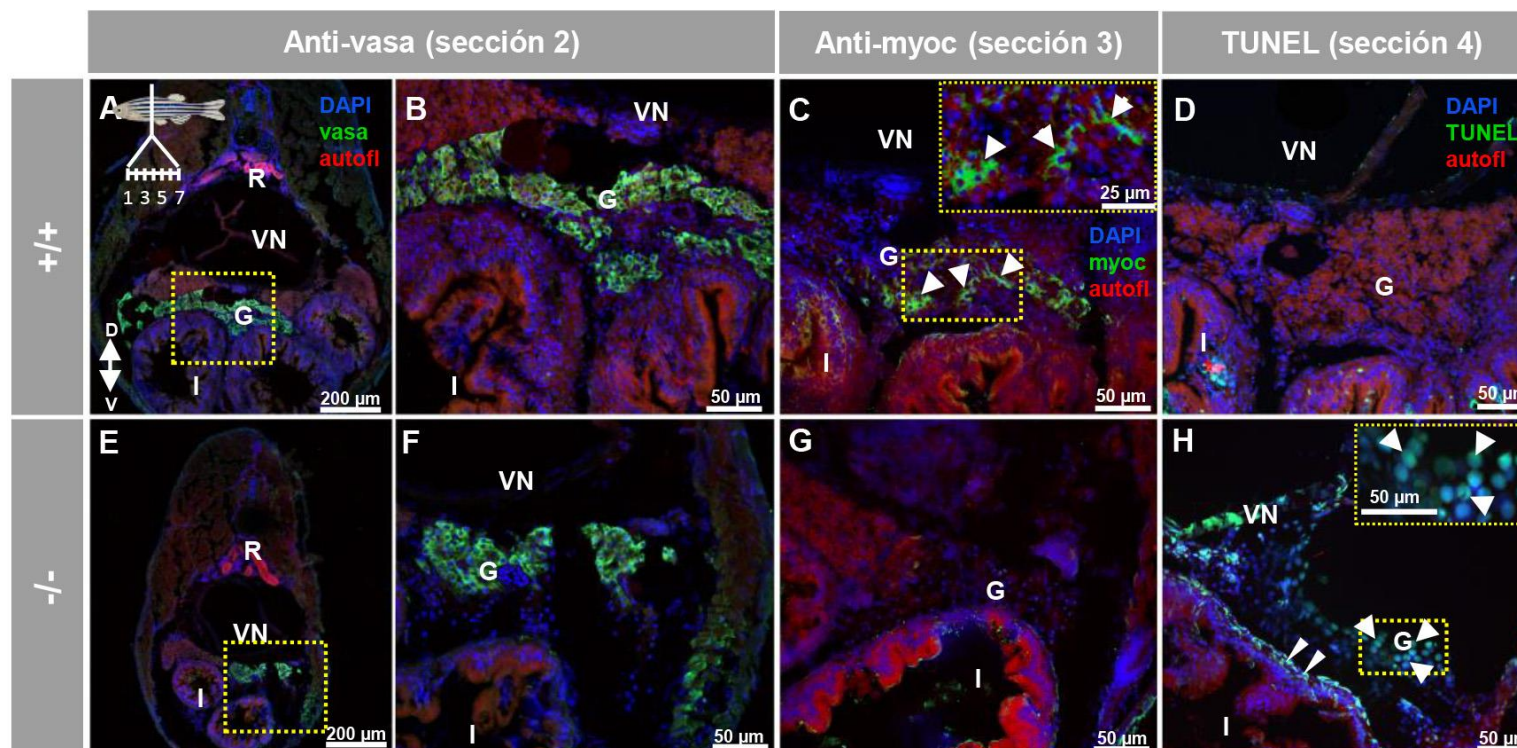


Figura 28. Expresión de vasa, miocilina y análisis de apoptosis (TUNEL) en larvas (28 dpf) de pez cebra KO. Los análisis se realizaron en tres cortes histológicos consecutivos (2 a 4, inserto de la esquina superior izquierda). La inmunotinción para detectar el marcado de gónada vasa se llevó a cabo en la sección 2 (A, B, E y F, señal verde). Las zonas indicadas con rectángulos amarillos en (A) y (E) se amplían en (B) y (F), respectivamente. La sección tisular 3 se incubó con un anticuerpo anti-miocilina (TNT) para localizar la expresión de miocilina (C y G). La apoptosis se evaluó en la sección tisular 4 mediante el ensayo TUNEL (D y H). Las flechas en (C) indican la inmunorreactividad de miocilina. Las flechas y las cabezas de flecha en H indican células positivas para TUNEL en el tejido gonadal y en la pared intestinal externa, respectivamente. G: gónada. I: intestino. R: riñón. VN: vejiga natatoria; +: alelo silvestre; -: alelo mutante. La doble flecha vertical en (A) indica el eje dorsoventral (D: dorsal; V: ventral). Las imágenes son representativas de los resultados observados en cuatro peces de cada genotipo. Los controles negativos de gónada juvenil se muestran en la **Figura suplementaria 5** (secciones de tejido de 5 a 7).

6.1.6 Estudio transcriptómico de peces cebra *knock-out* para *myoc*

Con el objetivo de estudiar genes diferencialmente expresados debido a la pérdida de función de *myoc*, se realizó un análisis comparativo del transcriptoma completo de peces cebra adultos (2,5 meses) silvestres y homocigotos KO. El ARNm se extrajo de un conjunto de peces hermanos obtenidos mediante endocruces de peces heterocigotos mutantes para el gen *myoc* de la generación F4. Para minimizar el efecto de la variabilidad individual, se agruparon 3 peces en cada muestra y se analizaron dos réplicas biológicas independientes de cada grupo experimental. Una vez extraído el ARN, se determinaron espectrofotométricamente la concentración, pureza e integridad (RIN) de cada muestra. Las muestras se consideraron válidas con valores de RIN >7.

Se excluyeron del estudio un total de 10.168 genes que presentaban recuentos de lecturas nulos en todas las muestras, quedando 29.819 genes para su posterior análisis. El análisis transcriptómico identificó tanto ARN codificantes como múltiples ARN poliadenilados no codificantes. La evaluación de la similitud entre las muestras, mediante el coeficiente de Pearson, mostró que las réplicas biológicas de cada grupo experimental eran similares (**Figura 29 A**). La representación mediante mapas de calor del análisis de agrupación jerárquica, realizado con genes que mostraban diferencias significativas de expresión (≥ 2 , $p < 0,05$), reveló agrupaciones similares de genes diferencialmente expresados (DEG) entre las dos réplicas de cada grupo experimental, indicando que la mayoría de los patrones de expresión génica identificados eran reproducibles (**Figura 29 B**).

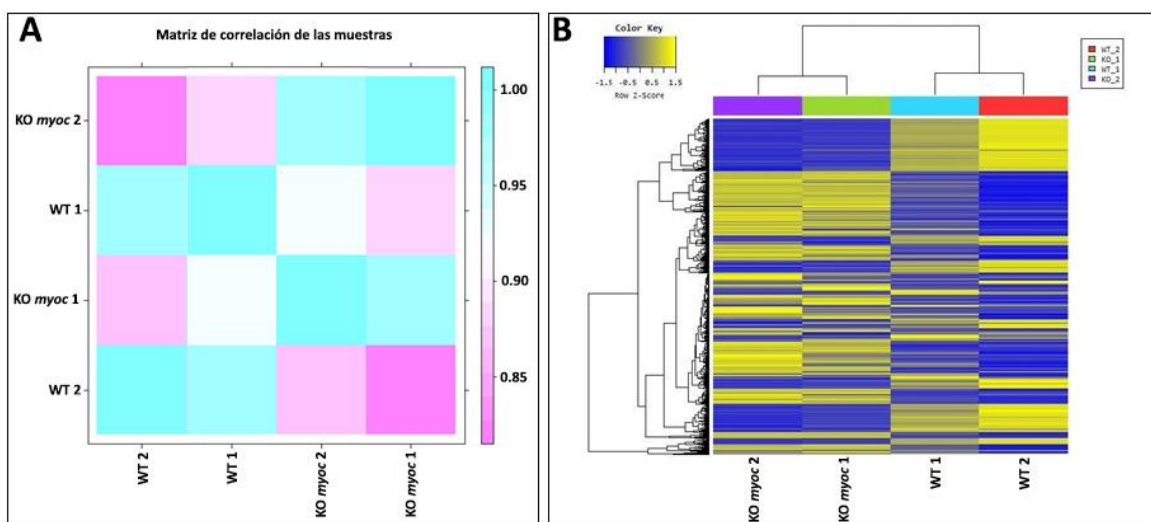


Figura 29. Análisis de la expresión diferencial de los datos obtenidos en el estudio transcriptómico de los peces KO *myoc*. (A) Matriz de correlación que muestra la similitud entre las réplicas (macho KO para *myoc* vs. macho *wild-type*). La similitud entre las muestras se evalúa mediante el

coeficiente de Pearson ($-1 \leq r \leq 1$). Cuanto más cerca esté el valor de 1, más similares son las muestras. **(B)** Mapa de calor del análisis de la agrupación jerárquica de las réplicas de los DEGs (macho KO *myoc* vs. macho tipo silvestre). El análisis de agrupación se realizó utilizando la distancia Euclídea y la vinculación completa como medida de similitud. Los resultados muestran 3000 DEGs que cuyas diferencias significativas ($p < 0,05$) de expresión > 2 o < -2 . KO: *knock out*; WT: silvestre.

Se identificó una media de 6.184 genes significativamente sobreexpresados (diferencia de expresión ≥ 2 , $p < 0,05$) consistentemente en los peces KO, tras realizar cuatro comparaciones (KO1 vs. WT1, KO1 vs. WT2, KO2 vs. WT1 y KO2 vs. WT2). Del mismo modo, una media de 6.023 genes fueron significativamente subexpresados en los animales KO (diferencia de expresión ≤ -2 , $p < 0,05$) tras aplicar el mismo procedimiento (**Figura 30**). Seguidamente se realizó un análisis de enriquecimiento de procesos biológicos utilizando la base de datos KEGG con los genes sobrerrepresentados en los peces KO. Se encontraron 14 vías moleculares relacionadas con el metabolismo y 6 relacionadas con el procesamiento de la información genética (**Figura suplementaria 6**).

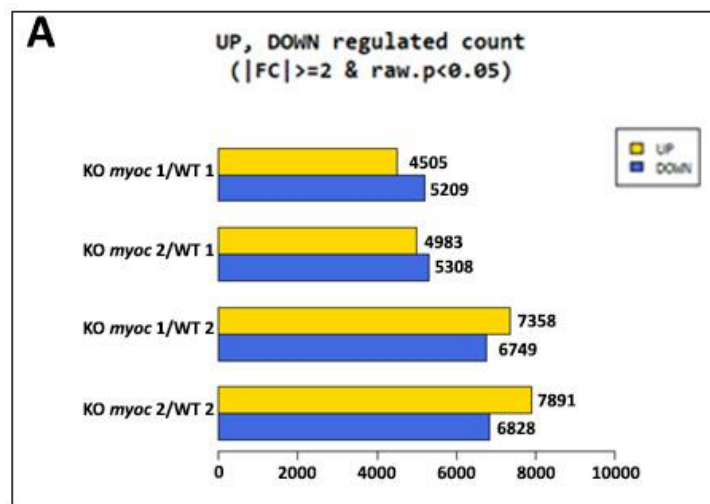


Figura 30. Número de genes diferencialmente expresados en peces cebrá macho y KO para el gen *myoc*. Se seleccionaron los genes con diferencias de expresión ≥ 2 o ≤ -2 y $p < 0,05$.

Una vez realizado un primer análisis, seleccionamos los 50 genes principales regulados al alza y a la baja (**Figura 31**, **Tabla suplementaria 1** y **Tabla suplementaria 2**) para realizar los análisis posteriores.

El grupo de los 50 genes más sobreexpresados con una diferencia de expresión ($|FC| \geq 2$) fue sometido a un análisis de enriquecimiento funcional para identificar genes implicados en diferentes vías, mediante el programa *ShiniGO* (Ge et al., 2020). Éste mostró DEGs significativos

en varias categorías funcionales, incluyendo procesos biosintéticos y catabólicos y regulación de procesos metabólicos (Tabla suplementaria 3) de acuerdo con el análisis general de KEGG. Además, tanto las categorías como los procesos relacionados con el desarrollo, el desarrollo de la estructura anatómica y la reproducción también se enriquecieron significativamente en este grupo.

Por otro lado, el grupo de los 50 genes más subexpresados (Figura 31) mostró DEGs significativos en categorías funcionales relacionadas principalmente con procesos biosintéticos, reproducción, meiosis, transducción de señales SMAD y ciclo celular (Tabla suplementaria 4).

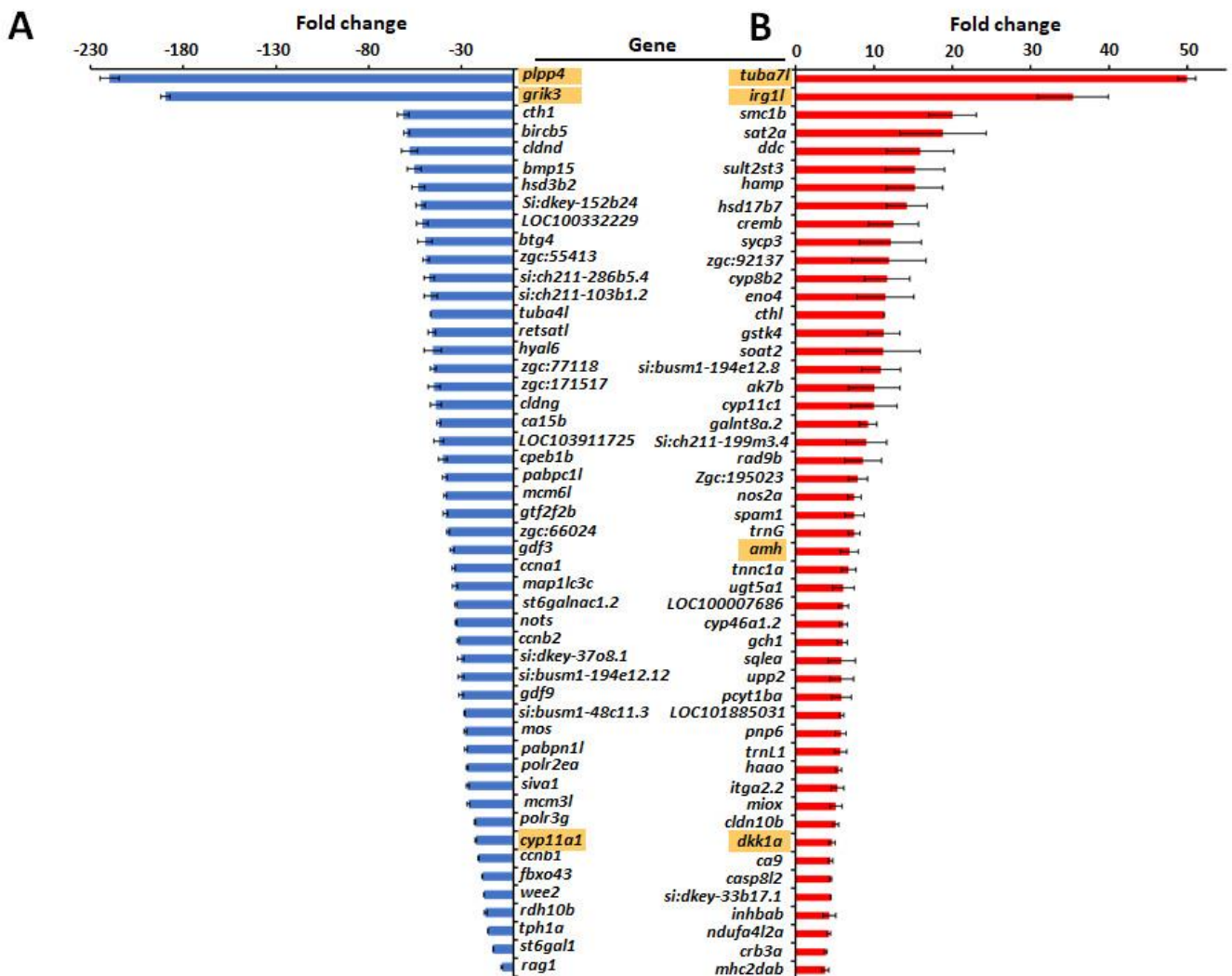


Figura 31. Identificación de los cincuenta genes con mayores diferencias de expresión en el pez cebra macho KO para *myoc*. Genes regulados a la baja (A) y al alta (B) en los peces cebra KO machos, identificados por secuenciación de ARN de alto rendimiento con diferencias significativas en las cuatro comparaciones (KO1 vs. WT1, KO1 vs. WT2, KO2 vs. WT1 y KO2 vs. WT2). Los genes sombreados en naranja indican aquellos que fueron analizados por qRT-PCR.

Para validar los resultados del transcriptoma, seleccionamos en primer lugar los dos genes más sobreexpresados (*tuba7l* e *irg1l*) y los dos más subexpresados (*plpp4* y *grik3*) en los peces KO y se confirmó la expresión diferencial mediante qRT-PCR. Además, se seleccionaron para ser reevaluados por esta misma técnica otros nueve genes con diferencias de expresión absolutas superiores o igual a 2. Este grupo incluía cinco genes representativos conocidos por jugar un papel clave en la diferenciación sexual del pez cebra (*dmrt1*, *amh*, *sycp3*, *cyp11a1* y *star*) y cuatro genes de la vía *Wnt* que también estaban subexpresados en el transcriptoma de los peces KO para *myoc* (*dkk1a*, *lef1*, *ctnnbip1* y *dvl3a*). Estos últimos genes fueron seleccionados en base a su papel en la señalización de la vía *Wnt* en la diferenciación sexual del pez cebra debido a que *myoc* podría actuar como modulador de esta vía (Kwon, Lee, Ji, Rubin, & Tomarev, 2009).

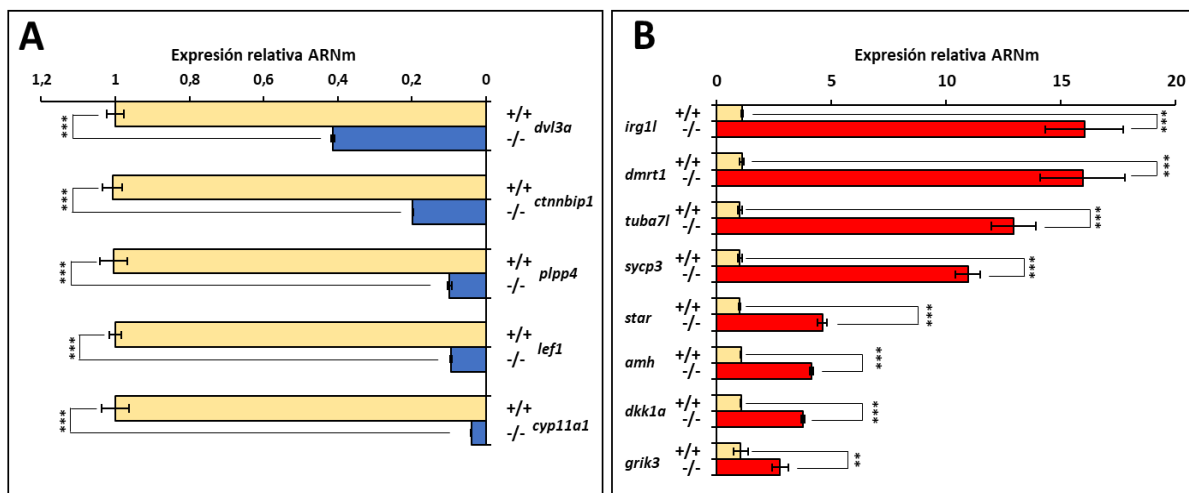


Figura 32. Confirmación mediante qRT-PCR de la expresión génica diferencial de los genes seleccionados. Se muestran los genes sobreexpresados (A) y subexpresados (B) comprobados por qRT-PCR. Se midieron los niveles de ARNm de las muestras enviadas al transcriptoma. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos a las muestras de peces silvestres. Los valores representan la media de tres experimentos diferentes. (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$. +: alelo silvestre; -: alelo mutante.

Los resultados de la qRT-PCR (**Figura 32** y **Tabla suplementaria 5**) mostraron una buena correlación con los datos del transcriptoma y confirmaron la mayoría de los genes diferencialmente expresados excepto *grik3* (**Figura 32 B** y **Tabla suplementaria 5**). La mayor sensibilidad de la qRT-PCR en comparación con el análisis transcriptómico y las diferencias técnicas entre los dos procedimientos podrían explicar las diferencias observadas entre los valores absolutos de diferencia de expresión.

Además de los DEGs mencionados, encontramos una expresión significativamente disminuida en los peces KO para *myoc* de otros dos genes relevantes implicados en estos procesos: *ctnnb2*

(diferencia de expresión: -3,6; p-valor: $1,0 \times 10^{-11}$), que codifica la β -catenina 2, y *cyp19a1* (diferencia de expresión: -18,1; p-valor: $2,5 \times 10^{-7}$), que se propone como un gen clave en la diferenciación del ovario (Lau et al., 2016a). Estos datos no han sido confirmados por qRT-PCR. Como era de esperar, la expresión de *myoc* se vio significativamente reducida en los animales KO (diferencia de expresión: -4,7; p-valor: $1,2 \times 10^{-18}$), confirmando nuevamente la disminución de la expresión del gen diana.

6.2 Generación y caracterización de una línea de pez cebra transgénica para el gen *myoc*

6.2.1 Generación de una línea con sobreexpresión constitutiva de *myoc* mediante transgénesis mediada por el transposón Tol2

Obtención de las construcciones de ADN recombinante

Con el objetivo de continuar explorando la función biológica del gen *myoc* se generó, mediante transgénesis mediada por el transposón Tol2, una línea transgénica de pez cebra que sobreexpresaba *myoc*. Dicha línea fue generada por los doctores José Daniel Aroca Aguilar, Jesús José Ferre Fernández y Julio Escribano en el laboratorio de Genética Humana de la UCLM y su caracterización molecular y fenotípica forma parte de esta tesis doctoral. Para la generación de las construcciones de transgénesis se realizó, tal y como se ha detallado en materiales y métodos, una reacción de recombinación entre los vectores p5E, pME y p3E y el vector pDestTol2pA2 del kit Tol2 (**Figura 33**). El vector p3E cuenta con la región codificante de la proteína mCherry (proteína monomérica roja fluorescente), una proteína de la familia RFP (proteínas rojas fluorescentes) que, debido a su rápida maduración, intensidad y la alta fotoestabilidad ha demostrado ser un marcador adecuado para la obtención de imágenes *in vivo*. Como resultado del proceso de recombinación, se generó una construcción bicistrónica que, al ser integrada en el genoma del pez, expresaba las proteínas mCherry y miocilina bajo el control del promotor del gen de la β -actina.

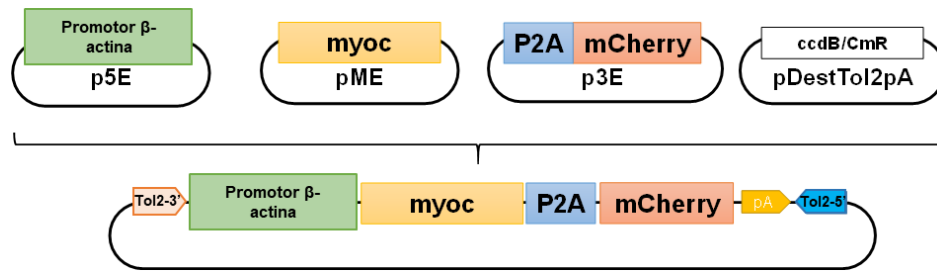


Figura 33. Generación del *cassette* bicistrónico para la obtención de la línea transgénica de miocilina mediante el sistema *gateway*. El diagrama muestra las principales características de los vectores *gateway* empleados para crear el *cassette* transgénico bicistrónico de expresión de *myoc* y de *mCherry*. La construcción final contiene el promotor constitutivo del gen de la β -actina2 seguido del ADNc de *myoc* de pez cebra, el péptido viral bicistrónico 2A y el ADNc de *mCherry*. El vector incluye la señal de poliadenilación (pA) al final de la construcción y los sitios de recombinación Tol2 que flanquean la construcción. p5E-bactin: plásmido de entrada 5', que contiene 5,3 kb del promotor del gen de la β -actina 2 de pez cebra; pME: plásmido de entrada medio que contiene el ADNc de miocilina de pez cebra; P2A: péptido autolítico 2A del Teschovirus porcino-1; p3E: plásmido de entrada 3', que contiene el péptido bicistrónico 2A y el ADNc de *mCherry*; *ccdB*: gen inductor de apoptosis dirigido a la ADN girasa; *CmR*: gen de resistencia al cloranfenicol; pDestTol2pA: vector de destino.

Microinyección y selección de embriones transgénicos fluorescentes

El plásmido bicistrónico *myoc*-P2A-*mcherry* se microinyectó en embriones de pez cebra en fase de una célula junto con el ARNm de la enzima transposasa Tol2, que cataliza la integración del transgén en el genoma (Figura 34 A). Dado que la construcción expresaba *mCherry*, fue posible la visualización de los embriones fluorescentes durante las primeras horas del desarrollo. Como se esperaba, a las 24 hpf la mayoría de los individuos de la generación F0 mostraron fluorescencia en mosaico (Figura 34 B, cabezas de flecha). Gracias a la fluorescencia, se identificaron los fundadores que transmitían el transgén bicistrónico *myoc*-P2A-*mCherry* (Figura 34 B).

Para aumentar la probabilidad de obtener peces portadores de una inserción transgénica única, y por tanto con una herencia mendeliana predecible del transgén funcional, el fundador seleccionado se cruzó dos veces consecutivas con peces cebra silvestres AB (Figura 34 A) obteniendo así la generación F2. Finalmente, la generación F3 heterocigota se obtuvo mediante un cruce de peces transgénicos heterocigotos F2 con peces silvestres. Los animales de la generación F3 mostraron una segregación del 50% de la fluorescencia, apoyando la integración exitosa del transgén en la línea germinal del fundador y la existencia de una única inserción genómica en la línea transgénica obtenida.

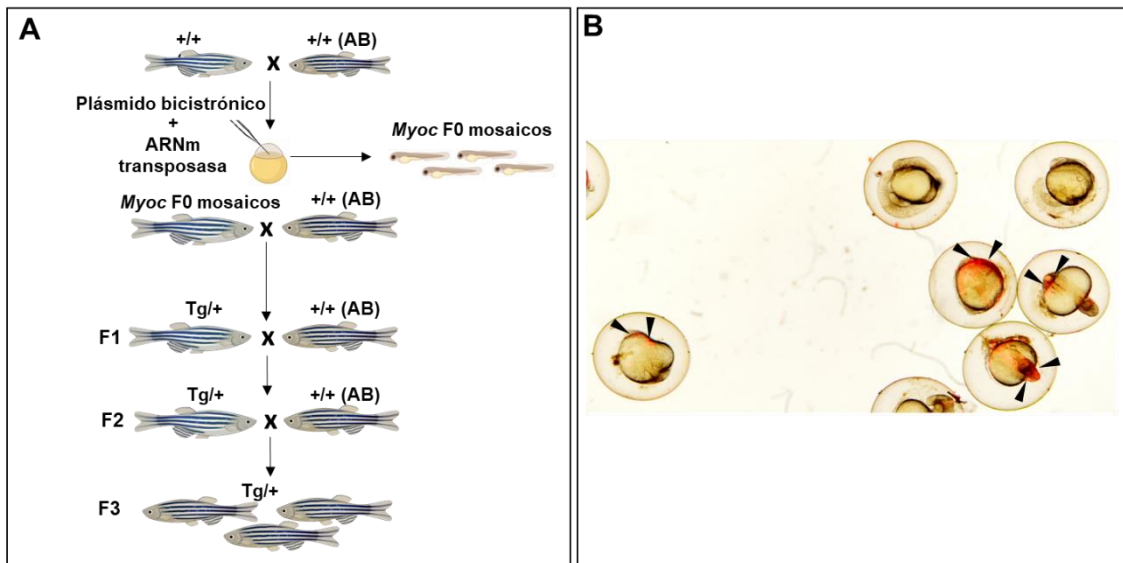


Figura 34. Procedimiento de microinyección y esquema de los cruces realizados para el establecimiento de la línea transgénica de pez cebra. (A) El plásmido que contenía el *cassette* bicistrónico se inyectó en embriones de pez cebra silvestres en fase de una célula, junto con el ARNm de la transposasa sintetizado *in vitro*. Los animales de la generación F0 transgénicos se criaron hasta la edad adulta y se cruzaron con peces cebra silvestres. Los heterocigotos transgénicos F1 se cruzaron con peces silvestres y la progenie (F2) se cruzó de nuevo con peces silvestres para aumentar la probabilidad de obtener inserciones de un solo transgén con transmisión Mendeliana. Se utilizó la herramienta *Biorender* para obtener este esquema. (B) Detección de fluorescencia mCherry en embriones F0 (24 hpf). Se observa que la mayoría de los embriones microinyectados presentan fluorescencia en mosaico (puntas de flecha negras) correspondiente a la expresión de la proteína mCherry. Las imágenes de fluorescencia roja y de campo claro están superpuestas. Las fotos son representativas de un mínimo de 5 individuos.

6.2.2 Identificación del lugar de inserción del ADN transgénico

Con el fin de determinar el punto genómico de inserción de la construcción bicistrónica se realizó una PCR anidada. Para ello, se extrajo el ADN genómico de un conjunto de embriones silvestres y transgénicos heterocigotos de 6 dpf, que posteriormente fue digerido con la enzima de restricción *AluI* (Figura 35 A). Una vez finalizada la digestión, se procedió a su unión con ligasa T4 para circularizar los fragmentos obtenidos. A continuación, se realizaron dos rondas de PCR anidada utilizando los cebadores específicos descritos previamente (Kawakami et al., 2004a), correspondientes a los dos extremos (5' y 3') que contienen las secuencias del transposón Tol2. El producto de la segunda PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 35 B). La PCR del extremo 5' originó dos amplicones específicos (A5-1 y A5-2, Figura 35 B), que no se observaron en el control realizado con ADN silvestre. Igualmente, la PCR correspondiente al extremo 3' dio lugar a otros dos productos (A3-1 y A3-2, Figura 35 B) que tampoco se observaron en el control correspondiente. Las bandas amplificadas de cada extremo corresponden a la autoligación de diferentes fragmentos que resultaron del corte en diferentes dianas *AluI* situadas

en la proximidad de los sitios de inserción. El ADN de las bandas fue purificado y secuenciado mediante el método Sanger como se describe en materiales y métodos, empleando un cebador localizado en la secuencia Tol2-5' (**Tabla 5**, tol2-5'/f1), para los amplicones derivados del extremo 5', y un cebador localizado en la secuencia Tol2-3' (**Tabla 5**, tol2-3'/f1), en el caso de los amplicones derivados del extremo 3'.

El análisis de los resultados obtenidos reveló la identidad de las secuencias genómicas que rodean el sitio de inserción del transgén. El análisis mediante las herramientas BLAST (*Basic Logic Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1990) y *Clustal* (Thompson et al., 1994) permitió identificar unas secuencias correspondientes al cromosoma 11 del pez cebra flanqueadas por las secuencias Tol2, mostrando que la construcción transgénica se introdujo en la posición 8.560.932 del cromosoma 11. Se diseñaron cebadores de secuenciación adicionales utilizando estas secuencias del cromosoma 11 (**Figura 35 A**, flechas negras), y los nuevos electroferogramas revelaron las secuencias 5'- y 3'-Tol2 situadas al final de la construcción transgénica (**Figura 35 C**), seguidas de una duplicación de ocho pb (**Figura 35 C**, secuencia subrayada), característica de la transposición mediada por Tol2 (Kawakami et al., 2000). Los electroferogramas también mostraron los nucleótidos genómicos que flanquean las secuencias de Tol2 en el sitio de integración. A continuación, con la herramienta *Ensembl* se evaluó la existencia de genes cercanos al lugar del punto de inserción. Se observó que el transgén se introdujo en una región intergénica (**Figura 35 D**) localizado aguas arriba del gen *tbl1xr1a*, lo que muestra que no se alteró ningún gen como consecuencia de la inserción. Este dato indica que los posibles fenotipos desarrollados por los peces transgénicos son debidos a la sobreexpresión del gen, aunque no podemos descartar completamente la alteración de algún elemento regulador de la expresión génica como consecuencia de la inserción del transgén y como consecuencia de ello la contribución a los fenotipos presentes en los animales transgénicos.

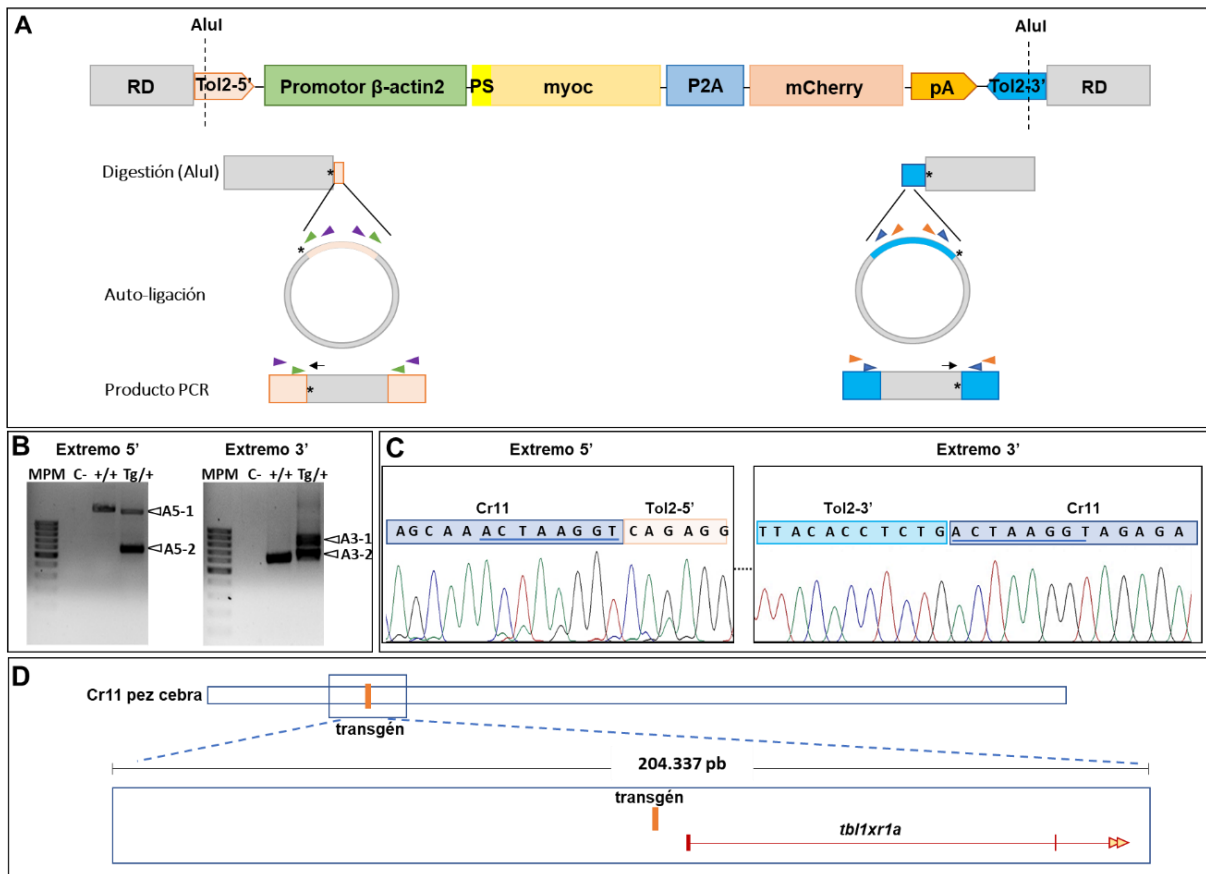


Figura 35. Identificación de la región genómica de inserción del transgén. (A) Esquema del proceso de la PCR anidada. Sobre el esquema del transgén bicistónico se indica la localización de las dianas de restricción *Alul* en las secuencias Tol2, seguido de las etapas del proceso. Las cabezas de flecha moradas y naranjas muestran la posición de los cebadores de la primera PCR, mientras que las verdes y azules corresponden a la segunda PCR, y cuyas secuencias se describen en materiales y métodos **Tabla 5**. Los rectángulos en gris (RD) corresponden a las regiones flanqueantes desconocidas; PS: péptido señal de miocilina de pez cebra; P2A: péptido autolítico 2A del Teschovirus porcino-1. Únicamente se muestran los lugares de corte de la enzima *Alul* (líneas discontinuas negras) en los extremos Tol2. (B) Electroforesis en gel de agarosa de la segunda ronda de PCR anidada. Las cabezas de flechas blancas indican los amplicones con una longitud diferente a la de los obtenidos a partir de ADN silvestre, cuya secuencia fue determinada mediante el método Sanger. (C) Secuenciación Sanger representativa de los amplicones obtenidos por la PCR anidada. La secuencia azul subrayada corresponde a la duplicación de 8 nucleótidos resultante de la inserción mediada por el transposón Tol2. (D) Esquema de la región cromosómica en la que se produjo la inserción del transgén. C-: control negativo de la PCR; MPM: marcador de pesos moleculares; Tg: transgénico; +/-: Silvestre.

6.2.3 Confirmación mediante qRT-PCR de la sobreexpresión de *myoc* en la línea transgénica

Con el fin de confirmar si la línea transgénica establecida sobreexpresaba *myoc*, se cuantificó el ARNm mediante PCR cuantitativa empleando un grupo de 20 larvas transgénicas de 6 dpf, correspondientes a la generación F4. Como control se utilizó una muestra similar de larvas silvestres. El análisis de los resultados reveló un aumento aproximado de 3,5 veces la cantidad de

ARNm de *myoc* en las larvas transgénicas en comparación con las larvas silvestres (**Figura 36**), confirmando que la línea transgénica generada sobreexpresa *myoc*.

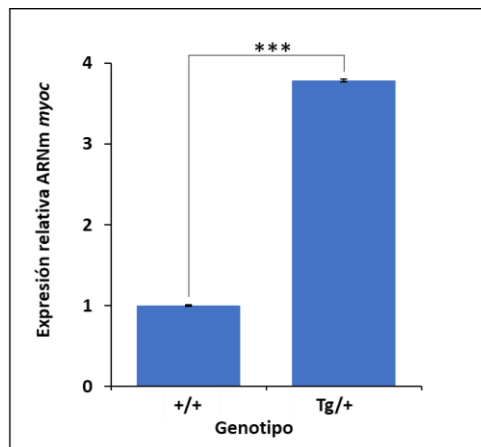


Figura 36. Cuantificación mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de ARNm de *myoc* en embriones de peces cebra transgénicos. Se midieron los niveles de ARNm en grupos de 20 larvas de pez cebra transgénicos de *myoc* de la F4 (6 dpf). Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos a las larvas silvestres. Los valores representan la media de tres experimentos independientes. ***: $p < 0,001$. Tg: transgénico; +: silvestre.

6.2.4 Caracterización fenotípica de la línea transgénica de pez cebra

Una vez generada y establecida la línea transgénica, se procedió a su caracterización histológica para analizar la aparición de posibles fenotipos asociados a la sobreexpresión de *myoc*. Tal y como se comentó en el capítulo anterior, los ojos fueron el principal foco de estudio del análisis fenotípico.

En primer lugar, se realizó una caracterización macroscópica de las larvas (96 hpf) provenientes de un cruce de animales transgénicos heterocigotos (F3) con silvestres. Un 48% de las larvas transgénicas mostraron fluorescencia roja emitida por la expresión de la proteína mCherry, especialmente visible en la cabeza y en la zona dorsal (**Figura 37 A**). La observación microscópica no mostró diferencias morfológicas significativas entre las larvas transgénicas (**Figura 37 B y C**) y las silvestres (**Figura 37 D y E**).

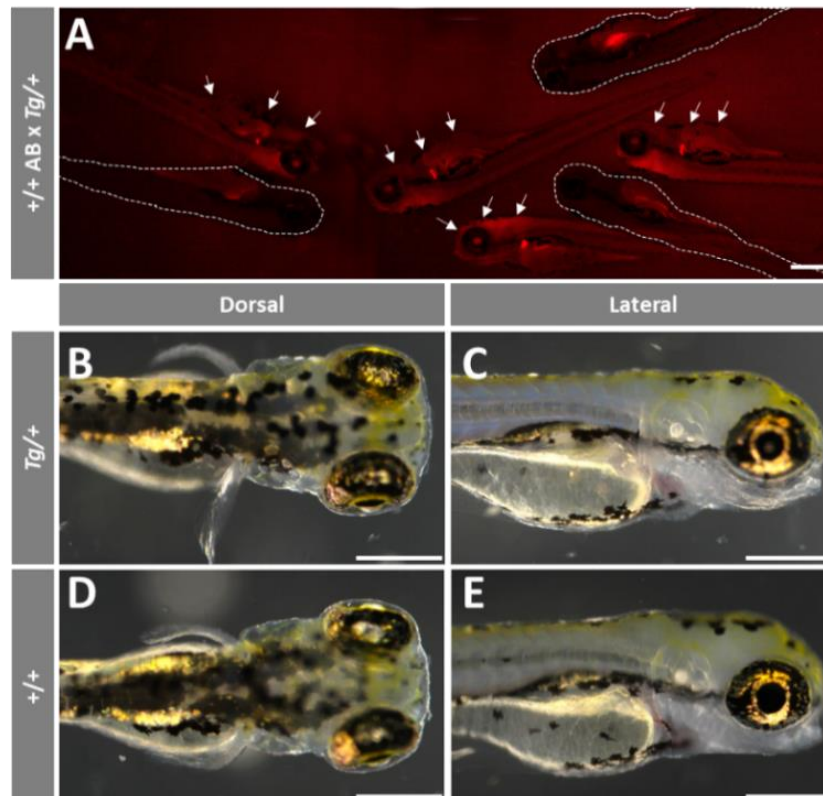


Figura 37. Análisis de los fenotipos macroscópicos en larvas de pez cebra (96 hpf) transgénicas para el gen *myoc*. (A) Peces transgénicos heterocigotos se cruzaron con peces silvestres para obtener la F3. La descendencia se genotipó observando la fluorescencia a las 96 hpf. Imágenes de campo claro representativas de larvas transgénicas (B y C) y silvestres (D y E). Flechas blancas: fluorescencia emitida por mCherry; contorno blanco; larvas sin fluorescencia. Barra de escala: 200 μm . Las imágenes son representativas de diez individuos analizados. Tg: transgénico; +/-: silvestre.

Se analizó la presencia de fenotipos macroscópicos en individuos transgénicos heterocigotos adultos en la generación F3 a los 2 años. Hasta esa edad, un total de 21 animales (14 machos y 7 hembras) sobrevivieron. Además, se observó que ocho de los catorce machos (57%, **Figura suplementaria 7**) desarrollaron fenotipos oculares variables que afectaban al segmento anterior y/o al globo ocular. Tres de los machos transgénicos presentaban un sobrecrecimiento bilateral del iris que daba lugar a pupilas pequeñas o ausentes (**Figura 38 B-E**, flechas amarillas) con córneas turbias y, en algunos ojos, aplanadas (**Figura 38 F-G**, flechas negras), lo que sugiere la existencia de anomalías en el estroma corneal. También se observó un tamaño reducido de la cámara anterior (**Figura 38 A, F y G**) y globos oculares unilateralmente agrandados (**Figura 38 A**, asterisco). Los cinco peces cebra transgénicos restantes mostraron alteraciones unilaterales similares en el iris, la córnea y el segmento anterior (**Figura 38 H-N**), y tres de ellos también mostraron ojos unilateralmente agrandados (**Figura 38 H**, asterisco). Estos fenotipos no se observaron en los peces silvestres de la misma edad (**Figura 38 O-U**), ni en ninguna de las hembras transgénicas

(Figura suplementaria 8), lo que indica que estos fenotipos son característicos de los peces transgénicos machos y de edad avanzada. En la **Figura suplementaria 8**, también se muestran los peces transgénicos hermanos machos que no mostraron fenotipos oculares.

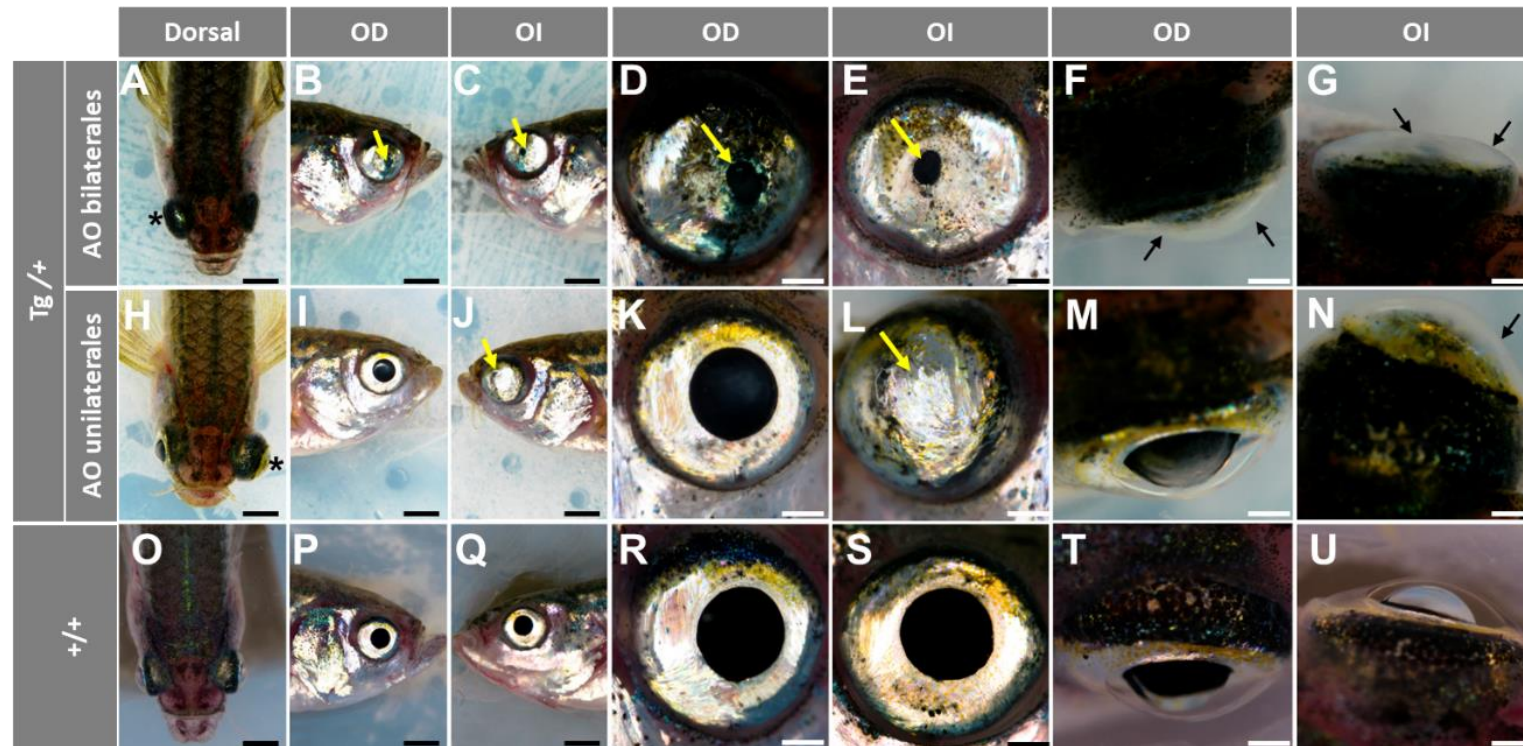


Figura 38. Fenotipos oculares variables en los peces cebra adultos (2 años) transgénicos para el gen *myoc*. Imágenes de campo claro representativas de las alteraciones oculares bilaterales (A-G) y unilaterales (H-N) presentes en los peces cebra macho transgénicos. Como control se muestra un macho silvestre de 2 años (O-U). Flechas amarillas: reducción o ausencia de pupilas; Flechas negras: turbidez corneal; Asterisco: globo ocular agrandado. Barra de escala: 200 μ m en los paneles A-C, H-J, O-Q y 50 μ m en D-G, K-N y R-U. AO: alteraciones oculares; OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo; Tg: transgénico; +/+ : Silvestre. Las imágenes son representativas de 7 peces de cada genotipo.

Para caracterizar en profundidad estos fenotipos, se realizó en primer lugar el análisis histológico de cortes seriados y teñidos con hematoxilina eosina o Rojo Sirio, procedentes de dos peces transgénicos y tres peces silvestres. La tinción con Rojo Sirio se usó para evaluar la matriz extracelular y la musculatura, ya que tiñe de color rojo y amarillo las fibras de colágeno y musculares, respectivamente (Dapson et al., 2011).

La observación general de las secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina reveló distintos grados de alteraciones caracterizadas por un notable engrosamiento de la córnea y su fusión con el iris (**Figura 39 A y B**, punta de flecha negra y flecha negra, respectivamente), y confirmó la presencia de una cámara anterior reducida o ausente en los peces con fenotipos oculares más graves (**Figura 39 A y B**, flechas negras), lo que se correlaciona con las observaciones *in vivo* (**Figura 38 F, G y N**). La cápsula del cristalino mostraba un engrosamiento y un plegamiento variable (**Figura 39 A y B**, flechas verdes) y en algunos ojos había grandes acumulaciones de material amorfo en la región del cuerpo vítreo (**Figura 39 A y B**, asteriscos negros). La cápsula del cristalino de los peces transgénicos presentaba un grosor medio más de dos veces superior a la de los peces silvestres (**Figura suplementaria 9 A**). Las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) en el ángulo iridocorneal estaban desorganizadas, con capas plegadas de forma irregular e invadiendo la parte anterior de la masa retiniana (**Figura 39 A**, puntas de flecha blanca). Además, observamos alteraciones neuroretinianas variables que, en el fenotipo más grave, se caracterizaban por una masa retiniana que ocupaba la cavidad vítrea y desplazaba el cristalino (**Figura 39 A**, asterisco rojo). El cuerpo coroideo también estaba extremadamente agrandado (**Figura 39 A**, asterisco amarillo). La masa retiniana estaba aparentemente dominada por extensiones plegadas e hipertróficas de la capa de fibras nerviosas de la retina (**Figura 39 A**, flechas blancas). También se observaron anomalías en los fotorreceptores, pliegues en la retina (**Figura 39 B**, puntas de flecha amarillas y azules, respectivamente) e hipertrofia del nervio óptico (**Figura 39 A y B**). La tinción con Rojo Sirio confirmó estos hallazgos y demostró la intensa coloración roja en el estroma corneal y el ligamento anular (**Figura suplementaria 10**, puntas de flecha negra) y la cápsula del cristalino (**Figura suplementaria 10**, flechas verdes), lo que indica una mayor deposición de colágeno.

En general, estos resultados podrían indicar la existencia de una grave alteración de la matriz extracelular y de diferentes estadios de proliferación anormal del segmento anterior y de la retina en la línea transgénica de pez cebra que sobreexpresa miocilina.

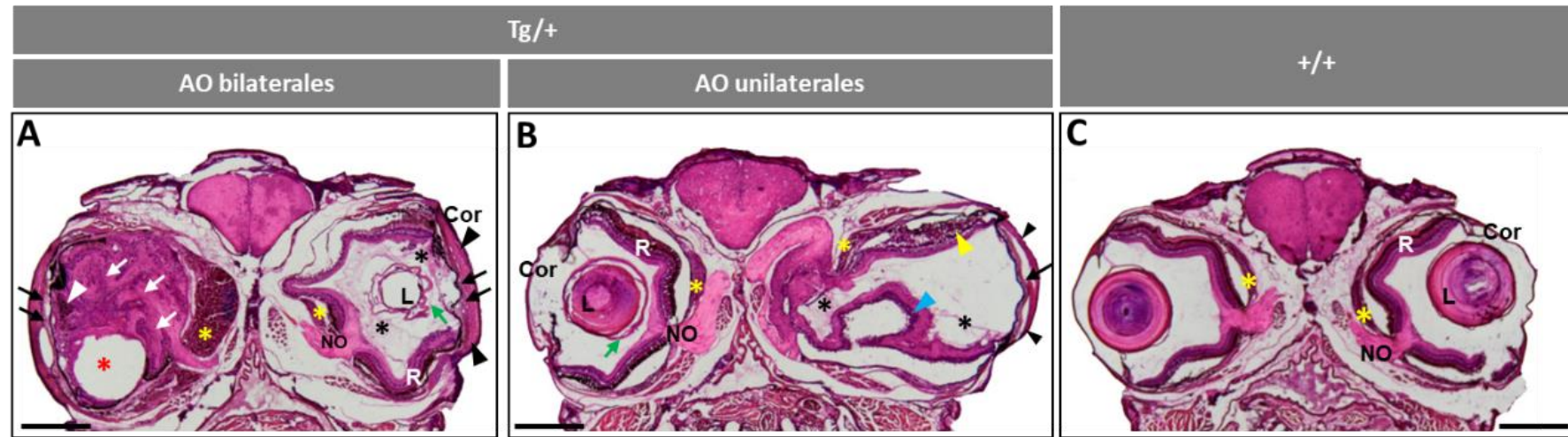


Figura 39. Histología de secciones de la cabeza de peces cebra transgénicos para el gen *myoc* (machos adultos de 2 años). Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina-eosina. Peces cebra transgénicos con alteraciones oculares macroscópicas bilaterales (A), unilaterales (B) y peces silvestres de la misma edad y sexo (C, control). Asteriscos amarillos: sobrecrecimiento del cuerpo coroideo; asteriscos negros: aumento del material vítreo; asterisco rojo: cristalino desplazado; flechas blancas: hipertrofia de la capa de fibras de la retina y del nervio óptico; flechas negras: contactos entre el iris y la córnea; flechas verdes: cápsula del cristalino plegada y engrosada; puntas de flecha amarillas: fotorreceptores anormales; punta de flecha azul: crecimiento excesivo y plegado de la retina; puntas de flecha negras: aumento del grosor del estroma corneal. Barra de escala: 800 μ m. Cor: córnea; OA: alteraciones oculares; ON: nervio óptico; L: cristalino; R: retina; Tg/+ : transgénico; +/+ : silvestre.

El examen microscópico detallado del segmento anterior ocular a mayor aumento confirmó las anomalías observadas, tales como el engrosamiento variable del epitelio y estroma corneal y el ligamento anular (**Figura 40 A-D**, **Figura suplementaria 9 B-D**) y mostró nuevas características como la formación de grandes cordones de colágeno en el epitelio corneal (**Figura 40 B**, flecha azul) y la presencia de cavidades entre el estroma corneal y el ligamento anular (**Figura 40 A y B**, puntas de flecha amarillas). En la córnea central también se observaron zonas de estrecho contacto entre el ligamento anular hipertrófico y el iris (**Figura 40 F, G e I**). En algunos ojos, el estroma corneal también presentaba un mayor número de queratocitos y cavidades (**Figura 40 G**, puntas de flecha azules y verdes, respectivamente). Igualmente, el limbo corneal estaba notablemente agrandado (**Figura suplementaria 9E**) y presentaba un mayor número de melanocitos (**Figura 40 A y B**, flechas amarillas). En los ojos con fenotipos más graves, las células del EPR se acumulaban en el ángulo iridocorneal, infiltrando la masa retiniana anterior (**Figura 40 A y B**, asteriscos amarillos). Los ojos aparentemente normales de peces cebra transgénicos con alteraciones oculares unilaterales no mostraban estas características microscópicas, aunque el estroma corneal estaba engrosado en comparación con los ojos de los peces silvestres (**Figura 40 C y H**), lo que podría indicar que se encuentran en una fase inicial de las alteraciones oculares. Los peces silvestres no mostraron ninguna de estas alteraciones (**Figura 40 E y J**).

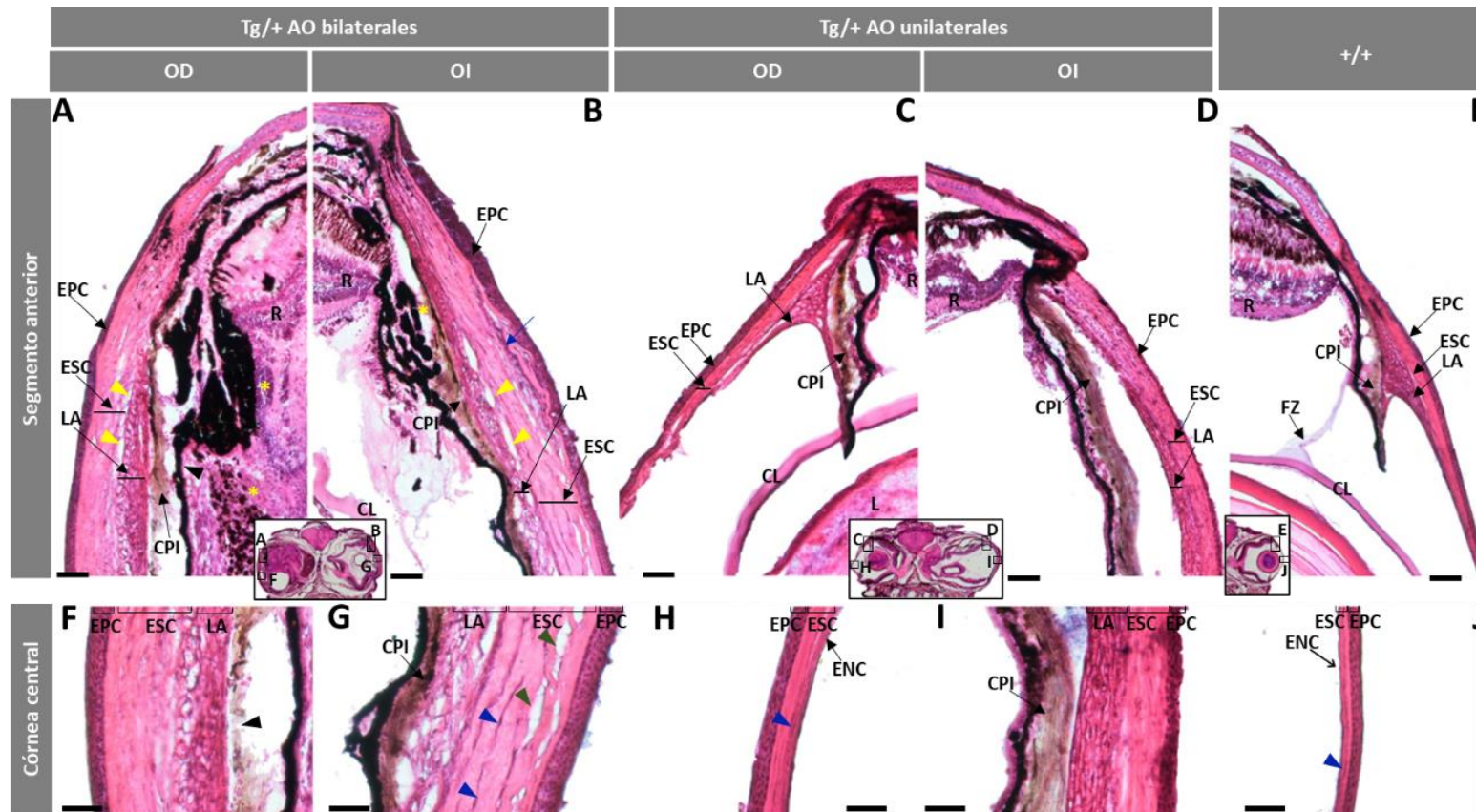


Figura 40. Histología del segmento anterior de peces cebra transgénicos machos adultos. Las secciones de tejido de peces cebra adultos (2 años) transgénicos para *myoc* con alteraciones oculares bilaterales (A, B, F y G) o unilaterales (C, D, H e I) y silvestres como control (E y J) se tiñeron con hematoxilina-eosina. Los insertos indican la localización de los campos mostrados en los diferentes paneles. Las imágenes son representativas de dos individuos de cada genotipo. Barra de escala: 200 μm en los paneles A-E y 100 μm en F-J. Flechas amarillas: melanocitos limbales; puntas de flecha amarillas: cavidades entre CPI y LA; puntas de flecha azules; cavidades en el ESC; puntas de flecha verdes: queratocitos; AO: alteraciones oculares; C: córnea; CL: cápsula de la lente; CPI: células pigmentadas del iris; ENC: endotelio de la córnea; EPC: epitelio de la córnea; ESC: estroma de la córnea; FZ: fibra zonular; L: lente; LA: ligamento anular; OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo; R: retina; Tg: transgénico; +/-: silvestre.

Por otra parte, la tinción con el Rojo Sirio confirmó estos hallazgos y reveló el engrosamiento de la córnea, especialmente el estroma, junto con un engrosamiento de la cápsula del cristalino (**Figura suplementaria 11 A-D, F-I**), mostrando una banda exterior teñida de color rosa con grandes pliegues en comparación con los peces silvestres (**Figura suplementaria 11 E y J**), lo que indica la presencia de grandes depósitos de colágeno. En conjunto, estos datos muestran la existencia de una grave alteración de la matriz extracelular en los tejidos del segmento anterior ocular del pez cebra macho transgénico.

El análisis detallado de las retinas de los peces transgénicos reveló alteraciones variables que, en el fenotipo más grave, se caracterizaban por una masa neuroretiniana desorganizada, que invadía la cavidad vítrea, y que conservaba la organización en capas en regiones periféricas (**Figura 41 A y F**). Se observó un aumento aparente del número de núcleos tanto en la capa plexiforme interna como en la capa de células ganglionares, junto con una hipertrofia de la capa de fibras retinianas (**Figura 41 A**). Estas observaciones preliminares sugieren la existencia de una proliferación de células ganglionares en la retina. También se observó una alteración variable de los fotorreceptores, así como la desorganización de las capas plexiforme y nucleares (**Figura 41 B-D**). La parte central de la retina estaba muy degenerada, mostrando fotorreceptores desorganizados, capas plexiformes y nucleares desestructuradas y ausencia del epitelio pigmentario de la retina (**Figura 41 F, G e I**). Sin embargo, las capas de la retina eran reconocibles en algunos ojos (**Figura 41 H**). El globo ocular presentaba un cartílago escleral engrosado con un mayor número de condrocitos y matriz extracelular circundante en los fenotipos más graves (**Figura 41 A-D**, flechas). Estas alteraciones no se observaron en las retinas de los peces cebra silvestres (**Figura 41 E y J**).

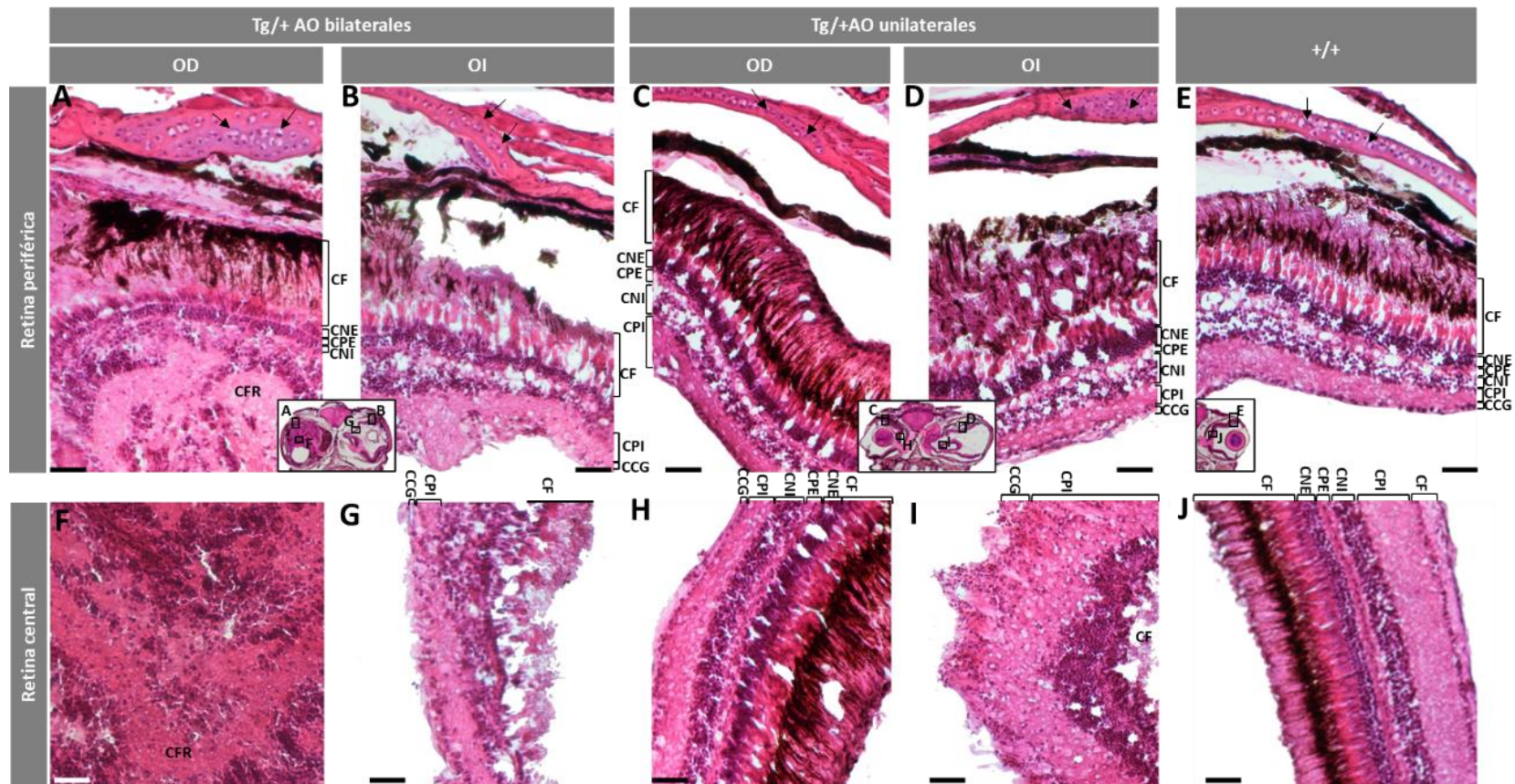


Figura 41. Histología de la retina periférica y central de peces cebra transgénicos adultos. Las secciones de tejido de peces cebra adultos (2 años) transgénicos para *myoc* (A-D, F-I) y silvestre (E y J) se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las imágenes son representativas de dos individuos de cada genotipo. Barra de escala: 50 μ m. Flechas: condrocitos en el cartílago escleral. Los insertos indican la localización de los campos retinianos mostrados en los diferentes paneles. AO: alteraciones oculares; CCG: capa de células ganglionares; CF: capa de fotorreceptores; CFR: capa de fibras de la retina; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo; Tg: transgénico; +/-: silvestre.

Los resultados de la tinción con Rojo Sirio (**Figura suplementaria 12**) confirmaron estos hallazgos. En conjunto, estos datos muestran nuevamente la existencia de una grave alteración de la matriz extracelular, indicando la existencia de diferentes etapas de proliferación anormal del segmento anterior ocular y de la retina, con un aumento de la deposición de colágeno en los peces cebra transgénicos machos adultos (2 años).

6.2.5 Caracterización inmunohistoquímica de la expresión de miocilina en los peces cebra transgénicos

Para evaluar la correlación de las alteraciones oculares con la presencia de miocilina transgénica, analizamos la expresión del transgén bicistrónico en los tejidos oculares de peces cebra transgénicos adultos de dos años. En primer lugar, se realizó la inmunohistoquímica para detectar el patrón de expresión de miocilina en secciones histológicas de la cabeza de los peces (F3) que mostraron alteraciones oculares. Éstas se incubaron con el anticuerpo primario anti-miocilina (TNT) y se visualizaron mediante microscopía confocal. La presencia de la proteína mCherry se analizó directamente mediante detección de la fluorescencia emitida, como se indica en materiales y métodos.

De acuerdo con los resultados mostrados en el capítulo de la generación del KO, el análisis del segmento anterior de los ojos de los peces silvestres usados como control mostró expresión de miocilina en epitelio ciliar no pigmentado, células pigmentarias del iris (**Figura 42 A**) y endotelio corneal (**Figura 42 B**). Los ojos de animales transgénicos presentaban señales claras de miocilina en tejidos alterados del ángulo iridocorneal como el epitelio no pigmentado ciliar, células pigmentarias del iris, ligamento anular y estroma corneal (**Figura 42 E, F, I y J**). También se observó expresión de miocilina en células sanguíneas de la vasculatura del iris (**Figura 42 I**). Adicionalmente, se detectó miocilina en la zona donde se acumulaban las células del epitelio pigmentario de la retina (**Figura 42 E y F**).

El análisis inmunohistoquímico en la córnea central de los ojos alterados reveló una señal anti-miocilina extracelular variable y difusa en el estroma corneal y en el ligamento anular (**Figura 42 G y H**), con zonas de intensa acumulación en el estroma del iris (**Figura 42 H**, asterisco). Igualmente, se detectó inmunomarcaje con el anticuerpo anti-miocilina en el endotelio corneal, especialmente en la capa más superficial del epitelio (**Figura 42 G, H, K y L**, flechas). El humor vítreo también presentó inmunorreactividad positiva para miocilina (**Figura 42 F**, asterisco). Por último, se observaron señales de miocilina en epitelio no pigmentado ciliar del pez cebra silvestre,

utilizado como control (**Figura 42 J**), que pueden corresponder a la expresión de la proteína endógena.

Aunque la fluorescencia de mCherry no fue muy intensa, se detectaron áreas amarillentas en el epitelio no pigmentado ciliar (**Figura 42 E**), lo que muestra la co-localización de ambas proteínas en esta capa epitelial. También se detectaron señales fluorescentes débiles correspondientes a mCherry en el ligamento anular alterado, en estroma corneal (**Figura 42 G y H**) y en epitelio corneal (**Figura 42 G, H, I, K y L**). La falta de superposición precisa de las señales anti-miocilina y mCherry en algunos tejidos puede deberse al diferente destino celular de las dos proteínas, dado que la primera tiene localización extracelular y la segunda permanece en el espacio intracelular. Por otro lado, la tinción con DAPI reveló un mayor número de núcleos en algunas zonas del estroma corneal (**Figura 42 G, H y K, Figura suplementaria 9 F**), ligamento anular (**Figura 42 G y H, Figura suplementaria 9 G**) y células pigmentarias del iris, así como en la región de acumulación de melanocitos del epitelio pigmentario de la retina (**Figura 42 F, Figura suplementaria 9 H**), lo que sugiere la existencia de proliferación celular en estas estructuras.

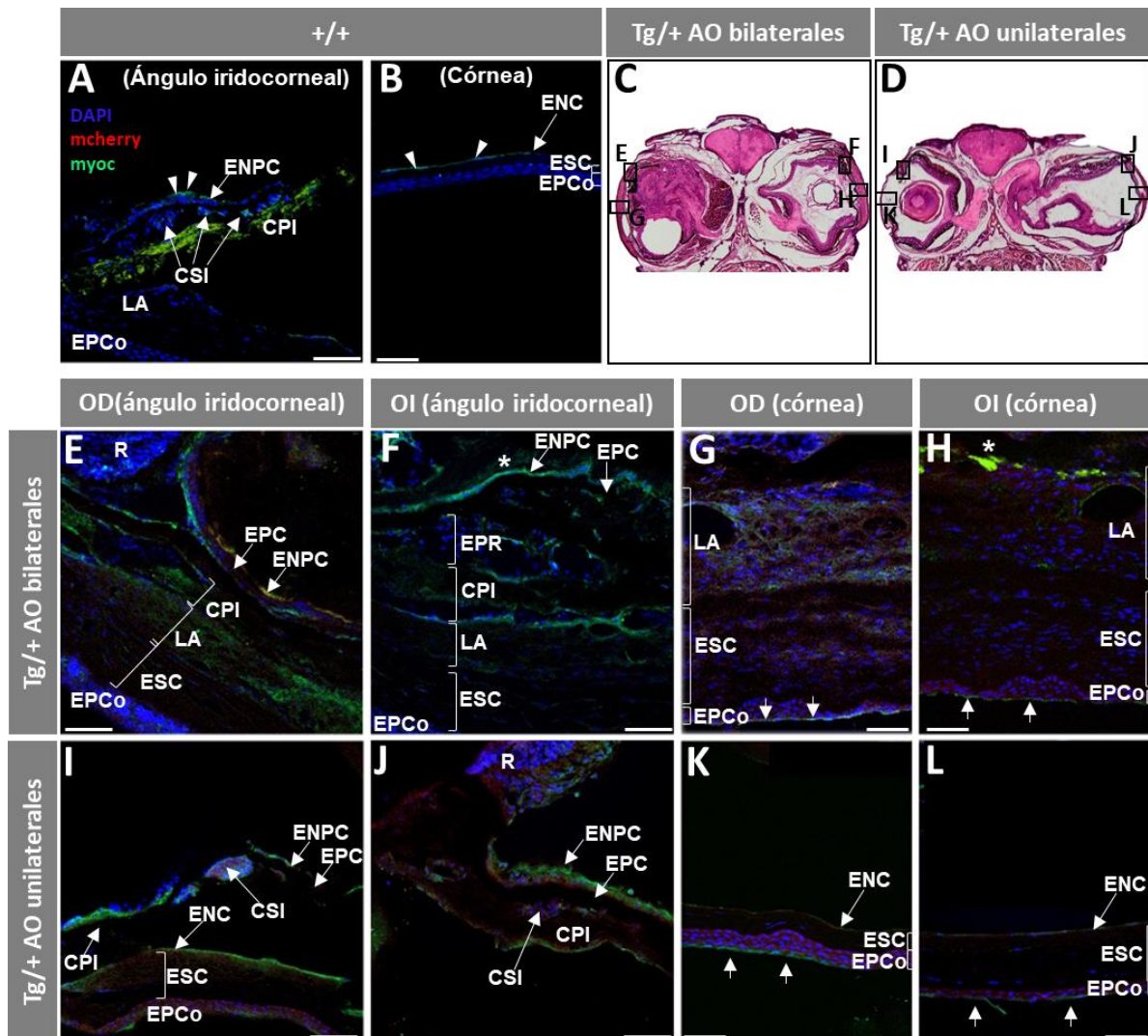


Figura 42. Expresión de miocilina y mCherry en el segmento anterior de peces cebra transgénicos adultos (2 años). El análisis inmunohistoquímico se realizó en secciones histológicas de peces silvestres de la misma edad y sexo que los peces transgénicos, como control (A y B), en peces transgénicos con alteraciones oculares bilaterales (E-L) y unilaterales (I-L). Las muestras se incubaron con un anticuerpo primario anti-TNT. Los cortes histológicos de los paneles (C y D) indican las regiones analizadas por inmunohistoquímica en los peces transgénicos. Barra de escala: 50 μ m. Asteriscos: inmunoreactividad de miocilina en el estroma del vítreo e iris; AO: alteraciones oculares; CPI: células pigmentarias del iris; CSI: células sanguíneas del iris; ENC: endotelio de la córnea; ENPC: epitelio no pigmentado ciliar; EPC: epitelio ciliar pigmentado; EPCo: epitelio de la córnea; ESC: estroma de la córnea; LA: ligamento anular; R: retina; OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo; Tg: transgénico; +/-: silvestre.

Por otra parte, en peces silvestres se observó inmunomarcaje anti-miocilina en los condrocitos y en el pericondrio del cartílago escleral (Figura 43, puntas de flecha y flechas, respectivamente). En los peces transgénicos con alteraciones oculares, el cartílago escleral hipertrófico presentó mayores señales anti-miocilina junto con una débil fluorescencia de mCherry (Figura 43 E-H), lo que muestra que la sobreexpresión de miocilina transgénica está asociada a la hipertrofia de este cartílago. La ausencia de señales fluorescentes de mCherry en los peces silvestres (Figura 42 A y

B, Figura 43 A y B) y la de miocilina en los controles negativos (Figura 43 B y Figura suplementaria 13) apoyó la especificidad de estas señales.

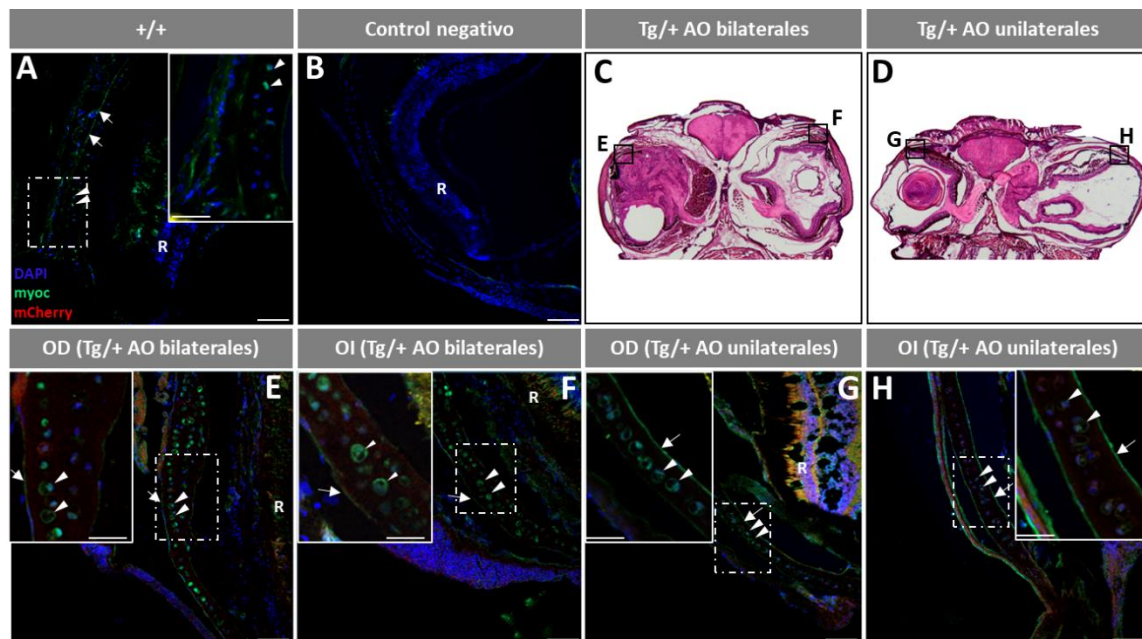


Figura 43. Expresión de miocilina y mCherry en cartílago escleral de peces cebra transgénicos adultos (2 años). Las secciones de tejido de animales silvestres (A) y transgénicos con alteraciones oculares bilaterales (E y F) o unilaterales (G y H) se incubaron con un anticuerpo primario anti-TNT obtenido en gallina o con sólo el anticuerpo secundario como control negativo (B). Las secciones de tejido indican las regiones analizadas por inmunohistoquímica (C y D). Barras de escala: 50 μ m; flechas blancas: inmunoreactividad del pericondrio; puntas de flecha blancas: inmunoreactividad de los condrocitos; R: retina. Tg: transgénico; +/+ : silvestre. Las imágenes son representativas de los resultados observados en dos peces de cada genotipo.

También se analizó la correlación entre la expresión del transgén bicistrónico y las alteraciones del cristalino y la retina. En los peces cebra silvestres utilizados como control, se detectó marcaje anti-miocilina en el epitelio y la superficie externa de la cápsula del cristalino (Figura 44 A), así como en la capa de células ganglionares, en la plexiforme interna y en los fotorreceptores de la retina (Figura 44 B). Estas señales corresponden probablemente a miocilina endógena. En los ojos transgénicos con alteraciones graves se observó inmunoreactividad anti-miocilina y señales fluorescentes procedentes de mCherry en el epitelio del cristalino (Figura 44 E y F), confirmando la expresión de la proteína transgénica. También se identificaron señales anti-miocilina en la capa superficial de la cápsula del cristalino (Figura 44 F). Por otro lado, la masa retiniana presentaba un intenso y difuso marcaje en la capa de fibras retinianas hipertróficas (Figura 44 G), así como en las regiones de la retina en las que se reconocían todas las capas, como la capa de células ganglionares y la plexiforme interna (Figura 44 H-J) y en los fotorreceptores, particularmente en el segmento externo de los bastones (Figura 44 H-J). Las señales débiles de mCherry, las cuales

coincidían con las señales de miocilina, estaban presentes en la masa retiniana (**Figura 44 G**), en los fotorreceptores y en la capa plexiforme interna (**Figura 44 H**), apoyando la expresión de miocilina transgénica. Como se esperaba, no se detectó mCherry en la retina de los peces silvestres, a pesar de que se observó una débil autofluorescencia en los fotorreceptores (**Figura 44 B**). Las secciones de tejido incubadas con el anticuerpo preinmune anti-TNT, utilizadas como control, no mostraron ninguna señal (**Figura suplementaria 13 C y D**), confirmando la especificidad de las señales observadas en el cristalino y la retina. Estos datos muestran claramente la correlación entre la presencia de miocilina transgénica y las alteraciones del cristalino y la retina.

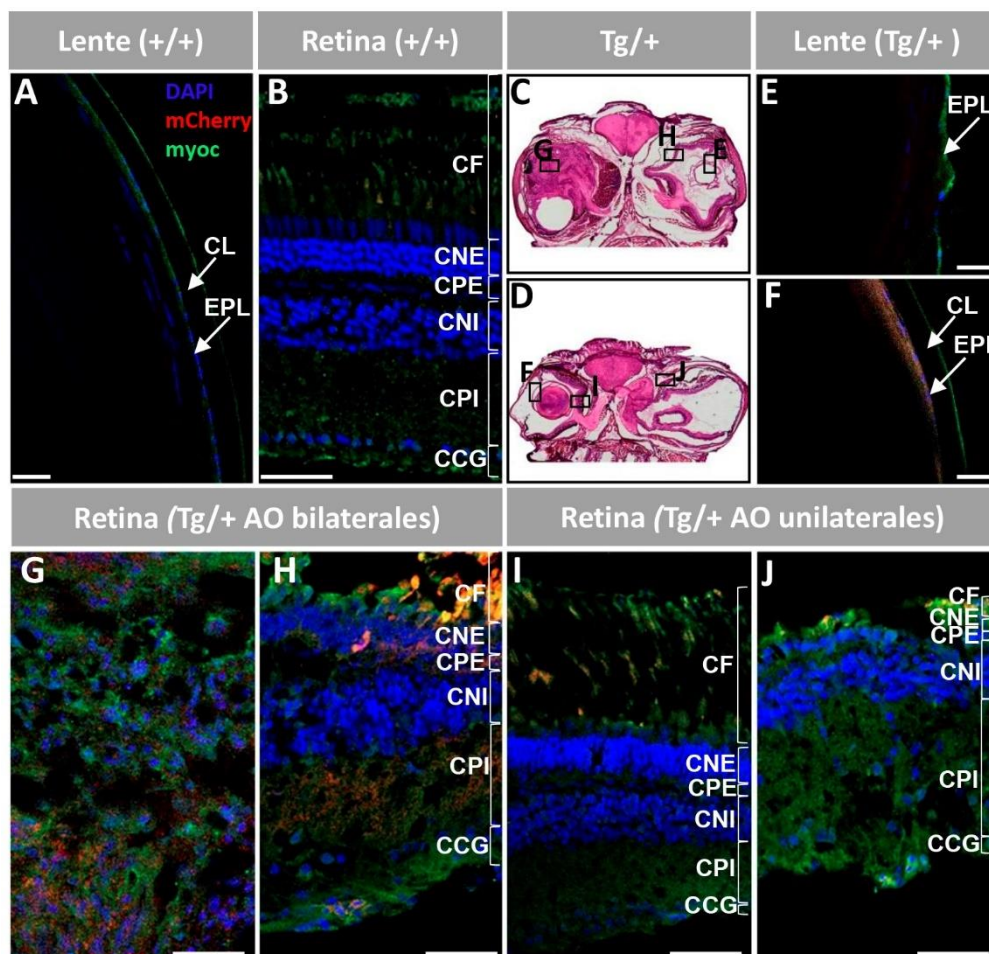


Figura 44. Análisis inmunohistoquímico para la detección de miocilina y mCherry en cristalino y retina de peces cebra transgénicos adultos (2 años). Se utilizó el anticuerpo primario anti-miocilina (TNT). Las secciones representativas del tejido de la cabeza de los peces transgénicos en los paneles (C y D) indican las regiones analizadas por inmunohistoquímica. Barra de escala: 50 μ m. CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: Capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo; Tg: transgénico; +/+: silvestre.

6.2.6 Análisis de la apoptosis mediante el ensayo TUNEL

Con la finalidad de analizar el posible papel de la apoptosis en las alteraciones oculares que presentaban los peces transgénicos, se realizó un ensayo mediante TUNEL. Para ello se emplearon secciones histológicas de la cabeza de peces adultos (2 años) silvestres y transgénicos como se describe en materiales y métodos.

Tanto la retina como la córnea de los peces silvestres usados como control presentaban un número reducido de células positivas en la capa de células ganglionares y en la capa más superficial del epitelio corneal (**Figura 45 A y B**, puntas de flecha). Sin embargo, los peces cebra transgénicos (**Figura 45 C y D**) presentaban un mayor número de células positivas en epitelio corneal, localizadas principalmente en la capa más superficial (**Figura 45 E-H**, cabezas de flecha), pero también en las capas epiteliales interiores de los ojos con alteraciones más graves (**Figura 45 E**, puntas de flecha). No se observaron células apoptóticas en ninguna otra parte del segmento anterior. También se detectaron células TUNEL positivas en la masa retiniana (**Figura 45 I**, puntas de flecha), así como en la capa de células ganglionares de los ojos de peces transgénicos con fenotipos leves (**Figura 45 J-L**). El análisis cuantitativo reveló un aumento significativo de cinco a diez veces de células apoptóticas en epitelio corneal y retina de peces cebra transgénicos en comparación con los peces silvestres (**Figura 45 M**). La especificidad del ensayo TUNEL se apoyó por la presencia de células positivas en córnea y retina de los controles positivos (**Figura suplementaria 14 A y C**), así como la ausencia de señales en los controles negativos correspondientes (**Figura suplementaria 14 B y D**). De forma global, estos datos muestran un aumento de la apoptosis en células del epitelio corneal y en la neuroretina desestructurada de los peces transgénicos.

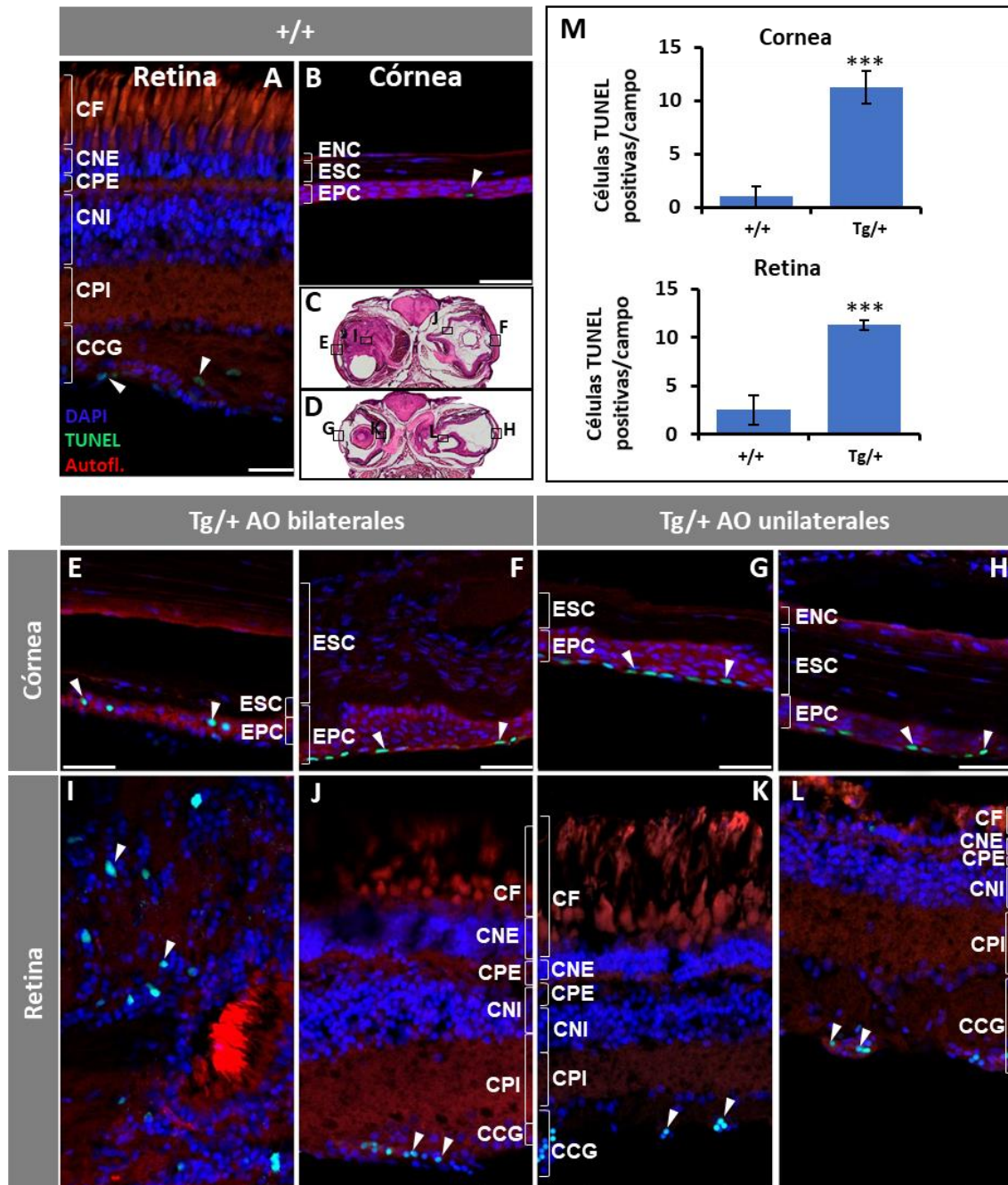


Figura 45. Análisis de apoptosis mediante TUNEL en córnea y retina de peces cebra adultos (2 años) transgénicos para *myoc*. La apoptosis se evaluó en cortes histológicos de tejidos oculares de peces cebra transgénicos de la generación F3 (E-L) y peces silvestres utilizados como control (A y B). Las secciones de tejido indican las regiones analizadas (C y D). (M) Cuantificación de células positivas a TUNEL por campo microscópico, expresada como el número medio de células por campo en un total de cuatro campos por ojo. n= cuatro ojos. ***: $p < 0.001$. Barras de escala: 50 μm en los paneles B, E-H y 25 μm en los paneles A, I-L. Puntas de flecha: células positivas a TUNEL. AO: alteraciones oculares; CCG: capa de células ganglionares; CF: capa fotorreceptora; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; ENC: endotelio corneal; EPC: epitelio corneal; ESC: estroma corneal; Tg: transgénico; +/-: silvestre. Las imágenes son representativas de los resultados observados en dos peces de cada genotipo.

6.2.7 Estudio de la activación glial y de la proliferación celular en la retina

Las alteraciones neuroretinianas observadas en los peces transgénicos sugieren la existencia de una posible activación glial. Para evaluar esta hipótesis, se estudió mediante inmunohistoquímica la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un marcador de las células de Müller activadas (Jacque et al., 1978) como se describe en materiales y métodos.

Tal y como habíamos anticipado, la retina y el nervio óptico de los animales silvestres usados como control mostraban una débil señal de GFAP, localizada principalmente en la capa de células ganglionares y también en la superficie del nervio óptico (**Figura 46 A y B**, cabezas de flecha). Por el contrario, las retinas de los animales transgénicos mostraban una mayor intensidad de las señales anti-GFAP. En los ojos con alteraciones más graves, se observó un patrón granular anti-GFAP en la masa retiniana que no se asociaba a ninguna capa celular identificable (**Figura 46 E**). En los ojos con una estructura retiniana más conservada, el marcaje anti-GFAP se localizaba principalmente en la capa de células ganglionares (**Figura 46 F-H**, puntas de flecha), lo que apoya la activación de las células de Müller. Aunque se ha descrito que GFAP se expresa únicamente en las células gliales de Müller de la retina del pez cebra (Koke et al., 2010), no se observó la morfología típica de estas células en los peces cebra transgénicos alterados, lo que podría deberse a las graves alteraciones estructurales y celulares de la retina presentes en estos animales. En el nervio óptico de los animales transgénicos se observó una inmunoreactividad variable anti-GFAP, desde indetectable o débil (**Figura 46 I y K**, respectivamente) hasta intensa (**Figura 46 J y L**). Inesperadamente, no se detectó GFAP en el nervio óptico más afectado (**Figura 46 I**), lo que podría indicar una pérdida completa de células de Müller debido a la degeneración avanzada del nervio óptico. La especificidad del marcaje fue apoyada por la ausencia de señales anti-GFAP en el control negativo (**Figura suplementaria 15**). Este hecho indica la existencia de gliosis asociado al fenotipo observado y, por consiguiente, a la sobreexpresión de *myoc*.

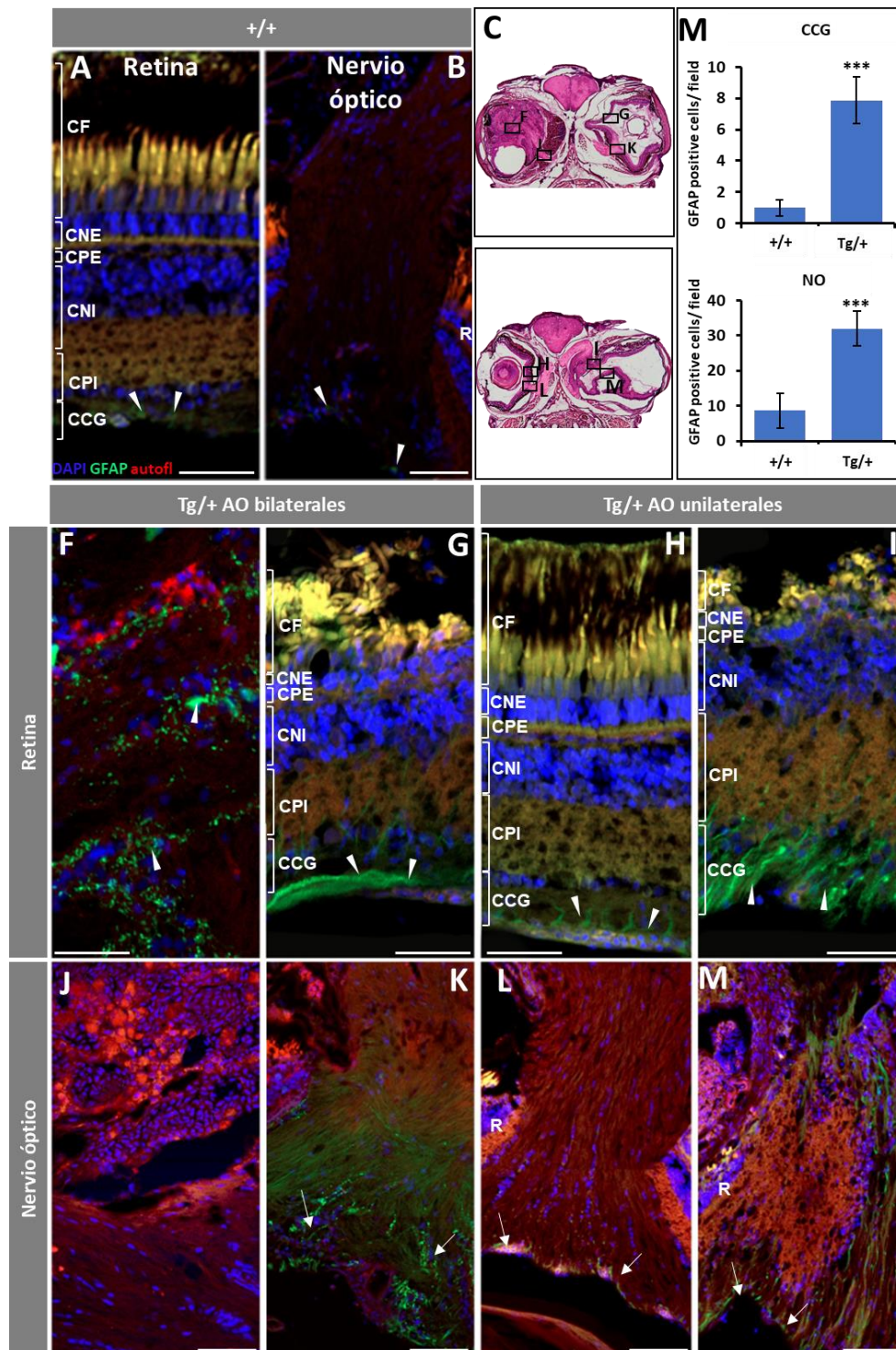


Figura 46. Detección inmunohistoquímica de GFAP en retina central y nervio óptico de peces cebra transgénicos adultos (2 años). Se utilizó un anticuerpo primario anti-GFAP para detectar las células gliales de Müller. (A y B) Retina y nervio óptico de peces silvestres usados como control. (C y D) Secciones representativas de tejido de los peces transgénicos indicando las regiones analizadas por inmunohistoquímica. (E-H) Retina transgénica. (I-L) Nervio óptico transgénico. (M) Cuantificación de las células positivas para GFAP, expresada como número medio de células por campo microscópico en un total de cuatro campos por ojo. n= cuatro ojos; ***: p<0.001. Se observa un aumento de células positivas para GFAP en los peces transgénicos. Cabezas de flecha: Marcaje de GFAP de las células de Müller. Barras de escala:50 μ m. AO: alteraciones oculares;

CCG: capa de células ganglionares; CF: capa fotorreceptora; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; NO: nervio óptico; R: retina. Tg: transgénico; +/-: silvestre. Las imágenes son representativas de los resultados observados en dos peces de cada genotipo.

Para identificar la contribución de las células ganglionares de la retina a la masa retiniana que caracterizaba el fenotipo ocular más grave de los peces cebra transgénicos, se realizó una inmunohistoquímica utilizando simultáneamente el anticuerpo anti-calretinina (García-Crespo & Vecino, 2004) y anti-Brn3a (Xiang et al., 1995). Estos análisis fueron llevados a cabo en colaboración con los doctores María José Ruiz Pastor y Nicolás Cuenca del departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante. Las retinas de los peces silvestres utilizados como control mostraron un marcaje positivo de calretinina en la capa de células ganglionares de la retina y en las fibras del nervio óptico, así como una subpoblación de células amacrinias y bipolares en la capa nuclear interna (**Figura 47 A y B**). La mayoría de las células ganglionares, además de las células bipolares y los conos de los fotorreceptores, mostraron inmunoreactividad para Brn3a (**Figura 47 A y B**). Las células ganglionares se identificaron por su doble inmunomarcaje para calretinina y Brn3a (**Figura 47 B**, puntas de flecha). De acuerdo con el análisis histológico anterior, la observación global de los ojos transgénicos mostró la pérdida de organización de la retina (**Figura 47 C y E**). Además, se observaron varios haces de axones (asteriscos) y un aumento de las células positivas para calretinina (**Figura 47 C y D**). La abundancia de células doblemente positivas indicaba la expansión de las células ganglionares en la retina displásica (**Figura 47 E y F**, puntas de flecha). Estos datos apoyan la contribución del aumento de células ganglionares y de las fibras nerviosas a la retina altamente desestructurada del pez cebr que sobreexpresa miocilina. No se observaron señales positivas en los controles negativos, apoyando la especificidad del inmunomarcaje observado (**Figura suplementaria 16**).

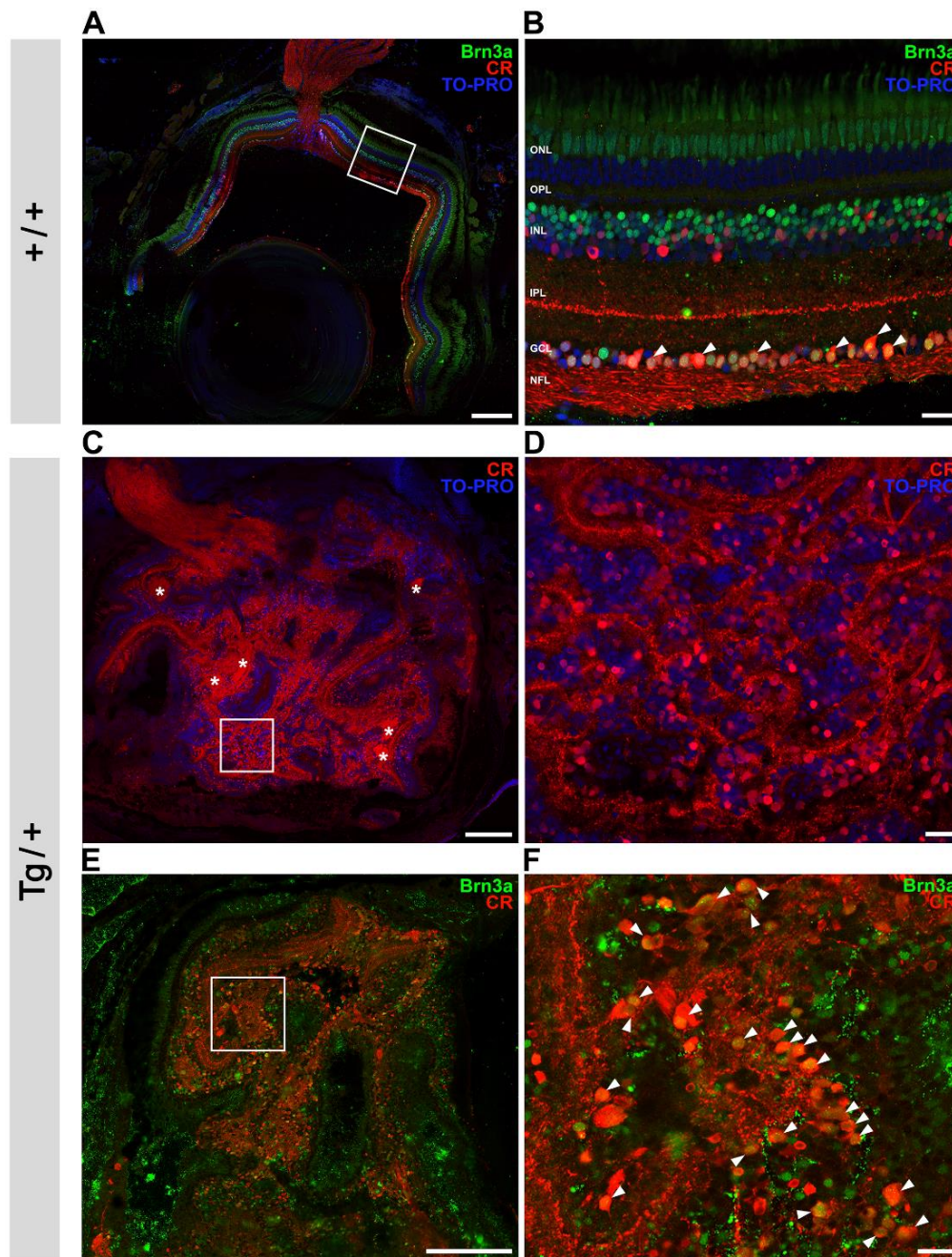


Figura 47. Aumento del número de células ganglionares en la masa retiniana presente en el fenotipo más grave de los peces cebra transgénicos adultos (2 años). Vista general e imágenes detalladas del ojo del pez cebra silvestre (A y B) y de ojos de peces cebra transgénicos (C-F). Las imágenes en B, D y F son detalles de A, C y E, respectivamente. (A y B) Se utilizó la doble inmunotinción para la calretinina (CR), una proteína de unión al calcio, y el factor de transcripción Brn3a para la identificación de las células ganglionares (cabezas de flecha). Las fibras del nervio óptico eran inmunopositivas para la calretinina. (C-F) En la masa retiniana del pez cebra transgénico se observó un gran número de células doblemente inmunopositivas que correspondían a células ganglionares (cabezas de flecha). Barras de escala: 200 μm en los paneles A, C y E y 20 μm en B, D y F. ONL: capa nuclear externa; OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares; NFL: capa de fibras nerviosas; Tg: transgénico; +/+: silvestre.

6.2.8 Análisis de la función visual de los peces transgénicos para *myoc*

Se analizó la función visual de los peces transgénicos mediante el ensayo de preferencia social como se describe en materiales y métodos. Para ello, se utilizó una pecera rectangular dividida en dos cámaras con una placa de metacrilato transparente que permite el contacto visual entre el pez probando (peces transgénicos) y el grupo de peces control (silvestres). Se analizaron un total de 13 peces cebra macho transgénicos para *myoc* disponibles, de los cuales, seis presentaban fenotipos oculares aparentemente normales y 7 mostraban presencia de las alteraciones oculares descritas de manera uni o bilateral. Se utilizaron como control cuatro peces cebra machos silvestres de la misma edad. Curiosamente, todos los animales transgénicos mostraron una reducción significativa del tiempo de permanencia en la ventana que permitía el estímulo social, aproximadamente cuatro veces menor para los animales transgénicos con ojos aparentemente normales y 10 veces más corto para los peces cebra transgénicos con alteraciones oculares (**Figura 48**). Estos resultados indican que todos los peces cebra transgénicos adultos tienen una función visual deteriorada, incluso aquellos que no presentaban alteraciones morfológicas observables.

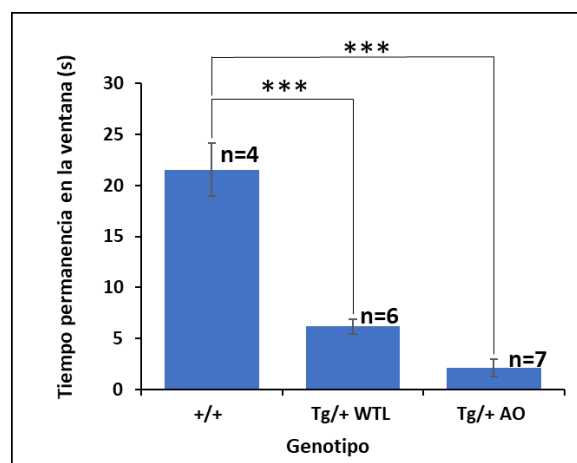


Figura 48. Evaluación de la función visual de peces cebra transgénicos adultos mediante un ensayo de preferencia social. El ensayo de respuesta visual se realizó en peces adultos (2 años) machos silvestres, peces transgénicos con fenotipo aparentemente normal o peces transgénicos con alteraciones oculares. Se midió el tiempo que los peces cebra examinados pasaban en la ventana que permitía el estímulo social en tres intervalos de un minuto y se calculó el valor medio. Ensayo t de *Student*, ***: $p < 0.001$. Tg/+ AO: transgénico con alteraciones oculares; Tg/+ WTL: transgénico con fenotipo ocular aparentemente normal; +/+ : silvestre.

6.2.9 Estudio transcriptómico de los peces transgénicos para *myoc*

Con el objetivo de estudiar los cambios en la expresión génica asociados a la sobreexpresión de *myoc* y a las alteraciones oculares en los peces transgénicos adultos, se realizó una secuenciación comparativa del transcriptoma de ojos de animales transgénicos con alteraciones morfológicas frente a ojos de peces macho silvestres de 2 años. Adicionalmente, como control y para estudiar la expresión génica en etapas previas al fenotipo, se realizó en paralelo el análisis transcriptómico de ojos aparentemente normales (con fenotipo silvestre) de peces transgénicos machos de 2 años. En todos los casos se utilizaron seis ojos obtenidos a partir de tres peces. El limitado número de peces transgénicos permitió realizar una única réplica biológica, mientras que se realizaron dos réplicas biológicas independientes en los peces silvestres.

Siguiendo la metodología de análisis ya descrita en el estudio de los peces KO para *myoc*, de un total de 39.987 ARN codificantes y múltiples ARN poliadenilados no codificantes identificados en el análisis transcriptómico, se excluyeron del estudio un total de 18.954 genes con lecturas nulas en todas las muestras, quedando 21.033 genes para el análisis de expresión diferencial. La similitud entre las réplicas biológicas, evaluada mediante el coeficiente de Pearson, indicó una alta similitud siendo la más alta entre las dos réplicas de los ojos silvestres (Figura 49 A). Además, el mapa de calor de agrupación jerárquica, basado en una diferencia de expresión $\geq |2|$ y un valor $p < 0,05$, reveló agrupaciones similares de DEG entre las dos réplicas de cada grupo experimental, indicando que la mayoría de los patrones de expresión génica identificados eran reproducibles (Figura 49 B).

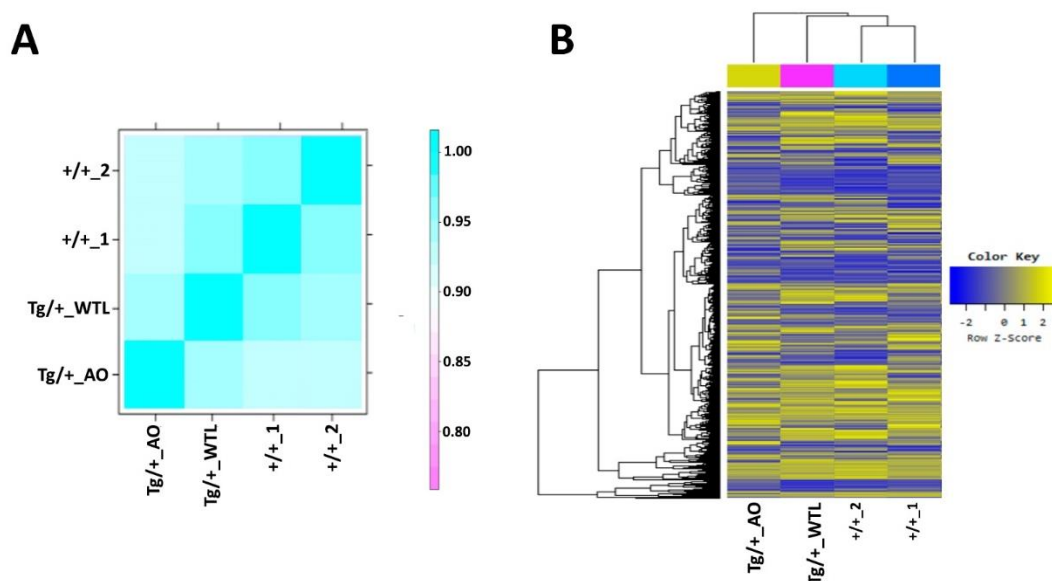


Figura 49. Análisis de la variabilidad entre las réplicas biológicas empleadas en el estudio transcriptómico. (A) Matriz de correlación que muestra la similitud entre las réplicas (transgénicos

de *myoc* (Tg/+) con y sin alteraciones oculares, AO y WTL, respectivamente, frente a peces silvestres, +/+). La similitud entre las muestras se obtiene a través del coeficiente de Pearson del valor normalizado de la muestra ($-1 \leq r \leq 1$). Cuanto más se aproxima este valor a 1, más similares son las muestras. **(B)** Mapa de calor del análisis de agrupación jerárquica de los genes DEG y réplicas significativas (Tg/+ frente a +/+). El análisis de agrupación se realizó utilizando la distancia Euclídea y la vinculación completa como medida de similitud. Se representan hasta 3000 genes de 10.566 que satisfacen la diferencia de expresión ≥ 2 y el valor de p sin corregir $>0,05$. La gama de colores del mapa de calor va desde el amarillo para los valores positivos de la puntuación Z hasta el azul para los valores negativos. La puntuación Z permite la visualización en mapas de calor de los grupos de genes con tendencias similares de expresión entre las muestras. Se calcula como la diferencia entre el valor de expresión génica en la muestra de interés y la expresión media en todas las muestras, y esto dividido entre la desviación estándar.

Tras la comparación de la expresión génica de cada grupo muestral de los peces transgénicos (Tg/+ WT-L y Tg/+ AO) con cada una de las dos replicas biológicas de los peces silvestres (+/+ 1 y +/+ 2) se identificaron una media de 2332 genes significativamente sobreexpresados (diferencia de expresión ≥ 2 y $p < 0,05$). Del mismo modo, una media de 2384 genes fueron significativamente subexpresados (diferencia de expresión ≤ -2 y $p < 0,05$) en las cuatro comparaciones (**Figura 50**).

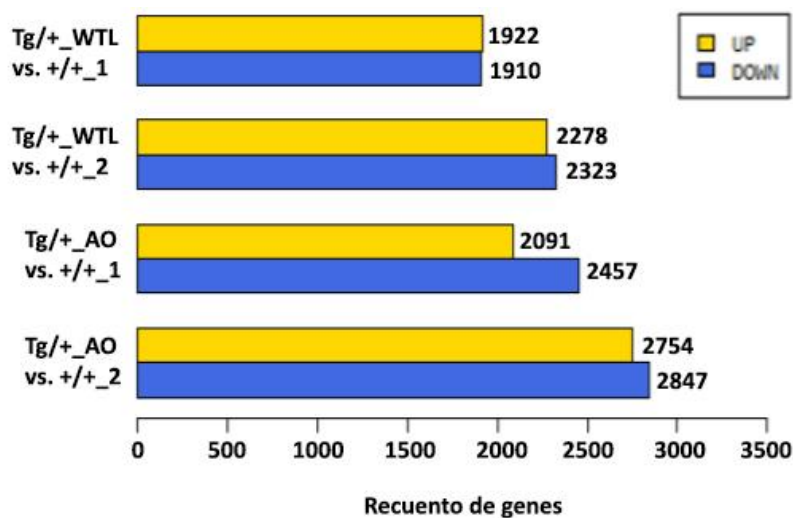


Figura 50. Número de genes significativamente sobre- (UP) y subexpresados (DOWN) en los ojos de los peces transgénicos para el gen *myoc*. Se muestra el número de genes diferencialmente expresados en las comparaciones realizadas (Tg/+ WTL vs. +/+1 y +/+2; Tg/+AO vs. +/+1 y +/+2). Se toma como punto de corte una diferencia de expresión en valor absoluto de dos veces y un valor $p < 0,05$. Tg: transgénico; WTL: fenotipo silvestre; +/+: silvestre.

Tras realizar un primer análisis, seleccionamos los 50 genes significativamente más sobreexpresados y subexpresados de los dos grupos muestrales (transgénico con alteraciones oculares y fenotipo WTL) para realizar análisis adicionales (**Figura 51**, **Figura 52**,

Tabla suplementaria 6, Tabla suplementaria 7). Como se esperaba, encontramos un aumento significativo de la expresión de *myoc* en los ojos transgénicos (2,83 veces; $p = 1,3 \times 10^{-5}$).

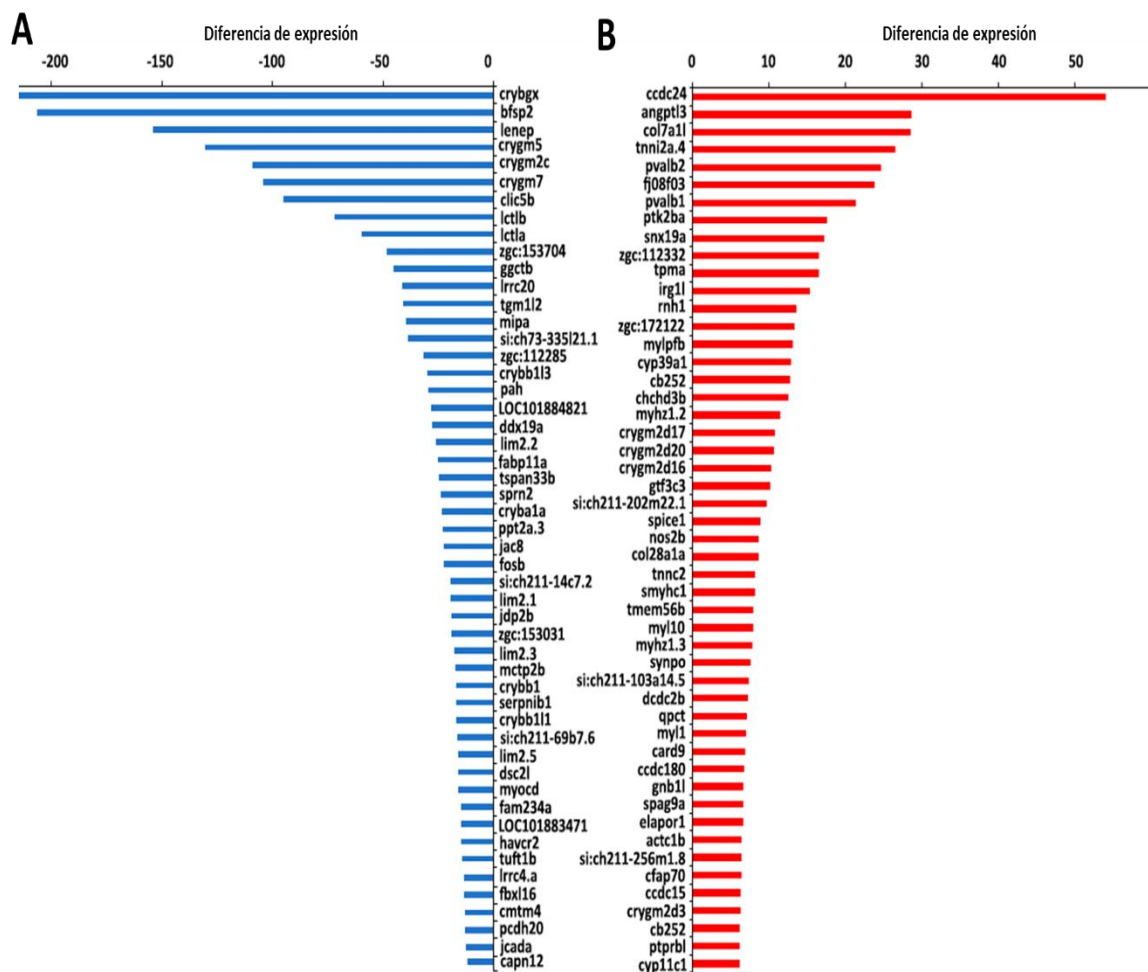


Figura 51. Identificación transcriptómica de los cincuenta genes con mayores diferencias de expresión en los ojos con alteraciones de peces cebra machos transgénicos de *myoc* adultos (2 años). Genes subexpresados (A) y sobreexpresados (B) identificados por secuenciación masiva de ARN con diferencias significativas en las dos comparaciones (Tg/+ AO vs. +/+1 y Tg/+AO vs. +/+2). Tg: transgénico; +/+: silvestre.

A continuación, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de estos 50 DEGs de las muestras oculares utilizando *Epistemic AI*. Ésta es una plataforma de software basada en la web de inteligencia artificial (Koo et al., 2022) y tres bases de datos diferentes (Elsevier pathway collection, BioPlanet 2019 y KEGG pathway database). Los resultados revelaron que al menos 12 de estos genes (12% de los principales DEG) codificaban proteínas relacionadas con el cristalino y las cataratas, por ejemplo, β -cristalinas, γ y β - γ , proteína intrínseca del cristalino, proteína epitelial del cristalino y proteínas similares a la lactasa (Tabla suplementaria 8). Al menos seis genes relacionados con el músculo (el 6% de los principales DEGs), entre los que se encuentran

los genes que codifican miosina, actina, tropomiosina y troponina, también se sobreexpresaron significativamente en los ojos con alteraciones de los peces cebra transgénicos (**Tabla suplementaria 8**). Además, los genes implicados en el metabolismo de esteroides endógenos (*cyp39a1* y *cyp11c1*), folato (*zgc:153031* y *zgc:153031*), ciclo visual (*zgc:112332* y *zgc:112332*) y migración transendotelial de leucocitos (*myl10*, *mylpfb* y *ptk2ba*), también se enriquecieron entre estos DEGs.

Una evaluación complementaria de enriquecimiento funcional del mismo grupo de DEGs utilizando la herramienta web de análisis de enriquecimiento de ontología genética *ShinyGO* (Ge et al., 2020) mostró resultados similares. Las diferentes categorías que resultaron de este análisis se clasificaron en dos grandes grupos funcionales: 1) desarrollo ocular y del cristalino; y 2) contracción del músculo esquelético (**Tabla suplementaria 9**). Estos grupos estaban compuestos, respectivamente, por los genes relacionados con el cristalino y el músculo identificados en el análisis anterior. Curiosamente, dos genes de colágeno α , *col7a1l* y *col28a1a*, fueron regulados al alza en los ojos alterados del pez cebra transgénico, siendo uno de ellos *col7a1l* el tercer gen más sobreexpresado. Estos cambios están en consonancia con el aumento del depósito de matriz extracelular observado en los ojos alterados del pez cebra transgénico.

A continuación, también se seleccionó el grupo de los 50 genes más sobreexpresados y subexpresados con un $|FC| \geq 2$ en las muestras de ojos transgénicos sin alteraciones aparentes (fenotipo silvestre, WTL) para realizar un análisis de enriquecimiento funcional mediante los programas *Epistemic* y *ShinyGO* e identificar genes implicados en diferentes vías. (**Figura 52,**

Tabla suplementaria 10, Tabla suplementaria 11).

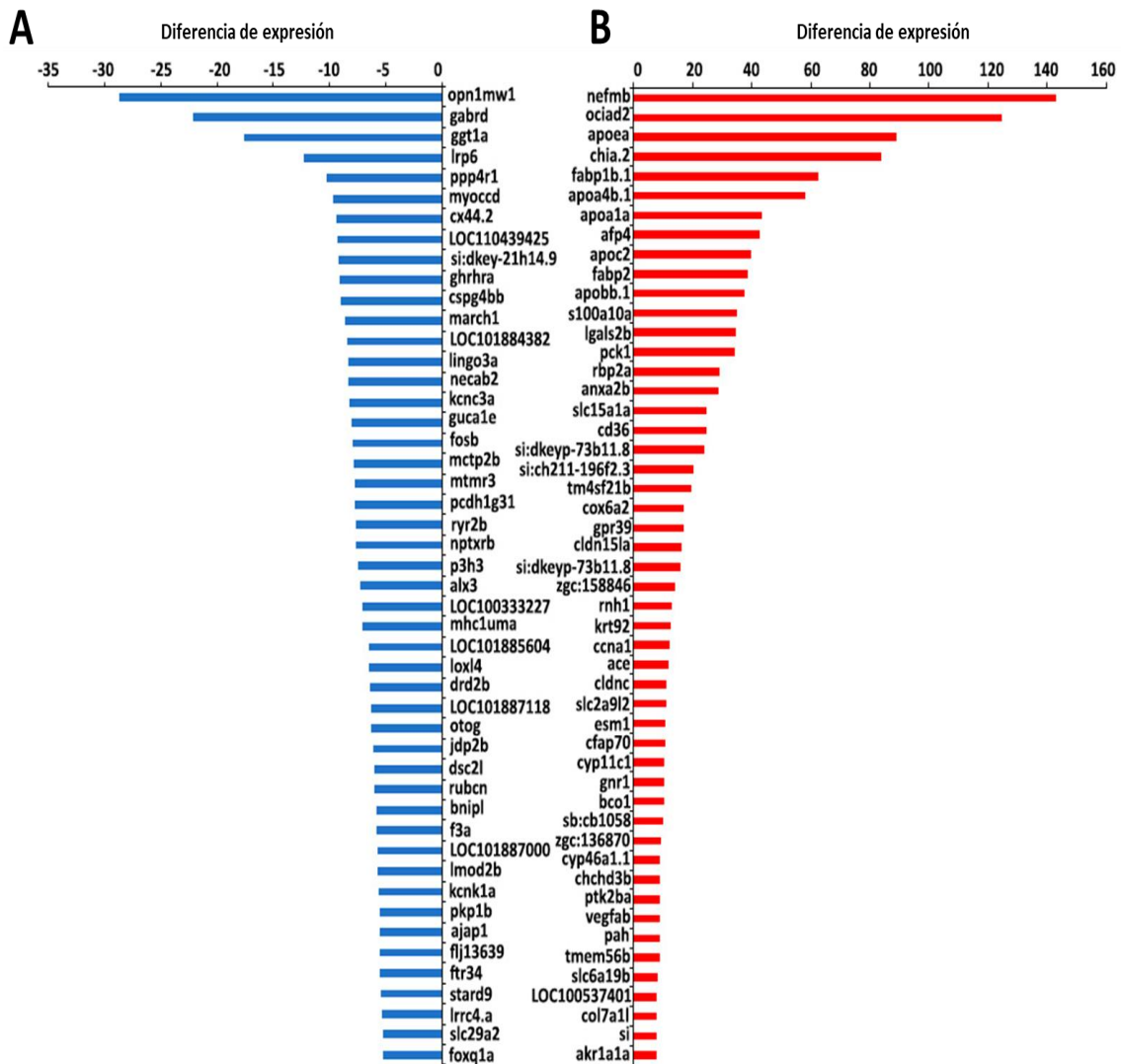


Figura 52. Identificación de los cincuenta genes con mayores diferencias de expresión en los peces transgénico para *myoc* sin alteraciones oculares aparentes. Genes subexpresados (A) y sobreexpresados (B) identificados por secuenciación masiva de ARN con diferencias significativas en las dos comparaciones (Tg/+ WTL vs. +/+1 y Tg/+WTL vs. +/+2). Tg: transgénico;+/: silvestre.

El análisis de enriquecimiento funcional de estos genes realizado con la herramienta *Epistemic* mostró DEGs significativos clasificados principalmente en los siguientes tres grandes grupos: 1) metabolismo lipídico, incluyendo transporte o localización de lípidos; 2) procesos del sistema inmune y 3) adhesión celular (Tabla suplementaria 12). El primer grupo estaba compuesto, entre otros, por genes de la familia de las apolipoproteínas como *apo1a*, *apo4b.1*, *apobb.1*, *apoae1* y *apoc2*. Dentro de los genes involucrados en el sistema inmune se encontraron *ggt1a* (gamma-glutamyltransferasa 1a), *cd36* (receptor de trombospondina) y el factor de crecimiento endotelial vascular *vegfab* o *gnr1* (granulina 1), y en el grupo de adhesión celular *la desmocolina 2-like* (*dsc2l*) y *pck1* (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1).

El análisis complementario de enriquecimiento funcional del mismo grupo de DEGs utilizando la herramienta web de análisis de enriquecimiento de ontología genética *ShinyGO* reveló resultados similares. Las diferentes categorías que resultaron de este análisis se clasificaron principalmente en procesos catabólicos, adhesión celular y respuesta inmune. Estos grupos estaban compuestos por genes identificados con Epistemic, incrementando la fiabilidad del análisis realizado. Curiosamente, con los dos análisis de enriquecimiento realizados también se observaron grupos de DEGs relacionados con proliferación celular. Entre estos, se encontraban los genes *ptk2ba* (proteína tirosina quinasa 2-beta a) y *vegfab*, los cuales estaban sobreexpresados.

Para confirmar los DEGs identificados, evaluamos mediante qRT-PCR las diferencias de expresión de algunos genes representativos. Para ello seleccionamos, de los dos grupos muestrales (ojos con alteraciones y ojos aparentemente normales), los dos genes más sobreexpresados (*ccdc24* y *angptl3*; *nefmb* y *ociad2*) y los dos más subexpresados (*crybgx* y *bfsp2*; *opn1mw1* y *gabrd*).

Adicionalmente, analizamos un grupo de genes que no estaban en el top-50 de DEGs pero que presentaban valores de diferencia de expresión absoluta superiores a 2 y que fueron considerados funcionalmente interesantes por distintas razones que se comentarán posteriormente. Estos genes incluían *lgsn* (lengsina, proteína del cristalino con dominio de glutamina sintetasa), *cav2* (caveolina 2), *arhgef40* (factor de intercambio de nucleótidos de guanina rho 40), *vangl2* (proteína de polaridad celular plana VANGL 2), *lenep* (proteína epitelial de la lente), *rpe65a* (retinoide isomerohidrolasa RPE65 a), *col7a1l* (colágeno tipo VII alfa 1-like), *col28a1a* (colágeno, tipo XXVIII, alfa 1a), *apoae* (apolipoproteína Ea) y *apoa1a* (apolipoproteína A-1a). *Lgsn* y *lenep* se expresan en el cristalino (Harding et al., 2008), *cav2* es un gen relacionado con el glaucoma (Thorleifsson et al., 2010) al igual que *myoc*, *vangl2* codifica una proteína relacionada con la vía de señalización Wnt (Gao et al., 2011), *arhgef40* desempeña un papel en la adhesión celular (Isozaki et al., 2020) y *rpe65a*, isomerohidrolasa retinoide expresada principalmente en el epitelio pigmentario de la retina (Redmond et al., 2005; Yu et al., 1998). Los genes *apoae* y *apoa1a* se seleccionaron debido al papel que juegan los lípidos tanto en la fisiología como en la patología de la retina (Bretillon et al., 2008; Fliesler & Anderson, 1983). Debido a los depósitos de colágeno observados con la tinción del Rojo Sirio, se seleccionaron dos genes del colágeno α , *col7a1l* y *col28a1a*, que participa en la organización de la matriz extracelular (<https://zfin.org/>). Los resultados de la qRT-PCR (**Figura 53 y**

Tabla suplementaria 14) mostraron una buena correlación con los datos del transcriptoma y confirmaron la mayoría de los genes diferencialmente expresados excepto *rpe65a*, *opn1mw1*, *apoae* y *apoa1a*. No obstante, los valores absolutos de las diferencias de expresión fueron menores que los obtenidos en el análisis transcriptómico. La mayor sensibilidad de la qRT-PCR en

comparación con el análisis transcriptómico y las diferencias técnicas entre los dos procedimientos podrían explicar esta discrepancia observada.

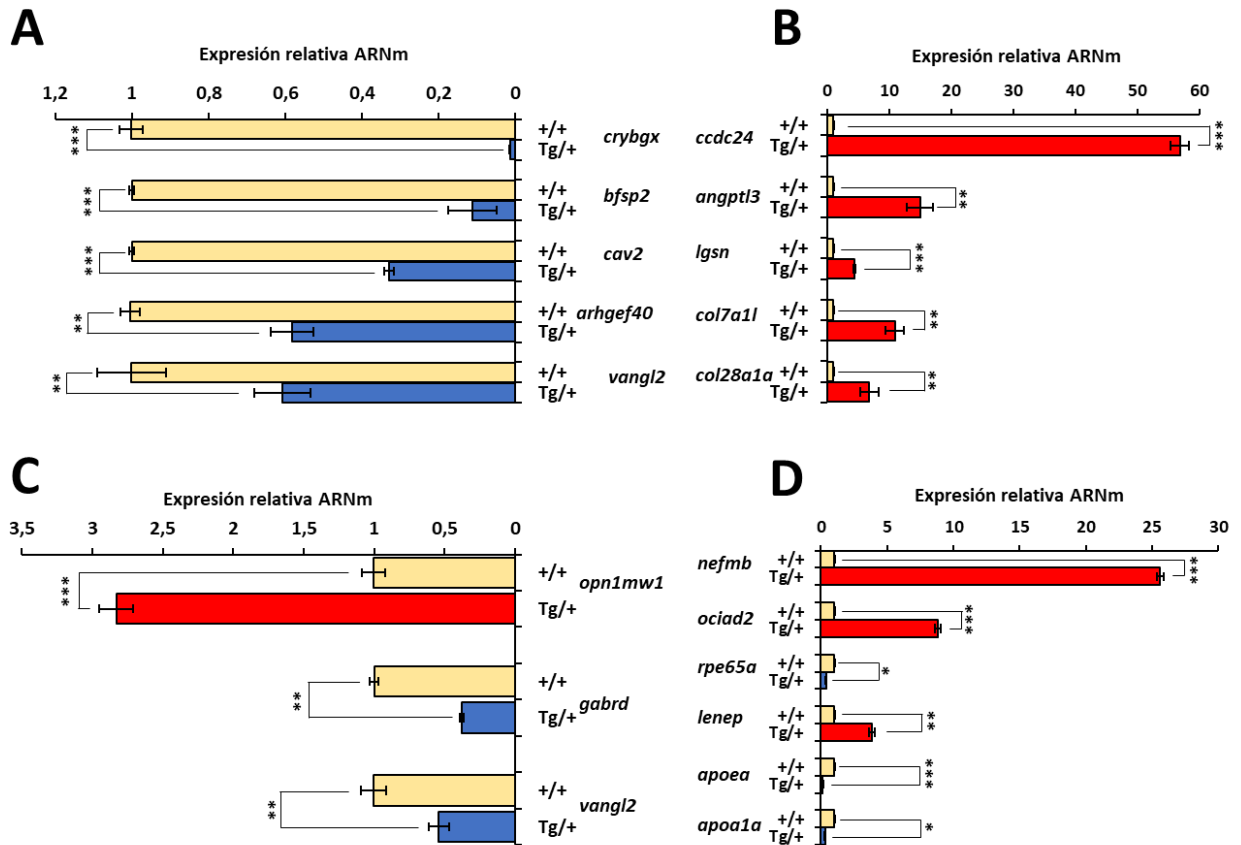


Figura 53. Confirmación mediante qRT-PCR de la expresión génica diferencial de los genes seleccionados en el estudio transcriptómico. Se muestran los genes subexpresados (A y C) y sobreexpresados (B y D) comprobados por qRT-PCR de las muestras de ojos con alteraciones oculares (A y B) y aparentemente normales (con fenotipo silvestre) (C y D) de los peces adultos transgénicos de *myoc*. Se midieron los niveles de ARNm de las muestras enviadas al transcriptoma. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos y se normalizan con respecto a las muestras de peces silvestre. Los valores representan la media de tres experimentos diferentes. Tg: transgénico; +/+ : silvestre. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,05$; *: $p > 0,05$, (t de Student).

6.2.10 Confirmación de los fenotipos oculares en una nueva generación de peces cebra transgénicos para *myoc*

Para confirmar las alteraciones oculares identificadas en los peces transgénicos de *myoc* y determinar con precisión la edad en la que éstas aparecen, obtuvimos mediante fecundación *in vitro* una nueva generación (F4) de peces heterocigotos. Para ello, se empleó el esperma de tres machos transgénicos F3 y ovocitos de dos peces cebra hembra silvestres. Los gametos de los machos y de las hembras se agruparon. Dieciocho de los 40 embriones fueron positivos para la

fluorescencia de mCherry, indicando que eran transgénicos. Estos animales fueron examinados para detectar alteraciones oculares macroscópicas e histológicas a las edades de cinco (cuatro individuos), siete (seis individuos) y 13 meses (siete individuos). A los 5 meses de edad, no se observó ninguna diferencia ocular significativa entre los peces transgénicos (**Figura suplementaria 17 A-C**) y los silvestres (**Figura suplementaria 17 D-F**). Tampoco se observaron a los 7 meses (**Figura suplementaria 17 G-I**) por lo que se dejaron crecer para un posterior análisis a una edad más avanzada. Las anomalías oculares macroscópicas no fueron evidentes hasta el decimotercer mes de vida.

Los siete peces cebra que permanecieron vivos a esta edad eran machos, y en seis de ellos (85,7%) el cristalino presentaba una ligera turbidez, sugiriendo la existencia de cataratas (**Figura 54 C, I y J**, asterisco). Las anomalías del cristalino no eran visibles en la posición lateral del pez (**Figura 54 D-G y K-N**). Tres peces mostraron alteraciones adicionales variables del segmento anterior del ojo que afectaban a la córnea y al iris. Los fenotipos de la córnea variaban desde aparentemente normales (**Figura 54 B**) hasta córneas con gran hiperplasia (**Figura 54 C**, flecha amarilla), engrosadas (**Figura 54 I**, flechas amarillas) y aplanadas (**Figura 54 J**, flechas amarillas). También se observó el sobrecrecimiento del iris con una pupila reducida e irregular (**Figura 54 E y G**, punta de flecha blanca) en el ojo de este pez con hiperplasia corneal (**Figura 54 G**). La disminución del tamaño de la cámara anterior (**Figura 54 E y G**, punta de flecha blanca) también estaba presente en el ojo con hiperplasia corneal. Además, este mismo pez presentaba opérculos acortados y curvados hacia fuera (**Figura 54 D y E**). Dos peces transgénicos (28%) presentaban acortamiento de la mandíbula inferior (**Figura 54 H, K y L**, flecha blanca). Estas alteraciones no estaban presentes en los peces silvestres del mismo sexo y edad utilizados como control (**Figura 54 O-U**), indicando que eran específicas de los peces transgénicos.

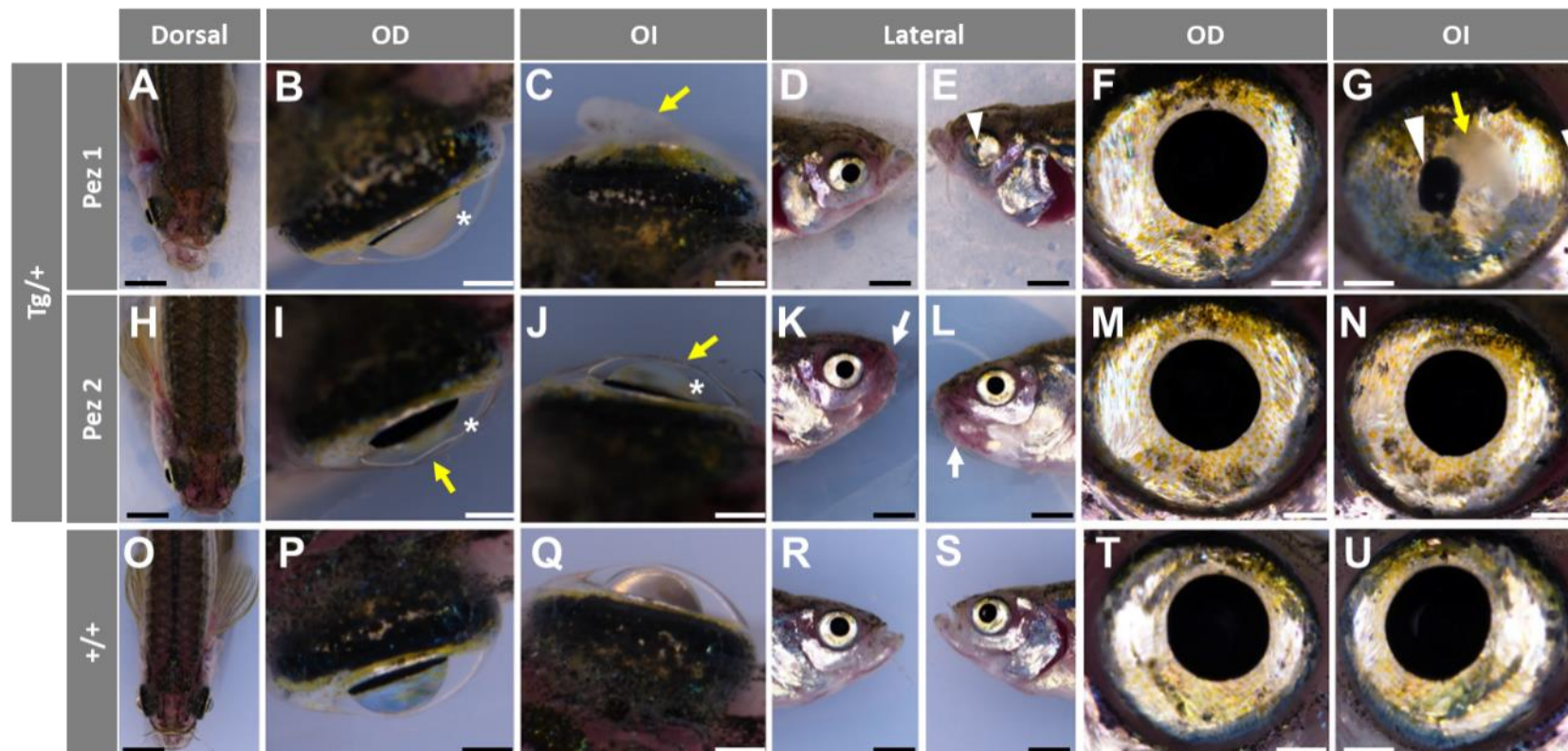


Figura 54. Fenotipos oculares macroscópicos en peces cebra F4 adultos transgénicos de *myoc*. Se muestran imágenes de campo claro de peces adultos transgénicos (13 meses) machos representativos con alteraciones oculares(A-N) y de peces silvestres (O-U) como control. Asteriscos: córneas nubladas; flechas amarillas: hiperplasia corneal; punta de flecha blanca: reducción del tamaño de la pupila. Barras de escala: 200 μm en los paneles A, D, E, H, K, L, O, R y S y 50 μm en los paneles B, C, F, G, I, J, M, N, P, Q, T y U y L. OI: ojo izquierdo. OD: ojo derecho. Tg: transgénico; +/+ : silvestre.

Para estudiar los posibles fenotipos oculares en mayor profundidad, se procedió al análisis histológico de cortes transversales de la cabeza de animales transgénicos y silvestres, tanto en estado larvario como adulto, teñidos con hematoxilina eosina o con Rojo Sirio. Como se esperaba, el análisis histológico de las larvas de 6 dpf no reveló ninguna diferencia significativa entre los animales transgénicos heterocigotos y los silvestres (**Figura suplementaria 18**), en concordancia con las observaciones realizadas en la generación F3. Del mismo modo, la histología de los adultos de 5 y 7 meses no mostró diferencias significativas entre peces transgénicos para *myoc* y peces silvestres en las estructuras oculares analizadas del segmento anterior, tales como ángulo iridocorneal dorsal y ventral, lente o córnea. Tampoco se observaron alteraciones en la retina de estos peces (**Figura suplementaria 19** y **Figura suplementaria 20**).

A continuación, se realizó el análisis histológico de secciones de tejido ocular de cinco peces transgénicos (13 meses) y de dos peces silvestres, usados como control. Las secciones, teñidas con hematoxilina-eosina, confirmaron las principales alteraciones variables del segmento ocular anterior detectadas en los peces transgénicos de la generación F3. Una observación general de estas secciones reveló anomalías variables del segmento anterior de tres peces, sin cambios aparentes en la retina (**Figura 55 A y B**). A esta edad, ni la cápsula ni el epitelio del cristalino parecían afectados. Tampoco se observaron otras anomalías significativas del cristalino en los peces que presentaban opacidad del mismo (**Figura 55 A y B**). El examen microscópico detallado del segmento anterior mostró claramente grados variables de engrosamiento del epitelio y estroma corneal, así como del ligamento anular en todos los ojos (**Figura 55 D-G**). El fenotipo más grave presentaba un segmento anterior extremadamente hipertrófico, con un notable aumento del número de células en epitelio corneal (**Figura 55 A y E**). También se observó un engrosamiento del estroma corneal y del ligamento anular, así como un sobrecrecimiento del iris con ausencia de la cámara anterior (**Figura 55 A y E, OI**). Otras características observadas de estos fenotipos fueron la presencia de numerosas células, probablemente queratocitos, en el estroma corneal engrosado (**Figura 55 E**, flechas azules), la formación de cavidades entre el epitelio corneal y el estroma, así como en los puntos de contacto entre la córnea y el iris (**Figura 55 B, E y G**), ensanchamiento del limbo corneal, aumento del número de melanocitos limbales (**Figura 55 E-G**, flechas amarillas), y engrosamiento e hipertrofia del epitelio ciliar no pigmentado (**Figura 55 E**). Los peces silvestres no mostraron ninguna de estas alteraciones oculares (**Figura 55 C y H**), indicando que son específicas de los animales transgénicos.

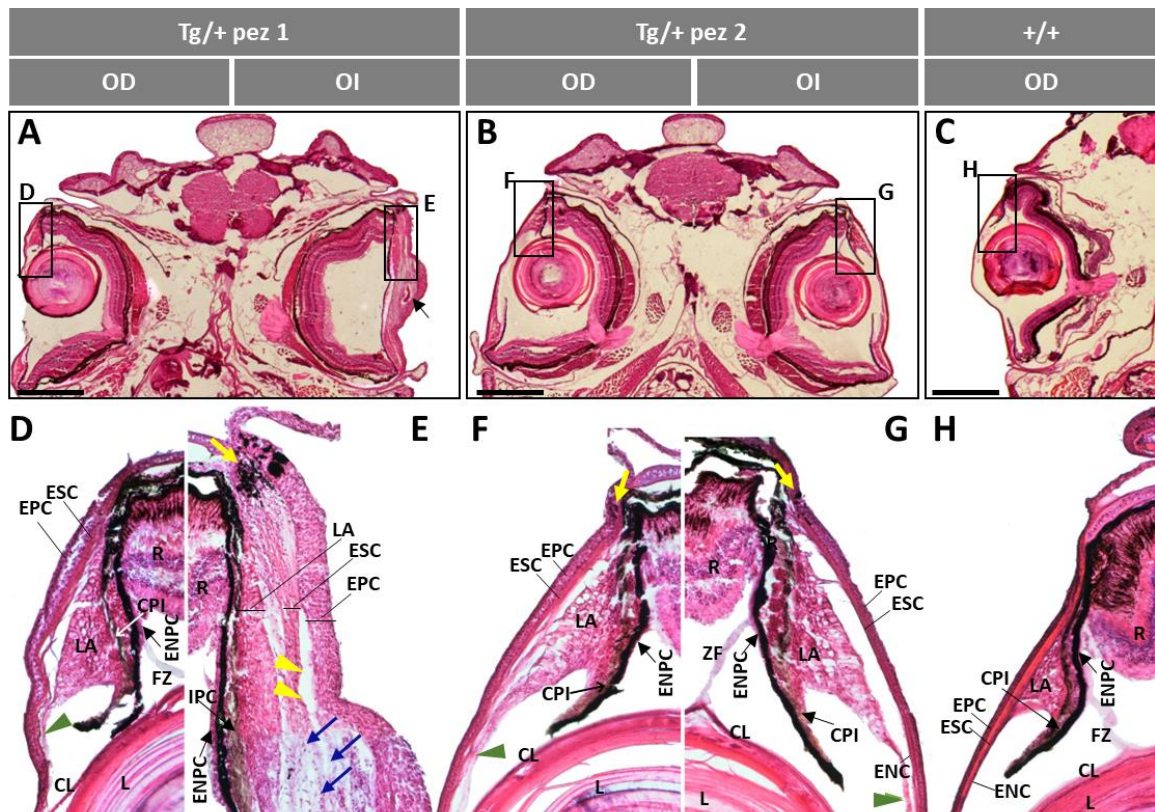


Figura 55. Histología del segmento ocular anterior de peces cebra transgénicos machos adultos de la generación F4 (13 meses). Las secciones de tejido de peces transgénicos de *myoc* (A, B, D-G) y silvestres (C y H) se tiñeron con hematoxilina-eosina. Barras de escala: 800 μ m en los paneles A-C y 50 μ m en los paneles D-H. Las imágenes son representativas de cinco peces cebra transgénicos. LA: ligamento anular; EPC: epitelio corneal; ESC: estroma corneal; ENC: endotelio corneal; R: retina; CPI: células pigmentarias del iris; L: lente; CL: cápsula de la lente; ENPC: epitelio ciliar no pigmentado; FZ: fibra zonular; OI: ojo izquierdo; OD: ojo derecho; Tg: transgénico; +/-: silvestre; flechas azules: aumento de queratocitos; flechas amarillas: melanocitos limbales; puntas de flecha amarilla: cavidades entre el LA y el ESC; puntas de flecha verde: alteración del ligamento anular.

En general, estos resultados revelan que los peces transgénicos adultos de la generación F4 a los 13 meses de edad presentan la mayoría de las principales alteraciones oculares, tanto macroscópicas como histológicas, identificadas en los peces transgénicos de la generación F3. Además, los fenotipos oculares de estos peces cebra transgénicos muestran que las alteraciones son variables y comienzan en el segmento anterior y en estadios más avanzados se extienden a la retina.

La tinción con Rojo Sirio confirmó estos hallazgos, revelando una intensa coloración roja en el estroma corneal de los peces transgénicos (Figura suplementaria 21 A-D, F-I), lo que evidenciaba la presencia de depósitos de colágeno en el estroma corneal del ojo izquierdo del pez transgénico 1 (Figura suplementaria 21 E y J).

Finalmente, el análisis detallado de las retinas y del nervio óptico no reveló ninguna diferencia entre los peces transgénicos y los peces silvestres a esta edad (**Figura suplementaria 22**), sugiriendo que las alteraciones observadas comienzan en el segmento anterior ocular. En conjunto, estos datos apoyan la existencia de una grave alteración de la matriz extracelular en los tejidos del segmento anterior de peces cebra transgénicos para el gen *myoc*.

Para caracterizar más en profundidad el patrón de expresión de miocilina en los peces transgénicos antes de la aparición de las alteraciones oculares, se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína a dos edades diferentes (6 dpf y 5 meses). La inmunodetección en larvas de 6 dpf mostró inmunoreactividad anti-miocilina en la capa de células ganglionares de la retina y en la capa plexiforme interna, como ya se observó en peces adultos. Esta señal detectada fue más intensa en larvas transgénicas (**Figura 56 A, B y D**) que en larvas silvestres (**Figura 56 E, F y H**), indicando la sobreexpresión de la proteína en estadios tempranos del desarrollo.

Por otro lado, la expresión del marcador fluorescente mCherry se observó débilmente en los fotorreceptores y en la lente (**Figura 56 C y D**). En esta etapa la expresión de ambas proteínas no es coincidente, pudiéndose deber al diferente destino celular de las dos proteínas como se ha comentado anteriormente. Como era de esperar, las larvas silvestres no mostraron expresión de mCherry. Únicamente, se observó la autofluorescencia propia del tejido en la zona del ángulo iridocorneal (**Figura 56 C, asterisco**). Como control para evaluar la especificidad de la señal, se utilizaron cortes histológicos de animales KO para *myoc* y silvestres. Estas secciones, incubadas bien con el anticuerpo anti-TNT o con el anticuerpo preinmune TNT respectivamente, confirmaron la especificidad de las señales observadas (**Figura suplementaria 23**).

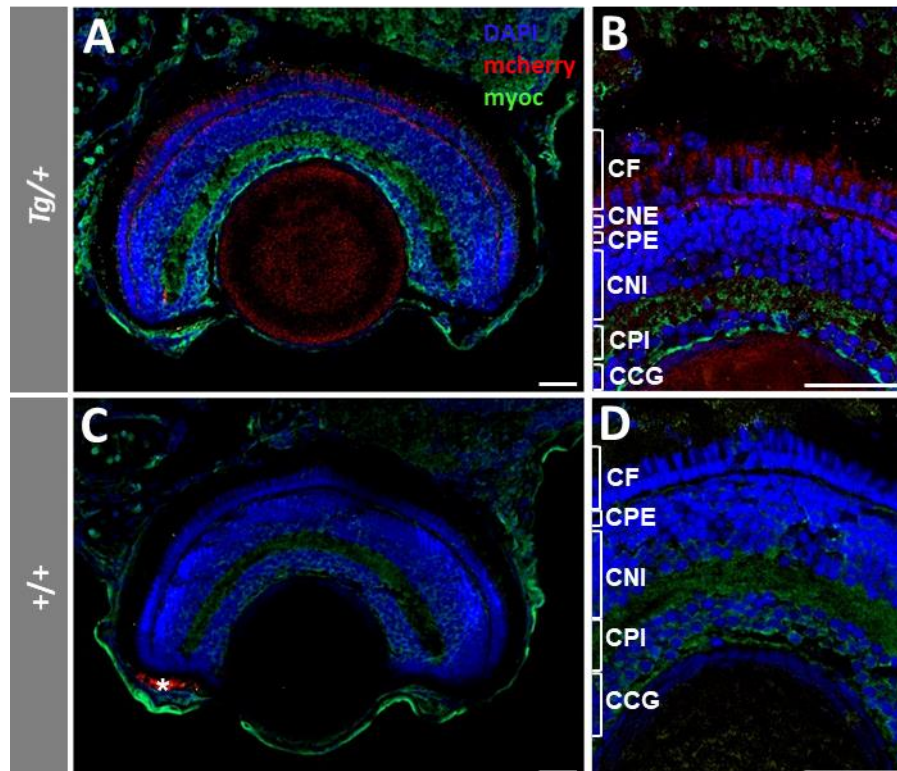


Figura 56. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de miocilina y mCherry en retina de larvas transgénicas de 6 dpf. Las secciones histológicas de larvas transgénicas para *myoc* (A y B) y silvestres (C y D) se incubaron con un anticuerpo primario anti-TNT obtenido en gallina (IgY). La especificidad de la señal se comprobó utilizando peces cebra KO para *myoc* o el anticuerpo preinmune, como controles negativos (**Figura suplementaria 23**). Barras de escala: 25 μ m. Las imágenes son representativas de cuatro individuos de cada genotipo. Asterisco: autofluorescencia del ángulo iridocorneal. CCG: capa de células ganglionares; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CF: capa fotorreceptora; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; Tg: transgénico; +/+ : Silvestre.

A continuación, se procedió a realizar la misma caracterización en peces adultos de 5 meses sin alteraciones oculares. Nos centramos en analizar estructuras oculares del segmento anterior en las que se observó la aparición inicial de los fenotipos. Los análisis inmunohistoquímicos revelaron un inmunomarcaje intenso de miocilina en el epitelio no pigmentado ciliar de los peces transgénicos (**Figura 57 A**) como ya se había descrito anteriormente. Esta expresión también se observó en los peces silvestres, aunque fue menos intensa (**Figura 57 E**). También se detectó expresión de miocilina tanto en epitelio como en endotelio corneal (**Figura 57 B**) en los animales transgénicos, mientras que en los silvestres únicamente se detectó en endotelio corneal (**Figura 57 F**). Además, se detectó expresión en la capa de células ganglionares de la retina y en fotorreceptores (**Figura 57 C**). Esta señal fue más intensa en los animales transgénicos en comparación con los peces silvestres (**Figura 57 G**).

La señal de mCherry, aunque muy débil, fue detectada en las células sanguíneas localizadas en los vasos del iris, en estroma corneal y en la capa de los fotorreceptores de los animales transgénicos (**Figura 57 A-C**) pero no en los silvestres (**Figura 57 E-G**). El inmunomarcaje de miocilina se correlacionó con la fluorescencia de mCherry en células sanguíneas de los vasos del iris, apoyando la especificidad de las señales observadas. Tanto en los peces transgénicos como en los silvestres se observó reactividad anti-miocilina en los condrocitos y en el pericondrio del cartílago escleral (**Figura 57 D y H**, flechas y cabeza de flecha respectivamente), siendo más intensa en los peces transgénicos, lo que apoya la sobreexpresión de miocilina en este cartílago. La especificidad de las señales observadas se confirmó mediante la incubación de las secciones histológicas con el anticuerpo preinmune y mediante inmunohistoquímica de animales *knock-out* para *myoc* incubadas con el anticuerpo anti-TNT, en las que como era de esperar, las tinciones fueron negativas (**Figura suplementaria 24**). Los resultados muestran la sobreexpresión de miocilina a los 5 meses en las estructuras que habían mostrado alteraciones en los peces adultos a partir del decimotercer mes de edad.

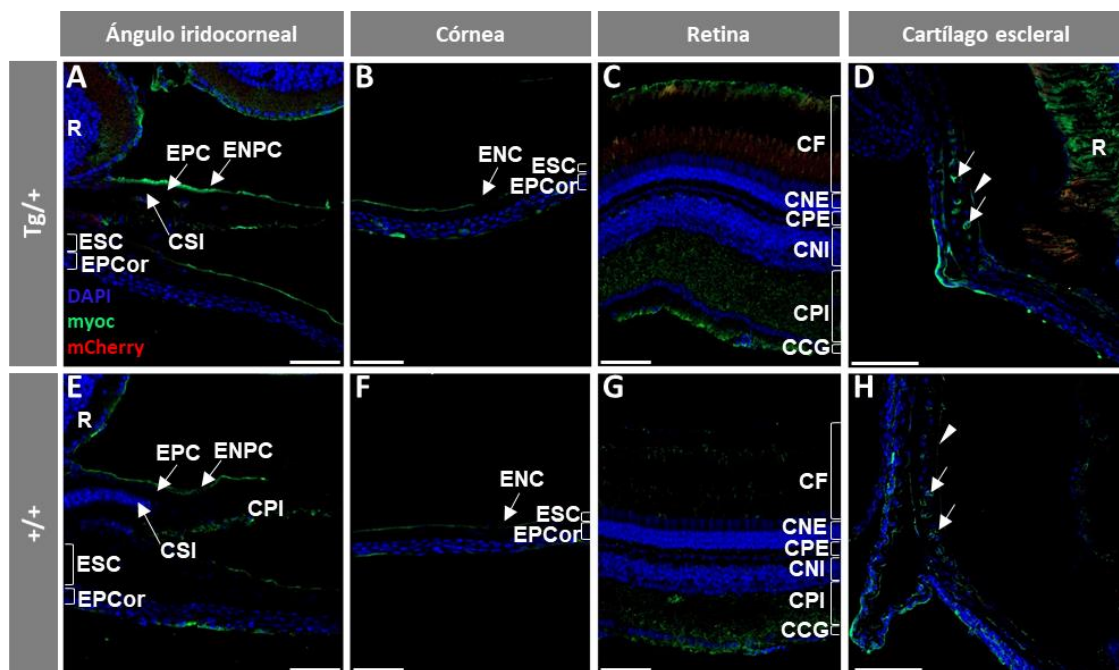


Figura 57. Detección inmunohistoquímica de miocilina en tejidos oculares de peces cebra transgénicos adultos (5 meses). Las secciones histológicas de peces transgénicos (A-D) y silvestres (E-H) se incubaron con un anticuerpo primario anti-TNT obtenido en gallina (IgY). Barra de escala: 50 μ m. CCG: capa de células ganglionares; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; CF: capa fotorreceptora; CSI: células sanguíneas del iris; ENPC: epitelio no pigmentado ciliar; EPC: epitelio pigmentado ciliar; EPCor: epitelio de la córnea; ESC: estroma de la córnea; R: retina; Tg: transgénico; +/+ : silvestre.

6.2.11 Estudio de proliferación celular en peces transgénicos adultos

Finalmente se evaluó la existencia de células en división en ojos de peces cebras transgénicos adultos mediante la detección del marcador de proliferación celular ki-67 (Gerdes et al., 1984). Para ello, se realizó un análisis inmunohistoquímico usando cortes histológicos de cabezas de peces adultos como se ha descrito anteriormente. Se identificaron grupos distribuidos irregularmente de células positivas para el anticuerpo anti-ki-67 en la capa de células ganglionares de la retina de peces transgénicos de 13 meses (**Figura 58 A**). Los peces silvestres de la misma edad, utilizados como control, presentaron un pequeño número de células positivas para el marcador Ki-67, aisladas en esta capa de la retina (**Figura 58 B**). Estas señales no se observaron en el control negativo (**Figura 58 C**) indicando la especificidad de la señal. Para el análisis, se seleccionaron zonas representativas de la retina de los peces cebras transgénicos y silvestres (**Figura 58 D y E**, respectivamente). El análisis cuantitativo mostró un número aproximadamente cuatro veces mayor de células ki-67 positivas en la capa de células ganglionares de la retina de los animales transgénicos en comparación con los peces silvestres (**Figura 58 F**). Estos resultados indican que la proliferación de las células ganglionares de la retina comienza al menos a los 13 meses de edad y apoyan la idea de que estas células contribuyen a las graves alteraciones de la retina previamente descritas en los peces transgénicos de 2 años que sobreexpresan miocilina.

Por otro lado, el análisis inmunohistoquímico para la detección de ki-67 en los peces transgénicos de 2 años no reveló diferencias significativas con los ojos de los peces silvestres (**Figura suplementaria 25**), lo que muestra que a esta edad no había un aumento detectable de la proliferación celular en el segmento anterior hipertrófico y en la retina.

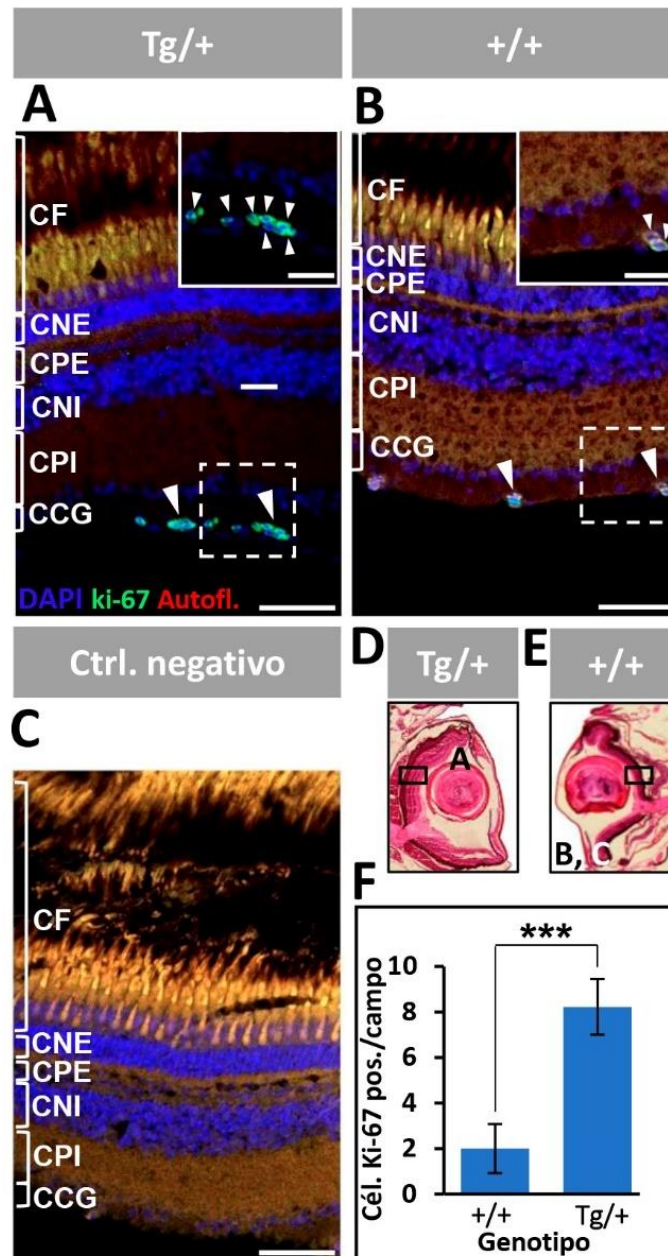


Figura 58. Detección inmunohistoquímica del marcador de proliferación celular ki-67 en tejidos oculares de peces cebra transgénicos adultos (13 meses). Se utilizó un anticuerpo primario anti-Ki-67 para detectar las células en proliferación. En los insertos se muestra una ampliación digital de las células positivas indicadas con cuadrados blancos discontinuos. (C) El control negativo consistió en secciones de tejido incubadas sólo con el anticuerpo secundario. (D y E) Secciones oculares representativas que indican la ubicación de los campos microscópicos mostrados en los diferentes paneles. (F) Cuantificación de las células Ki-67 positivas. Se analizaron cuatro campos microscópicos por ojo (n=cuatro ojos). ***: $p < 0,001$, prueba t de *Student*. Barra de escala :50 μm . Fotos representativas de un mínimo de tres peces por genotipo. Puntas de flecha: Marcaje de ki-67 en células sanguíneas. CCG: capa de células ganglionares; cél.: células; CF: capa fotorreceptora; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; pos.: positivas; Tg: transgénico; +/+ : silvestre.

7. DISCUSIÓN

7.1 Generación y establecimiento de la línea KO para *myoc*

Desde que se identificó en 1997 el gen *MYOC* por su relación con glaucoma, se ha avanzado poco tanto en el conocimiento de su función biológica como en la comprensión del mecanismo por el que las mutaciones en este gen producen la patología. Por lo tanto, estas cuestiones siguen representando un problema científico de interés.

Los estudios genéticos humanos han demostrado que las mutaciones en *MYOC* que causan GPAA se localizan mayoritariamente en el tercer exón del gen. Aunque la enfermedad podría estar causada por una cantidad insuficiente de proteína en los individuos heterocigotos, los estudios realizados apoyan un mecanismo de ganancia de función (Kim et al., 2001; Lam et al., 2000). La inducción de la pérdida de función de un gen, así como la sobreexpresión y/o expresión ectópica de productos normales de genes constituyen herramientas experimentales potentes para identificar las vías biológicas en las que éstos están involucrados (Prelich, 2012). De acuerdo con estas ideas, en la presente tesis doctoral se ha empleado como estrategia inicial para estudiar la función biológica de miocilina, la generación de un modelo de pérdida de función en pez cebra mediante el desarrollo de una línea *knock-out* para el gen *myoc* y en la que se han caracterizado los fenotipos resultantes en los niveles molecular, tisular y macroscópico.

7.1.1 Establecimiento de la línea *knock-out* para *myoc*

Mediante el sistema CRISPR/Cas9, generamos una línea *knock-out* de *myoc* portadora de la mutación c.236_239delinsAAAGGGGAAGGGA, que consiste en una inserción de 14 nucleótidos y una deleción de 4. El análisis de las características de esta mutación permite predecir que causa un desplazamiento de la pauta de lectura en la región codificante y la aparición de un codón de terminación prematuro p.(V75EfsX60), por lo que la proteína mutante no sería funcional en caso de ser traducida. Además, la presencia del codón prematuro de terminación en el ARNm mutante también podría conducir a su degradación mediante el mecanismo de degradación de ARN mediado por mutaciones sin sentido, también conocido como NMD por sus siglas en inglés (*Non-sense Mediated Decay*) (Hug et al., 2016). En efecto, el estudio mediante qRT-PCR demostró una reducción drástica del ARNm de un 80% en las larvas *knock-out* homocigotas, apoyando fuertemente que la línea obtenida es un modelo experimental de pérdida de función del gen *myoc*. Estudios previos han utilizado el sistema CRISPR/Cas9 para alterar el gen *MYOC* y su función en células de la malla trabecular humanas y de ratón en un modelo de ratón de GPAA (Jain et al., 2017).

Hasta donde sabemos, a pesar de que se han generado diferentes líneas *knock-out* para el gen *myoc* en ratón (Jain et al., 2017; Kim et al., 2001), esta es la primera obtenida en pez cebra.

7.1.2 Caracterización del patrón de expresión de la proteína miocilina en el pez cebra

La línea *knock-out* obtenida es un buen control para investigar la localización tisular específica de miocilina mediante técnicas de inmunodetección. La falta de anticuerpos específicos para detectar miocilina y los controles adecuados han dificultado la inmunodetección de esta proteína y ha proporcionado resultados controvertidos sobre su expresión. Para poder detectar miocilina de la manera más específica posible, se utilizó un anticuerpo policlonal obtenido en gallina (IgY) dirigido contra el péptido N-terminal de la proteína humana (anti-TNT). Otros grupos también han sintetizado sus propios anticuerpos para realizar estos estudios y así poder detectar la presencia de miocilina (Karali et al., 2000).

Los análisis inmunohistoquímicos de embriones completos de 96 hpf revelaron la presencia de la proteína de manera específica en el ojo y en los músculos caudales. Este último dato coincide con los obtenidos en otros estudios en los que se ha mostrado la presencia de la proteína en el músculo esquelético de ratones silvestres, concretamente alrededor del sarcolema y el sarcoplasma (Joe et al., 2012).

Además, los análisis inmunohistoquímicos en secciones histológicas de peces adultos revelaron la presencia de miocilina en las células secretoras del epitelio ciliar no pigmentado, en coincidencia con la expresión del gen humano en el cuerpo ciliar (Aroca-Aguilar et al., 2011; Karali et al., 2000). También se ha detectado la expresión de miocilina en el epitelio no pigmentado en cánidos (Hart et al., 2007). Estos resultados sugieren que, al igual que su gen ortólogo humano, la proteína del pez cebra podría secretarse en el humor acuoso (Aroca-Aguilar et al., 2005; Russell et al., 2001). También se ha detectado miocilina en el estroma del iris, en endotelio corneal y en la capa de células ganglionares de la retina. Esta localización también es similar a la de la proteína humana, que está presente en las células del estroma del iris, así como en epitelio y endotelio de la córnea (Karali et al., 2000). No obstante, y a diferencia de la proteína humana, miocilina es casi indetectable en epitelio corneal del pez cebra, localizándose predominantemente en el endotelio.

Respecto a la expresión en tejidos extraoculares, los análisis inmunohistoquímicos en pez cebra han revelado la expresión de miocilina alrededor de las células del músculo esquelético faríngeo

e intracelularmente en las células epiteliales del intestino medio, detectándose intensamente en el borde en cepillo.

Nuevamente, en consonancia con nuestros resultados, se ha detectado la presencia de ARNm de *myoc* en el músculo esquelético humano (Nguyen et al., 1998; Ortego et al., 1997a) y en el intestino delgado (Fingert et al., 1998). Además, mediante análisis inmunohistoquímico se ha descrito la presencia de miocilina en el intestino delgado, duodeno y estómago, y en menor medida en el colon (Uhlén et al., 2015). Cabe resaltar que la proteína olfactomedina-4, relacionada con miocilina, está presente en las células madre intestinales y aparentemente está involucrada en la defensa de la mucosa (Liu et al., 2010). Estos resultados sugieren que miocilina, como proteína secretada, podría desempeñar un papel en la matriz extracelular muscular y del intestino delgado, aunque se requiere más trabajo para determinar el papel de miocilina en estos tejidos.

Finalmente, en pez cebra se detectó miocilina en gónadas masculinas y femeninas adultas, concretamente en el epitelio folicular del ovario, en los gránulos corticales de los ovocitos vitelogénicos y en las células de los túbulos seminíferos. Esto podría indicar que miocilina juega un papel en la producción de los gametos en el pez cebra. Mediante *Northern blot* se ha descrito la presencia de ARNm de *myoc* en testículos de ratón (Tomarev et al., 1998), y por otra parte también se ha detectado mediante inmunohistoquímica la presencia de la proteína humana en las trompas de Falopio, endometrio y en menor medida en los testículos, el epidídimo y en la vesícula seminal (Uhlén et al., 2015). También se ha detectado una ligera expresión del ARNm de *myoc* en órganos reproductores humanos, tanto femeninos (vagina, ovario, trompas de Falopio y endometrio), como masculinos (próstata y epidídimo) (Uhlén et al., 2015). La expresión de miocilina en tejido germinal indiferenciado de pez cebra sugiere que esta proteína puede desempeñar un papel en la diferenciación sexual de este animal, como se discutirá más adelante.

Así pues, las características y los paralelismos en el patrón de expresión de miocilina entre estos dos organismos indican que el pez cebra es un modelo para estudiar la función de miocilina.

7.1.3 Caracterización fenotípica de los peces *knock-out* para *myoc*

Debido a la asociación del gen *MYOC* con el glaucoma, los ojos fueron principal foco de estudio.

El análisis histológico de las secciones de pez cebra, tanto embriones como adultos, no mostró alteraciones macroscópicas ni histológicas en las estructuras oculares. Tampoco se observaron

anomalías en los diferentes órganos que expresan miocilina, como el músculo esquelético o el aparato digestivo. Estos resultados indican que, en condiciones normales, miocilina no es esencial para la morfología normal de los tejidos en los que la proteína se expresa.

Es interesante resaltar que, estudios previos han mostrado que la pérdida de función de *myoc* en ratones, tampoco origina alteraciones fenotípicas significativas en tejidos oculares. Esto demuestra que la reducción de la dosis genética o la eliminación del producto génico no causa ninguna anomalía relevante en los ojos (Kim et al., 2001), al menos en condiciones normales.

Además, y en consonancia con nuestros resultados, se ha descrito que la variante p. (Arg46X), que produce un codón prematuro de terminación, presente en homocigosis en una mujer de 77 años que puede ser considerada como un *knock-out* natural para el gen *MYOC*, no produce fenotipos patogénicos identificables. (Lam et al., 2000). El truncamiento de la proteína 13 aminoácidos después del aminoácido 46 por la presencia del codón prematuro de terminación eliminaría más del 90% de la longitud normal de la proteína.

El hecho de no observar fenotipos relacionados con el glaucoma en la línea KO apoya la hipótesis de que las variantes patogénicas conducen a una ganancia de función con un efecto tóxico debido al plegamiento anómalo y la agregación intracelular de la proteína mutante (Joe et al., 2015; Joe & Tomarev, 2010). Por otra parte, el fenotipo aparentemente normal, que se asocia con la pérdida de función de *MYOC* en diferentes especies, puede deberse a la existencia de redundancia funcional de otros productos génicos relacionados que, al menos en condiciones normales, podrían compensar la ausencia de miocilina en la mayoría de los tejidos que expresan este gen.

Como se ha comentado, la generación de una línea *knock-out* de *myoc* no ha mostrado fenotipos oculares en los peces homocigotos mutantes. Sin embargo, durante el proceso de obtención de la línea KO observamos un sorprendente hallazgo. Durante ocho cruces en diferentes generaciones (F3-F5) obtenidas por endocruces de peces hermanos heterocigotos, no observamos la aparición hembras entre los peces homocigotos. Además, en los peces heterocigotos también se observó una reducción de la proporción de hembras, respecto de animales silvestres. Así, mientras el 41% de los peces silvestres eran hembras, solamente el 25 % de los peces heterocigotos fueron de este sexo. En los cruces realizados, las proporciones genotípicas no difirieron significativamente de los valores mendelianos esperados, lo que descarta un sesgo producido por el genotipo e indica que el gen *myoc* es necesario para la determinación de la gónada de las hembras en los peces cebra. Se sabe que la proporción y la determinación sexual en esta especie se ve alterada por factores ambientales tanto bióticos como

abióticos (Valdivieso et al., 2019). Uno de los principales factores es el estrés, que puede estar causado por cambios en la temperatura del agua y el pH (Abozaid et al., 2011, 2012; Ribas et al., 2017; Santos et al., 2017; Uchida et al., 2002); la hipoxia (Lo et al., 2011; Robertson et al., 2014; Shang & Wu, 2004; Shang et al., 2006); hormonas disruptoras endocrinas; altas densidades de estabulación (Hazlerigg et al., 2012; Liew et al., 2012; Ribas et al., 2017) y la reducción del alimento (Lawrence et al., 2008). Estudios transcriptómicos han mostrado genes masculinos diferencialmente sobreexpresados en el pez cebra cuando se incrementa la temperatura del agua (King et al., 2020). Todos estos factores ambientales fueron controlados en la realización de los cruces experimentales, por lo que resulta muy poco probable que hayan afectado a la proporción de sexos observada. Además, la localización cromosómica de *myoc* (cromosoma 20) no coincide con ninguno de los *loci* identificados en el pez cebra que afectan a la proporción de sexos de una manera dependiente de la cepa (Anderson et al., 2012; Bradley et al., 2011; Howe et al., 2013a; Liew et al., 2012).

El análisis inmunohistoquímico de miocilina en gónadas de peces cebra reveló su expresión en la gónada juvenil inmadura de peces silvestres a los 28 dpf, pero no en la de peces *knock-out*, apoyando la especificidad de la señal. Estos datos indican que *myoc* podría ser un gen nuevo que participa en la determinación del sexo del pez cebra. Por otro lado, la ausencia de la proteína no afecta a la viabilidad de los machos, formándose testículos normales. Este hecho indica que la proteína es necesaria para la diferenciación de los ovarios, y que la presencia de miocilina en el pez cebra silvestre no bloquea el desarrollo testicular en todos los individuos, lo que sugiere que otros factores podrían modular el papel de la miocilina como factor pro femenino.

Para confirmar esta hipótesis se requieren más estudios, que no han podido ser realizados en el contexto de este trabajo de tesis doctoral, entre los que se incluiría el análisis histológico, inmunohistoquímico y de expresión génica de células germinales primordiales y de gónadas juveniles en proceso de transformación de ovario a testículo. Los resultados obtenidos posiblemente serán útiles para dilucidar el mecanismo por el que miocilina interviene en la diferenciación gonadal en el pez cebra.

7.1.4 Estudio transcriptómico de los peces KO para *myoc*

Con el objetivo de caracterizar el fenotipo observado en la línea *knock-out* para *myoc* a nivel de expresión génica, se realizó un análisis transcriptómico a partir de ARN de un grupo de peces adultos.

Este análisis reveló una media de 6184 genes significativamente sobreexpresados y 6023 significativamente subexpresados, lo que indica la existencia de diferencias marcadas en la expresión génica entre los machos adultos asociados al genotipo KO. Los DEGs se analizaron mediante un análisis de enriquecimiento utilizando la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), que permite evaluar las relaciones funcionales existentes entre los genes de interés. La selección de las 20 vías de KEGG con mayores diferencias significativas entre los peces mutantes y silvestres y su análisis posterior permitió agruparlas en dos categorías funcionales generales relacionadas con el metabolismo y con el procesamiento de la información y genética. Por otra parte, el análisis detallado del enriquecimiento, centrado en los DEGs más sobre- y subexpresados, identificó categorías funcionales significativas relacionadas con la reproducción, la meiosis, la estructura anatómica y el desarrollo. Estos datos indican que estos procesos posiblemente están implicados en el mecanismo por el que la pérdida de función de miocilina da lugar a la diferenciación de la gónada del pez cebra a ovario. Dos genes de α -tubulina (*tuba7l* y *tuba4l*), fueron, respectivamente, los más *sobreexpresados* y *subexpresados* en los peces machos KO. De acuerdo con nuestros resultados, se ha descrito mediante qRT-PCR que *tuba7l* está sobreexpresado en testículos de pez cebra sexualmente maduro (Santos et al., 2007), mientras que *tuba4l* es el gen más subexpresado en gónadas masculinas de pez cebra masculinizado por tratamiento con alta temperatura (Hosseini et al., 2019). Los genes *tuba4* y *tuba7l* están implicados funcionalmente en el desarrollo del folículo ovárico y de los testículos, respectivamente (Knoll-Gellida et al., 2006; Santos et al., 2007).

También identificamos varios DEGs en el pez cebra macho *KO* que desempeñan un papel clave en la diferenciación sexual masculina, entre los que se encuentran los siguientes: *dmrt1*, *amh*, *sycp3*, *cyp11a1*, *cyp11c1* y *star*. Estudios previos mediante la generación de peces *knock-out* han demostrado que el gen *dmrt1* interviene en la determinación y/o mantenimiento del sexo masculino, ya que la mayoría de los mutantes que han perdido la función de este gen se desarrollan como hembras. Además, estas investigaciones revelaron que, aunque en ausencia de *dmrt1* en algunos individuos la gónada se diferencia a testículo normal, éstos acaban perdiendo células germinales (Webster et al., 2017). Además, los testículos derivados de los peces *knock-out* para *dmrt1* no expresan el gen de la hormona antimülleriana (*amh*), que es clave en la expresión testicular, y sobreexpresan el gen *foxl2* asociado al ovario (Webster et al., 2017). La hormona antimülleriana es un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento TGF- β y se sobreexpresa en testículos del pez cebra sexualmente maduro (Santos et al., 2007), promoviendo el desarrollo masculino, aunque no es esencial para este proceso (Yan et al., 2019). Trabajos

previos han demostrado que peces cebra mutantes para *amh*, que se desarrollan como machos, conservan los ovocitos durante más tiempo que sus hermanos silvestres, que generalmente se desarrollan como hermafroditas antes de hacer la transición para convertirse en machos o hembras alrededor de 19 a 30 días después de la fertilización (Rodríguez-Marí et al., 2005; Takahashi, 1977; Wang et al., 2007). Esto sugiere que *amh* promueve la apoptosis de los ovocitos en la transición juvenil del pez cebra.

Por otro lado, *sycp* es un gen pro-masculino y un marcador de espermatocitos para células meióticas (Ozaki et al., 2011). *Cyp11a1* y *star* son dos genes esteroidogénicos que codifican proteínas que controlan etapas limitantes de biogénesis de esteroides necesarios para la producción de andrógenos (Miller, 1988). Además, *cyp11c1* es necesario para la transición de ovario a testículo en los peces juveniles, el desarrollo de células de Leydig y la espermatogénesis en machos, dado que participa en la síntesis del principal andrógeno natural en peces teleósteos (11-cetotestosterona) (Zhang et al., 2020).

De acuerdo con nuestros resultados, otros estudios también han descrito que algunos de estos genes están sobreexpresados (*dmrt1*, *amh*, *sycp3*, *cyp11c1* y *star*) o subexpresados (*cyp11a1*) en gónadas masculinas de pez cebra masculinizados por tratamiento con temperatura elevada del agua (35 °C) (Hosseini et al., 2019). Considerados globalmente, estos datos revelan que la pérdida de función del gen *myoc* está asociada con la sobreexpresión de genes responsables de la diferenciación sexual de los machos en el pez cebra.

También cabe resaltar que en este estudio encontramos varios genes de señalización de la vía Wnt como *dvl3a*, *lef1*, *ctnnb2* y *ctnnbip1*, que estaban subexpresados en los peces machos *knock-out* de *myoc*. Desde hace tiempo, se sabe que la señalización de la vía Wnt está implicada en el desarrollo sexual de los mamíferos (Vainio et al., 1999a). Trabajos realizados recientemente en pez cebra han demostrado que la inhibición de Wnt puede dar lugar a proporciones de sexo con predominio masculino, indicando que Wnt está implicada en la diferenciación gonadal del pez cebra (Sreenivasan et al., 2014a). El producto del gen *dvl3a* es necesario en el cigoto para la activación de la señalización de la vía Wnt/ β -catenina y de la vía Wnt que controla la polaridad celular planar (Xing et al., 2018). El factor de transcripción *lef1* se asocia con β -catenina para activar la expresión génica (Brock, 2014) y *ctnnb2* codifica β -catenina 2, que es el factor de transcripción clave de esta vía de señalización. Se ha observado que los machos para *myoc* presentan una expresión disminuida de la expresión del gen *ctnnbip1*, un represor de la transactivación mediada por β -catenina-TCF-4 (Tago K. et al., 2000), que podría contribuir a equilibrar la atenuación de la vía Wnt. No obstante, esta diferencia de expresión debe ser

confirmada. Además, se ha observado que el inhibidor secretado de Wnt, *dkk1a* (Krupnik et al., 1999), estaba sobreexpresado en los machos *knock-out*, lo que puede contribuir a la disminución de la señalización de esta vía.

De acuerdo con nuestros resultados, se ha demostrado que *myoc* modula la vía de señalización Wnt (Kwon, Lee, Ji, Rubin, Tomarev, et al., 2009; Shen et al., 2008b) y que interactúa con dos inhibidores secretados de la señalización Wnt (proteínas 1 y 3 relacionadas con *Frizzled*) y con varios receptores *Frizzled* (Fzd1, Fzd7 y Fzd10) (Kwon, Lee, Ji, Rubin, Tomarev, et al., 2009). Por otro lado, la inhibición de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en pez cebra conduce a un aumento de la proporción de machos de pez cebra y a una disminución de la expresión de los genes *cyp19a1a* y *lef1* (Sreenivasan et al., 2014b). En conjunto estos datos apoyan que la pérdida de función de *myoc* regula negativamente la vía pro-femenina de señalización Wnt (Kossack et al., 2019; Sreenivasan et al., 2014b), inhibiendo la diferenciación de los ovarios y conduciendo a la formación de testículos. Además, se sabe que β -catenina es un regulador transcripcional esencial de la aromatasa (Parakh et al., 2006), un gen que parece desempeñar un papel clave en la diferenciación y el desarrollo ovárico (Lau et al., 2016b).

En consonancia con estos datos, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran que el gen *cyp19a1* está subexpresado en el transcriptoma de pez cebra KO *myoc*. Así pues, la subexpresión tanto de la vía de señalización Wnt como de la aromatasa (*cyp19a1*) que se han encontrado asociadas con la pérdida de función del gen *myoc*, puede bloquear la diferenciación ovárica de la gónada del pez cebra juvenil, lo que conduciría a la formación de los testículos. De acuerdo con estas ideas, otros estudios han demostrado que la señalización de Wnt desempeña un papel en la determinación del sexo tanto en otros teleósteos (Alber & development, 1992; Nicol & Guiguen, 2011) como en mamíferos (Vainio et al., 1999b), planteando la investigación del papel que podría desempeñar *myoc* en la determinación del sexo en los seres humanos y en otros mamíferos.

7.2 Generación y establecimiento de una línea transgénica para *myoc*

7.2.1 Establecimiento de la línea transgénica para *myoc*

Como estrategia adicional para intentar determinar el papel biológico de *myoc* hemos generado la primera línea transgénica de pez cebra que sobreexpresa miocilina.

Hasta donde sabemos, no se han establecido líneas transgénicas de pez cebra para estudiar la función de *myoc*. No obstante, se han generado varias líneas transgénicas para este gen en

ratones con el objetivo de tener un modelo genético de GPAA. Un ejemplo es la línea transgénica con la mutación Tyr437His, que ha sido identificada en pacientes con glaucoma severo (Senatorov et al., 2006; Zhou et al., 2008).

La línea de pez cebra establecida en esta tesis doctoral integró el transgén bicistrónico [Tg(actb1:myoc-2A-mCherry)] en el cromosoma 11, en una región intergénica aguas arriba del gen *tbl1xr1a*, dando como resultado la sobreexpresión de *myoc* de aproximadamente cuatro veces con respecto al pez cebra silvestre.

7.2.2 Caracterización fenotípica de los peces transgénicos de *myoc*

Teniendo en cuenta la expresión de miocilina en los tejidos oculares humanos (Huang et al., 2000; Ortego et al., 1997a) y del pez cebra (Atienzar-Aroca et al., 2021) y el papel de este gen en el glaucoma, en este estudio centramos nuestros análisis principalmente en los fenotipos oculares asociados a la sobreexpresión miocilina.

El análisis general de los embriones transgénicos de 6 dpf no mostró alteraciones macroscópicas ni histológicas en las estructuras oculares. Del mismo modo, la histología de los adultos de 5 y 7 meses tampoco mostró alteraciones detectables en las estructuras oculares analizadas. Estos datos apoyan que, hasta esa edad, la sobreexpresión de miocilina no afecta a la morfología ocular normal y a los tejidos en los que la proteína se expresa. Este hallazgo no fue sorprendente, ya que estudios anteriores han demostrado que los modelos animales vertebrados en condiciones estándar no desarrollan alteraciones oculares como resultado de la pérdida de función (Atienzar-Aroca et al., 2021; Kim et al., 2001) o de la sobreexpresión transgénica de *myoc* (Gould et al., 2004). No obstante, otros estudios han revelado que la expresión elevada de este gen en el invertebrado *Drosophila* dio lugar a alteraciones oculares (Carbone et al., 2009; Gould et al., 2004).

Curiosamente, a los 13 meses detectamos la presencia de alteraciones variables y con penetrancia incompleta en el segmento anterior ocular de los peces cebra transgénicos, que afectaban predominantemente a la córnea, al ligamento anular y al cristalino. De los 7 peces analizados, el 85,7% mostró turbidez variable del cristalino, indicando la existencia de cataratas. Cabe resaltar que, en la línea transgénica de ratón que sobreexpresa miocilina mutada, las lentes desarrollaron cataratas perdiendo completamente la transparencia del cristalino (Zillig et al., 2005). Las anomalías más graves del segmento anterior descritas en esta memoria se caracterizaban por el ensanchamiento del limbo corneal, el engrosamiento del epitelio y el

estroma de la córnea, y un crecimiento excesivo del ligamento anular y el iris, que en el fenotipo más grave daba lugar a una reducción del tamaño de la cámara anterior y de la pupila. En algunos casos también se observó un llamativo engrosamiento del estroma corneal con la presencia de quistes que contenían depósitos de colágeno y abundantes queratocitos. La expansión de los queratocitos estromales podría indicar un defecto en el nicho de células madre del limbo, el lugar de formación de las células corneales y estromales (Funderburgh et al., 2016). A esta edad también encontramos una hipertrofia del epitelio no pigmentado ciliar y una mayor proliferación de células ganglionares. Esto podría preceder a las graves alteraciones displásicas de la retina presentes en los peces cebra transgénicos de dos años. Aunque se observaron diferentes grados de opacidad del cristalino en los peces cebra transgénicos vivos de esta edad, no se detectaron alteraciones histológicas significativas con la tinción de hematoxilina-eosina. Una característica adicional fue la presencia de una hipertrofia variable del cuerpo coroideo. Estas anomalías oculares también estaban presentes en los peces cebra transgénicos de dos años que, en algunos ojos, también mostraban una mayor deposición de colágeno e hipertrofia de la cápsula del cristalino. Además, el cartílago escleral presentaba un mayor número de condrocitos y de matriz extracelular, y en los fenotipos más graves se observó la presencia abundante de material vítreo.

En general, estos resultados demuestran que la sobreexpresión de miocilina se asocia con graves alteraciones de la matriz extracelular en diferentes regiones del ojo y con un mayor número de células implicadas en la síntesis de ésta, es decir, queratocitos, células epiteliales del cristalino, condrocitos del cartílago escleral y células del epitelio no pigmentado ciliar. Todo ello refuerza su papel como proteína matricelular.

En los peces transgénicos de dos años, las alteraciones retinianas variables asociadas a la sobreexpresión *in vivo* de miocilina se caracterizaron por áreas de degeneración. El fenotipo más grave presentaba un notable sobrecrecimiento retiniano que daba lugar a la desorganización de las capas de la retina y a la invasión de la cavidad vítrea y a la hipertrofia del nervio óptico. Estas alteraciones no se observaron en los peces silvestres, apoyando que los fenotipos son específicos de los peces transgénicos. Otros investigadores han generado tres líneas transgénicas de *myoc* en ratón. Una de ellas expresa 1,8 Kb del ADNc humano de *MYOC* bajo el control de un promotor específico del cristalino (β -cristalina 1) (Koch et al., 2014; Zillig et al., 2005). Cabe destacar que, en esta línea, se observó un aumento en el grosor de la capa nuclear externa (CNE) pero no cambios morfológicos en los fotorreceptores o en la córnea. Por el contrario, nuestros resultados mostraron una reducción de la capa plexiforme externa, pero con un incremento en el número de núcleos en el estroma corneal y el ligamento anular. La otra línea transgénica de ratón

expresaba altos niveles de miocilina en tejidos oculares, similares a los inducidos por el uso de corticosteroides y tampoco mostró ningún signo de degeneración en la retina y del nervio óptico, lo que llevó a sus creadores a proponer que la patogénesis de la enfermedad en pacientes con GPAA depende de la expresión de proteínas mutantes anormales y no solo de la sobreexpresión o incremento de la cantidad de la proteína normal (Gould et al., 2004).

La tercera línea de ratones transgénicos para miocilina expresaba la mutación de *myoc* Tyr423His, correspondiente a la mutación humana Tyr437His, encontrada en pacientes con glaucoma juvenil. En estos ratones transgénicos observaron fenotipos oculares como un ligero aumento de la presión intraocular, degeneración axonal del nervio óptico y una pérdida de aproximadamente el 20% de células ganglionares de la retina (Chou et al., 2014; Zhou et al., 2008).

Otro hallazgo interesante fue que las alteraciones oculares estaban presentes en los peces cebra transgénicos adultos que eran machos, pero no en las hembras, lo que indica que podría ser necesaria la interacción a largo plazo de los factores fisiológicos masculinos con miocilina sobreexpresada para desarrollar las alteraciones oculares presentes en esta línea. Como se ha comentado anteriormente, nuestros estudios han propuesto un papel de miocilina en la determinación del sexo del pez cebra (Atienzar-Aroca et al., 2021). Sin embargo, debido a la muestra relativamente pequeña de peces cebra transgénicos, no se puede descartar completamente un sesgo de sexo en estas observaciones. Por lo tanto, se requieren trabajos adicionales para confirmar estos resultados.

Muchos de los defectos del segmento anterior descritos se asemejan a los causados por la pérdida de función del gen *crumbs2b* (*crb2b-lf*) del pez cebra. Éstos se caracterizan por un sobrecrecimiento variable e incompleto del iris y de los tejidos del ángulo iridocorneal, lo que da lugar a pupilas pequeñas, a un mayor número de queratocitos del estroma corneal, a una alteración del endotelio corneal y a una proliferación de la cápsula del cristalino (Kujawski et al., 2020). Las “crumbs” son proteínas transmembrana, localizadas en la membrana apical que intervienen en la organización epitelial y en los procesos de polaridad celular (Kujawski et al., 2020). Su disfunción se relaciona con pérdida de polaridad y adhesión celulares, aumento de la apoptosis temprana de la retina, alteración de la laminación retiniana (Quinn & Wijnholds, 2019) y degeneración variable de la retina (Alves et al., 2013; Pellissier et al., 2013). El complejo de la proteína crumbs también coordina múltiples vías de señalización como las vías de Notch e Hippo, con funciones en diferentes procesos de desarrollo, incluyendo la autorrenovación celular, la proliferación, la diferenciación, la mitosis y la apoptosis (Genevet et al., 2009; Thompson et al., 2013). La integración de todos estos datos puede sugerir un posible mecanismo para explicar los

fenotipos observados en la línea transgénica generada. La sobreexpresión de miocilina, como proteína matricelular, podría alterar la adhesión celular a través del complejo *crumbs* contribuyendo a las alteraciones observadas en la retina. También es interesante resaltar que estudios previos han aportado evidencias sobre el papel de adhesión celular de miocilina, aunque probablemente por mecanismos diferentes (Aroca-Aguilar et al., 2018; Goldwich et al., 2009). Además, de acuerdo a estas ideas, se ha propuesto que los dominios de olfactomedina facilitan las interacciones proteína-proteína, las interacciones intercelulares y la adhesión celular (Anholt, 2014). Aunque todos estos datos sugieren un vínculo funcional entre las vías de *myoc* y las *crumbs*, se requieren más investigaciones para confirmar las hipótesis.

7.2.3 Estudio del patrón de expresión de miocilina en la línea transgénica

En primer lugar, se analizó el patrón de expresión del transgén bicistrónico en los peces adultos de 2 años que presentaban alteraciones oculares. Se observó una expresión débil de la proteína fluorescente mCherry en epitelio no pigmentado ciliar (ENPC), en células sanguíneas de los vasos del iris y en epitelio y endotelio corneal. Estas señales colocalizaron con la expresión de miocilina, detectada en el ENPC, en vasos sanguíneos del iris y en endotelio de la córnea. El hallazgo de la expresión de miocilina en el ENPC apoyaría que la proteína en el pez cebra podría secretarse en el humor acuoso, como sucede en mamíferos. La señal observada en epitelio corneal se limitó a la capa más externa, y no se solapaba con mCherry, por lo que probablemente sea miocilina endógena. También se observó colocalización de mCherry y miocilina en los segmentos externos de los bastones y en la capa plexiforme interna. Estos datos muestran claramente una correlación entre la expresión de miocilina y la presencia de alteraciones oculares, indicando una relación causa-efecto. No obstante, y a diferencia de nuestros resultados en pez cebra, los ratones transgénicos que sobreexpresan miocilina en la malla trabecular y en la esclera no parecen mostrar alteraciones morfológicas (Senatorov et al., 2006), lo que podría deberse a diferencias relacionadas con cada una de las especies.

El estudio del patrón de expresión en estado larvario reveló la expresión de mCherry en lente, capa plexiforme externa de la retina y fotorreceptores, mientras que la expresión de miocilina se detectó en la capa de células ganglionares y la capa plexiforme interna. A esta edad no hubo co-expresión de ambas proteínas, indicando que la proteína detectada podría ser endógena. Por otro lado, los niveles de expresión de miocilina en los peces transgénicos de 5 meses fueron mayores que en los silvestres en estructuras oculares tales como el ENPC, vasos sanguíneos del iris, endotelio de la córnea y capa de células ganglionares de la retina. No solo la intensidad de la

señal de miocilina fue diferente, sino también la distribución tisular. En los animales transgénicos, se observó sobreexpresión de miocilina en el epitelio y endotelio de la córnea, mientras que en los animales silvestres únicamente se observó expresión en endotelio corneal. En los animales transgénicos de 2 años, se observó expresión de miocilina por toda la retina, incluyendo los fotorreceptores y las capas plexiformes, mientras que en los animales silvestres únicamente se observó expresión en la capa de células ganglionares y débilmente en los fotorreceptores. Los estudios mediante transferencia Western en la línea de ratones transgénicos β B1-crystallin-MYOC no detectan miocilina transgénica en la retina indicando que las cantidades ésta en la parte posterior del ojo son muy pequeñas (Paper et al., 2008).

7.2.4 Estudio de la función visual de los peces transgénicos mayores

Adicionalmente, se analizó la función visual de los peces transgénicos de 2 años mediante el ensayo de preferencia social. Los resultados de este análisis mostraron una reducción significativa del tiempo de permanencia en la ventana de hasta un 90% en los peces con alteraciones oculares. Los peces cebra transgénicos con fenotipo silvestre también manifestaron pérdida visual, indicando la existencia de cambios moleculares que afectan a la vista antes de que el daño sea detectable a nivel histológico y macroscópico. Estos datos indicaron que, en general, los peces adultos transgénicos para *myoc* tienen una función visual deteriorada, siendo más acusada en los peces con alteraciones oculares. Esto no se observó con la línea homocigota mutante de *myoc* ya que, durante ocho generaciones, no manifestó fenotipos oculares.

7.2.5 Muerte y proliferación celular en tejidos oculares de los peces transgénicos

Para evaluar el posible papel de la apoptosis en las alteraciones oculares presentes en los peces transgénicos se realizó un ensayo TUNEL. Se detectó un aumento significativo en la apoptosis de 5 veces en la capa de células ganglionares de la retina de los peces transgénicos para *myoc* (2 años) en comparación con los peces silvestres. No pudimos determinar si la muerte de las células ganglionares de la retina fue secundaria a la aparición del fenotipo o si era producida directamente por el aumento de la expresión de miocilina. Además, nuestros resultados mostraron también núcleos apoptóticos en la capa superficial del epitelio corneal de los peces transgénicos, que no se observó en los silvestres, siendo específicos de la propia línea. Estudios anteriores han reportado que la línea transgénica no mostró apoptosis en el cristalino, ni en la córnea ni en las células ganglionares de la retina (Zillig et al., 2005). No obstante, se debe tener en cuenta que el marcaje TUNEL requiere la presencia de ADN nuclear y que, en los cristalinos

adultos, los núcleos solo están presentes en las células del epitelio anterior y la región ecuatorial del arco de la lente. Una limitación importante del estudio es que solo pudimos analizar la apoptosis en los peces de 2 años, por lo que no pudimos determinar el momento de aparición ni estudiar su evolución.

Dado que las alteraciones neuroretinianas observadas en los peces transgénicos sugerían la existencia de una posible activación glial, se evaluó mediante inmunohistoquímica la expresión de GFAP. El incremento esta proteína es un marcador celular temprano universal para la lesión de la retina (Bringmann et al., 2006). El aumento de expresión de GFAP mostró la existencia de daño retiniano severo y gliosis en la línea de pez cebra transgénico para *myoc*. También se observó un marcaje variable en el nervio óptico de los animales transgénicos en comparación con los silvestres. Cabe resaltar que, en los ratones jóvenes de la línea transgénica que sobreexpresa la proteína mutada humana Tyr437His, la tinción para GFAP en los axones de la capa de células ganglionares de la retina fue normal y mostró inmunomarcaje positivo en la capa de fibras del nervio óptico de la retina, siendo más extensa que en los ratones control (Chou et al., 2014).

El análisis inmunohistoquímico de calretinina y Brn3a confirmó un incremento de células ganglionares en la retina displásica de los peces transgénicos, lo que apoya que estas células pueden desempeñar un papel clave en esta alteración retiniana. El análisis del marcador de proliferación celular Ki-67 no identificó células en división en la retina displásica de los peces transgénicos de 2 años, lo que indica la lenta progresión del fenotipo y/o que éste se aproxima a su fase final. Sin embargo, se observó un aumento significativo del número de células en proliferación en la capa de células ganglionares de la retina del pez cebra transgénico de 13 meses, sugiriendo que la proliferación excesiva de estas células comienza al menos en este momento, y apoya la contribución de las células ganglionares al fenotipo.

7.2.6 Estudio transcriptómico de los peces transgénicos adultos

Con el objetivo de caracterizar las alteraciones oculares en los peces transgénicos de 2 años que sobreexpresan miocilina a nivel de expresión génica, se realizó un estudio transcriptómico a partir de ARN de los ojos de dos grupos de peces adultos transgénicos (con alteraciones y con fenotipo silvestre) y de peces silvestres de la misma edad y sexo como control. El análisis transcriptómico reveló que muchos de los principales DEGs en los ojos alterados del pez cebra transgénico eran característicos de cristalino, músculo y matriz extracelular. Los genes implicados en metabolismo,

inflamación, fisiología de fotorreceptores y división celular también se expresaron de forma diferencial, mostrando que estos procesos se vieron afectados por la sobreexpresión *in vivo* de miocilina. Sin embargo, es difícil determinar si estos cambios son causa o efecto de los fenotipos oculares descritos.

Las cristalinas diferencialmente expresadas en los ojos de peces transgénicos con alteraciones son constituyentes estructurales del cristalino, con funciones en el desarrollo del cristalino en los ojos tipo cámara y en la percepción visual y se expresan en el epitelio del cristalino (Wang et al., 2004). Entre los DEGs también relacionados con el cristalino se encuentran *mipa* (proteína intrínseca mayor de la fibra del cristalino, también conocida como acuaporina 0 o aqp0) y *bfsp2* (proteína estructural del filamento de cuentas 2, faquinina). Sus genes ortólogos humanos están implicados en las cataratas (Berry et al., 2000; Jakobs et al., 2000). Por tanto, la expresión alterada de estos genes podría contribuir a la turbidez del cristalino presente en los ojos de algunos peces cebra transgénicos adultos. La proteína codificada por el gen *mipa* funciona como un canal de agua y es la más abundante en la membrana celular de la fibra del cristalino (Varadaraj et al., 1999), mientras que el producto del gen *bfsp2* participa en la organización de filamentos intermedios en el cristalino (Song et al., 2009). La sobreexpresión de otros dos genes del cristalino, *lgsn* (lengsina) y *lenep* (proteína epitelial del cristalino) con funciones en la diferenciación y en las interacciones de las células del cristalino (Harding et al., 2008; WEN et al., 2000) podría alterar estos procesos e influir en los fenotipos del cristalino. Por otro lado, las α -cristalinas, proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (de Jong et al., 1989) que protegen a otras proteínas contra la agregación inducida por el estrés (Andley & Xi, 2002; Horwitz, 1992), no se encontraron entre los principales DEGs. Además, las dos únicas α -cristalinas, *cryaa* y *cryabb*, se encontraban subexpresadas con una diferencia de expresión de -3,8 y -3,6, respectivamente. Estos datos indican que los fenotipos del cristalino observados no están relacionados con el estrés celular inducido por la sobreexpresión de la proteína transgénica.

Los DEGs relacionados con el músculo codificaban proteínas estructurales (*myl1* y *myl10*) o reguladoras (*mylpfb*) constituyentes de la cadena ligera de miosina. Las proteínas reguladoras de la contracción muscular, como la troponina C2 (*tnnc2*), la troponina I tipo 2a (esquelética rápida), tándem duplicado 4, (*tnni2a.4*), y la α -tropomiosina (*tpma*), también eran componentes de este grupo. Curiosamente, dos de estos genes (*myl10* y *mylpfb*), junto con *ptk2ba* (proteína tirosina quinasa 2 β -a), también pertenecían al grupo enriquecido funcionalmente relacionado con la migración transendotelial de los leucocitos, de acuerdo con el papel reportado de miocilina en la adhesión de los leucocitos humanos a las monocapas endoteliales (Aroca-Aguilar et al., 2018).

Estos datos indican la posible existencia de fenotipos musculares asociados a la sobreexpresión de miocilina en el pez cebra. En línea con estas ideas, un estudio previo han revelado que el tamaño promedio de las fibras musculares de los ratones transgénicos que sobreexpresan miocilina aumentó en un 36% en relación a los controles, lo que sugiere que la miocilina intracelular juega un papel como regulador de las vías de hipertrofia muscular, actuando a través de los componentes del complejo proteico asociado a la distrofina (Joe et al., 2012).

Por otro lado, se sobreexpresaron dos genes que participan en el metabolismo de los esteroides: *cyp11c1* y *cyp39a1*. El primero de ellos codifica una enzima CYP450 que cataliza principalmente la formación de cortisol y del andrógeno 11-Ketotestosterona del pez cebra (Zhang et al., 2020; Zheng et al., 2020). Curiosamente, como se comentó anteriormente, también se observó sobreexpresión *cyp11c1* en los peces cebra *knock-out* para *myoc*, todos ellos machos (Atienzar-Aroca et al., 2021). Estos datos indican la posible existencia de un vínculo funcional entre *cyp11c1* y *myoc* y los fenotipos asociados a los machos transgénicos observados en este estudio. El segundo gen, *cyp39a1*, está implicado en la biosíntesis de ácidos biliares (Pandak & Kakiyama, 2019) y en la homeostasis del colesterol (Li-Hawkins et al., 2000). Por tanto, estos datos muestran posibles conexiones de miocilina con los procesos biológicos mencionados, aunque es esencial realizar trabajos experimentales adicionales para realizar una interpretación funcional completa. La sobreexpresión de *spice1* (proteína asociada al huso y al centríolo 1), un gen necesario para la duplicación del centríolo y la reunión mitótica de los cromosomas (Archinti et al., 2010), apoya la existencia de un aumento de la proliferación celular y de la displasia en los ojos alterados del pez cebra transgénico.

Es probable que algunas de las diferencias de expresión génica observadas en los ojos alterados del pez cebra transgénico pueden ser consecuencia o respuesta a la inflamación y al daño tisular. De hecho, dos de los genes sobreexpresados, *irg1l* (gen inmunorresistente 1-like) y *nos2b* (óxido nítrico sintasa 2b, inducible), están involucrados en la respuesta inflamatoria (Hall et al., 2013; Okamoto et al., 2004; Wittmann et al., 2015). La herramienta de enriquecimiento funcional *Epistemic* identificó dos genes sobreexpresados, *zgc:112332* y *zgc:112332*, como ortólogos de las retinol deshidrogenasas 11 y 12 humanas (*RDH11* y *RDH12*) y de la *LOC118142757* humana, respectivamente. Este último gen codifica un transcrito que es el resultado de la síntesis de ARN a través de los genes *GUCA1ANB* (vecino de *GUCA1A*, del inglés *GUCA1A neighbour*) y *GUCA1A* (activador de la guanilato ciclasa 1A). Estos datos indican que *zgc:112332* y *zgc:112332* desempeñan funciones en el ciclo visual y su sobreexpresión en el pez cebra transgénico podría

ser una consecuencia de las alteraciones de los fotorreceptores presentes en los ojos del pez cebra transgénico.

Dadas las diferencias evolutivas entre las proteínas del pez cebra y las del ser humano, es necesario seguir investigando para confirmar si los efectos de la sobreexpresión de miocilina en el pez cebra pueden tener un significado biológico general o si se limitan a esta especie.

Por otro lado, el análisis transcriptómico y de enriquecimiento funcional de los ojos con fenotipo silvestre reveló que la mayoría de los principales DEGs pertenecían al grupo del metabolismo de los lípidos. Este grupo estaba constituido por genes involucrados en el transporte del colesterol mediado por apolipoproteínas como *apoae*, *apoa4b.1*, *apoa1a*, *apoc2* y *apobb.1*. El gen *APOE* (*apolipoproteína E*) tiene un papel importante en el transporte y metabolismo del colesterol y los triglicéridos plasmáticos (Mahley, 1988; Weisgraber, 1994), y se ha demostrado su expresión durante el desarrollo embrionario del pez cebra (Babin et al., 1997). El análisis transcriptómico reveló la sobreexpresión de *apoae* y *apoa1a*. La sobreexpresión de estas apolipoproteínas en los ojos aparentemente normales de los peces transgénicos resulta interesante dado que otros estudios sobre degeneración retiniana en el pez cebra, han descrito la sobreexpresión de apolipoproteínas como *apoa1* y *apoae* después de una lesión en tejidos como la aleta y el ojo (Harel et al., 1989; Monnot et al., 1999). Los lípidos juegan un papel fundamental tanto en la fisiología como en la patología de la retina. Así por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) como el ácido docosahexaenoico (DHA) es necesario para el funcionamiento de los fotorreceptores (Fliesler & Anderson, 1983) y el colesterol para el de la neurorretina (Bretillon et al., 2008). Recientemente, se ha descrito un modelo de ratón con disfunción en los fotorreceptores y depósitos de drusas subretinianas debido a un metabolismo alterado del colesterol (Ban et al., 2018).

Los genes *cyp46a1.1* y *afp4* también se encontraban sobreexpresados en los ojos de animales transgénicos con fenotipo silvestre. *Cyp46a1* (Citocromo P450, Familia 46, Subfamilia A, Miembro 1) es una de las enzimas que metaboliza el colesterol intracelular (no esterificado) en la retina (Petrov et al., 2019). La sobreexpresión de esta familia de genes podría tener relación con el inicio de las alteraciones oculares asociadas con la sobreexpresión de *myoc*. Estos datos indican un posible vínculo entre *myoc* con la regulación del metabolismo y transporte de lípidos, así como con la reorganización de éstos. No obstante, es esencial realizar trabajos experimentales adicionales para una completa interpretación.

Tanto la herramienta *Epistemic* como *ShinyGO* detectaron DEGs enriquecidos dentro del grupo de funcional de regulación de la respuesta inmune, como el gen *grn1* (*granulina 1*), el cual estaba sobreexpresado. El daño retiniano en mamíferos produce una respuesta gliótica asociada a una inflamación continua (Bringmann et al., 2009) iniciada por el sistema inmunitario innato. Estudios realizados en pez cebra, se han encontrado que en respuesta a una lesión retiniana se produce una acumulación de células inmunes compuestas de microglía, así como de macrófagos derivados de la retina (Mitchell et al., 2018). Estos datos podrían indicar de nuevo, que en estos ojos, ya empezaba a producirse el daño retiniano debido a la sobreexpresión de *myoc*.

Curiosamente, también se enriqueció significativamente un grupo de genes diferencialmente expresados relacionados con la proliferación celular. El ortólogo del gen humano *BNIP1*, *bnip1*, se encuentra subexpresado en las muestras de ojos con fenotipo silvestre. La sobreexpresión de miembros antiapoptóticos de las proteínas de la familia Bcl-2 puede suprimir la proliferación y promover la entrada en fase celular G0 (Gross et al., 1999). La subexpresión de este gen podría estar relacionada con el posible inicio de la proliferación celular en los ojos, como etapa previa al desarrollo de los fenotipos oculares graves. Los genes de colágeno α , *col7a1* y *col28a1a* también fueron regulados al alza en los ojos con fenotipo silvestre. Resulta de interés el hecho de que en los ojos con alteraciones la diferencia de expresión es mayor que en los ojos con fenotipo silvestre (FC 28,5 frente a 7,8 para *col7a1* y FC 8,2 frente a 2,0 para *col28a1a*), sugiriendo que la sobreexpresión de *myoc* altera la expresión de estos genes, la cual se incrementa con la aparición de los fenotipos. En los ojos con fenotipo silvestre, las α -cristalinas tampoco se encontraron entre los 50 DEGs principales. Al igual que en los ojos con alteraciones, *cryaa* y *cryabb* se encontraban subexpresadas (FC -3,4 y -2,0 respectivamente). También se observaron otras β -cristalinas reguladas a la baja, como *crybb1/3*, sugiriendo que la sobreexpresión de *myoc* altera la expresión de las cristalinas antes de la aparición de los fenotipos del cristalino observados.

También se ha observado, mediante qRT-PCR, la subexpresión del gen *rpe65a* en los ojos con fenotipo silvestre de los animales transgénicos. Este gen, en pez cebra, se expresa en estructuras sensibles a la luz durante el desarrollo y en el epitelio pigmentario de la retina (Schonthaler et al., 2007). Además, se ha observado que en larvas en las que inhiben de manera transitoria la expresión de *rpe65a* mediante morfolinós hay una alteración de la función y de la morfología de los segmentos externos de los bastones, que se rompen en pequeñas partículas (fagosomas), similares a las observadas en la línea transgénica adulta que sobreexpresa miocilina. No obstante,

para confirmar este resultado harían falta más estudios histológicos y descartar un artefacto durante el proceso experimental.

7.3 Novedades y limitaciones del estudio e investigaciones futuras

En un balance general y respondiendo a los objetivos planteados, las principales novedades de este trabajo han sido la generación de unas líneas *knock-out* y transgénicas para *myoc* para intentar comprender mejor la función biológica de esta proteína utilizando el pez cebra como modelo animal.

Se ha generado y establecido la primera línea *knock-out* de *myoc* en el pez cebra, y esto ha permitido asignar un posible papel clave que podría desempeñar la proteína en la determinación del sexo en el pez cebra, siendo necesaria para la diferenciación de ovarios.

Para confirmar esta hipótesis y para una mejor caracterización de este fenotipo se requieren más estudios entre los que se incluiría el análisis histológico de células germinales primordiales y de gónadas juveniles en proceso de transformación de ovario a testículo. Además, los cambios de DEGs observados en el análisis transcriptómico corresponden a la expresión de genes de peces completos, por lo que sería necesario un análisis restringido a las gónadas de los peces KO para caracterizar mejor los genes implicados.

También se ha concluido que la eliminación del producto génico no causa ninguna anomalía significativa en los ojos, como se ha descrito en estudios anteriores (Kim et al., 2001).

Por otro lado, a pesar de que se han realizado ensayos inmunohistoquímicos para el estudio de expresión de miocilina, podría haberse realizado adicionalmente una hibridación *in situ* de ARN dado que miocilina se localiza extracelularmente. Para confirmar y apoyar los datos de la expresión de miocilina, podrían realizarse ensayos de Western Blot en los diferentes tejidos en los que la proteína se ha detectado mediante IHC, no obstante, la disponibilidad de los anticuerpos es una limitación. Adicionalmente, podrían realizarse qRT-PCR del ARNm de los diferentes tejidos para detectar *myoc*.

También se ha generado una línea transgénica que sobreexpresaba constitutivamente miocilina. Hasta la fecha, únicamente se habían producido líneas transgénicas en ratón para desarrollar un modelo genético de GPAA inducido por la expresión de miocilina mutante, así como el estudio del procesamiento y caracterización fenotipos resultantes (Chou et al., 2014; Zhou et al., 2008; Zillig et al., 2005). Los resultados de este trabajo muestran que los peces transgénicos presentan

alteraciones oculares, con una grave alteración de la matriz extracelular en los tejidos del segmento anterior. Con todo ello, una de las conclusiones relevantes de este trabajo ha sido el apoyo de la función de miocilina como una proteína matricelular, que podría jugar un papel en la morfología del segmento anterior ocular y de la retina a través de la influencia de la organización de la matriz extracelular y la proliferación celular.

Dadas las diferencias evolutivas entre las proteínas del pez cebra y las del humano, es necesario seguir investigando para confirmar si los efectos de la sobreexpresión de miocilina en el pez cebra pueden tener un significado biológico general o si se limitan a esta especie.

Una limitación del presente estudio fue el número relativamente pequeño de peces transgénicos de dos años con alteraciones oculares utilizados para los diferentes análisis. Para dar solidez a estos resultados, sería conveniente disponer de un mayor número de peces para realizar análisis histológicos o inmunohistoquímicos y a edades a partir de los 13 meses.

Por otro lado, el análisis transcriptómico presentó varias limitaciones. En primer lugar, el reducido número de peces, como se acaba de comentar. Teniendo esto en cuenta y para minimizar el efecto de la variabilidad de la expresión génica individual, agrupamos seis ojos alterados obtenidos de tres hermanos de 2 años de la generación F3. Por lo tanto, la muestra de ARN utilizada para los análisis transcriptómicos representan la expresión génica media de tres réplicas biológicas independientes. Se siguió un enfoque paralelo con las dos preparaciones de ARN de ojos de peces silvestres usados como control. El análisis de qRT-PCR de los genes seleccionados corroboró, mayoritariamente, que las diferencias de expresión génica detectadas en el análisis transcriptómico eran fiables. No obstante, hemos observado discrepancias entre los resultados obtenidos por los ensayos del transcriptoma y la qRT-PCR. Estudios previos han concluido que, dentro del análisis transcriptómico, entre un 15 y un 20% de genes se consideran “no concordantes” (los distintos métodos muestran diferencias de expresión (FC) opuestas) cuando se comparan los resultados del transcriptoma con los obtenidos con los de la qRT-PCR (Everaert et al., 2017). Existen diferentes razones por las que los resultados podrían no coincidir, como el diseño de cebadores para la qRT-PCR, el contenido de GC (Price et al., 2017), la estructura secundaria del ARN (Onoa & Tinoco Jr, 2004) o el proceso de normalización en las diferentes técnicas. Mientras que en qRT-PCR se utilizan genes de referencia o constitutivos para la normalización, con el análisis transcriptómico en la mayoría de los casos se asume que cada muestra tiene el mismo ARNm total expresado (esto también puede expresarse como RPKM). Así pues, para abordar estas discrepancias, serían necesarios ensayos adicionales.

Por otra parte, los peces cebra macho de dos años utilizados como controles se criaron en paralelo con los animales transgénicos. No obstante, los peces silvestres no eran hermanos de los animales transgénicos con alteraciones oculares. Así pues, la replicación adicional del análisis transcriptómico utilizando peces silvestres hermanos de los peces transgénicos, contribuiría a demostrar firmemente las diferencias de expresión génica identificadas.

Las futuras investigaciones para terminar de comprender la función normal de la proteína y el mecanismo por el cual produce el glaucoma deberían estar encaminadas a la generación de líneas *knock-in* mediante la técnica CRISPR/Cas9. Éste es un proceso de inserción dirigida de un gen exógeno en un *locus* específico del genoma, que se utiliza para modificar la función de un gen endógeno con el fin de estudiar las mutaciones concretas en las enfermedades humanas. Se debería generar una línea *knock-in* con algunas de las mutaciones en *myoc* identificadas en pacientes con glaucoma juvenil dominante (D380A o P370L) y estudiar los fenotipos resultantes en el pez cebrá, para así, comprender mejor su mecanismo patogénico.

8. CONCLUSIONES

1. Se ha generado la primera línea de pez cebra *knock-out* para el gen *myoc*.
2. El empleo como control negativo de la línea KO para el gen *myoc* en los análisis inmunohistoquímicos ha permitido confirmar la expresión de miocilina en estructuras oculares del segmento anterior del ojo y en las células ganglionares de la retina, así como el músculo esquelético, intestino y gónadas.
3. La pérdida de función del gen *myoc* en pez cebra no produce alteraciones oculares relacionadas con el glaucoma, apoyando estudios previos que afirman que esta enfermedad es debida a una ganancia de función.
4. Miocilina interviene en la diferenciación sexual del pez cebra. Su pérdida de función determina la formación de testículos asociada con la sobreexpresión de genes implicados en la determinación del sexo masculino.
5. Se ha generado la primera línea de pez cebra transgénica para el gen *myoc* [*Tg(actb1:myoc-2A-mCherry)*].
6. La sobreexpresión de esta proteína, en pez cebra, no produce alteraciones oculares relacionadas con el glaucoma, apoyando nuevamente que esta enfermedad es producida por una ganancia de función característica de las mutaciones patogénicas.
7. La sobreexpresión de miocilina en pez cebra, a largo plazo, produce anomalías estructurales relacionadas con la matriz extracelular y alteraciones variables del segmento anterior y de la retina. También afecta a la expresión de genes implicados en la fisiología del cristalino, del músculo, metabolismo de lípidos, adhesión celular y respuesta inmune.
8. Las dos líneas de pez cebra generadas representan modelos útiles para mejorar la comprensión de la función elusiva de la proteína miocilina.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abderrahim, H., Jaramillo-Babb, V. L., Zhou, Z., & Vollrath, D. (1998). Characterization of the murine TIGR/myocilin gene. *Mammalian genome*, 9(8), 673-675.
- Abozaid, H., Wessels, S., & Hörstgen-Schwark, G. (2011). Effect of rearing temperatures during embryonic development on the phenotypic sex in zebrafish (*Danio rerio*). *Sexual Development*, 5(5), 259-265.
- Abozaid, H., Wessels, S., & Hörstgen-Schwark, G. (2012). Elevated temperature applied during gonadal transformation leads to male bias in zebrafish (*Danio rerio*). *Sexual Development*, 6(4), 201-209.
- Abu-Amero, K. K., Azad, T. A., Spaeth, G. L., Myers, J., Katz, L. J., Moster, M., & Bosley, T. M. (2012). Unaltered myocilin expression in the blood of primary open angle glaucoma patients. *Molecular vision*, 18, 1004.
- Adam, M. F., Belmouden, A., Binisti, P., Brézin, A. P., Valtot, F., Béchettille, A., Dascotte, J.-C., Copin, B., Gomez, L., & Chaventré, A. (1997a). Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma. *Human molecular genetics*, 6(12), 2091-2097.
- Adam, M. F., Belmouden, A., Binisti, P., Brézin, A. P., Valtot, F., Béchettille, A., Dascotte, J.-C., Copin, B., Gomez, L., & Chaventré, A. J. H. m. g. (1997b). Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma. 6(12), 2091-2097.
- Aguilar, J. D. A. (2009). *Secreción, procesamiento proteolítico e interacciones moleculares de miocilina* [Universidad de Castilla-La Mancha].
- Ahmed, F., Torrado, M., Johnson, E., Morrison, J., & Tomarev, S. I. (2001). Changes in mRNA levels of the Myoc/Tigr gene in the rat eye after experimental elevation of intraocular pressure or optic nerve transection. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(13), 3165-3172.
- Alber, T. (1992). Structure of the leucine zipper. *Current opinion in genetics & development*, 2(2), 205-210.
- Alber, T. J. C. o. i. g., & development. (1992). Structure of the leucine zipper. 2(2), 205-210.
- Allingham, R. R., Wiggs, J. L., De La Paz, M., Vollrath, D., Tallett, D. A., Broomer, B., Jones, K. H., Del Bono, E. A., Kern, J., & Patterson, K. (1998). Gln368STOP myocilin mutation in families with late-onset primary open-angle glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, 39(12), 2288-2295.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Alves, C. H., Sanz Sanz, A., Park, B., Pellissier, L. P., Tanimoto, N., Beck, S. C., Huber, G., Murtaza, M., Richard, F., & Sridevi Gurubaran, I. (2013). Loss of CRB2 in the mouse retina mimics human retinitis pigmentosa due to mutations in the CRB1 gene. *Human molecular genetics*, 22(1), 35-50.

- Amsterdam, A., Varshney, G. K., & Burgess, S. M. J. M. i. c. b. (2011). Retroviral-mediated insertional mutagenesis in zebrafish. *104*, 59-82.
- Anderson, J. L., Marí, A. R., Braasch, I., Amores, A., Hohenlohe, P., Batzel, P., & Postlethwait, J. H. (2012). Multiple sex-associated regions and a putative sex chromosome in zebrafish revealed by RAD mapping and population genomics. *Plos one*, *7*(7), e40701.
- Andley, U., & Xi, J. (2002). Reduced Survival of Lens Epithelial Cells in the alphaA-crystallin Knockout Mouse. *Investigative ophthalmology & visual science*, *43*(13), 1920-1920.
- Angius, A., De Gioia, E., Loi, A., Fossarello, M., Sole, G., Orzalesi, N., Grignolo, F., Cao, A., & Pirastu, M. (1998). A novel mutation in the GLC1A gene causes juvenile open-angle glaucoma in 4 families from the Italian region of Puglia. *Archives of Ophthalmology*, *116*(6), 793-797.
- Anholt, R. (2014). Olfactomedin proteins: central players in development and disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, *2*, 6.
- Archinti, M., Lacasa, C., Teixidó-Travesa, N., & Lüders, J. (2010). SPICE—a previously uncharacterized protein required for centriole duplication and mitotic chromosome congression. *Journal of cell science*, *123*(18), 3039-3046.
- Arensburger, P., Hice, R. H., Zhou, L., Smith, R. C., Tom, A. C., Wright, J. A., Knapp, J., O'Brochta, D. A., Craig, N. L., & Atkinson, P. W. J. G. (2011). Phylogenetic and functional characterization of the hAT transposon superfamily. *188*(1), 45-57.
- Aroca-Aguilar, J.-D., Fernández-Navarro, A., Ontañón, J., Coca-Prados, M., & Escribano, J. (2018). Identification of myocilin as a blood plasma protein and analysis of its role in leukocyte adhesion to endothelial cell monolayers. *Plos one*, *13*(12), e0209364.
- Aroca-Aguilar, J.-D., Sánchez-Sánchez, F., Ghosh, S., Fernández-Navarro, A., Coca-Prados, M., & Escribano, J. (2011). Interaction of recombinant myocilin with the matricellular protein SPARC: functional implications. *Investigative ophthalmology & visual science*, *52*(1), 179-189.
- Aroca-Aguilar, J.-D., Sánchez-Sánchez, F., Martínez-Redondo, F., Coca-Prados, M., & Escribano, J. (2008). Heterozygous expression of myocilin glaucoma mutants increases secretion of the mutant forms and reduces extracellular processed myocilin. *Molecular vision*, *14*, 2097.
- Aroca-Aguilar, J. D., Sánchez-Sánchez, F., Ghosh, S., Coca-Prados, M., & Escribano, J. (2005). Myocilin mutations causing glaucoma inhibit the intracellular endoproteolytic cleavage of myocilin between amino acids Arg226 and Ile227. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(22), 21043-21051.
- Atienzar-Aroca, R., Aroca-Aguilar, J.-D., Alexandre-Moreno, S., Ferre-Fernández, J.-J., Bonet-Fernández, J.-M., Cabañero-Varela, M.-J., & Escribano, J. (2021). Knockout of myoc Provides Evidence for the Role of Myocilin in Zebrafish Sex Determination Associated with Wnt Signalling Downregulation. *Biology*, *10*(2), 98.
- Babin, P. J., Thisse, C., Durliat, M., Andre, M., Akimenko, M.-A., & Thisse, B. (1997). Both apolipoprotein E and AI genes are present in a nonmammalian vertebrate and are

- highly expressed during embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(16), 8622-8627.
- Ban, N., Lee, T. J., Sene, A., Choudhary, M., Lekwuwa, M., Dong, Z., Santeford, A., Lin, J. B., Malek, G., & Ory, D. S. (2018). Impaired monocyte cholesterol clearance initiates age-related retinal degeneration and vision loss. *JCI insight*, 3(17).
- Baumann, L. (2008). *Effects of endocrine disruptors in zebrafish (Danio rerio) as revealed with the fish sexual development test*
- Berry, V., Francis, P., Kaushal, S., Moore, A., & Bhattacharya, S. (2000). Missense mutations in MIP underlie autosomal dominant 'polymorphic' and lamellar cataracts linked to 12q. *Nature genetics*, 25(1), 15-17.
- Bibliowicz, J., Tittle, R. K., & Gross, J. M. (2011). Toward a better understanding of human eye disease: Insights from the zebrafish, *Danio rerio*. *Progress in molecular biology and translational science*, 100, 287-330.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Bornstein, P. (1995). Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *The Journal of cell biology*, 130(3), 503-506.
- Bornstein, P., & Sage, E. H. (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current opinion in cell biology*, 14(5), 608-616.
- Borrás, T., Rowlette, L. L. S., Tamm, E. R., Gottanka, J., & Epstein, D. L. (2002). Effects of elevated intraocular pressure on outflow facility and TIGR/MYOC expression in perfused human anterior segments. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(1), 33-40.
- Botstein, D., Cherry, J. M., Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Butler, H., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., & Eppig, J. T. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat genet*, 25(1), 25-29.
- Branzei, D., & Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(4), 297-308.
- Bretillon, L., Thuret, G., Grégoire, S., Acar, N., Joffre, C., Bron, A. M., Gain, P., & Creuzot-Garcher, C. P. (2008). Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Experimental eye research*, 87(6), 521-528.
- Brézin, A. P., Adam, M. F., Belmouden, A., Lureau, M. A., Chaventré, A., Copin, B., Gomez, L., de Dinechin, S. D., Berkani, M., & Valtot, F. (1998). Founder effect in GLC1A-linked familial open-angle glaucoma in Northern France. *American journal of medical genetics*, 76(5), 438-445.
- Bringmann, A., Iandiev, I., Pannicke, T., Wurm, A., Hollborn, M., Wiedemann, P., Osborne, N. N., & Reichenbach, A. (2009). Cellular signaling and factors involved in Müller cell

- gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Progress in retinal and eye research*, 28(6), 423-451.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N., & Reichenbach, A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research*, 25(4), 397-424.
- Brock, R. (2014). The uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides: putting the puzzle together. *Bioconjugate chemistry*, 25(5), 863-868.
- Caballero, M., & Borrás, T. (2001). Inefficient processing of an olfactomedin-deficient myocilin mutant: potential physiological relevance to glaucoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 282(3), 662-670.
- Caballero, M., Rowlette, L. L. S., & Borrás, T. (2000). Altered secretion of a TIGR/MYOC mutant lacking the olfactomedin domain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1502(3), 447-460.
- Campos-Mollo, E., Sánchez-Sánchez, F., López-Garrido, M. P., López-Sánchez, E., López-Martínez, F., & Escribano, J. J. M. V. (2007). MYOC gene mutations in Spanish patients with autosomal dominant primary open-angle glaucoma: a founder effect in southeast Spain. *13(186-87)*, 1666-1673.
- Carbone, M. A., Ayroles, J. F., Yamamoto, A., Morozova, T. V., West, S. A., Magwire, M. M., Mackay, T. F., & Anholt, R. R. (2009). Overexpression of myocilin in the Drosophila eye activates the unfolded protein response: implications for glaucoma. *Plos one*, 4(1), e4216.
- Chang, H. H., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(8), 495-506.
- Chhetri, J., Jacobson, G., & Gueven, N. (2014). Zebrafish—on the move towards ophthalmological research. *Eye*, 28(4), 367-380.
- Chou, T.-H., Tomarev, S., & Porciatti, V. (2014). Transgenic mice expressing mutated Tyr437His human myocilin develop progressive loss of retinal ganglion cell electrical responsiveness and axonopathy with normal iop. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(9), 5602-5609.
- Clark, A. F., Kawase, K., English-Wright, S., Lane, D., Steely, H. T., Yamamoto, T., Kitazawa, Y., Kwon, Y. H., Fingert, J. H., & Swiderski, R. E. (2001). Expression of the glaucoma gene myocilin (MYOC) in the human optic nerve head. *The FASEB Journal*, 15(7), 1251-1253.
- Clark, A. F., Steely, H. T., Dickerson, J. E., English-Wright, S., Stropki, K., McCartney, M. D., Jacobson, N., Shepard, A. R., Clark, J. I., & Matsushima, H. (2001). Glucocorticoid induction of the glaucoma gene MYOC in human and monkey trabecular meshwork cells and tissues. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(8), 1769-1780.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., & Marraffini, L. A. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.

- Cong, L., & Zhang, F. (2015). Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. In *Chromosomal mutagenesis* (pp. 197-217). Springer.
- Damji, K., Song, X., Gupta, S., Gao, J., Rock, W., & Bulman, D. (1999). Childhood-onset primary open angle glaucoma in a Canadian kindred: clinical and molecular genetic features. *Ophthalmic genetics*, *20*(4), 211-218.
- Dapson, R., Fagan, C., Kiernan, J., & Wickersham, T. (2011). Certification procedures for sirius red F3B (CI 35780, Direct red 80). *Biotechnic & Histochemistry*, *86*(3), 133-139.
- Davidson, A. E., Balciunas, D., Mohn, D., Shaffer, J., Hermanson, S., Sivasubbu, S., Cliff, M. P., Hackett, P. B., & Ekker, S. C. (2003). Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *Developmental biology*, *263*(2), 191-202.
- Donegan, R. K., Hill, S. E., Turnage, K. C., Orwig, S. D., & Lieberman, R. L. (2012). The glaucoma-associated olfactomedin domain of myocilin is a novel calcium binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(52), 43370-43377.
- 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. (2008). Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*, *26*(6), 702-708.
- Escribano, J., Ortego, J., & Coca-Prados, M. (1995). Isolation and characterization of cell-specific cDNA clones from a subtractive library of the ocular ciliary body of a single normal human donor: transcription and synthesis of plasma proteins. *The Journal of Biochemistry*, *118*(5), 921-931.
- Everaert, C., Luypaert, M., Maag, J. L., Cheng, Q. X., Dinger, M. E., Hellemans, J., & Mestdagh, P. (2017). Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. *Scientific reports*, *7*(1), 1-11.
- Fautsch, M. P., & Johnson, D. H. (2001). Characterization of myocilin–myocilin interactions. *Investigative ophthalmology & visual science*, *42*(10), 2324-2331.
- Fingert, J. H., Héon, E., Liebmann, J. M., Yamamoto, T., Craig, J. E., Rait, J., Kawase, K., Hoh, S.-T., Buys, Y. M., & Dickinson, J. J. H. m. g. (1999). Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *8*(5), 899-905.
- Fingert, J. H., Ying, L., Swiderski, R. E., Nystuen, A. M., Arbour, N. C., Alward, W. L., Sheffield, V. C., & Stone, E. M. (1998). Characterization and Comparison of the Human and MouseGLC1A Glaucoma Genes. *Genome research*, *8*(4), 377-384.
- Fleisch, V. C., & Neuhaus, S. C. (2006). Visual behavior in zebrafish. *Zebrafish*, *3*(2), 191-201.
- Fliesler, A. J., & Anderson, R. E. (1983). Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Progress in lipid research*, *22*(2), 79-131.
- Funderburgh, J. L., Funderburgh, M. L., & Du, Y. (2016). Stem cells in the limbal stroma. *The ocular surface*, *14*(2), 113-120.

- Gaiano, N., Allende, M., Amsterdam, A., Kawakami, K., & Hopkins, N. (1996). Highly efficient germ-line transmission of proviral insertions in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 7777-7782.
- Gao, B., Song, H., Bishop, K., Elliot, G., Garrett, L., English, M. A., Andre, P., Robinson, J., Sood, R., & Minami, Y. (2011). Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Developmental cell*, 20(2), 163-176.
- García-Crespo, D., & Vecino, E. (2004). Differential expression of calretinin in the developing and regenerating zebrafish visual system. *Histology and histopathology*.
- Ge, S. X., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, 36(8), 2628-2629.
- Genevet, A., Polesello, C., Blight, K., Robertson, F., Collinson, L. M., Pichaud, F., & Tapon, N. (2009). The Hippo pathway regulates apical-domain size independently of its growth-control function. *Journal of cell science*, 122(14), 2360-2370.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.-H., Schwab, U., & Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The journal of immunology*, 133(4), 1710-1715.
- Goldwich, A., Baulmann, D. C., Ohlmann, A., Fluogel-Koch, C., Schocklmann, H., & Tamm, E. R. (2005). Myocilin is expressed in the glomerulus of the kidney and induced in mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney international*, 67(1), 140-151.
- Goldwich, A., Ethier, C. R., Chan, D. W.-H., & Tamm, E. R. (2003). Perfusion with the olfactomedin domain of myocilin does not affect outflow facility. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(5), 1953-1961.
- Goldwich, A., Scholz, M., & Tamm, E. R. (2009). Myocilin promotes substrate adhesion, spreading and formation of focal contacts in podocytes and mesangial cells. *Histochemistry and cell biology*, 131(2), 167-180.
- Gould, D. B., Miceli-Libby, L., Savinova, O. V., Torrado, M., Tomarev, S. I., Smith, R. S., & John, S. W. (2004). Genetically increasing Myoc expression supports a necessary pathologic role of abnormal proteins in glaucoma. *Molecular and cellular biology*, 24(20), 9019-9025.
- Graff, C., Urbak, S. F., Jerndal, T., & Wadelius, C. (1995). Confirmation of linkage to 1q21-31 in a Danish autosomal dominant juvenile-onset glaucoma family and evidence of genetic heterogeneity. *Human genetics*, 96(3), 285-289.
- Gray, M. P., Smith, R. S., Soules, K. A., John, S. W., & Link, B. A. (2009). The aqueous humor outflow pathway of zebrafish. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(4), 1515-1521.
- Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 13(15), 1899-1911.

- Gruber, H., Ingram, J., & Hanley Jr, E. (2006). Cellular immunohistochemical localization of the matricellular protein myocilin in the intervertebral disc. *Biotechnic & Histochemistry*, *81*(4-6), 119-124.
- Grunwald, D. J., & Eisen, J. S. (2002). Headwaters of the zebrafish—emergence of a new model vertebrate. *Nature reviews genetics*, *3*(9), 717-724.
- Grunwald, D. J., & Streisinger, G. J. G. R. (1992). Induction of recessive lethal and specific locus mutations in the zebrafish with ethyl nitrosourea. *59*(2), 103-116.
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., & Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS computational biology*, *1*(6), e60.
- Hall, C. J., Boyle, R. H., Astin, J. W., Flores, M. V., Oehlers, S. H., Sanderson, L. E., Ellett, F., Lieschke, G. J., Crosier, K. E., & Crosier, P. S. (2013). Immuno-responsive gene 1 augments bactericidal activity of macrophage-lineage cells by regulating β -oxidation-dependent mitochondrial ROS production. *Cell metabolism*, *18*(2), 265-278.
- Hamlet, M. R. J., Yergeau, D. A., Kulyev, E., Takeda, M., Taira, M., Kawakami, K., & Mead, P. E. (2006). Tol2 transposon-mediated transgenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis*, *44*(9), 438-445.
- Harding, R. L., Howley, S., Baker, L. J., Murphy, T. R., Archer, W. E., Wistow, G., Hyde, D. R., & Vihtelic, T. S. (2008). Lengsin expression and function during zebrafish lens formation. *Experimental eye research*, *86*(5), 807-818.
- Hardy, K. M., Hoffman, E. A., Gonzalez, P., McKay, B. S., & Stamer, W. D. (2005). Extracellular trafficking of myocilin in human trabecular meshwork cells. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(32), 28917-28926.
- Harel, A., Fainaru, M., Shafer, Z., Hernandez, M., Cohen, A., & Schwartz, M. (1989). Optic nerve regeneration in adult fish and apolipoprotein A-I. *Journal of neurochemistry*, *52*(4), 1218-1228.
- Hart, H., Samuelson, D., Tajwar, H., MacKay, E., Lewis, P., Kallberg, M., & Gelatt, K. (2007). Immunolocalization of myocilin protein in the anterior eye of normal and primary open-angle glaucomatous dogs. *Veterinary ophthalmology*, *10*, 28-37.
- Hazlerigg, C. R., Lorenzen, K., Thorbek, P., Wheeler, J. R., & Tyler, C. R. (2012). Density-dependent processes in the life history of fishes: evidence from laboratory populations of zebrafish *Danio rerio*. *Plos one*, *7*(5), e37550.
- Hebert, D. N., & Molinari, M. (2007). In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiological reviews*, *87*(4), 1377-1408.
- Her, J., & Bunting, S. F. (2018). How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(27), 10502-10511.
- Hewitt, A. W., Mackey, D. A., & Craig, J. E. J. H. m. (2008). Myocilin allele-specific glaucoma phenotype database. *29*(2), 207-211.

- Hill, S. E., Donegan, R. K., & Lieberman, R. L. (2014). The glaucoma-associated olfactomedin domain of myocilin forms polymorphic fibrils that are constrained by partial unfolding and peptide sequence. *Journal of molecular biology*, *426*(4), 921-935.
- Hogewind, B. F., Gaplovska-Kysela, K., Theelen, T., Cremers, F. P., Yam, G., Hoyng, C. B., & Mukhopadhyay, A. (2007). Identification and functional characterization of a novel MYOC mutation in two primary open angle glaucoma families from The Netherlands.
- Horwitz, J. (1992). Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(21), 10449-10453.
- Hosseini, S., Ha, N.-T., Simianer, H., Falker-Gieske, C., Brenig, B., Franke, A., Hörstgen-Schwark, G., Tetens, J., Herzog, S., & Sharifi, A. R. (2019). Genetic mechanism underlying sexual plasticity and its association with colour patterning in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC genomics*, *20*(1), 1-17.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., & Matthews, L. (2013a). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498-503.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., & Matthews, L. J. N. (2013b). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *496*(7446), 498-503.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., & Shalem, O. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, *31*(9), 827-832.
- Huang, P., Xiao, A., Zhou, M., Zhu, Z., Lin, S., & Zhang, B. (2011). Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nature biotechnology*, *29*(8), 699-700.
- Huang, W., Jaroszewski, J., Ortego, J., Escibano, J., & Coca-Prados, M. (2000). Expression of the TIGR gene in the iris, ciliary body, and trabecular meshwork of the human eye. *Ophthalmic genetics*, *21*(3), 155-169.
- Hug, N., Longman, D., & Cáceres, J. F. (2016). Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic acids research*, *44*(4), 1483-1495.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. J., & Joung, J. K. J. N. b. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *31*(3), 227-229.
- Irion, U., Krauss, J., & Nüsslein-Volhard, C. (2014). Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. *Development*, *141*(24), 4827-4830.
- Ishikawa, K., Funayama, T., Ohtake, Y., Tanino, T., Kurosaka, D., Suzuki, K., Ideta, H., Fujimaki, T., Tanihara, H., & Asaoka, R. (2004). Novel MYOC gene mutation, Phe369Leu, in Japanese patients with primary open-angle glaucoma detected by denaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of glaucoma*, *13*(6), 466-471.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in

- Escherichia coli, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429-5433.
- Isozaki, Y., Sakai, K., Kohiro, K., Kagoshima, K., Iwamura, Y., Sato, H., Rindner, D., Fujiwara, S., Yamashita, K., & Mizuno, K. (2020). The Rho-guanine nucleotide exchange factor Solo decelerates collective cell migration by modulating the Rho-ROCK pathway and keratin networks. *Molecular biology of the cell*, 31(8), 741-752.
- Jacobson, N., Andrews, M., Shepard, A. R., Nishimura, D., Searby, C., Fingert, J. H., Hageman, G., Mullins, R., Davidson, B. L., & Kwon, Y. H. (2001). Non-secretion of mutant proteins of the glaucoma gene myocilin in cultured trabecular meshwork cells and in aqueous humor. *Human molecular genetics*, 10(2), 117-125.
- Jacque, C., Vinner, C., Kujas, M., Raoul, M., Racadot, J., & Baumann, N. J. J. o. t. n. s. (1978). Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. 35(1), 147-155.
- Jain, A., Zode, G., Kasetti, R. B., Ran, F. A., Yan, W., Sharma, T. P., Bugge, K., Searby, C. C., Fingert, J. H., & Zhang, F. (2017). CRISPR-Cas9–based treatment of myocilin-associated glaucoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(42), 11199-11204.
- Jakobs, P. M., Hess, J. F., FitzGerald, P. G., Kramer, P., Weleber, R. G., & Litt, M. (2000). Autosomal-dominant congenital cataract associated with a deletion mutation in the human beaded filament protein gene BFSP2. *The American Journal of Human Genetics*, 66(4), 1432-1436.
- Jansen, R., Embden, J. D. v., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jao, L.-E., Wente, S. R., & Chen, W. J. P. o. t. N. A. o. S. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. 110(34), 13904-13909.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. J. s. (2012). A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. 337(6096), 816-821.
- Joe, M. K., Kee, C., & Tomarev, S. I. (2012). Myocilin interacts with syntrophins and is member of dystrophin-associated protein complex. *Journal of Biological Chemistry*, 287(16), 13216-13227.
- Joe, M. K., Nakaya, N., Abu-Asab, M., & Tomarev, S. I. (2015). Mutated myocilin and heterozygous Sod2 deficiency act synergistically in a mouse model of open-angle glaucoma. *Human molecular genetics*, 24(12), 3322-3334.
- Joe, M. K., & Tomarev, S. I. (2010). Expression of myocilin mutants sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis: implication for glaucoma pathogenesis. *The American journal of pathology*, 176(6), 2880-2890.
- Johnson, A. T., Richards, J. E., Boehnke, M., Stringham, H. M., Herman, S. B., Wong, D. J., & Lichter, P. R. (1996). Clinical phenotype of juvenile-onset primary open-angle glaucoma linked to chromosome 1q. *Ophthalmology*, 103(5), 808-814.

- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.
- Karali, A., Russell, P., Stefani, F. H., & Tamm, E. R. (2000). Localization of myocilin/trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response protein in the human eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(3), 729-740.
- Kawakami, K. (2005). Transposon tools and methods in zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 234(2), 244-254.
- Kawakami, K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome biology*, 8(1), 1-10.
- Kawakami, K., Koga, A., Hori, H., & Shima, A. (1998). Excision of the tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene*, 225(1-2), 17-22.
- Kawakami, K., Shima, A., & Kawakami, N. (2000). Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11403-11408.
- Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., & Mishina, M. (2004a). A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Developmental cell*, 7(1), 133-144.
- Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., & Mishina, M. J. D. c. (2004b). A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. 7(1), 133-144.
- Kee, C., & Ahn, B. H. (1997). TIGR gene in primary open-angle glaucoma and steroid-induced glaucoma. *Korean Journal of Ophthalmology*, 11(2), 75-78.
- Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A., & Altevogt, P. (2006). Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunology letters*, 107(2), 102-108.
- Kempken, F., & Windhofer, F. J. C. (2001). The hAT family: a versatile transposon group common to plants, fungi, animals, and man. 110(1), 1-9.
- Kennan, A. M., Mansergh, F. C., Fingert, J. H., Clark, T., Ayuso, C., Kenna, P. F., Humphries, P., & Farrar, G. J. (1998). A novel Asp380Ala mutation in the GLC1A/myocilin gene in a family with juvenile onset primary open angle glaucoma. *Journal of medical genetics*, 35(11), 957-960.
- Kim, B. S., Savinova, O. V., Reedy, M. V., Martin, J., Lun, Y., Gan, L., Smith, R. S., Tomarev, S. I., John, S. W., & Johnson, R. L. (2001). Targeted disruption of the myocilin gene (Myoc) suggests that human glaucoma-causing mutations are gain of function. *Molecular and cellular biology*, 21(22), 7707-7713.
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods*, 12(4), 357-360.

- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253-310.
- King, A. C., Gut, M., & Zenker, A. K. (2020). Shedding new light on early sex determination in zebrafish. *Archives of toxicology*, 94(12), 4143-4158.
- Kirchner, M., & Schneider, S. J. A. C. I. E. (2015). CRISPR-Cas: From the Bacterial Adaptive Immune System to a Versatile Tool for Genome Engineering. *54(46)*, 13508-13514.
- Knoll-Gellida, A., André, M., Gattegno, T., Forgue, J., Admon, A., & Babin, P. J. (2006). Molecular phenotype of zebrafish ovarian follicle by serial analysis of gene expression and proteomic profiling, and comparison with the transcriptomes of other animals. *BMC genomics*, 7(1), 1-28.
- Koch, M. A., Rosenhammer, B., Koschade, S. E., Braunger, B. M., Volz, C., Jäggle, H., & Tamm, E. R. (2014). Myocilin modulates programmed cell death during retinal development. *Experimental eye research*, 125, 41-52.
- Koga, A., Suzuki, M., Inagaki, H., Bessho, Y., & Hori, H. (1996). Transposable element in fish. *Nature*, 383(6595), 30-30.
- Koke, J. R., Mosier, A. L., & García, D. M. (2010). Intermediate filaments of zebrafish retinal and optic nerve astrocytes and Müller glia: differential distribution of cytokeratin and GFAP. *BMC research notes*, 3(1), 1-6.
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68-75.
- Koo, E., Bowling, H., Ashworth, K., Heeger, D. J., & Pacifico, S. (2022). Epistemic AI platform accelerates innovation by connecting biomedical knowledge. *arXiv preprint arXiv:2201.11331*.
- Kossack, M. E., High, S. K., Hopton, R. E., Yan, Y.-l., Postlethwait, J. H., & Draper, B. W. J. G. (2019). Female sex development and reproductive duct formation depend on Wnt4a in zebrafish. *211(1)*, 219-233.
- Krupnik, V. E., Sharp, J. D., Jiang, C., Robison, K., Chickering, T. W., Amaravadi, L., Brown, D. E., Guyot, D., Mays, G., & Leiby, K. J. G. (1999). Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *238(2)*, 301-313.
- Kubota, R., Noda, S., Wang, Y., Minoshima, S., Asakawa, S., Kudoh, J., Mashima, Y., Oguchi, Y., & Shimizu, N. (1997). A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics*, 41(3), 360-369.
- Kujawski, S., Crespo, C., Luz, M., Yuan, M., Winkler, S., & Knust, E. (2020). Loss of Crb2b-lf leads to anterior segment defects in old zebrafish. *Biology open*, 9(2), bio047555.
- Kur, E., Christa, A., Veth, K. N., Gajera, C. R., Andrade-Navarro, M. A., Zhang, J., Willer, J. R., Gregg, R. G., Abdelilah-Seyfried, S., & Bachmann, S. (2011). Loss of Lrp2 in zebrafish disrupts pronephric tubular clearance but not forebrain development. *Developmental Dynamics*, 240(6), 1567-1577.

- Kwan, K. M., Fujimoto, E., Grabher, C., Mangum, B. D., Hardy, M. E., Campbell, D. S., Parant, J. M., Yost, H. J., Kanki, J. P., & Chien, C. B. (2007). The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 236(11), 3088-3099.
- Kwon, H.-S., Lee, H.-S., Ji, Y., Rubin, J. S., & Tomarev, S. I. (2009). Myocilin is a modulator of Wnt signaling. *Molecular and cellular biology*, 29(8), 2139-2154.
- Kwon, H.-S., Lee, H.-S., Ji, Y., Rubin, J. S., Tomarev, S. I. J. M., & biology, c. (2009). Myocilin is a modulator of Wnt signaling. 29(8), 2139-2154.
- Lam, D. S., Leung, Y. F., Chua, J. K., Baum, L., Fan, D. S., Choy, K. W., & Pang, C. P. (2000). Truncations in the TIGR gene in individuals with and without primary open-angle glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(6), 1386-1391.
- Lau, E. S.-W., Zhang, Z., Qin, M., & Ge, W. (2016a). Knockout of zebrafish ovarian aromatase gene (*cyp19a1a*) by TALEN and CRISPR/Cas9 leads to all-male offspring due to failed ovarian differentiation. *Scientific reports*, 6(1), 1-14.
- Lau, E. S.-W., Zhang, Z., Qin, M., & Ge, W. J. S. r. (2016b). Knockout of zebrafish ovarian aromatase gene (*cyp19a1a*) by TALEN and CRISPR/Cas9 leads to all-male offspring due to failed ovarian differentiation. 6(1), 1-14.
- Lawrence, C., Ebersole, J. P., & Kesseli, R. V. (2008). Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Biology of Fishes*, 81(2), 239-246.
- Leske, M. C. J. A. j. o. e. (1983). The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. 118(2), 166-191.
- Li-Hawkins, J., Lund, E. G., Bronson, A. D., & Russell, D. W. (2000). Expression cloning of an oxysterol 7 α -hydroxylase selective for 24-hydroxycholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16543-16549.
- Lieberman, R. L., & Ma, M. T. (2021). Molecular Insights into Myocilin and Its Glaucoma-Causing Misfolded Olfactomedin Domain Variants. *Accounts of Chemical Research*, 54(9), 2205-2215.
- Liew, W. C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K. R., & Orban, L. (2012). Polygenic sex determination system in zebrafish. *Plos one*, 7(4), e34397.
- Lin, S., Gaiano, N., Culp, P., Burns, J. C., Friedmann, T., Yee, J.-K., & Hopkins, N. (1994). Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science*, 265(5172), 666-669.
- Lindsey, J. D., Gaton, D. D., Sagara, T., Polansky, J. R., Kaufman, P. L., & Weinreb, R. N. (2001). Reduced TIGR/myocilin protein in the monkey ciliary muscle after topical prostaglandin F2 α treatment. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(8), 1781-1786.
- Liu, W., Yan, M., Liu, Y., Wang, R., Li, C., Deng, C., Singh, A., Coleman, W. G., & Rodgers, G. P. (2010). Olfactomedin 4 down-regulates innate immunity against *Helicobacter pylori*

- infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(24), 11056-11061.
<https://www.pnas.org/content/pnas/107/24/11056.full.pdf>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lo, K. H., Hui, M. N. Y., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S., & Cheng, S. H. (2011). Hypoxia impairs primordial germ cell migration in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Plos one*, 6(9), e24540.
- López-Martínez, F., López-Garrido, M.-P., Sánchez-Sánchez, F., Campos-Mollo, E., Coca-Prados, M., & Escribano, J. (2007). Role of MYOC and OPTN sequence variations in Spanish patients with primary open-angle glaucoma. *Molecular vision*, 13, 862.
- Lütjen-Drecoll, E., May, C. A., Polansky, J. R., Johnson, D. H., Bloemendal, H., & Nguyen, T. D. (1998). Localization of the stress proteins alpha B-crystallin and trabecular meshwork inducible glucocorticoid response protein in normal and glaucomatous trabecular meshwork. *Investigative ophthalmology & visual science*, 39(3), 517-525.
- Mahley, R. W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240(4852), 622-630.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Wolf, Y. I., & Yakunin, A. F. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467-477.
- Malicki, J., Neuhauss, S., Schier, A. F., Solnica-Krezel, L., Stemple, D. L., Stainier, D., Abdelilah, S., Zwartkuis, F., Rangini, Z., & Driever, W. J. D. (1996). Mutations affecting development of the zebrafish retina. *123*(1), 263-273.
- Mansergh, F. C., Kenna, P. F., Ayuso, C., Kiang, A. S., Humphries, P., & Farrar, G. J. (1998). Novel mutations in the TIGR gene in early and late onset open angle glaucoma. *Human mutation*, 11(3), 244-251.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell cycle*, 7(18), 2902-2906.
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature reviews genetics*, 11(3), 181-190.
- Meeker, N. D., Hutchinson, S. A., Ho, L., & Trede, N. S. (2007). Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *Biotechniques*, 43(5), 610-614.
- Mellman, I., & Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell*, 100(1), 99-112.
- Menea, F., Braghini, C. A., Vasconcellos, J. P. C. D., Menea, B., Costa, V. P., Figueiredo, E. S. D., & Melo, M. B. D. (2011). Keeping an eye on myocilin: a complex molecule associated with primary open-angle glaucoma susceptibility. *Molecules*, 16(7), 5402-5421.

- Meng, X., Noyes, M. B., Zhu, L. J., Lawson, N. D., & Wolfe, S. A. (2008). Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*, 26(6), 695-701.
- Mertts, M., Garfield, S., Tanemoto, K., & Tomarev, S. I. (1999). Identification of the region in the N-terminal domain responsible for the cytoplasmic localization of Myoc/Tigr and its association with microtubules. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 79(10), 1237-1245.
- Miller, W. L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine reviews*, 9(3), 295-318.
- Mitchell, D. M., Lovel, A. G., & Stenkamp, D. L. (2018). Dynamic changes in microglial and macrophage characteristics during degeneration and regeneration of the zebrafish retina. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 1-20.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174-182.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*, 36(1), 244-246.
- Monnot, M. J., Babin, P. J., Poleo, G., Andre, M., Laforest, L., Ballagny, C., & Akimenko, M. A. (1999). Epidermal expression of apolipoprotein E gene during fin and scale development and fin regeneration in zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 214(3), 207-215.
- Morissette, J., Cote, G., Anctil, J.-L., Plante, M., Amyot, M., Héon, E., Trope, G. E., Weissenbach, J., & Raymond, V. (1995). A common gene for juvenile and adult-onset primary open-angle glaucomas confined on chromosome 1q. *American journal of human genetics*, 56(6), 1431.
- Nagy, I., Trexler, M., & Patthy, L. (2003). Expression and characterization of the olfactomedin domain of human myocilin. *Biochemical and biophysical research communications*, 302(3), 554-561.
- Nasevicius, A., & Ekker, S. C. J. N. g. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. 26(2), 216-220.
- Nguyen, T. D., Chen, P., Huang, W. D., Chen, H., Johnson, D., & Polansky, J. R. (1998). Gene structure and properties of TIGR, an olfactomedin-related glycoprotein cloned from glucocorticoid-induced trabecular meshwork cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), 6341-6350.
- Nickel, W. (2003). The mystery of nonclassical protein secretion: a current view on cargo proteins and potential export routes. *European Journal of Biochemistry*, 270(10), 2109-2119.
- Nicol, B., & Guiguen, Y. J. S. d. (2011). Expression profiling of Wnt signaling genes during gonadal differentiation and gametogenesis in rainbow trout. 5(6), 318-329.

- Noda, S., Mashima, Y., Obazawa, M., Kubota, R., Oguchi, Y., Kudoh, J., Minoshima, S., & Shimizu, N. (2000). Myocilin expression in the astrocytes of the optic nerve head. *Biochemical and biophysical research communications*, 276(3), 1129-1135.
- O'Brien, E. T., Ren, X.-o., & Wang, Y. (2000). Localization of myocilin to the Golgi apparatus in Schlemm's canal cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(12), 3842-3849.
- Ogi, A., Licitra, R., Naef, V., Marchese, M., Fronte, B., Gazzano, A., & Santorelli, F. M. (2021). Social preference tests in zebrafish: a systematic review. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 1239.
- Ohlmann, A., Goldwisch, A., Flügel-Koch, C., Fuchs, A. V., Schwager, K., & Tamm, E. R. (2003). Secreted glycoprotein myocilin is a component of the myelin sheath in peripheral nerves. *Glia*, 43(2), 128-140.
- Okamoto, T., Gohil, K., Finkelstein, E. I., Bove, P., Akaike, T., & Van Der Vliet, A. (2004). Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(1), L198-L209.
- Oliveira, R. F. (2013). Mind the fish: zebrafish as a model in cognitive social neuroscience. *Frontiers in neural circuits*, 7, 131.
- Onoa, B., & Tinoco Jr, I. (2004). RNA folding and unfolding. *Current opinion in structural biology*, 14(3), 374-379.
- Ortego, J., & Coca-Prados, M. (1997). Molecular characterization and differential gene induction of the neuroendocrine-specific genes neurotensin, neurotensin receptor, PC1, PC2, and 7B2 in the human ocular ciliary epithelium. *Journal of neurochemistry*, 69(5), 1829-1839.
- Ortego, J., Escribano, J., & Coca-Prados, M. (1997a). Cloning and characterization of subtracted cDNAs from a human ciliary body library encoding TIGR, a protein involved in juvenile open angle glaucoma with homology to myosin and olfactomedin. *FEBS letters*, 413(2), 349-353.
- ORTEGO, J., ESCRIBANO, J., & COCA-PRADOS, M. (1997b). Gene expression of proteases and protease inhibitors in the human ciliary epithelium and ODM-2 cells. *Experimental eye research*, 65(2), 289-299.
- Ozaki, Y., Saito, K., Shinya, M., Kawasaki, T., & Sakai, N. (2011). Evaluation of Sycp3, Plzf and Cyclin B3 expression and suitability as spermatogonia and spermatocyte markers in zebrafish. *Gene Expression Patterns*, 11(5-6), 309-315.
- Pandak, W. M., & Kakiyama, G. (2019). The acidic pathway of bile acid synthesis: Not just an alternative pathway. *Liver research*, 3(2), 88-98.
- Pang, C. P., Leung, Y. F., Fan, B., Baum, L., Tong, W. C., Lee, W. S., Chua, J. K., Fan, D. S., Liu, Y., & Lam, D. S. (2002). TIGR/MYOC gene sequence alterations in individuals with and

- without primary open-angle glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(10), 3231-3235.
- Paper, W., Kroeber, M., Heersink, S., Stephan, D. A., Fuchshofer, R., Russell, P., & Tamm, E. R. (2008). Elevated amounts of myocilin in the aqueous humor of transgenic mice cause significant changes in ocular gene expression. *Experimental eye research*, 87(3), 257-267.
- Parakh, T. N., Hernandez, J. A., Grammer, J. C., Weck, J., Hunzicker-Dunn, M., Zeleznik, A. J., & Nilson, J. H. J. P. o. t. N. A. o. S. (2006). Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires β -catenin. *103*(33), 12435-12440.
- Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N., & Engeszer, R. E. (2009). Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*, 238(12), 2975-3015.
- Pellissier, L. P., Alves, C. H., Quinn, P. M., Vos, R. M., Tanimoto, N., Lundvig, D. M., Dudok, J. J., Hooibrink, B., Richard, F., & Beck, S. C. (2013). Targeted ablation of CRB1 and CRB2 in retinal progenitor cells mimics Leber congenital amaurosis. *PLoS genetics*, 9(12), e1003976.
- Peters, D. M., Herbert, K., Biddick, B., & Peterson, J. A. (2005). Myocilin binding to Hep II domain of fibronectin inhibits cell spreading and incorporation of paxillin into focal adhesions. *Experimental cell research*, 303(2), 218-228.
- Petrov, A. M., Astafev, A. A., Mast, N., Saadane, A., El-Darzi, N., & Pikuleva, I. A. (2019). The interplay between retinal pathways of cholesterol output and its effects on mouse retina. *Biomolecules*, 9(12), 867.
- Plagens, A., Richter, H., Charpentier, E., & Randau, L. (2015). DNA and RNA interference mechanisms by CRISPR-Cas surveillance complexes. *FEMS microbiology reviews*, 39(3), 442-463.
- Polansky, J. R. (1993). HTM cell culture model for steroid effects on intraocular pressure: overview. *Basic aspects of glaucoma research III*, 307-318.
- Polansky, J. R., Fauss, D. J., Chen, P., Chen, H., Lütjen-Drecoll, E., Johnson, D., Kurtz, R. M., Ma, Z.-D., Bloom, E., & Nguyen, T. D. (1997). Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product. *Ophthalmologica*, 211(3), 126-139.
- Polansky, J. R., Fauss, D. J., & Zimmerman, C. C. (2000). Regulation of TIGR/MYOC gene expression in human trabecular meshwork cells. *Eye*, 14(3), 503-514.
- Ponnambalam, S., & Baldwin, S. A. (2003). Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Molecular membrane biology*, 20(2), 129-139.
- Prelich, G. (2012). Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, 190(3), 841-854.
- Price, A., Garhyan, J., & Gibas, C. (2017). The impact of RNA secondary structure on read start locations on the Illumina sequencing platform. *Plos one*, 12(2), e0173023.

- Quigley, H. A., Park, C. K., Tracey, P. A., & Pollack, I. P. J. A. j. o. o. (2002). Community screening for eye disease by laypersons: the Hoffberger program. *133*(3), 386-392.
- Quinn, P. M., & Wijnholds, J. (2019). Retinogenesis of the human fetal retina: an apical polarity perspective. *Genes*, *10*(12), 987.
- Ramcharran, S. (2016). *The Why and How of Breeding Zebrafish for Research*. <https://owlcation.com/stem/The-why-and-how-of-breeding-zebrafish-for-research>
- Rao, P. V., Allingham, R. R., & Epstein, D. L. (2000). TIGR/myocilin in human aqueous humor. *Experimental eye research*, *71*(6), 637-641.
- Redmond, T. M., Poliakov, E., Yu, S., Tsai, J.-Y., Lu, Z., & Gentleman, S. (2005). Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(38), 13658-13663.
- Reimand, J., Arak, T., Adler, P., Kolberg, L., Reisberg, S., Peterson, H., & Vilo, J. (2016). g: Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic acids research*, *44*(W1), W83-W89.
- Ribas, L., Liew, W. C., Díaz, N., Sreenivasan, R., Orbán, L., & Piferrer, F. (2017). Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(6), E941-E950.
- Ricard, C. S., Agapova, O. A., Salvador-Silva, M., Kaufman, P. L., & Hernandez, M. R. (2001). Expression of myocilin/TIGR in normal and glaucomatous primate optic nerves. *Experimental eye research*, *73*(4), 433-447.
- Richards, J. E., Ritch, R., Lichter, P. R., Rozsa, F. W., Stringham, H. M., Caronia, R. M., Johnson, D., Abundo, G. P., Willcockson, J., & Downs, C. A. (1998). Novel trabecular meshwork inducible glucocorticoid response mutation in an eight-generation juvenile-onset primary open-angle glaucoma pedigree. *Ophthalmology*, *105*(9), 1698-1707.
- Richardson, R., Tracey-White, D., Webster, A., & Moosajee, M. (2017). The zebrafish eye—a paradigm for investigating human ocular genetics. *Eye*, *31*(1), 68-86.
- Robertson, C. E., Wright, P. A., Köblitz, L., & Bernier, N. J. (2014). Hypoxia-inducible factor-1 mediates adaptive developmental plasticity of hypoxia tolerance in zebrafish, *Danio rerio*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *281*(1786), 20140637.
- Rodríguez-Marí, A., Yan, Y.-L., BreMiller, R. A., Wilson, C., Canestro, C., & Postlethwait, J. H. (2005). Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development. *Gene Expression Patterns*, *5*(5), 655-667.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H., & Löbrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and cellular biology*, *23*(16), 5706-5715.

- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 365-386). Springer.
- Russell, P., Tamm, E. R., Grehn, F. J., Picht, G., & Johnson, M. (2001). The presence and properties of myocilin in the aqueous humor. *Investigative ophthalmology & visual science*, *42*(5), 983-986.
- Sakai, H., Shen, X., Koga, T., Park, B. C., Noskina, Y., Tibudan, M., & Yue, B. Y. (2007). Mitochondrial association of myocilin, product of a glaucoma gene, in human trabecular meshwork cells. *Journal of cellular physiology*, *213*(3), 775-784.
- Sánchez-Sánchez, F., Martínez-Redondo, F., Aroca-Aguilar, J. D., Coca-Prados, M., & Escribano, J. (2007). Characterization of the intracellular proteolytic cleavage of myocilin and identification of calpain II as a myocilin-processing protease. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(38), 27810-27824.
- Sander, J. D., Yeh, J.-R. J., Peterson, R. T., & Joung, J. K. (2011). Engineering zinc finger nucleases for targeted mutagenesis of zebrafish. *Methods in cell biology*, *104*, 51-58.
- Santos, D., Luzio, A., & Coimbra, A. M. (2017). Zebrafish sex differentiation and gonad development: a review on the impact of environmental factors. *Aquatic Toxicology*, *191*, 141-163.
- Santos, E. M., Workman, V. L., Paull, G. C., Filby, A. L., Van Look, K. J., Kille, P., & Tyler, C. R. (2007). Molecular basis of sex and reproductive status in breeding zebrafish. *Physiological genomics*, *30*(2), 111-122.
- Schmid, B., & Haass, C. J. J. o. n. (2013). Genomic editing opens new avenues for zebrafish as a model for neurodegeneration. *127*(4), 461-470.
- Schonthaler, H. B., Lampert, J. M., Isken, A., Rinner, O., Mader, A., Gesemann, M., Oberhauser, V., Golczak, M., Biehlmaier, O., & Palczewski, K. (2007). Evidence for RPE65-independent vision in the cone-dominated zebrafish retina. *European Journal of Neuroscience*, *26*(7), 1940-1949.
- Senatorov, V., Malyukova, I., Fariss, R., Wawrousek, E. F., Swaminathan, S., Sharan, S. K., & Tomarev, S. (2006). Expression of mutated mouse myocilin induces open-angle glaucoma in transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, *26*(46), 11903-11914.
- Shang, E. H., & Wu, R. S. (2004). Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development. *Environmental science & technology*, *38*(18), 4763-4767.
- Shang, E. H., Yu, R. M., & Wu, R. S. (2006). Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental science & technology*, *40*(9), 3118-3122.
- Sheffield, V. C., Stone, E. M., Alward, W. L., Drack, A. V., Johnson, A. T., Streb, L. M., & Nichols, B. E. J. N. g. (1993). Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *4*(1), 47-50.

- Shen, X., Koga, T., Park, B.-C., SundarRaj, N., & Yue, B. Y. (2008a). Rho GTPase and cAMP/protein kinase A signaling mediates myocilin-induced alterations in cultured human trabecular meshwork cells. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(1), 603-612.
- Shen, X., Koga, T., Park, B.-C., SundarRaj, N., & Yue, B. Y. J. J. o. B. C. (2008b). Rho GTPase and cAMP/protein kinase A signaling mediates myocilin-induced alterations in cultured human trabecular meshwork cells. *283*(1), 603-612.
- Shepard, A. R., Jacobson, N., Sui, R., Steely, H. T., Lotery, A. J., Stone, E. M., & Clark, A. F. (2003). Characterization of rabbit myocilin: Implications for human myocilin glycosylation and signal peptide usage. *BMC genetics*, *4*(1), 1-10.
- Snyder, D. A., Rivers, A. M., Yokoe, H., Menco, B. P. M., & Anholt, R. R. (1991). Olfactomedin: purification, characterization, and localization of a novel olfactory glycoprotein. *Biochemistry*, *30*(38), 9143-9153.
- Song, S., Landsbury, A., Dahm, R., Liu, Y., Zhang, Q., & Quinlan, R. A. (2009). Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens. *The Journal of clinical investigation*, *119*(7), 1837-1848.
- Soules, K. A., & Link, B. A. (2005). Morphogenesis of the anterior segment in the zebrafish eye. *BMC developmental biology*, *5*(1), 1-16.
- Sreenivasan, R., Jiang, J., Wang, X., Bártfai, R., Kwan, H. Y., Christoffels, A., & Orbán, L. (2014a). Gonad differentiation in zebrafish is regulated by the canonical Wnt signaling pathway. *Biology of Reproduction*, *90*(2), 45, 41-10.
- Sreenivasan, R., Jiang, J., Wang, X., Bártfai, R., Kwan, H. Y., Christoffels, A., & Orbán, L. J. B. o. R. (2014b). Gonad differentiation in zebrafish is regulated by the canonical Wnt signaling pathway. *90*(2), 45, 41-10.
- Stamer, W., Perkumas, K., Hoffman, E., Roberts, B., Epstein, D., & McKay, B. (2006). Coiled-coil targeting of myocilin to intracellular membranes. *Experimental eye research*, *83*(6), 1386-1395.
- Stamer, W. D., Roberts, B. C., Howell, D. N., & Epstein, D. L. (1998). Isolation, culture, and characterization of endothelial cells from Schlemm's canal. *Investigative ophthalmology & visual science*, *39*(10), 1804-1812.
- Stoilova, D., Child, A., Brice, G., Crick, R. P., Fleck, B., & Sarfarazi, M. J. O. g. (1997). Identification of a new 'TIGR' mutation in a family with juvenile-onset primary open angle glaucoma. *18*(3), 109-118.
- Stone, E. M., Fingert, J. H., Alward, W. L., Nguyen, T. D., Polansky, J. R., Sunden, S. L., Nishimura, D., Clark, A. F., Nystuen, A., & Nichols, B. E. (1997). Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science*, *275*(5300), 668-670.
- Stuart, G. W., McMURRAY, J. V., & Westerfield, M. (1988). Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development*, *103*(2), 403-412.

- Summerton, J., Stein, D., Huang, S. B., Matthews, P., WELLER, D., Partridge, M. J. A., & Development, N. A. D. (1997). Morpholino and phosphorothioate antisense oligomers compared in cell-free and in-cell systems. *7(2)*, 63-70.
- Summerton, J., Weller, D. J. A., & Development, N. A. D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *7(3)*, 187-195.
- Sunden, S., Alward, W., Nichols, B. E., Rokhlina, T. R., Nystuen, A., Stone, E. M., & Sheffield, V. C. (1996). Fine mapping of the autosomal dominant juvenile open angle glaucoma (GLC1A) region and evaluation of candidate genes. *Genome research*, *6(9)*, 862-869.
- Suzuki, Y., Shirato, S., Taniguchi, F., Ohara, K., Nishimaki, K., & Ohta, S. (1997). Mutations in the TIGR gene in familial primary open-angle glaucoma in Japan. *American journal of human genetics*, *61(5)*, 1202.
- Swiderski, R. E., Ross, J. L., Fingert, J. H., Clark, A. F., Alward, W. L., Stone, E. M., & Sheffield, V. C. (2000). Localization of MYOC transcripts in human eye and optic nerve by in situ hybridization. *Investigative ophthalmology & visual science*, *41(11)*, 3420-3428.
- Swiderski, R. E., Ying, L., Cassell, M. D., Alward, W. L., Stone, E. M., & Sheffield, V. C. (1999). Expression pattern and in situ localization of the mouse homologue of the human MYOC (GLC1A) gene in adult brain. *Molecular brain research*, *68(1-2)*, 64-72.
- Taguchi, M., Kanno, H., Kubota, R., Miwa, S., Shishiba, Y., & Ozawa, Y. (2000). Molecular cloning and expression profile of rat myocilin. *Molecular genetics and metabolism*, *70(1)*, 75-80.
- Takahashi, H. (1977). Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *北海道大學水産學部研究彙報*, *28(2)*, 57-65.
- Takahashi, H., Noda, S., Mashima, Y., Kubota, R., Ohtake, Y., Tanino, T., Kudoh, J., Minoshima, S., Oguchi, Y., & Shimizu, N. (2000). The myocilin (MYOC) gene expression in the human trabecular meshwork. *Current eye research*, *20(2)*, 81-84.
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., & Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal*, *17(18)*, 5497-5508.
- Tamm, E. R. (2002). Myocilin and glaucoma: facts and ideas. *Progress in retinal and eye research*, *21(4)*, 395-428.
- Tamm, E. R., Russell, P., Epstein, D. L., Johnson, D. H., & Piatigorsky, J. (1999). Modulation of myocilin/TIGR expression in human trabecular meshwork. *Investigative ophthalmology & visual science*, *40(11)*, 2577-2582.
- Tawara, A., Okada, Y., Kubota, T., Suzuki, Y., Taniguchi, F., Shirato, S., Nguyen, T. D., & Ohnishi, Y. (2000). Immunohistochemical localization of MYOC/TIGR protein in the trabecular tissue of normal and glaucomatous eyes. *Current eye research*, *21(6)*, 934-943.

- Tham, Y.-C., Li, X., Wong, T. Y., Quigley, H. A., Aung, T., & Cheng, C.-Y. (2014). Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, *121*(11), 2081-2090.
- Thompson, B. J., Pichaud, F., & Röper, K. (2013). Sticking together the Crumbs—an unexpected function for an old friend. *Nature reviews Molecular cell biology*, *14*(5), 307-314.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, *22*(22), 4673-4680.
- Thorleifsson, G., Walters, G. B., Hewitt, A. W., Masson, G., Helgason, A., DeWan, A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Gudjonsson, S. A., & Magnusson, K. P. (2010). Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma. *Nature genetics*, *42*(10), 906-909.
- Tomarev, S. I., Tamm, E. R., & Chang, B. (1998). Characterization of the MouseMyoc/TigrGene. *Biochemical and biophysical research communications*, *245*(3), 887-893.
- Tu, Z., Yang, W., Yan, S., Guo, X., & Li, X.-J. J. M. n. (2015). CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *10*(1), 1-8.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., & Iguchi, T. (2002). Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *Journal of Experimental Biology*, *205*(6), 711-718.
- Ueda, J., Wentz–Hunter, K. K., Cheng, E. L., Fukuchi, T., Abe, H., & Yue, B. Y. (2000). Ultrastructural localization of myocilin in human trabecular meshwork cells and tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *48*(10), 1321-1329.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., & Asplund, A. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, *347*(6220).
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., & McMahon, A. P. (1999a). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, *397*(6718), 405-409.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., & McMahon, A. P. J. N. (1999b). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *397*(6718), 405-409.
- Valdivieso, A., Ribas, L., & Piferrer, F. (2019). Ovarian transcriptomic signatures of zebrafish females resistant to different environmental perturbations. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *332*(3-4), 55-68.
- van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Springer Science & Business Media.
- Varadaraj, K., Kushmerick, C., Baldo, G., Bassnett, S., Shiels, A., & Mathias, R. (1999). The role of MIP in lens fiber cell membrane transport. *The Journal of membrane biology*, *170*(3), 191-203.

- Wada, H., Iwasaki, M., Sato, T., Masai, I., Nishiwaki, Y., Tanaka, H., Sato, A., Nojima, Y., & Okamoto, H. (2005). Dual roles of zygotic and maternal Scribble1 in neural migration and convergent extension movements in zebrafish embryos. *Development*, *132*(10), 2273-2285.
- Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. J. A. r. o. b. (2016). CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *85*, 227-264.
- Wang, X., Bartfai, R., Sleptsova-Freidrich, I., & Orban, L. (2007). The timing and extent of 'juvenile ovary' phase are highly variable during zebrafish testis differentiation. *Journal of Fish Biology*, *70*, 33-44.
- Wang, X., Garcia, C. M., Shui, Y.-B., & Beebe, D. C. (2004). Expression and regulation of α -, β -, and γ -crystallins in mammalian lens epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, *45*(10), 3608-3619.
- Wang, X., & Johnson, D. H. (2000). mRNA in situ hybridization of TIGR/MYOC in human trabecular meshwork. *Investigative ophthalmology & visual science*, *41*(7), 1724-1729.
- Webster, K. A., Schach, U., Ordaz, A., Steinfeld, J. S., Draper, B. W., & Siegfried, K. R. (2017). Dmrt1 is necessary for male sexual development in zebrafish. *Developmental biology*, *422*(1), 33-46.
- Weisgraber, K. H. (1994). Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Advances in protein chemistry*, *45*, 249-302.
- WEN, Y., SACHS, G., & ATHMANN, C. (2000). A novel lens epithelium gene, LEP503, is highly conserved in different vertebrate species and is developmentally regulated in postnatal rat lens. *Experimental eye research*, *70*(2), 159-168.
- Wentz-Hunter, K., Shen, X., & Yue, B. (2003). Distribution of myocilin, a glaucoma gene product, in human corneal fibroblasts. *Mol Vis*, *9*, 308-314.
- Wentz-Hunter, K., Ueda, J., Shimizu, N., & Yue, B. Y. (2002). Myocilin is associated with mitochondria in human trabecular meshwork cells. *Journal of cellular physiology*, *190*(1), 46-53.
- Westerfield, M. (2000). The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish. http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html.
- Wienholds, E., Van Eeden, F., Kosters, M., Mudde, J., Plasterk, R. H., & Cuppen, E. (2003). Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome research*, *13*(12), 2700-2707.
- Wiggs, J., Allingham, R., & Vollrath, D. (1998). Frequency of mutations in TIGR/MYOC in families with juvenile and adult onset primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *39*, S30.
- Wiggs, J. L., Haines, J. L., Paglinauan, C., Fine, A., Sporn, C., & Lou, D. (1994). Genetic linkage of autosomal dominant juvenile glaucoma to 1q21-q31 in three affected pedigrees. *Genomics*, *21*(2), 299-303.

- Wittmann, C., Reischl, M., Shah, A. H., Kronfuss, E., Mikut, R., Liebel, U., & Grabher, C. (2015). A zebrafish drug-repurposing screen reveals sGC-dependent and sGC-independent pro-inflammatory activities of nitric oxide. *Plos one*, *10*(10), e0137286.
- Xiang, M., Zhou, L., Macke, J. P., Yoshioka, T., Hendry, S. H., Eddy, R. L., Shows, T. B., & Nathans, J. (1995). The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *Journal of Neuroscience*, *15*(7), 4762-4785.
- Xiao, T., Roeser, T., Staub, W., & Baier, H. (2005). A GFP-based genetic screen reveals mutations that disrupt the architecture of the zebrafish retinotectal projection. *Development*, *132*(13), 2955-2967.
- Xing, Y.-Y., Cheng, X.-N., Li, Y.-L., Zhang, C., Saquet, A., Liu, Y.-Y., Shao, M., & Shi, D.-L. (2018). Mutational analysis of dishevelled genes in zebrafish reveals distinct functions in embryonic patterning and gastrulation cell movements. *PLoS genetics*, *14*(8), e1007551.
- Yan, Y.-L., Batzel, P., Titus, T., Sydes, J., Desvignes, T., BreMiller, R., Draper, B., & Postlethwait, J. H. (2019). A hormone that lost its receptor: anti-Müllerian hormone (AMH) in zebrafish gonad development and sex determination. *Genetics*, *213*(2), 529-553.
- Ye, D., Zhu, L., Zhang, Q., Xiong, F., Wang, H., Wang, X., He, M., Zhu, Z., & Sun, Y. (2019). Abundance of early embryonic primordial germ cells promotes zebrafish female differentiation as revealed by lifetime labeling of germline. *Marine biotechnology*, *21*(2), 217-228.
- Yokoe, H., & Anholt, R. (1993). Molecular cloning of olfactomedin, an extracellular matrix protein specific to olfactory neuroepithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(10), 4655-4659.
- Yoon, S., Kim, H.-S., Moon, J.-I., Lim, J. M., & Joo, C.-K. (1999). Mutations of the TIGR/MYOC gene in primary open-angle glaucoma in Korea. *American journal of human genetics*, *64*(6), 1775.
- Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., Goletz, P., Ma, J.-X., Crouch, R. K., & Pfeifer, K. (1998). Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nature genetics*, *20*(4), 344-351.
- Zhang, Q., Ye, D., Wang, H., Wang, Y., Hu, W., & Sun, Y. (2020). Zebrafish *cyp11c1* knockout reveals the roles of 11-ketotestosterone and cortisol in sexual development and reproduction. *Endocrinology*, *161*(6), bqaa048.
- Zheng, Q., Xiao, H., Shi, H., Wang, T., Sun, L., Tao, W., Kocher, T. D., Li, M., & Wang, D. (2020). Loss of *Cyp11c1* causes delayed spermatogenesis due to the absence of 11-ketotestosterone. *Journal of Endocrinology*, *244*(3), 487-499.
- Zhou, Y., Grinchuk, O., & Tomarev, S. I. (2008). Transgenic mice expressing the Tyr437His mutant of human myocilin protein develop glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, *49*(5), 1932-1939.

- Zillig, M., Wurm, A., Grehn, F. J., Russell, P., & Tamm, E. R. (2005). Overexpression and properties of wild-type and Tyr437His mutated myocilin in the eyes of transgenic mice. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(1), 223-234.

10. Anexo I. Resultados suplementarios

10.1 Figuras suplementarias

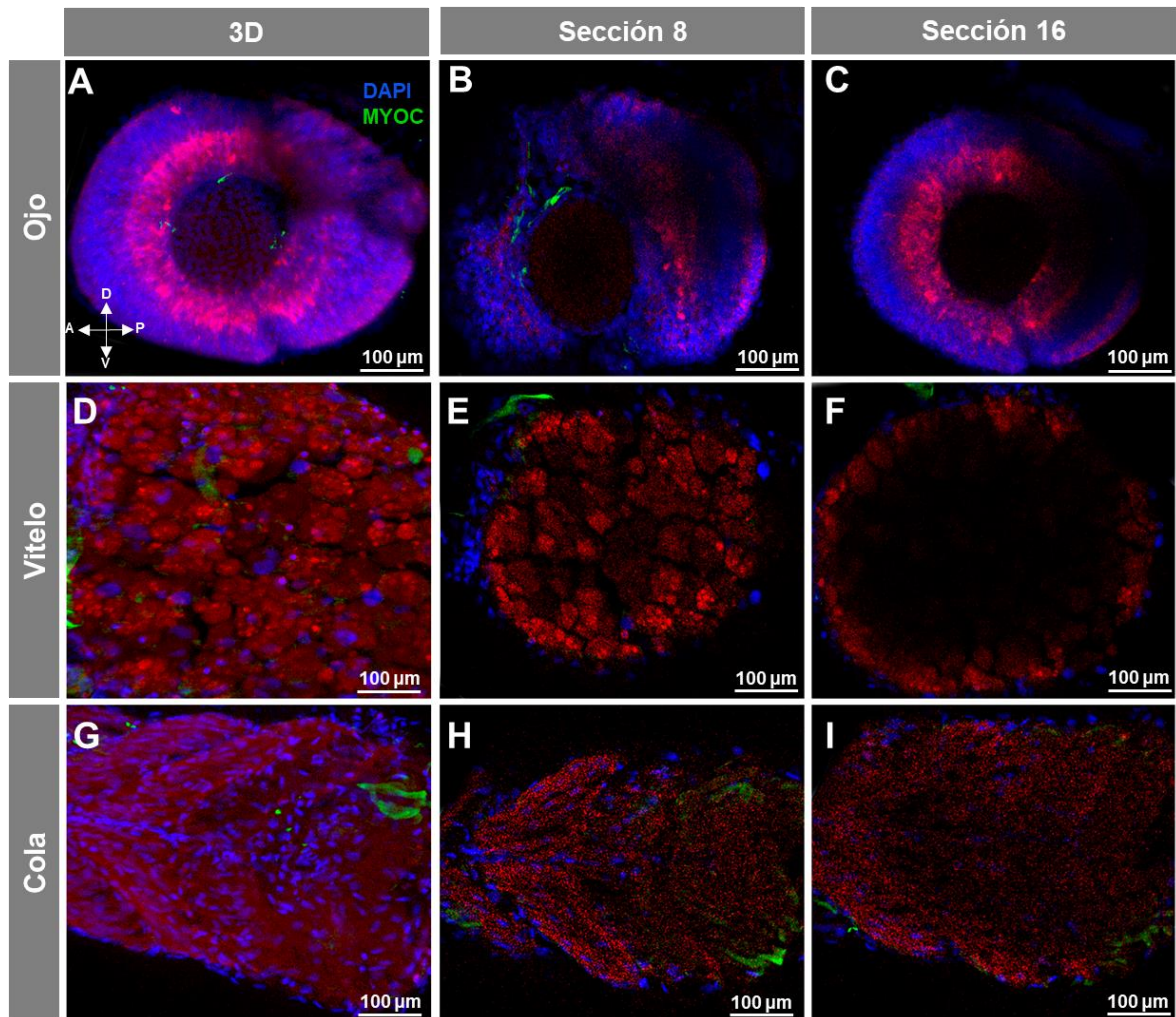


Figura suplementaria 1. Controles negativos de la inmunohistoquímica *in toto* fluorescente de miocilina en embriones silvestres (96 hpf) mostrado en las Figura 18, 19 y 20. Los embriones silvestres fueron incubados con un anticuerpo preinmune TNT y un anticuerpo secundario anti-IgY Cy2. La cruz indica la posición de los ejes embrionarios (D: dorsal; P: posterior; V: ventral; A: anterior. Rojo: autofluorescencia tisular.

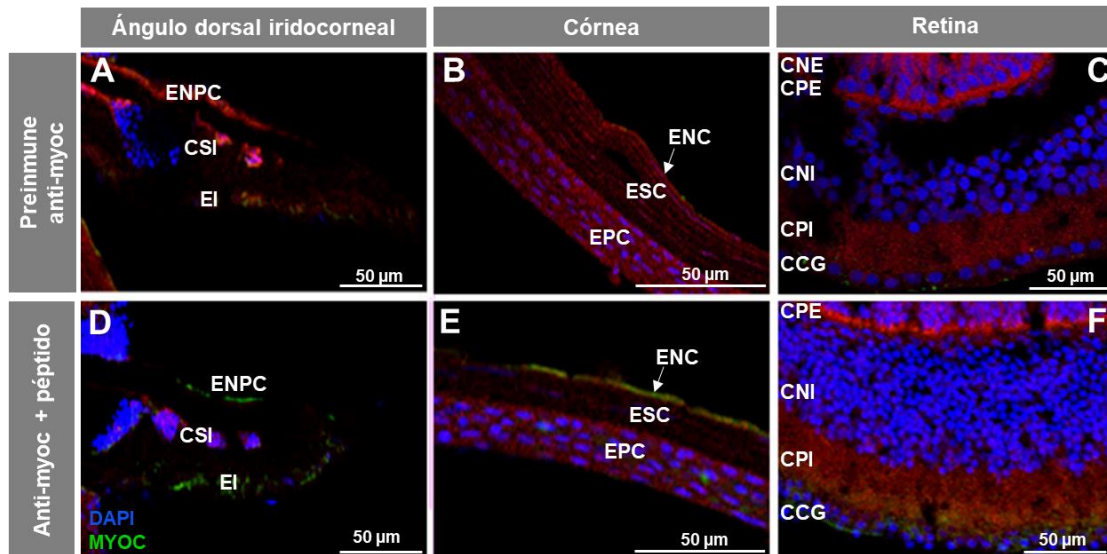


Figura suplementaria 2. Controles negativos de la inmunohistoquímica de miocilina en secciones de ojos de peces cebra adultos silvestres (7 meses) mostrados en la Figura 21. Los controles consisten en secciones de tejido incubados con el anticuerpo preimmune TNT, seguido de la incubación con un anticuerpo secundario Cy2 anti-IgY (A-C). Como control adicional, las secciones de tejido fueron incubadas con el péptido antigénico (1:10 anticuerpo: péptido) (D-F). CCG: capa de células ganglionares; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; CSI: células sanguíneas del iris; EI: estroma del iris; ENC: endotelio de la córnea; ENP: epitelio no pigmentado; EPC: epitelio de la córnea; ESC: estroma de la córnea; Rojo: autofluorescencia tisular.

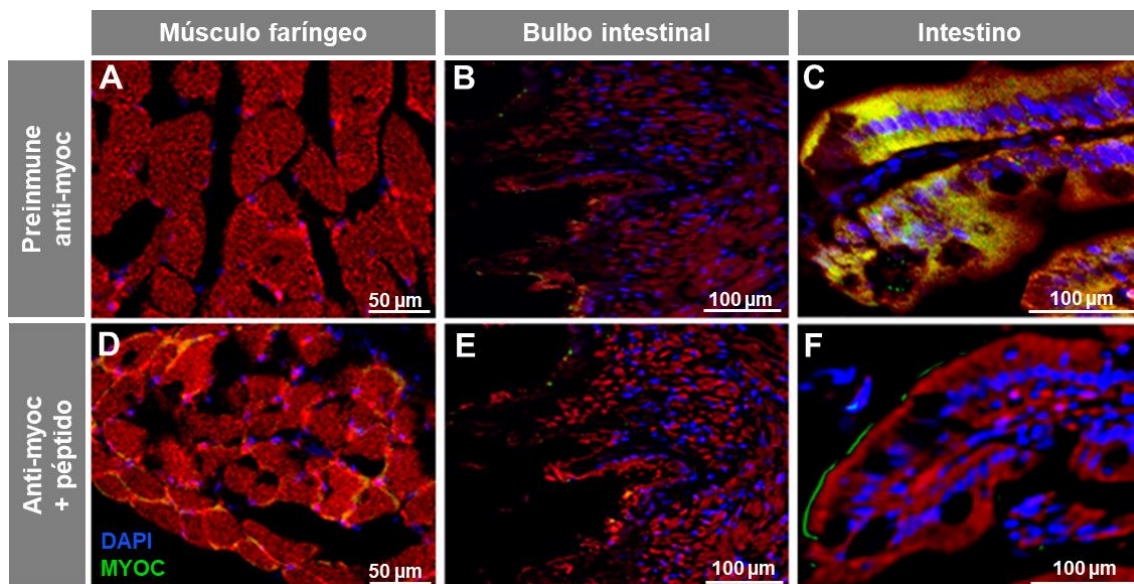


Figura suplementaria 3. Controles negativos de la inmunohistoquímica de miocilina en tejidos no oculares de peces cebra adultos silvestre mostrados en la Figura 22. Los controles consisten en secciones de tejido incubados con el anticuerpo preimmune TNT, seguido de la incubación con un anticuerpo secundario Cy2 anti-IgY (A-C). Como control competitivo, las secciones de tejido fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-TNT en presencia del péptido antigénico (1:10 anticuerpo: péptido) (D-F). Señal roja: autofluorescencia del tejido.

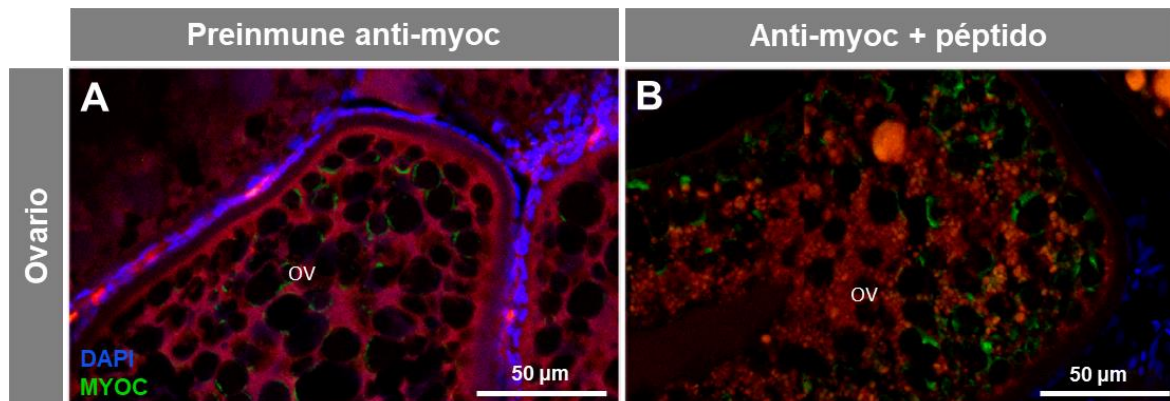


Figura suplementaria 4. Controles negativos de la inmunohistoquímica de miocilina en el ovario de peces cebra adultos mostrados en la Figura 23. Las secciones histológicas del ovario de peces adultos silvestres fueron incubadas con el anticuerpo preinmune TNT (A). Se usó el ensayo competitivo con el péptido antigénico (1:10 anticuerpo: péptido) como control adicional. OV: ovocitos vitelogénicos; rojo: autofluorescencia tisular.

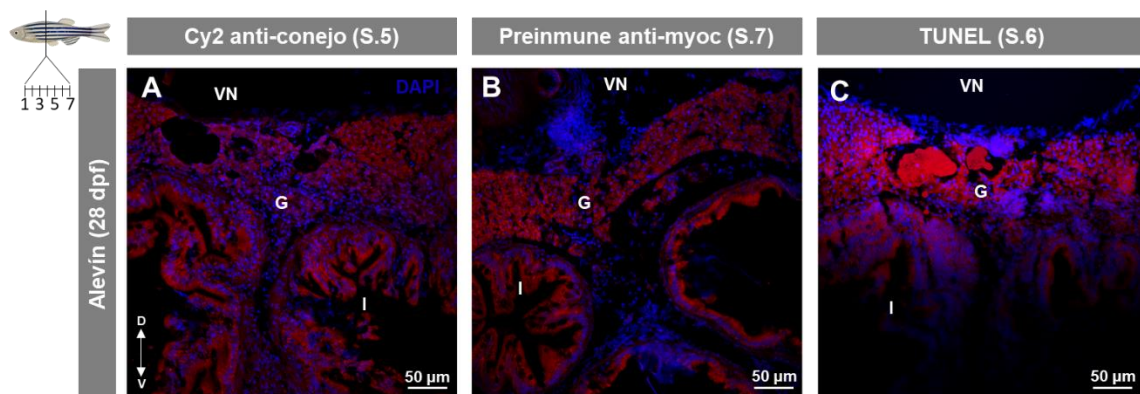


Figura suplementaria 5. Controles negativos de la inmunohistoquímica de vasa, de miocilina y del TUNEL de la gónada inmadura de peces cebra silvestres mostrados en la Figura 28. Tres secciones consecutivas (5-7, indicadas en el esquema superior izquierdo) fueron empleadas para los análisis. Como control negativo de la inmunohistoquímica la sección de tejido 5 fue incubada únicamente con el anticuerpo secundario Cy2 (A). La sección de tejido 7 fue incubada con el anticuerpo preinmune TNT seguido de un anticuerpo secundario anti-IgY marcado con Cy2 (B). La sección de tejido 6 fue tratada únicamente con la solución dUTP (C). La doble flecha en vertical indica en A el eje dorsoventral (D:dorsal; V:ventral); G: gonada; I: intestino; Rojo: autofluorescencia tisular; VN: vejiga natatoria.

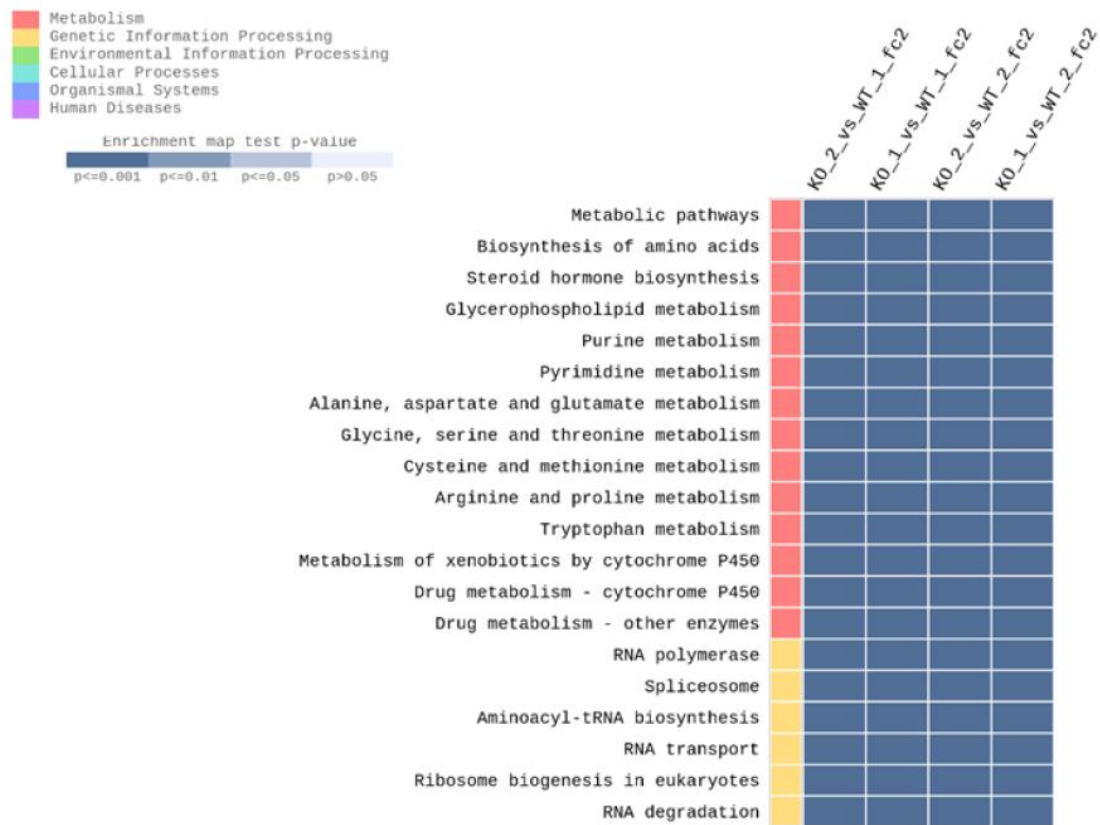


Figura suplementaria 6. Las 20 principales vías KEGG expresadas de forma diferencial en los peces cebra macho *knock-out* en las cuatro comparaciones (KO1 vs. WT1, KO1 vs. WT2, KO2 vs. WT1 y KO2 vs. WT2). Las vías se identificaron mediante el análisis de enriquecimiento KEGG. El mapa de enriquecimiento está coloreado por el nivel de gradiente del valor p bruto del test de Fisher modificado. Un valor p bruto < 0,05 significa que la vía se ha enriquecido significativamente.

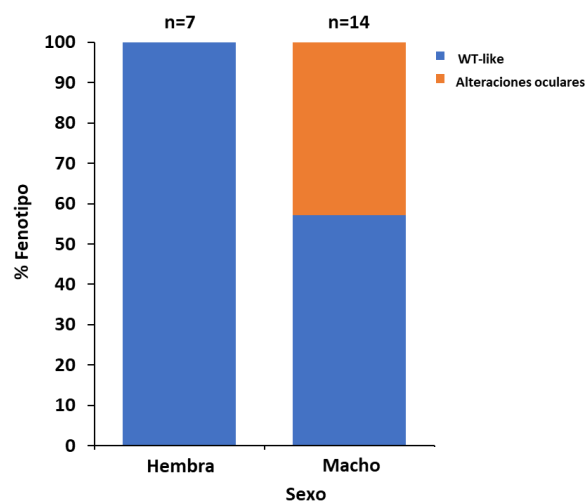


Figura suplementaria 7. Fenotipos oculares en los peces cebra adultos (2 años) transgénicos para el gen *myoc*. Análisis de la proporción de peces transgénicos con y sin alteraciones oculares en función del sexo. N: número de peces utilizados en el ensayo; WT-like: peces transgénicos con fenotipo silvestre.

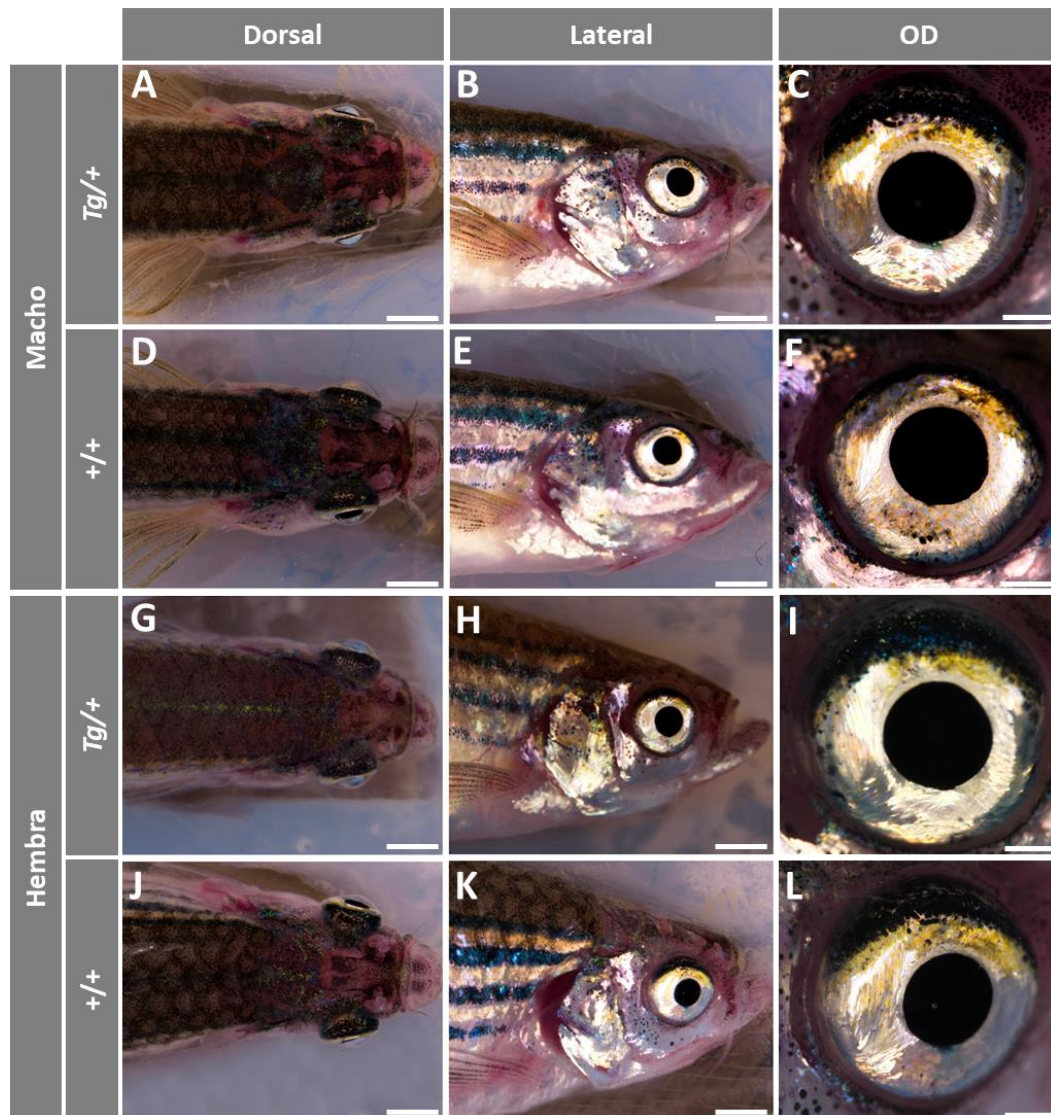


Figura suplementaria 8. Fenotipos macroscópicos de la cabeza y los ojos en el pez cebra adulto transgénico para *myoc*. Se muestran las imágenes de campo claro de peces transgénicos adultos (2 años) machos (A-C) y hembras (G-I) y silvestres como control (D-F y J-L). Barra de escala: 200 μm en los paneles A, B, D, E, G, H, J y K y 50 μm en C, F, I y L. Las imágenes son representativas de tres individuos de cada genotipo. OD: ojo derecho; Tg: transgénico; +/+ : silvestre.

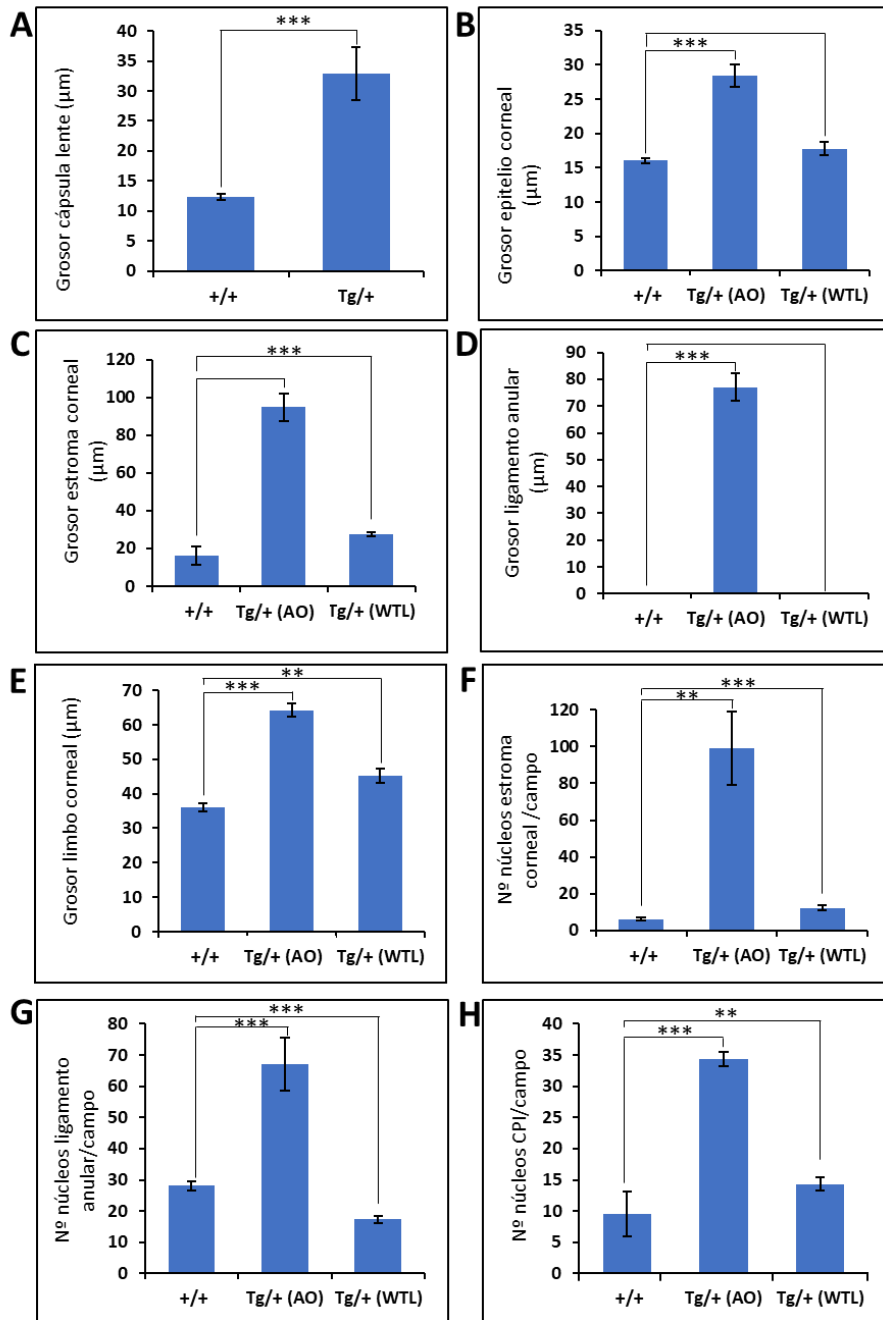


Figura suplementaria 9. Cuantificación de diferentes parámetros oculares en peces cebra transgénicos para *myoc* (2 años). Espesor de la cápsula de la lente (A), del epitelio corneal (B), del estroma corneal (C), del ligamento anular en la córnea central (D) y del limbo corneal (E). Número de núcleos en el estroma corneal (F), el ligamento anular (G) y las células pigmentadas del iris (H). Se utilizaron secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina para medir el grosor. Se contaron los núcleos en las secciones de tejido teñidas con DAPI. Se utilizaron secciones de tejido de cuatro ojos de cada fenotipo para los análisis. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,05$, prueba t de Student. CPI: células pigmentadas del iris; +/+ : tipo salvaje; OA: alteraciones oculares; Tg/+ : transgénico; WTL: fenotipo silvestre.

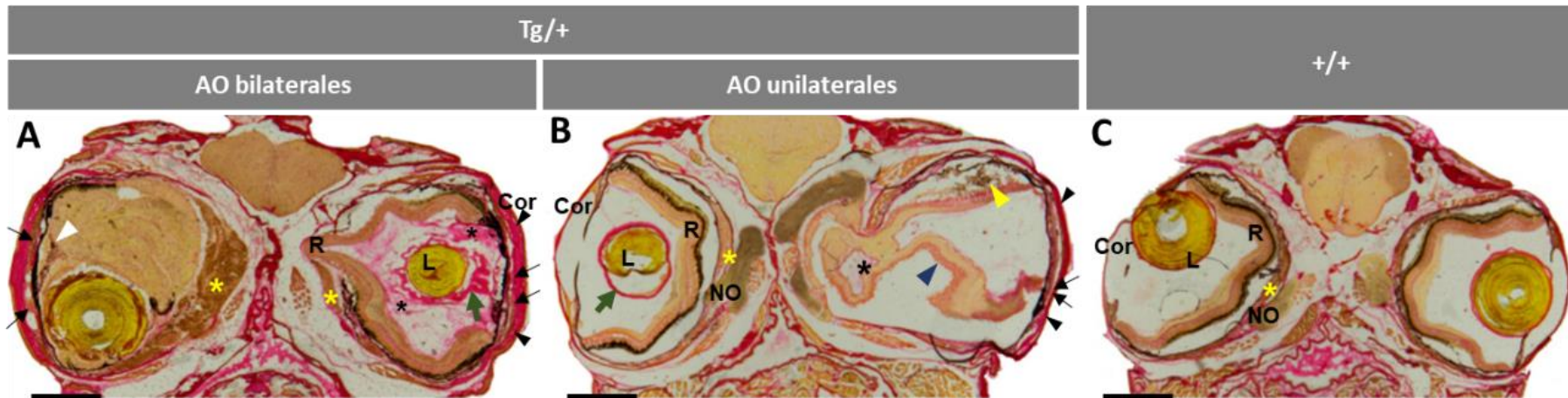


Figura suplementaria 10. Histología de secciones de la cabeza de peces cebra transgénicos adultos (2 años). Las secciones de tejido teñidas con Rojo Sirio corresponden a peces cebra transgénicos con alteraciones oculares macroscópicas bilaterales o unilaterales (A y B, respectivamente) y a peces silvestres como control (C). Las secciones de tejido son consecutivas a las mostradas en la **Figura 39**. Barra de escala: 800 μ m. Asteriscos amarillos: sobrecrecimiento del cuerpo coroideo; asteriscos negros: acumulación de material vítreo; flechas negras: fusión de la córnea con el iris; puntas de flecha negras: engrosamiento del estroma corneal; flecha verde: engrosamiento de la cápsula del cristalino; punta de flecha azul: sobrecrecimiento y plegamiento de la retina; AO: alteraciones oculares; Cor: córnea; L: lente; NO: nervio óptico; R: retina; Tg: transgénico; +/+ : silvestre.

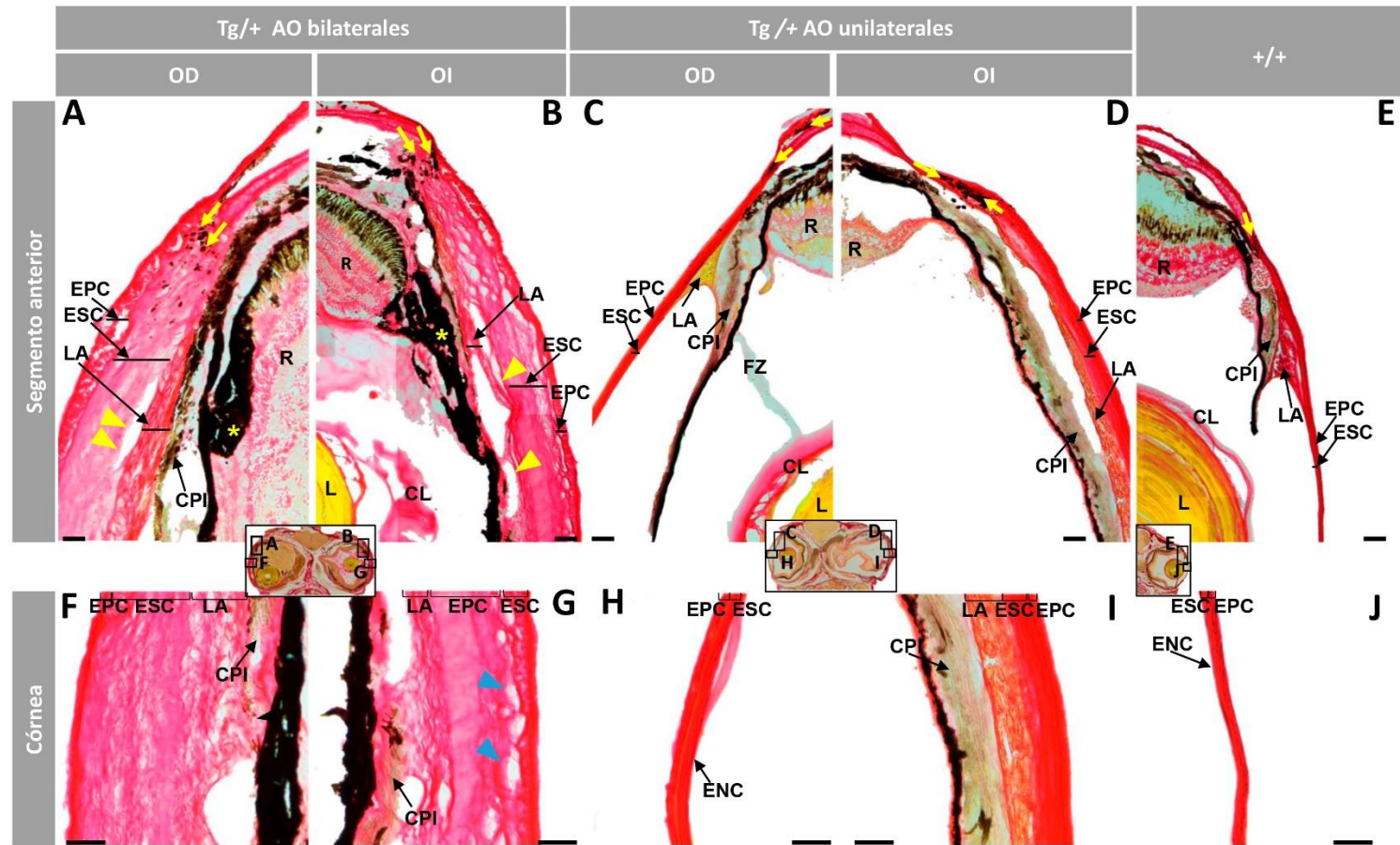


Figura suplementaria 11. Tinción con Rojo Sirio de secciones del segmento anterior de peces transgénicos para *myoc*. Se tiñeron con Rojo Sirio secciones de tejido de peces cebra transgénicos adultos (2 años) con alteraciones oculares bilaterales (A, B, F y G), unilaterales (C, D, H e I) y silvestres (E y J) como control. Barra de escala: 200 μ m en los paneles A-E y 100 μ m en F-J. Las imágenes son representativas de dos individuos de cada genotipo. AO: Alteraciones oculares; asterisco amarillo: aumento de las células del EPR; C: Córnea; CL: cápsula de la lente; CPI: células pigmentarias del iris; ENC: endotelio de la córnea; EPC: epitelio de la córnea; ESC: estroma de la córnea; flechas amarillas; melanocitos del limbo; L: lente; LA: ligamento anular; punta de flecha azul: cavidades entre el ESC y EPC; puntas de flecha amarillas; cavidades entre CPI y LA; OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo; R: retina; Tg: transgénico; +/-: silvestre.

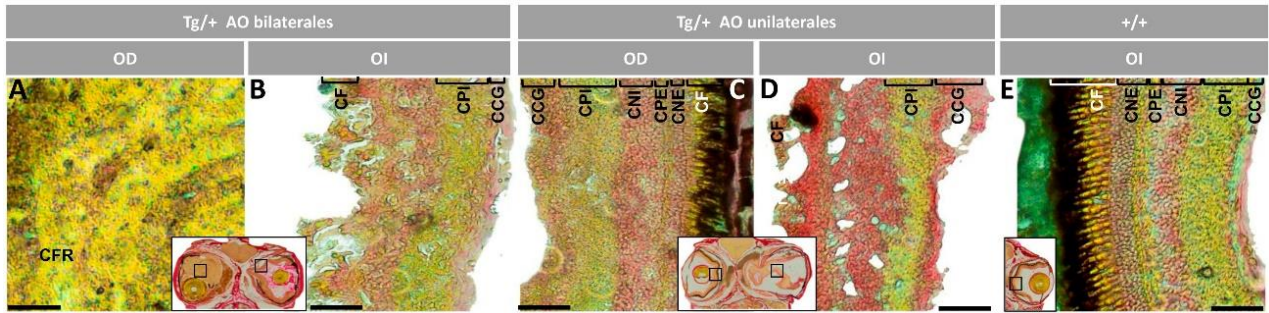


Figura suplementaria 12. Histología de la retina central del pez cebra transgénico adulto. Se tiñeron con Rojo Sirio las secciones de tejido de peces cebra transgénicos adultos (2 años) con alteraciones oculares bilaterales (A y B), unilaterales (C y D) y silvestres (E). Barra de escala: 50 μ m. Las imágenes son representativas de dos individuos de cada genotipo. AO: alteraciones oculares; CCG: Capa de células ganglionares; CF: Capa de fotorreceptores; CFR: capa de fibras de la retina; CNE: Capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: Capa plexiforme interna; OD: Ojo derecho; OI: Ojo izquierdo; Tg: transgénico; +/+ : silvestre.

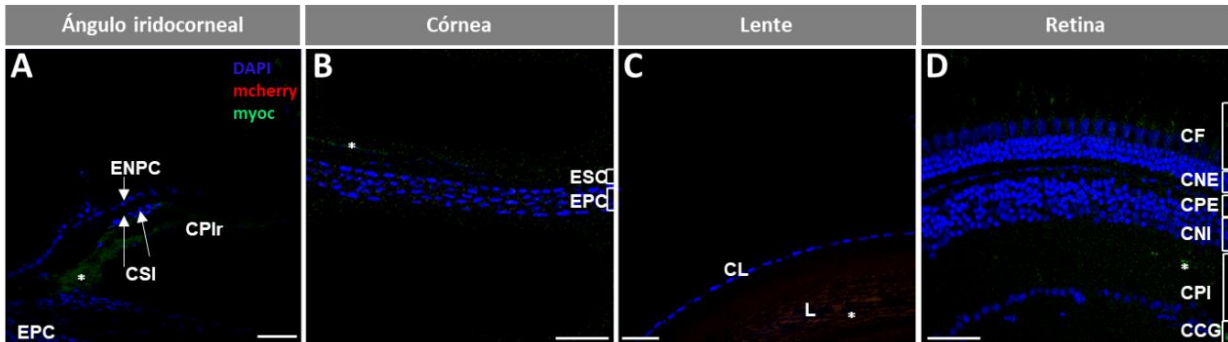


Figura suplementaria 13. Controles negativos del análisis inmunohistoquímico de miocilina en los peces cebra transgénicos (2 años). Los controles consistieron en secciones de tejido de peces silvestres incubadas con un anticuerpo preinmune anti-miocilina (TNT). Barras de escala: 50 μ m. Asterisco blanco: autofluorescencia tisular; asterisco rojo: señal de myoc; CCG: capa de células ganglionares; CF: capa fotorreceptora; CL: cápsula de la lente; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; CPIr: células pigmentarias del iris; CSI: Células sanguíneas del iris; ENPC: epitelio ciliar no pigmentado; EPC: epitelio corneal; ESC: estroma corneal; L: lente.

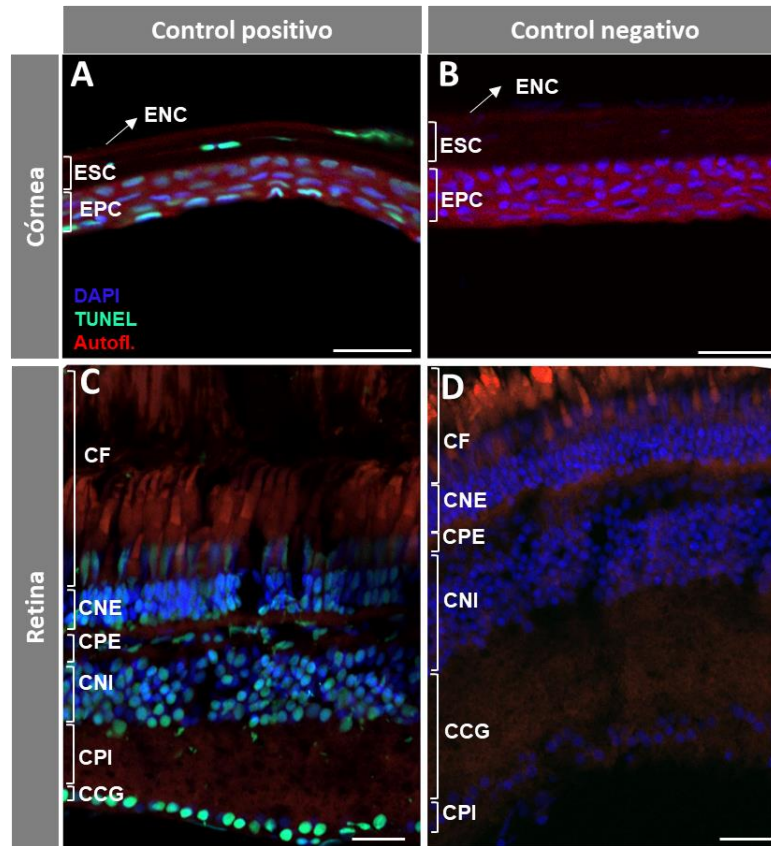


Figura suplementaria 14. Controles positivos y negativos del ensayo TUNEL en el pez cebra adulto de 2 años. Se utilizaron secciones de retina de peces cebra adultos silvestres incubadas con DNasa I (A y C) o sólo con la solución de marcaje (*labeling*) (B y D) como controles positivos y negativos, respectivamente. Barras de escala: 50 μm en los paneles A y B y 25 μm en los paneles C y D. CCG: capa de células ganglionares; CF: capa fotorreceptora; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; ENC: endotelio corneal; EPC: epitelio corneal; ESC: estroma corneal.

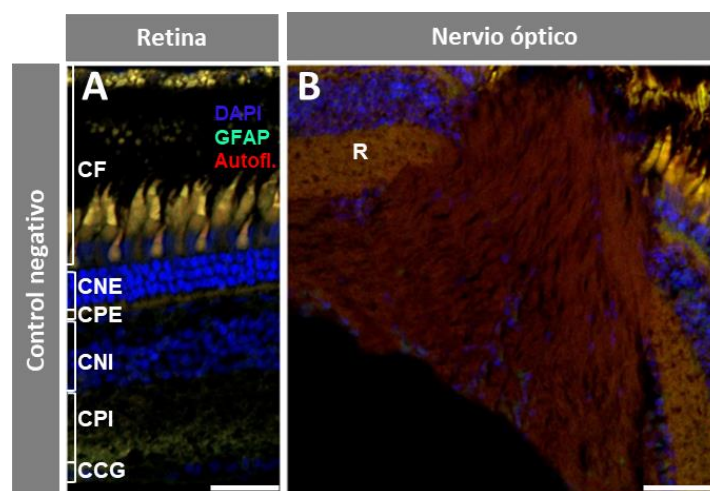


Figura suplementaria 15. Controles negativos del análisis inmunohistoquímico de GFAP en el pez cebra adulto de 2 años. Los controles consistieron en secciones de tejido de peces silvestres incubadas únicamente con el anticuerpo secundario. Barras de escala: 25 μm . CCG: capa de células ganglionares; CF: capa fotorreceptora; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna.

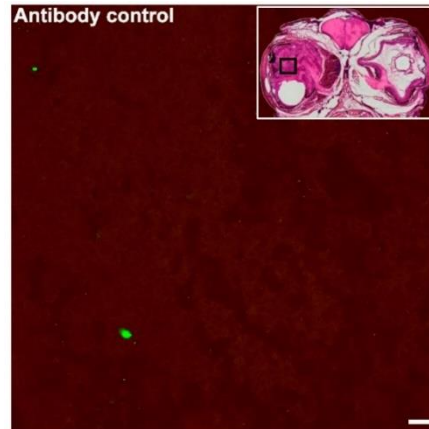


Figura suplementaria 16. Control negativo de la inmunohistoquímica de calretinina y Brn3a en el pez cebra adulto de 2 años. El rectángulo del recuadro muestra la región aproximada analizada para el control de anticuerpos secundarios de un tejido representativo. Los controles consistieron en secciones de tejido ocular incubadas únicamente con la mezcla de anticuerpos secundarios. Barra de escala: 20 μ m.

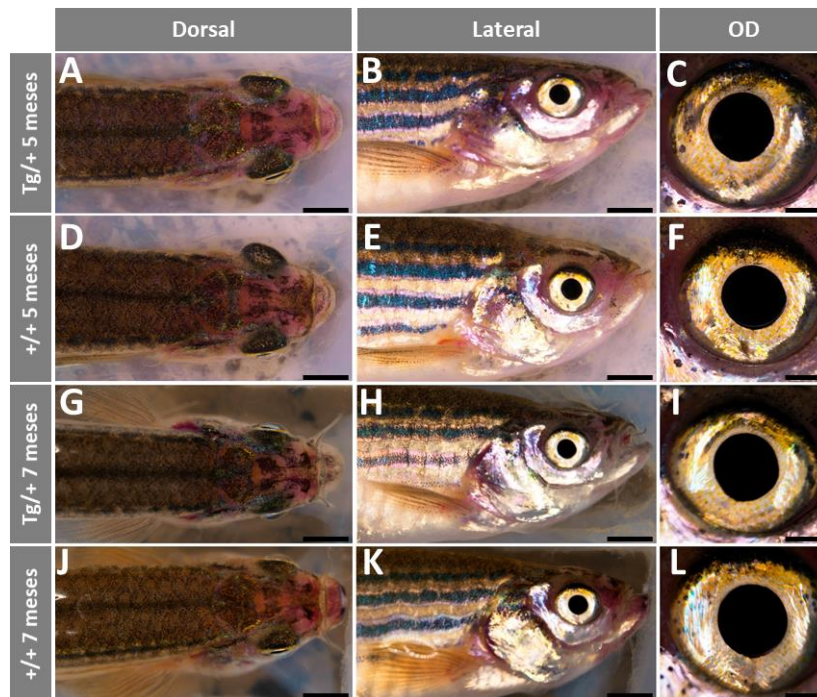


Figura suplementaria 17. Análisis de los fenotipos macroscópicos en peces cebra adultos transgénicos para *myoc*. Una parte de la progenie de los peces transgénicos para *myoc* de la F4 (A-C, G-I) fue criada hasta la edad adulta (5 y 7 meses) y fotografiada con un microscopio Nikon SMZ18. Se utilizaron peces silvestres como control (D-F y J-L). Las imágenes son representativas de cuatro individuos de cada genotipo. OD: ojo derecho; Tg: transgénico; +/+ : silvestre.

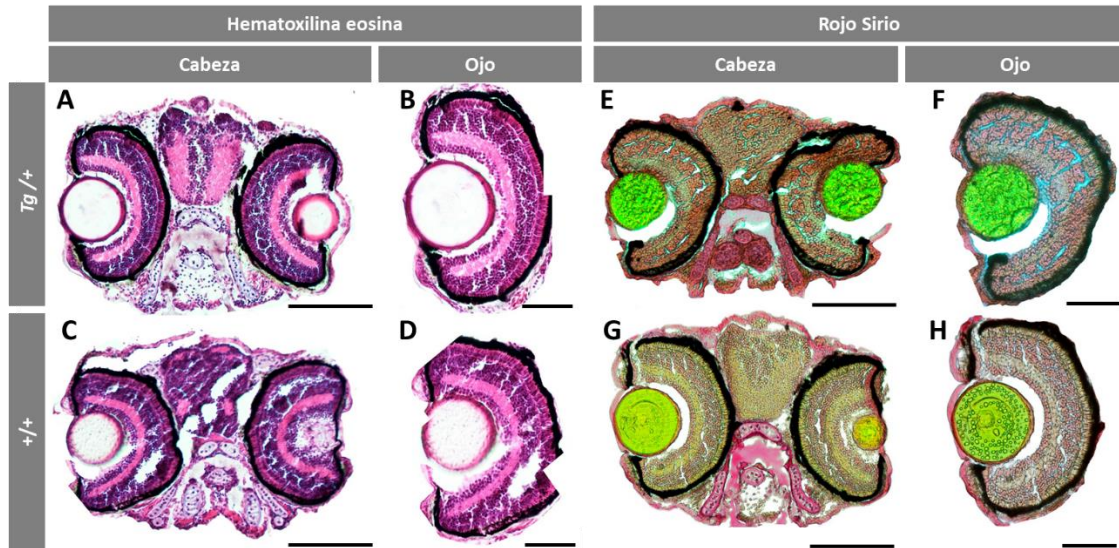


Figura suplementaria 18. Tinción con hematoxilina-eosina y Rojo Sirio de larvas transgénicas para *myoc*. Las secciones de tejido de larvas transgénicas para *myoc* de 6 dpf (F4) (A, B, E y F) y de los silvestres (C, D, G y H) como control, se tiñeron con hematoxilina-eosina (A-D) y con Rojo Sirio (E-H). Barras de escala: 100 µm en los paneles A, C, E y G y 50 µm en B, D, F y H. Las imágenes son representativas de cuatro individuos de cada genotipo. Las imágenes B, F, D y H se obtuvieron a partir de una composición de imágenes. Tg: transgénico; +/+ : silvestre.

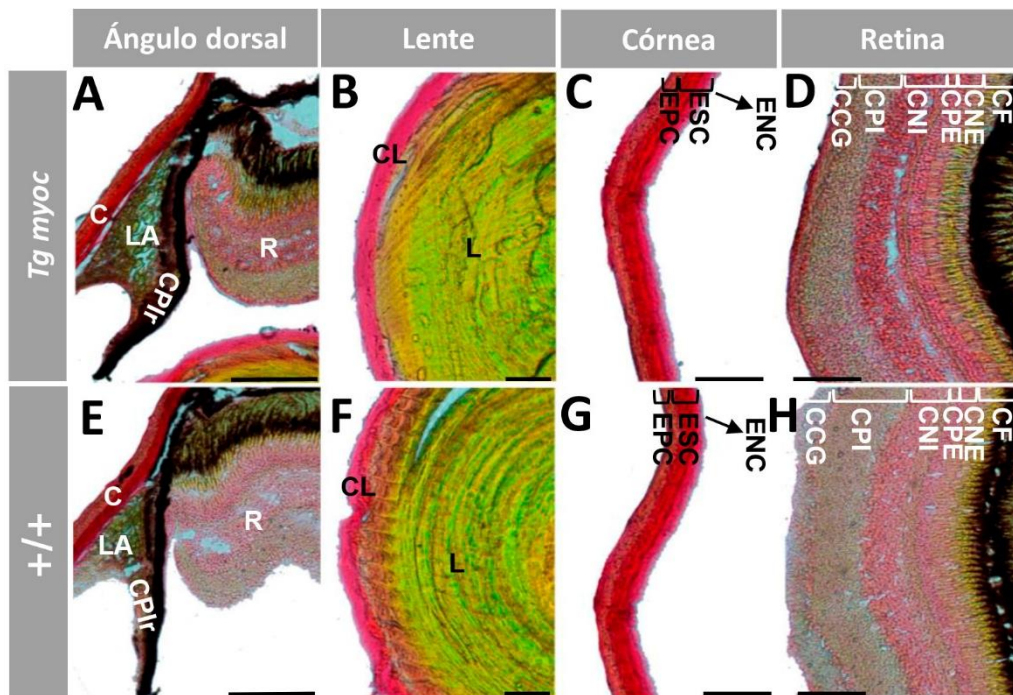


Figura suplementaria 19. Histología del ojo del pez cebra adulto transgénico para *myoc*. Tinción con Rojo Sirio de secciones del ángulo iridocorneal dorsal (A y E), de la lente (B y F), de la córnea (C y G) y de la retina (D y H) de peces cebra adultos (5 meses, F4) transgénicos y silvestres. Barra de escala: 50 µm. C: Cornea; CCG: capa de células ganglionares; CF: capa de fotorreceptores; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CL: cápsula de la lente; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; CPIr: células pigmentadas del iris; ENC: endotelio de la córnea; EPC: epitelio de la córnea, ESC: estroma de la córnea; LA: ligamento anular; L: lente; R: retina; Tg: transgénico; +/+ : silvestre.

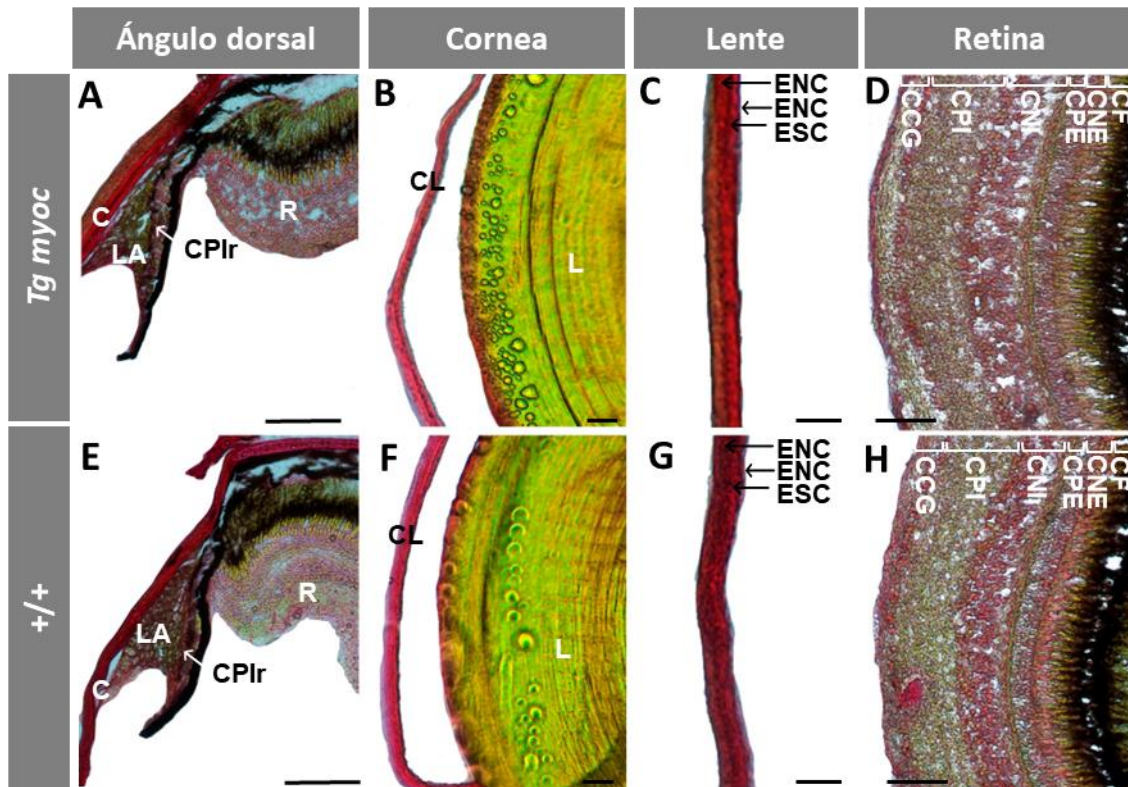


Figura suplementaria 20. Histología del ojo del pez cebra adulto transgénico para *myoc*. Tinción con Rojo Sirio de secciones del ángulo dorsal y del ángulo ventral (A, B, F y G), de la córnea (C y H), del cristalino (D y I) y de la retina (E y J) de peces cebra machos adultos (7 meses) transgénicos de *myoc* (A-E) y silvestres (F-J). Barra de escala: 50 μ m. C: Cornea; CCG: capa de células ganglionares; CF: capa de fotorreceptores; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CL: cápsula de la lente; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; CPIr: células pigmentadas del iris; ENC: endotelio de la córnea; EPC: epitelio de la córnea; ESC: estroma de la córnea; L: lente; LA: ligamento anular; R: retina; Tg: transgénico; +/+ : silvestre.

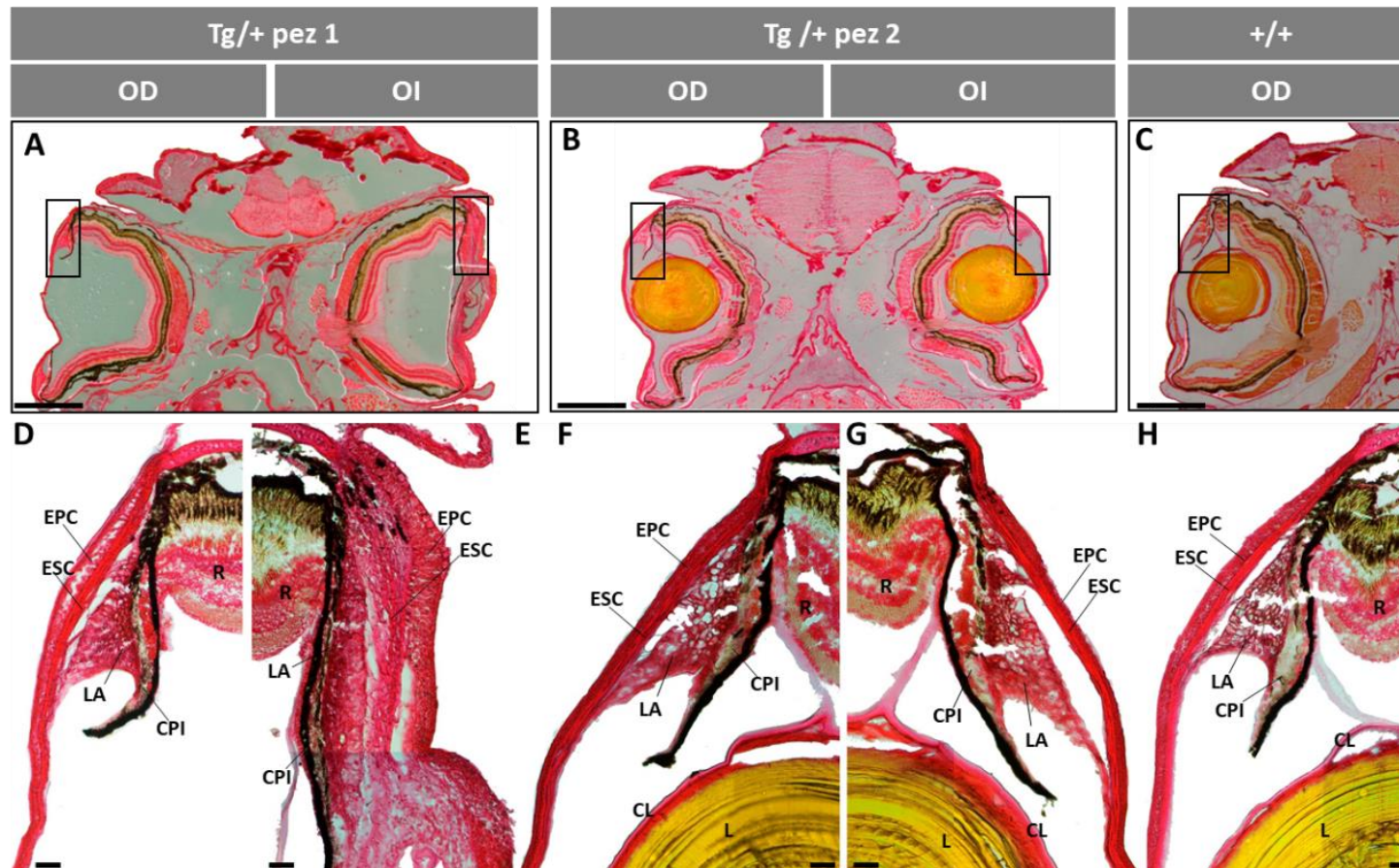


Figura suplementaria 21. Tinción con Rojo Sirio de secciones del segmento anterior de peces cebra transgénicos de *myoc*. Las secciones de los peces transgénicos adultos (13 meses) (F4) de *myoc* se tiñeron con Rojo Sirio. Se observan los mismos fenotipos oculares en los peces cebra transgénicos (A, B, D-G) descritos en la tinción de hematoxilina eosina en comparación con los silvestres (C y H). Las barras de escala representan 200 μ m en los paneles A-C y 100 μ m en D-H. Las imágenes son representativas de al menos de 3 individuos de cada genotipo. C: Córnea; CPI: células pigmentadas del iris; CL: cápsula de la lente; EPC: epitelio de la córnea; ESC: estroma de la córnea; L: lente; LA: ligamento anular; OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo; R: retina; Tg: transgénico; +/-: silvestre.

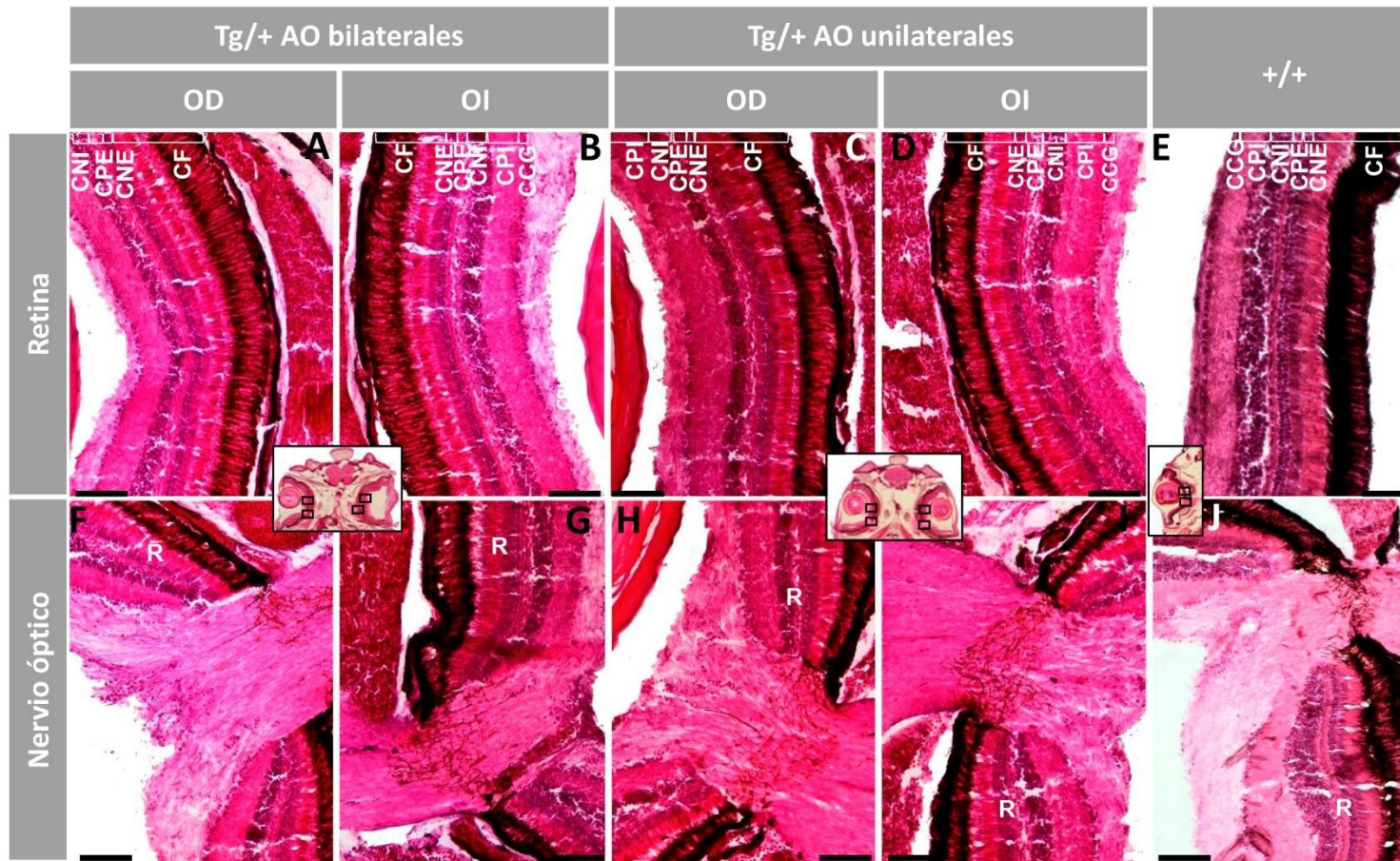


Figura suplementaria 22. Histología del ojo del pez cebra adulto transgénico para *myoc*. Tinción de hematoxilina-eosina de secciones la retina central (A-E) y del nervio óptico (F-J) de peces cebra adultos (13 meses) machos transgénicos para *myoc* (A-D, F-I) y silvestres como control (E y J). Barra de escala: 50 μ m. CCG: capa de células ganglionares; CF: capa de fotorreceptores; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; R: retina; Tg: transgénico; +/-: silvestre.

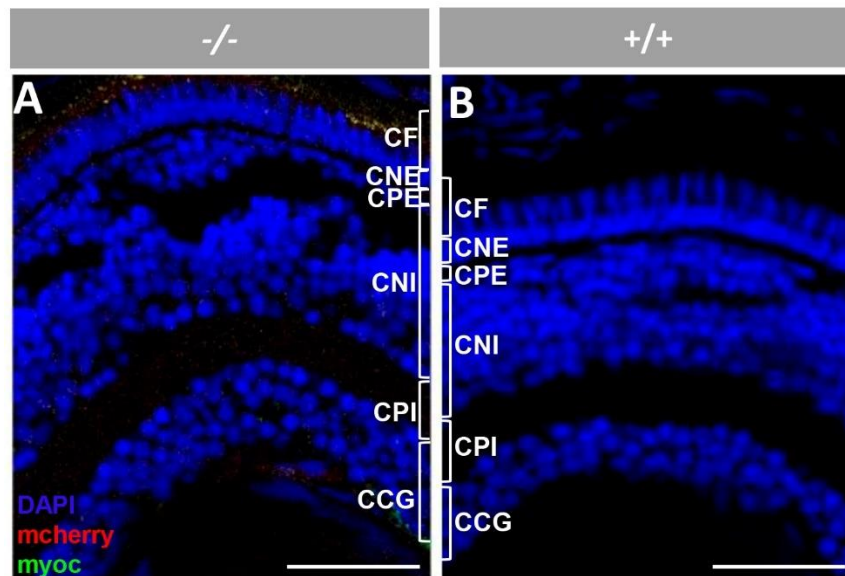


Figura suplementaria 23. Controles negativos del análisis inmunohistoquímico de miocilina en las larvas de 6dpf. Los controles consistieron en secciones de tejido de KO para *myoc* incubadas con un anticuerpo primario anti-TNT (A) o secciones de peces silvestres incubadas con el anticuerpo preinmune anti-TNT obtenido en gallina (IgY) (B) seguido del anticuerpo secundario. Barra de escala: 25 μ m. Las imágenes son representativas de cuatro individuos de cada genotipo. CCG: capa de células ganglionares; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; CF: capa fotorreceptora. -/-: *knock-out*; +/+ : silvestre.

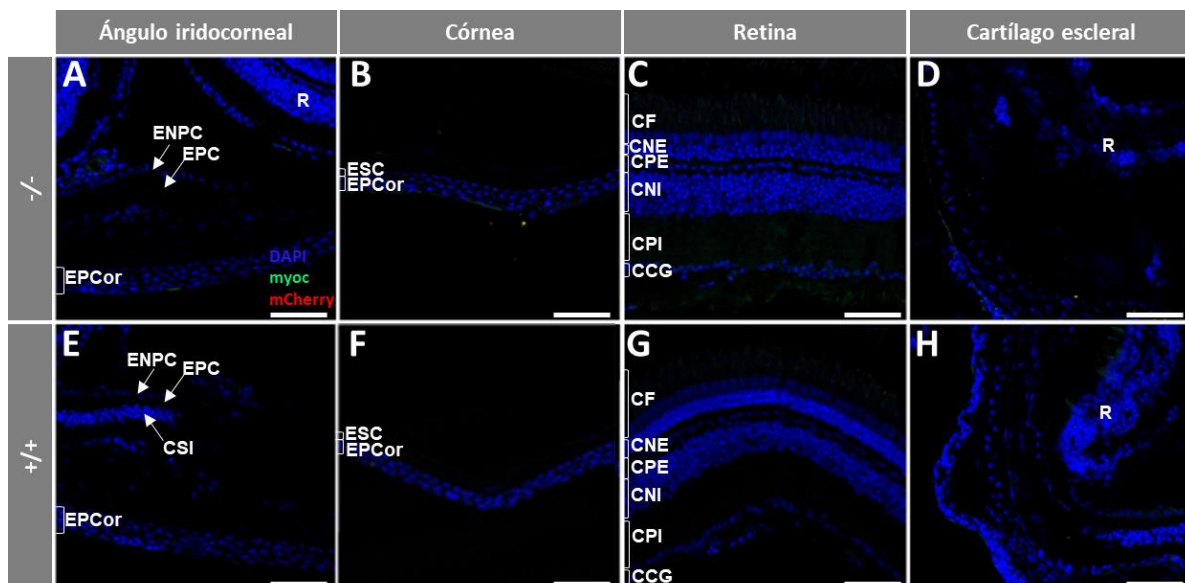


Figura suplementaria 24. Controles negativos del análisis inmunohistoquímico de miocilina en el pez cebra adulto de 5 meses. Los controles consistieron en secciones de tejido del KO *myoc* incubadas con un anticuerpo primario anti-TNT (A-D) o secciones de peces silvestres incubadas con un anticuerpo preinmune anti-TNT (E-H), seguido del anticuerpo secundario. Barra de escala: 25 μ m. Las imágenes son representativas de cuatro individuos de cada genotipo. CCG: capa de células ganglionares; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; CF: capa fotorreceptora; CSI: células sanguíneas del iris; ENPC: epitelio no pigmentado ciliar; EPC: epitelio pigmentado ciliar; EPCor: epitelio de la córnea; ESC: estroma de la córnea; R: retina; -/-: *knock-out*; +/+ : silvestre.

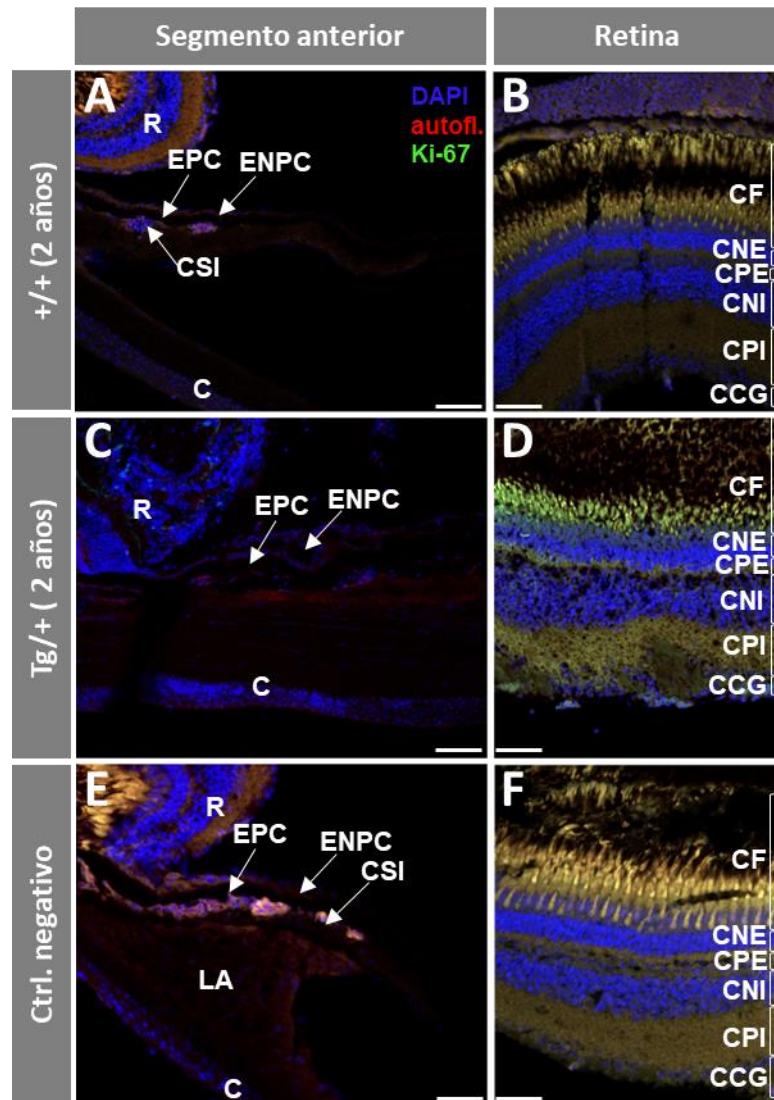


Figura suplementaria 25. Inmunohistoquímica del marcador de proliferación celular Ki-67 en el segmento anterior y la retina de peces cebra machos transgénicos adultos. Las secciones histológicas de peces transgénicos para *myoc* (C y D) y de silvestres utilizados como control (A y B) se incubaron con un anticuerpo primario anti-Ki-67 seguido del anticuerpo secundario o sólo con el anticuerpo secundario como control negativo (E y F). Barra de escala: 50 μ m. Las imágenes son representativas de los resultados observados en dos peces de cada genotipo. C: córnea; CCG: capa de células ganglionares; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CF: capa fotorreceptora; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; CSI: células sanguíneas del iris; EPC: epitelio pigmentado ciliar; ENPC: epitelio ciliar no pigmentado; LA: ligamento anular; R: retina; Tg: transgénico; +/-: silvestre.

10.2 Tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1. Top-50 de los genes sobreexpresados identificados en el estudio transcriptómico de peces KO para *myoc*. Condiciones para la expresión diferencial: diferencia de expresión >2; número de lecturas >20. p-valor<0.05.FC: diferencia de expresión (*fold change*).

Símbolo del gen	ID gen	Identificación	FC (KO vs WT)	P-valor
<i>tuba7l</i>	431777	tubulin, alpha 7 like	49.9	7.2E-25
<i>irg1l</i>	562007	immunoresponsive gene 1, like	35.4	1.5E-23
<i>smc1b</i>	797354	structural maintenance of chromosomes 1B	20.0	2.4E-11
<i>sat2a</i>	494055	spermidine/spermine N1-acetyltransferase family member 2a	18.8	6.7E-31
<i>Ddc</i>	406651	dopa decarboxylase	15.9	1.4E-39
<i>sult2st3</i>	777792	sulfotransferase family 2, cytosolic sulfotransferase 3	15.2	2.4E-16
<i>Hamp</i>	402837	hepcidin antimicrobial peptide	15.2	8.5E-27
<i>hsd17b7</i>	768185	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	14.2	2.1E-22
<i>cremb</i>	550357	cAMP responsive element modulator b	12.5	3.5E-13
<i>sycp3</i>	678602	synaptonemal complex protein 3	12.1	2.6E-21
<i>zgc:92137</i>	445049	<i>zgc:92137</i>	11.9	1.3E-27
<i>cyp8b2</i>	100004274	cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 2	11.7	1.6E-04
<i>eno4</i>	558487	enolase family member 4	11.5	2.0E-17
<i>Cthl</i>	445818	cystathionase (cystathionine gamma-lyase), like	11.3	9.0E-46
<i>gstk4</i>	678541	glutathione S-transferase kappa 4	11.2	7.7E-08
<i>soat2</i>	564868	sterol O-acyltransferase 2	11.2	1.1E-09
<i>si:busm1-194e12.8</i>	368816	<i>si:busm1-194e12.8</i>	10.9	1.2E-23
<i>ak7b</i>	504040	adenylate kinase 7b	10.0	4.5E-05
<i>cyp11c1</i>	791124	cytochrome P450, family 11, subfamily C, polypeptide 1	10.0	6.1E-13
<i>galnt8a.2</i>	568500	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 8a, tandem duplicate 2	9.2	4.4E-21
<i>si:ch211-199m3.4</i>	557708	<i>si:ch211-199m3,4</i> , transcript variant X1	9.0	1.3E-17
<i>rad9b</i>	563903	RAD9 checkpoint clamp component B	8.6	6.5E-04
<i>zgc:195023</i>	567953	<i>zgc:195023</i>	7.9	6.2E-15

<i>nos2a</i>	404036	nitric oxide synthase 2a, inducible	7.5	1.0E-28
<i>spam1</i>	791203	sperm adhesion molecule 1	7.5	9.6E-20
<i>trnG</i>	140510	tRNA-Gly	7.5	1.9E-03
<i>amh</i>	493624	anti-Mullerian hormone	6.9	1.6E-20
<i>tnnc1a</i>	353247	troponin C type 1a (slow)	6.8	4.9E-21
<i>ugt5a1</i>	641479	UDP glucuronosyltransferase 5 family, polypeptide A1	6.1	1.9E-04
<i>LOC100007686</i>	100007686	phosphomannomutase 1-like	6.1	6.6E-06
<i>cyp46a1.2</i>	393433	cytochrome P450, family 46, subfamily A, polypeptide 1, tandem duplicate 2	6.1	6.6E-06
<i>gch1</i>	100192219	GTP cyclohydrolase 1	6.0	6.1E-06
<i>sqlea</i>	799528	squalene epoxidase a	5.9	5.2E-11
<i>upp2</i>	393113	uridine phosphorylase 2	5.9	8.1E-23
<i>pcyt1ba</i>	100001552	phosphate cytidyltransferase 1, choline, beta a	5.9	3.8E-09
<i>LOC101885031</i>	101885031	laminin subunit beta-3-like	5.8	9.2E-19
<i>pnp6</i>	402953	purine nucleoside phosphorylase 6	5.7	3.9E-07
<i>trnL1</i>	140530	tRNA-Leu	5.7	2.8E-17
<i>haao</i>	492518	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	5.5	1.3E-05
<i>itga2.2</i>	100536533	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor), tandem duplicate 2, transcript variant X2	5.4	8.0E-12
<i>miox</i>	571850	myo-inositol oxygenase	5.1	5.8E-15
<i>cldn10b</i>	100004456	claudin 10b	5.1	1.1E-14
<i>dkk1a</i>	799377	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1a	4.6	6.2E-11
<i>ca9</i>	566612	carbonic anhydrase IX, transcript variant X4	4.5	3.4E-13
<i>casp8l2</i>	557302	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase, like 2	4.5	2.6E-07
<i>si:dkey-33b17.1</i>	795595	si:dkey-33b17.1	4.5	5.5E-08
<i>inhabab</i>	553816	inhibin, beta Ab	4.3	2.4E-08
<i>ndufa4l2a</i>	100003066	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2a	4.2	9.5E-11
<i>crb3a</i>	724017	crumbs homolog 3a	3.9	6.3E-14
<i>mhc2dab</i>	30762	major histocompatibility complex class II DAB gene	3.8	1.4E-13

Tabla suplementaria 2. Top-50 de los genes más subexpresados identificados en el estudio transcriptómico de peces KO para *myoc*. Condiciones para la expresión diferencial: diferencia de expresión >2; número de lecturas >20. p-valor<0.05. FC: diferencia de expresión (*fold change*).

Símbolo gen	ID gen	Identificación	FC (KO vs WT)	P-valor
<i>plpp4</i>	100334794	phospholipid phosphatase 4	-219.7	5.1E-04
<i>grik3</i>	100334689	glutamate receptor ionotropic, kainate 3	-189.5	1.8E-04
<i>cth1</i>	30114	cysteine three histidine 1	-61.4	6.7E-49
<i>birc5b</i>	246726	baculoviral IAP repeat containing 5b	-59.6	1.9E-36
<i>cldnd</i>	335628	claudin domain containing 1a	-57.9	4.1E-08
<i>bmp15</i>	334183	bone morphogenetic protein 15	-55.4	5.5E-16
<i>hsd3b2</i>	373131	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2	-53.3	4.4E-41
<i>si:dkey-152b24.6</i>	100002310	si:dkey-152b24.6	-52.1	3.1E-16
<i>LOC100332229</i>	100332229	histone H2A, sperm-like	-51.1	7.8E-17
<i>btg4</i>	378946	B-cell translocation gene 4	-49.7	2.2E-40
<i>zgc:55413</i>	406830	zgc:55413	-49.2	1.0E-45
<i>si:ch211-286b5.4</i>	556026	si:ch211-286b5.4	-47.3	3.9E-44
<i>si:ch211-103b1.2</i>	556271	si:ch211-103b1.2	-46.6	1.9E-49
<i>tuba4l</i>	327377	tubulin, alpha 4 like	-46.6	8.7E-48
<i>retsatl</i>	677660	retinol saturase (all-trans-retinol 13,14-reductase) like	-45.9	1.2E-46
<i>hyal6</i>	791189	hyaluronoglucosaminidase 6	-45.5	5.4E-22
<i>zgc:77118</i>	405845	zgc:77118	-45.2	6.2E-43
<i>zgc:171517</i>	563255	zgc:171517	-44.7	9.9E-10
<i>cldng</i>	81586	claudin g	-43.9	7.2E-46
<i>ca15b</i>	791844	carbonic anhydrase XVb	-42.3	1.1E-43
<i>LOC103911725</i>	103911725	molybdopterin synthase catalytic subunit-like	-42.2	2.6E-15
<i>cpeb1b</i>	30702	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1b	-40.2	4.5E-14
<i>pabpc1l</i>	327625	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1-like	-38.9	9.9E-48
<i>mcm6l</i>	564982	MCM6 minichromosome maintenance deficient 6, like	-38.7	1.8E-41
<i>gtf2f2b</i>	100148942	general transcription factor IIF, polypeptide 2b	-38.7	7.0E-31
<i>zgc:66024</i>	393657	zgc:66024	-37.3	3.8E-45
<i>gdf3</i>	30125	growth differentiation factor 3	-35.1	3.7E-48
<i>ccna1</i>	404206	cyclin A1	-34.2	4.4E-45
<i>map1lc3c</i>	393268	microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma	-33.6	4.8E-44
<i>st6galnac1.2</i>	799868	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1, tandem duplicate 2	-32.9	1.4E-39
<i>nots</i>	114367	nothepsin	-32.9	8.0E-19
<i>ccnb2</i>	368316	cyclin B2	-31.7	1.3E-45
<i>si:dkey-37o8.1</i>	407641	si:dkey-37o8,1	-30.2	2.5E-42
<i>si:busm1-194e12.12</i>	368615	si:busm1-194e12.12	-30.2	1.9E-53
<i>gdf9</i>	497643	growth differentiation factor 9	-30.1	1.2E-43
<i>si:busm1-48c11.3</i>	368614	si:busm1-48c11.3	-28.3	4.2E-41

<i>mos</i>	795517	v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog	-27.9	3.2E-38
<i>pabpn1l</i>	796580	poly(A) binding protein, nuclear 1-like (cytoplasmic)	-27.5	4.4E-38
<i>polr2ea</i>	100330570	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E, a	-26.9	3.3E-32
<i>siva1</i>	571845	SIVA1, apoptosis-inducing factor	-26.7	8.1E-42
<i>mcm3l</i>	100147915	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S, cerevisiae), like	-26.2	3.3E-46
<i>polr3g</i>	449786	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G like b	-22.7	1.7E-03
<i>cyp11a1</i>	80374	cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1	-22.3	5.6E-40
<i>ccnb1</i>	562825	cyclin B1 interacting protein 1	-20.7	2.4E-04
<i>fbxo43</i>	393403	F-box protein 43	-18.8	1.3E-40
<i>wee2</i>	327471	WEE1 homolog 2 (S, pombe)	-17.9	4.2E-41
<i>rdh10b</i>	378722	retinol dehydrogenase 10b	-17.0	1.6E-13
<i>tph1a</i>	352943	tryptophan hydroxylase 1 (tryptophan 5-monooxygenase) a	-15.7	4.4E-20
<i>st6gal1</i>	445376	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1	-13.0	1.0E-10
<i>rag1</i>	30663	recombination activating gene 1	-8.1	1.1E-26

Tabla suplementaria 3. Análisis ontológico realizado con *ShinyGO* de los 50 genes más sobreexpresados en el análisis transcriptómico en los KO para *myoc*. P-valor <0.05

N	High level GO category	Genes
13	Biosynthetic processes	<i>nos2a, cthl, cyp11c1, gch1, sqlea, hsd17b7, galnt8a,2, ak7b, upp2, pcyt1ba, eno4, haao, cremb</i>
7	Developmental processes	<i>sycp3, inhbab, dkk1a, amh, tnnc1a, ddc, crb3a</i>
7	Development of anatomical structure	<i>sycp3, inhbab, dkk1a, amh, tnnc1a, ddc, crb3a</i>
7	Regulation of molecular function	<i>nos2a, miox, casp8l2, dkk1a, amh, inhbab, zgc:195023, hamp</i>
6	Catabolic processes	<i>Nos2a, miox, cyp46a1,2, upp2, eno4, haao</i>
5	Stress response	<i>lrgl1, rad9b, nos2a, hamp, dkk1a</i>
5	Regulation of signalling	<i>dkk1a, inhbab, amh, zgc:195023, hamp</i>
5	Response to chemicals	<i>nos2a, cyp11c1, sult2st3, gstk4, hamp</i>
5	Regulation of response to stimuli	<i>dkk1a, inhbab, amh, zgc:195023, hamp</i>
5	Multi-organic process	<i>sycp3, nos2a, hamp, amh, irg1l</i>
5	Regulation of biological quality	<i>nos2a, cyp11c1, amh, zgc:195023, hamp</i>
4	System processes	<i>tnnc1a, nos2a, amh, zgc:195023</i>
4	Response to endogenous stimuli	<i>nos2a, cyp11c1, sult2st3, hamp</i>
4	Regulation of metabolic processes	<i>inhbab, nos2a, casp8l2, cremb</i>
3	Response to external stimuli	<i>nos2a, hamp, irg1l</i>
3	Response to biotic stimuli	<i>nos2a, hamp, irg1l</i>

3	Organisation of cellular components	<i>tuba7l, smc1b, crb3a</i>
3	Positive regulation of biological processes	<i>inhbab, nos2a, casp8l2</i>
3	Negative regulation of biological processes	<i>dkk1a, rad9b, amh</i>
3	Localisation	<i>soat2, amh, ndufa4l2a</i>
3	Establishment of localisation	<i>soat2, amh, ndufa4l2a</i>
3	Response to other organisms	<i>nos2a, hamp, irg1l</i>
3	Organisation or biogenesis of cellular components	<i>tuba7l, smc1b, crb3a</i>
2	Reproduction	<i>sycp3, amh</i>
2	Immune system processes	<i>mhc2dab, si:busm1-194E12,8</i>
2	Developmental processes involved in reproduction	<i>sycp3, amh</i>
2	Immune response	<i>mhc2dab, si:busm1-194E12,8</i>
2	Antigen processing	<i>mhc2dab, si:busm1-194E12,8</i>
2	Sexual reproduction	<i>sycp3, amh</i>
2	Reproductive processes	<i>sycp3, amh</i>
2	Reproduction of multicellular organisms	<i>sycp3, amh</i>
2	Localisation of macromolecules	<i>sycp3, amh</i>
2	Reproductive processes of multiple organisms	<i>sycp3, amh</i>
2	Reproductive processes of multicellular organisms	<i>sycp3, amh</i>
2	Regulation of processes of multicellular organisms	<i>sycp3, amh</i>

Tabla suplementaria 4. Análisis ontológico realizado con ShinyGO de los 50 genes más subexpresados en el análisis transcriptómico de los KO para *myoc*. P-valor <0.05

N	High level GO category	Genes
17	Biosynthetic processes	<i>cyp11a1, gdf9, gtf2f2b, cpeb1b, hsd3b2, bmp15, gdf3, cth1, si:dkey-37o8,1, zgc:171517, rdh10b, polr3g, tph1a, mcm6l, mcm3l, st6galnac1,2, st6gal1</i>
12	Positive regulation of biological processes	<i>gdf9, gtf2f2b, ccnb2, bmp15, gdf3, ccna1, ccnb1, cth1, mos, cyp11a1, birc15b, cpeb1b</i>
11	Organisation of cellular components	<i>wee2, ccnb2, ccna1, ccnb1, birc5b, mos, tuba4l, map1lc3c, fbxo43, mcm6l, cyp11a1</i>
11	Organisation or biogenesis of cellular components	<i>wee2, ccnb2, ccna1, ccnb1, birc5b, mos, tuba4l, map1lc3c, fbxo43, mcm6l, cyp11a1</i>
10	Regulation of metabolic processes	<i>gdf9, gtf2f2b, cpeb1b, ccnb2, bmp15, gdf3, ccna1, ccnb1, cth1, mos</i>
9	Developmental processes	<i>gdf9, bmp15, gdf3, ccnb1, rag1, tph1a, cyp11a1, hsd3b2, birc5b</i>
9	Regulation of anatomical structures	<i>gdf9, bmp15, gdf3, ccnb1, rag1, tph1a, cyp11a1, hsd3b2, birc5b</i>
8	Reproduction	<i>wee2, mos, fbxo43, bmp15, ccnb1, ca15b, gdf9, birc5b</i>
8	Reproductive processes	<i>wee2, mos, fbxo43, bmp15, ccnb1, ca15b, gdf9, birc5b</i>
8	Negative regulation of biological processes	<i>cpeb1b, wee2, btg4, cth1, mos, fbxo43, bmp15, birc5b</i>
7	Cell cycle processes	<i>wee2, ccnb2, ccna1, ccnb1, birc5b, mos, fbxo43</i>

7	Regulation of molecular function	<i>ccnb2, ccna1, ccnb1, gdf9, bmp15, gdf3, pabpn1l</i>
5	Response to endogenous stimuli	<i>cyp11a1, gdf9, bmp15, gdf3, cpeb1b</i>
5	Response to chemicals	<i>cyp11a1, gdf9, bmp15, gdf3, cpeb1b</i>
5	Regulation of biological quality	<i>cyp11a1, cth1, rdh10b, tph1a, ca15b</i>
4	Cell proliferation	<i>btg4, ccnb2, ccna1, ccnb1</i>
4	Catabolic processes	<i>cth1, zgc:171517, nots, map1lc3c</i>
4	Morphogenesis of anatomical structure	<i>gdf3, cyp11a1, hsd3b2, birc5b</i>
4	Sexual reproduction	<i>bmp15, ccnb1, ca15b, birc5b</i>
4	Regulation of signalling	<i>gdf9, bmp15, gdf3, mos</i>
4	Multicellular organism reproduction	<i>bmp15, ccnb1, ca15b, birc5b</i>
4	Multi-organism reproductive process	<i>bmp15, ccnb1, ca15b, birc5b</i>
4	Regulation of response to stimuli	<i>gdf9, bmp15, gdf3, mos</i>
4	Multicellular organism reproduction process	<i>bmp15, ccnb1, ca15b, birc5b</i>
4	Regulation of developmental processes	<i>tph1a, bmp15, gdf3, bircb5</i>
4	Regulation of multicellular organism processes	<i>tph1a, bmp15, gdf3, bircb5</i>
4	Multi-organism process	<i>bmp15, ccnb1, ca15b, birc5b</i>
4	Meiotic cell cycle process	<i>wee2, mos, fbxo43, birc5b</i>
4	Regulation of reproductive processes	<i>wee2, mos, fbxo43, bmp15</i>
3	Developmental processes involved in reproduction	<i>bmp15, map1lc3c, cyp11a1</i>
3	Cellular component of biogenesis	<i>birc5b, map1lc3c, cyp11a1</i>
2	Immune system processes	<i>rag1, tph1a</i>
2	Development of the immune system	<i>rag1, tph1a</i>
2	Stress response	<i>map1lc3c, cpeb1b</i>
2	Cell adhesion	<i>cldng, cldnd</i>
2	Biological adhesion	<i>cldng, cldnd</i>
2	Hormonal metabolic processes	<i>cyp11a1, rdh10b</i>
2	Formation of anatomical structures involved in morphogenesis	<i>gdf3, birc5b</i>
2	Localisation	<i>ca15b, birc5b</i>

Tabla suplementaria 5. Confirmación por qRT-PCR de los genes seleccionados en el estudio transcriptómico de peces KO para el gen *myoc*. FC: diferencia de expresión.

Gen	ID gen	Transcriptoma		qRT-PCR	
		FC	p-valor	FC	p-valor
<i>tuba7l</i>	431777	49.9	7.2E-25	12.9	7.2E-25
<i>irg1l</i>	562007	35.4	1.5E-23	16.0	1.5E-23
<i>sycp3</i>	678602	12.1	2.6E-21	10.9	2.6E-21
<i>stAR</i>	63999	11.6	3.9E-06	4.6	3.9E-06
<i>amh</i>	493624	6.9	1.6E-20	4.1	1.6E-20
<i>dmrt1</i>	402923	6.6	2.2E-09	15.9	2.2E-09
<i>dkk1a</i>	799377	4.6	6.2E-11	3.8	6.2E-11

<i>plpp4</i>	100334794	-219.7	5.1E-04	-10.8	5.1E-04
<i>grik3</i>	100334689	-189.5	1.8E-04	2.8	1.8E-04
<i>cyp11a1</i>	80374	-7.00	2.3E-04	-25.6	2.3E-04
<i>lef1</i>	30701	-5.1	1.7E-06	-10.6	1.7E-06
<i>ctnnbip1</i>	58117	-3.6	1.3E-12	-5.6	1.3E-12
<i>dvl3a</i>	80972	-2.6	8.3E-06	-2.4	8.3E-06

Tabla suplementaria 6. Cincuenta genes más sobreexpresados en las muestras de ojos con alteraciones de peces macho transgénicos para el gen *myoc* identificados en el estudio transcriptómico. FC: diferencia de expresión (*fold change*). Condiciones para la expresión diferencial: diferencia de expresión >2; número de lecturas >20. p-valor<0.05. Tg: transgénico; +/-: silvestre.

Símbolo gen	ID gen	Identificación	FC (Tg/+ vs. +/-)	P-valor
<i>Ccdc24</i>	541495	coiled-coil domain containing 24	54.1	4.9E-08
<i>angptl3</i>	010817	angiopoietin-like3	28.6	4.7E-07
<i>col7a1l</i>	559516	collagen type VII alpha 1-like	28.5	2.4E-11
<i>tnni2a.4</i>	494164	troponin I type 2a (skeletal, fast), tandem duplicate 4	26.5	3.9E-05
<i>pvalb2</i>	58028	parvalbumin 2	24.6	5.9E-09
<i>fj08f03</i>	030131	si:ch211-153b23.4	23.9	2.4E-16
<i>pvalb1</i>	402805	parvalbumin 1	21.3	3.0E-10
<i>ptk2ba</i>	768185	protein tyrosine kinase 2 beta, a, transcript variant X2	17.6	6.1E-06
<i>snx19a</i>	550357	sorting nexin 19a	17.2	9.9E-05
<i>zgc:112332</i>	678602	zgc:112332	16.6	7.8E-11
<i>tpma</i>	445049	alpha-tropomyosin	16.5	1.7E-06
<i>irg1l</i>	100004274	immunoresponsive gene 1, like	15.3	1.1E-09
<i>rnh1</i>	569436	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	13.6	3.3E-09
<i>zgc:172122</i>	571844	zgc:172122	13.1	2.1E-12
<i>mylpfb</i>	447930	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle b	12.9	1.7E-05
<i>cyp39a1</i>	564475	cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1	12.7	3.9E-05
<i>Cb252</i>	565454	si:ch211-153b23.5	12.5	6.2E-21
<i>chchd3b</i>	325751	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3b	11.5	8.2E-04
<i>myhz1.2</i>	799300	myosin, heavy polypeptide 1.2, skeletal muscle	10.8	5.9E-07
<i>crygm2d17</i>	561929	crystallin, gamma M2d17	10.6	2.3E-04
<i>crygm2d20</i>	100000175	crystallin, gamma M2d20	10.2	2.4E-05
<i>crygm2d16</i>	798701	crystallin, gamma M2d16	10.1	4.9E-15
<i>gtf3c3</i>	553318	general transcription factor IIIc, polypeptide 3	9.7	3.0E-17
<i>si:ch211-202m22.1</i>	100536303	si:ch211-202m22.1	8.9	1.4E-05
<i>spice1</i>	494093	spindle and centriole associated protein 1	8.6	2.8E-03
<i>nos2b</i>	563654	nitric oxide synthase 2b, inducible	8.5	4.3E-06

<i>col28a1a</i>	555428	collagen, type XXVIII, alpha 1a	8.2	1.2E-16
<i>tncn2</i>	58082	troponin C type 2 (fast)	8.1	5.7E-25
<i>smyhc1</i>	321552	slow myosin heavy chain 1	7.9	3.4E-16
<i>tmem56b</i>	449652	transmembrane protein 56b	7.9	4.4E-11
<i>myl10</i>	550569	myosin, light chain 10, regulatory	7.8	2.8E-13
<i>myhz1.3</i>	100008070	ns:zf-e68	7.6	1.4E-08
<i>synpo</i>	100536545	synaptopodin, transcript variant X2	7.3	5.1E-50
<i>si:ch211-103a14.5</i>	100330921	si:ch211-103a14.5	7.2	7.6E-06
<i>dc2c2b</i>	563259	doublecortin domain containing 2B	7.0	7.2E-10
<i>qpct</i>	795685	glutaminyl-peptide cyclotransferase	6.9	2.9E-04
<i>myl1</i>	336165	myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast	6.8	4.7E-08
<i>card9</i>	796425	caspase recruitment domain family, member 9	6.8	1.5E-16
<i>ccdc180</i>	100538012	coiled-coil domain containing 180, transcript variant X3	6.6	9.9E-06
<i>gnb1l</i>	541381	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1-like	6.5	3.5E-07
<i>spag9a</i>	558833	sperm associated antigen 9a	6.5	5.2E-11
<i>elapor1</i>	449761	si:ch211-163l21.8	6.4	6.1E-06
<i>actc1b</i>	58114	actin, alpha, cardiac muscle 1b	6.4	6.3E-08
<i>si:ch211-256m1.8</i>	795494	si:ch211-256m1.8	6.3	1.6E-07
<i>cfap70</i>	564542	si:dkey-254e1.1	6.3	8.3E-08
<i>ccdc15</i>	100333818	coiled-coil domain containing 15	6.2	2.3E-05
<i>crygm2d3</i>	790908	crystallin, gamma M2d3	6.1	8.2E-05
<i>cb252</i>	321177	si:ch211-153b23.5	6.1	4.1E-05
<i>ptprbl</i>	100333658	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B, like	6.1	4.8E-09
<i>cyp11c1</i>	791124	cytochrome P450, family 11, subfamily C, polypeptide 1	6.1	4.5E-05

Tabla suplementaria 7. Cincuenta genes más subexpresados identificados en los ojos con alteraciones de peces macho transgénicos para el gen *myoc* en el estudio transcriptómico. FC: diferencia de expresión (*fold change*). Condiciones para la expresión diferencial: diferencia de expresión >2; número de lecturas >20. p-valor<0.05. Tg: transgénico; +/-: silvestre.

Símbolo gen	ID gen	Identificación	FC (Tg/+ vs +/-)	P-valor
<i>crybgx</i>	553474	cristalina beta gamma X	-217.3	1.5E-50
<i>bfs2</i>	494090	beaded filament structural protein 2, phakinin	-206.4	6.1E-56
<i>lenep</i>	100002665	lens epithelial protein	-153.8	1.8E-49
<i>crygm5</i>	474328	cristalina, gamma M5	-130.3	1.2E-31
<i>crygm2c</i>	493628	cristalina, gamma M2c	-109.0	5.2E-22
<i>crygm7</i>	553967	cristalina, gamma M7	-104.3	3.7E-19
<i>clic5b</i>	405833	chloride intracellular channel 5b	-95.0	1.1E-06
<i>lctlb</i>	564250	lactase-like b	-71.8	5.9E-10
<i>lctla</i>	437008	lactase-like a	-59.6	4.4E-10
<i>zgc:153704</i>	767759	zgc:153704	-48.4	4.1E-06
<i>ggctb</i>	406278	gamma-glutamylcyclotransferase b	-45.2	5.0E-99
<i>lrrc20</i>	492485	leucine rich repeat containing 20	-41.2	2.2E-82
<i>tgm1l2</i>	793096	transglutaminase 1 like 2	-41.1	2.8E-06
<i>mipa</i>	445140	major intrinsic protein of lens fiber a	-39.7	5.4E-90

Anexo I. Resultados suplementarios

<i>si:ch73-335l21.1</i>	794738	si:ch73-335l21.1, transcript variant X3	-38.9	8.1E-79
<i>zgc:112285</i>	561476	<i>zgc:112285</i>	-31.6	1.6E-72
<i>crybb1l3</i>	566891	cristalina, beta B1, like 3	-30.2	7.7E-73
<i>pah</i>	378962	phenylalanine hydroxylase	-29.5	4.6E-21
<i>LOC101884821</i>	101884821	desmoplakin-like	-28.5	1.2E-43
<i>ddx19a</i>	563448	<i>zgc:193690</i>	-27.7	1.9E-42
<i>lim2.2</i>	572341	lens intrinsic membrane protein 2.2	-26.0	1.5E-63
<i>fabp11a</i>	447944	fatty acid binding protein 11a	-25.4	5.9E-66
<i>tspan33b</i>	567512	tetraspanin 33b	-24.6	6.9E-63
<i>sprn2</i>	100006310	shadow of prion protein 2	-24.0	2.7E-43
<i>cryba1a</i>	436683	crystallin, beta A1a	-23.6	1.4E-60
<i>ppt2a.3</i>	406830	<i>zgc:55413</i>	-23.1	1.5E-32
<i>jac8</i>	796228	jacalin 8	-22.5	8.5E-59
<i>fosb</i>	492346	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	-22.4	5.1E-65
<i>si:ch211-14c7.2</i>	571950	si:ch211-14c7.2, transcript variant X11	-19.7	2.1E-63
<i>lim2.1</i>	573354	lens intrinsic membrane protein 2.1	-19.4	3.8E-61
<i>jdp2b</i>	436766	Jun dimerization protein 2b	-19.2	4.1E-50
<i>zgc:153031</i>	557552	<i>zgc:153031</i>	-19.1	7.9E-49
<i>lim2.3</i>	436860	lens intrinsic membrane protein 2.3	-17.9	5.8E-51
<i>mctp2b</i>	562526	multiple C2 domains, transmembrane 2b, transcript variant X2	-17.3	3.6E-45
<i>crybb1</i>	114418	cristalina, beta B1	-17.1	6.4E-50
<i>serpinb1</i>	436926	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	-17.0	2.6E-50
<i>crybb1l1</i>	553473	cristalina, beta B1, like 1	-16.9	2.9E-53
<i>si:ch211-69b7.6</i>	556640	si:ch211-69b7.6	-16.3	3.9E-46
<i>lim2.5</i>	541395	proteína intrínseca de la membrana del cristalino 2.5	-16.2	6.1E-51
<i>dsc2l</i>	560091	desmocollin 2 like	-16.0	1.6E-29
<i>myocd</i>	100331725	miocardina, variante de transcripción X4	-15.9	3.2E-39
<i>fam234a</i>	796439	family with sequence similarity 234, member A, transcript variant X1	-14.9	1.1E-52
<i>LOC101883471</i>	101883471	specifically androgen-regulated gene protein-like	-14.8	1.2E-24
<i>havcr2</i>	100536120	receptor celular 2 del virus de la hepatitis A, variante de transcripción X2	-14.6	7.2E-29
<i>tuft1b</i>	100005886	tuftelina 1b	-14.3	2.4E-26
<i>fbxl16</i>	797939	F-box and leucine-rich repeat protein 16	-13.4	2.3E-35
<i>cmtm4</i>	436765	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4	-13.3	1.6E-24
<i>pcdh20</i>	100007362	protocadherina 20	-13.2	1.7E-22
<i>jcada</i>	100001168	junctional cadherin 5 associated a, transcript variant X1	-13.1	1.4E-54
<i>capn12</i>	799247	calpaína 12	-12.4	6.9E-38

Tabla suplementaria 8. Análisis de enriquecimiento ontológico (GO) de los 50 genes más y menos expresados en el estudio transcriptómico. El análisis se llevó a cabo mediante la plataforma de software basada en la web *Epistemic artificial intelligence*. B: BioPlanet 2019; EPC: Elsevier Pathway Collection; FDR: tasa de falso descubrimiento. KEGG; Enciclopedia de genes y genomas de Kioto; Overlap count: número de genes cargados que pertenecen a los diferentes grupos funcionales. Gene set count: número total de genes en el grupo funcional.

Functional group	Database	Overlap count	Gene set count	FDR adjust. p-value	Mapped gene symbols	Uploaded genes
Proteins Involved in cataract	EPC	12	94	3,9E+04	<i>BFSP2, CRYBA1, CRYBB1, CRYBB2, CRYBB3, CRYGB, CRYGC, CRYGD, FOSB, IRS1, LIM2, MIP</i>	<i>bfsp2, cryba1a, crybb1, crybb1l1, crybb1l3, crygm2c, crygm2d16, crygm2d17, crygm2d20, crygm2d3, crygm5, crygm7, fosb, lim2.1, lim2.3, lim2.5, mipa, si:ch73-335l21.1</i>
Cataract Congenital	EPC	8	19	3,9E+04	<i>BFSP2, CRYBB1, CRYBB2, CRYGB, CRYGC, CRYGD, LIM2, MIP</i>	<i>bfsp2, crybb1, crybb1l1, crybb1l3, crygm2c, crygm2d16, crygm2d17, crygm2d20, crygm2d3, crygm5, crygm7, lim2.1, lim2.3, lim2.5, mipa</i>
Genes With Mutations Associated with Cataract	EPC	8	21	3,9E+04	<i>BFSP2, CRYBB1, CRYBB2, CRYBB3, CRYGC, CRYGD, LIM2, MIP</i>	<i>bfsp2, crybb1, crybb1l1, crybb1l3, crygm2c, crygm2d16, crygm2d17, crygm2d20, crygm2d3, crygm5, crygm7, lim2.1, lim2.3, lim2.5, mipa</i>
Striated Muscle Contraction	B	6	38	2,8E+08	<i>ACTC1, MYL1, TNNC2, TNNI2, TPM1, TPM3</i>	<i>actc1b, myl1, tnnc2, tnni2a.4, tpma</i>

Anexo I. Resultados suplementarios

Muscle Contraction	B	5	49	2,6E+11	<i>MYL1, TNNC2, TNNI2, TPM1, TPM3</i>	<i>myl1, tnnc2, tnni2a.4, tpma</i>
Steroids Induced Cataract	EPC	5	59	2,4E-04	<i>BFSP2, CRYBB2, CRYGD, IRS1, MIP</i>	<i>bfsp2, crybb1l3, crygm2c, crygm2d16, crygm2d17, crygm2d20, crygm2d3, crygm5, crygm7, mipa, si:ch73-335l21.1</i>
Hypertrophic Cardiomyopathy	EPC	5	88	1,4E-03	<i>ACTC1, IRS1, MYH7, PTK2B, TPM1</i>	<i>actc1b, ptk2ba, si:ch73-335l21.1, smyhc1, tpma</i>
Integrins in Angiogenesis	B	4	74	2,6E-03	<i>ANGPTL3, COL7A1, IRS1, PTK2B</i>	<i>angptl3, col7a1l, ptk2ba, si:ch73-335l21.1</i>
Cardiac Muscle Contraction	B	4	83	3,0E-03	<i>ACTC1, MYH7, TPM1, TPM3</i>	<i>actc1b, smyhc1, tpma</i>
Dilated Cardiomyopathy	B	4	100	4,9E-03	<i>ACTC1, MYH7, TPM1, TPM3</i>	<i>actc1b, smyhc1, tpma</i>
Tight Junction	B	4	133	1,0E-02	<i>MYH4, MYH7, MYL10, MYLPF</i>	<i>myhz1.2, myhz1.3, myl10, mylpfb, smyhc1</i>
Diabetes Induced Cataract	EPC	4	18	4,5E+11	<i>CRYGB, CRYGC, CRYGD, MIP</i>	<i>crygm2c, crygm2d16, crygm2d17, crygm2d20, crygm2d3, crygm5, crygm7, mipa</i>
Age-Related Cataract	EPC	4	23	1,0E-04	<i>CRYGB, CRYGC, CRYGD, MIP</i>	<i>crygm2c, crygm2d16, crygm2d17, crygm2d20, crygm2d3, crygm5, crygm7, mipa</i>
Proteins Involved in Hypertrophic Cardiomyopathy	EPC	4	65	2,8E-03	<i>ACTC1, FOSB, MYH7, TPM1</i>	<i>actc1b, fosb, smyhc1, tpma</i>
Dilated Cardiomyopathy	EPC	4	69	3,1E-03	<i>ACTC1, IRS1, MYH7, TPM1</i>	<i>actc1b, si:ch73-335l21.1, smyhc1, tpma</i>
Proteins Involved in Dilated Cardiomyopathy	EPC	4	166	3,6E-02	<i>ACTC1, MYH7, MYOCD, TPM1</i>	<i>actc1b, myocd, smyhc1, tpma</i>
Cardiac Muscle Contraction	KEGG	4	78	1,4E-03	<i>ACTC1, MYH7, TPM1, TPM3</i>	<i>actc1b, smyhc1, tpma</i>
Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM)	KEGG	4	83	1,4E-03	<i>ACTC1, MYH7, TPM1, TPM3</i>	<i>actc1b, smyhc1, tpma</i>

Dilated Cardiomyopathy	KEGG	4	89	1,4E-03	<i>ACTC1, MYH7, TPM1, TPM3</i>	<i>actc1b, smyhc1, tpma</i>
Adrenergic Signaling in Cardiomyocytes	KEGG	4	144	5,1E-03	<i>ACTC1, MYH7, TPM1, TPM3</i>	<i>actc1b, smyhc1, tpma</i>
Leukocyte Transendothelial Migration	B	3	117	3,5E-02	<i>MYL10, MYLPF, PTK2B</i>	<i>myl10, mylpfb, ptk2ba</i>
Oxygen Shortage in Myocardial Ischemia	EPC	3	20	1,4E-03	<i>ACTC1, MYH7, TPM1</i>	<i>actc1b, smyhc1, tpma</i>
Sarcomere in Cardiomyocyte in Dilated Cardiomyopathy	EPC	3	25	2,4E-03	<i>ACTC1, MYH7, TPM1</i>	<i>actc1b, smyhc1, tpma</i>
Ca ²⁺ Toxicity in Lens Cells	EPC	3	27	2,7E-03	<i>CRYGB, CRYGC, CRYGD</i>	<i>crygm2c crygm2d16, crygm2d17, crygm2d20, crygm2d3, crygm5, crygm7</i>
Sarcomere Disorganization and Intracellular Calcium Overload	EPC	3	29	2,8E-03	<i>ACTC1, MYH7, TPM1</i>	<i>actc1b, smyhc1, tpma</i>
TRPM4/6/7/8 Signaling in Arterial Hypertension (Hypothesis)	EPC	3	39	5,8E-03	<i>MYOCD, PTK2B, TPM1</i>	<i>myocd, ptk2ba, tpma</i>
Cardiomyocyte Dysfunction	EPC	3	48	9,8E-03	<i>ACTC1, MYH7, TPM1</i>	<i>actc1b, smyhc1, tpma</i>
Cardiomyocyte Hypertrophy	EPC	3	65	1,8E-02	<i>IRS1, MYH7, PTK2B</i>	<i>ptk2ba, si:ch73-335l21.1, smyhc1</i>
Leukocyte Transendothelial Migration	KEGG	3	114	1,5E-02	<i>MYL10, MYLPF, PTK2B</i>	<i>myl10, mylpfb, ptk2ba</i>
Cytochrome P450 Metabolism of Endogenous Sterols	B	2	15	9,6E-03	<i>CYP11B1, CYP39A1</i>	<i>cyp11c1, cyp39a1</i>
Smooth Muscle Contraction	B	2	22	1,4E-02	<i>TPM1, TPM3</i>	<i>tpma</i>
Visual Signal Transduction: Cones	B	2	23	1,4E-02	<i>LOC118142757, RDH12</i>	<i>si:ch211-103a14.5, zgc:112332</i>
Visual Signal Transduction: Rods	B	2	23	1,4E-02	<i>LOC118142757, RDH12</i>	<i>si:ch211-103a14.5, zgc:112332</i>
Steroid Hormone Vitamin A and Vitamin D Metabolism	B	2	36	3,0E-02	<i>CYP11B1, RDH11</i>	<i>cyp11c1, zgc:112332</i>
Rod Visual Cycle Impairment in Retinitis Pigmentosa	EPC	2	16	1,1E-02	<i>RDH11, RDH12</i>	<i>zgc:112332, zgc:112332</i>

Anexo I. Resultados suplementarios

Visual Cycle in Retinal Rods	EPC	2	16	1,1E-02	<i>RDH11, RDH12</i>	<i>zgc:112332, zgc:112332</i>
NTRK1/2/3 -> Acetylcholine Production	EPC	2	17	1,2E-02	<i>IRS1, PTK2B</i>	<i>ptk2ba, si:ch73-335 21.1</i>
Microglia and Motor Neuron Interaction Dysregulation	EPC	2	26	2,5E-02	<i>CD200, PTK2B</i>	<i>ptk2ba, zgc:172122</i>
Aldosterone Synthesis Chronic Regulation	EPC	2	31	3,1E-02	<i>CYP11B1, PTK2B</i>	<i>cyp11c1, ptk2ba</i>
Estrogens/Esr1 Non-Genomic Signaling	EPC	2	32	3,1E-02	<i>IRS1, PTK2B</i>	<i>ptk2ba, si:ch73-335 21.1</i>
IGF1R -> MEF/MYOD/MYOG Signaling	EPC	2	32	3,1E-02	<i>IRS1, PTK2B</i>	<i>ptk2ba, si:ch73-335 21.1</i>
Vitamin a (Retinol) Metabolism and Visual Cycle	EPC	2	32	3,1E-02	<i>RDH11, RDH12</i>	<i>zgc:112332, zgc:112332</i>
Folate Biosynthesis	KEGG	2	15	5,1E-03	<i>DHFR, DHFR2</i>	<i>zgc:153031, zgc:153031</i>
One Carbon Pool by Folate	KEGG	2	20	6,1E-03	<i>DHFR, DHFR2</i>	<i>zgc:153031, zgc:153031</i>
Antifolate Resistance	KEGG	2	31	1,2E-02	<i>DHFR, DHFR2</i>	<i>zgc:153031, zgc:153031</i>
Retinol Metabolism	KEGG	2	65	4,0E-02	<i>RDH11, RDH12</i>	<i>zgc:112332, zgc:112332</i>

Tabla suplementaria 9. Análisis ontológico de los 50 genes más sobreexpresados y subexpresados en los peces transgénicos de *myoc* con alteraciones oculares en el estudio transcriptómico. El análisis se llevó a cabo mediante la plataforma de software basada en la web ShinyGO. P <0,05

N	High level GO category	Genes
12/98	Lens development in camera-type eye	<i>crybb1l1, crybgx, crygm7, cryba1a, crygm5, crybb1, crygm2d17, crygm2d16, crygm2d3, crygm2d20, crygm2c, mipa</i>
12/187	Visual perception	<i>crybb1l1, crybgx, crygm7, cryba1a, crygm5, crybb1, crygm2d17, crygm2d16, crygm2d3, crygm2d20, crygm2c, si:ch211-103a14.5</i>
12/195	Sensory perception of light stimulus	<i>crybb1l1, crybgx, crygm7, cryba1a, crygm5, crybb1, crygm2d17, crygm2d16, crygm2d3, crygm2d20, crygm2c, si:ch211-103a14.5</i>
13/361	Eye development	<i>crybb1l1, crybgx, crygm7, cryba1a, crygm5, crybb1, crygm2d17, crygm2d16, crygm2d3, crygm2d20 crygm2c, mipa, fabp11a</i>
13/361	Visual system development	<i>crybb1l1, crybgx, crygm7, cryba1a, crygm5, crybb1 crygm2d17, crygm2d16, crygm2d3, crygm2d20 crygm2c, mipa, fabp11a</i>
12/309	Camera-type eye development	<i>crybb1l1, crybgx, crygm7, cryba1a, crygm5, crybb1 crygm2d17, crygm2d16, crygm2d3, crygm2d20 crygm2c, mipa</i>
13/411	Sensory perception	<i>crybb1l1, crybgx, crygm7, cryba1a, crygm5, crybb1 crygm2d17, crygm2d16, crygm2d3, crygm2d20 crygm2c, clic5b, si:ch211-103a14.5</i>
13/437	Sensory system development	<i>crybb1l1, crybgx, crygm7, cryba1a, crygm5, crybb1 crygm2d17, crygm2d16, crygm2d3, crygm2d20 crygm2c, mipa, fabp11a</i>
13/484	Sensory organ development	<i>crybb1l1, crybgx, crygm7, cryba1a, crygm5, crybb1 crygm2d17, crygm2d16, crygm2d3, crygm2d20 crygm2c, mipa, fabp11a</i>
16/885	System process	<i>crybb1l1, tnni2a.4, crybgx, crygm7, cryba1a, crygm5, crybb1, crygm2d17, tnnc2, crygm2d16 crygm2d3, crygm2d20, crygm2c, clic5b si:ch211-103a14.5, smyhc1</i>
13/559	Nervous system process	<i>crybb1l1, crybgx, crygm7, cryba1a, crygm5, crybb1 crygm2d17, crygm2d16, crygm2d3, crygm2d20 crygm2c, clic5b, si:ch211-103a14.5</i>
3/26	Skeletal muscle contraction	<i>tnni2a.4, tnnc2, smyhc1</i>
3/27	Multicellular organismal movement	<i>tnni2a.4, tnnc2, smyhc1</i>
3/27	Musculoskeletal movement	<i>tnni2a.4, tnnc2, smyhc1</i>
15/1872	Animal organ development	<i>crybb1l1, crybgx, crygm7, cryba1a, crygm5, crybb1 crygm2d17, crygm2d16, crygm2d3, crygm2d20 crygm2c, ptk2ba, mipa, capn12, fabp11a</i>
3/54	Striated muscle contraction	<i>tnni2a.4, tnnc2, smyhc1</i>
22/4051	Multicellular organismal process	<i>crybb1l1, ptk2ba, tnni2a.4, crybgx, crygm7, cryba1a crygm5, crybb1, crygm2d17, tnnc2, crygm2d16 crygm2d3, jcada, crygm2d20, crygm2c, clic5b, lenep si:ch211-103a14.5, mipa, smyhc1, capn12, fabp11a</i>

Tabla suplementaria 10. Cincuenta genes más sobreexpresados en los ojos con fenotipo silvestre del pez cebra transgénico para el gen *myoc* identificados por el estudio transcriptómico. Condiciones para la expresión diferencial: diferencia de expresión >2; número de lecturas >20. Valor $p < 0,05$. Tg: transgénico; WTL: fenotipo silvestre; +/-: silvestre.

Símbolo gen	ID gen	Identificación	Diferencia de expresión (Tg/+ WTL vs +/-)	P-valor
<i>nefmb</i>	100033387	neurofilament medium polypeptide b	143.2	1.7E-28
<i>ociad2</i>	559516	collagen type VII alpha 1-like	124.7	4.7E-07
<i>apoea</i>	553587	apolipoprotein Ea	88.9	1.6E-18
<i>chia.2</i>	406338	chitinase acidic.2	83.9	1.1E-15
<i>fabp1b.1</i>	554095	fatty acid binding protein 1b tandem duplicate 1	62.6	2.0E-21
<i>apoa4b.1</i>	322543	apolipoprotein A-IV b tandem duplicate 1	58.1	4.5E-24
<i>apoa1a</i>	30355	apolipoprotein A-Ia	43.6	6.4E-43
<i>afp4</i>	568707	antifreeze protein type IV	42.6	9.8E-29
<i>apoc2</i>	568972	apolipoprotein C-II	39.6	1.5E-10
<i>fabp2</i>	30708	fatty acid binding protein 2 intestinal	38.6	4.8E-24
<i>apobb.1</i>	321166	apolipoprotein Bb tandem duplicate 1	37.7	1.6E-18
<i>s100a10a</i>	449788	S100 calcium binding protein A10a	35.1	1.6E-20
<i>lgals2b</i>	393486	lectin galactoside-binding soluble 2b	34.5	1.6E-17
<i>pck1</i>	378727	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	34.2	2.2E-24
<i>rbp2a</i>	568032	retinol binding protein 2a cellular	29.2	1.1E-26
<i>anxa2b</i>	799806	annexin A2b	28.6	1.4E-28
<i>ociad2</i>	558261	OCIA domain containing 2	24.6	1.6E-48
<i>cd36</i>	436636	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	24.5	4.2E-22
<i>si:dkeyp-73b11.8</i>	100333708	si:dkeyp-73b11.8	24.0	8.8E-12
<i>si:ch211-196f2.3</i>	566363	si:ch211-196f2.3	20.3	2.9E-24
<i>tm4sf21b</i>	563398	zgc:172079	19.4	5.8E-30
<i>cox6a2</i>	447942	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2	17.1	2.8E-24
<i>gpr39</i>	791773	G protein-coupled receptor 39	17.1	1.8E-31
<i>cldn15la</i>	81591	claudin 15-like a	16.3	2.4E-42
<i>si:dkey-219e21.2</i>	797371	si:dkey-219e21.2 transcript variant X1	15.8	1.1E-14
<i>zgc:158846</i>	100009654	zgc:158846	13.9	3.8E-29
<i>rnh1</i>	569436	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	12.8	1.2E-12
<i>krt92</i>	550522	keratin 92	12.4	2.4E-32
<i>ccna1</i>	404206	cyclin A1	12.1	8.1E-18
<i>ace</i>	565980	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	11.8	7.7E-08
<i>cldnc</i>	81582	claudin c	11.2	4.9E-20

<i>slc2a9l2</i>	798023	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 9-like 2	11.0	2.7E-16
<i>esm1</i>	767774	endothelial cell-specific molecule 1	10.9	1.6E-10
<i>zgc:172122</i>	571844	<i>zgc:172122</i>	10.8	4.6E-16
<i>cfap70</i>	564542	si:dkey-254e1.1 transcript variant X1	10.5	2.4E-34
<i>cyp11c1</i>	791124	cytochrome P450 family 11 subfamily C polypeptide 1	10.3	4.0E-31
<i>grn1</i>	553977	granulin 1	10.2	2.6E-23
<i>bco1</i>	84039	beta-carotene oxygenase 1	9.9	1.7E-16
<i>sb:cb1058</i>	394209	<i>sb:cb1058</i> transcript variant X3	9.3	1.4E-11
<i>zgc:136870</i>	664693	<i>zgc:136870</i>	9.1	2.9E-17
<i>cyp46a1.1</i>	553543	cytochrome P450 family 46subfamily A polypeptide 1 tandem duplicate 1	9.0	6.7E-21
<i>chchd3b</i>	325751	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3b	9,0	1,9E-18
<i>ptk2ba</i>	557258	protein tyrosine kinase 2 beta a transcript variant X2	8,9	7,6E-19
<i>vegfab</i>	558154	vascular endothelial growth factor Ab	8,8	8,2E-35
<i>pah</i>	378962	phenylalanine hydroxylase	8,7	8,9E-07
<i>tmem56b</i>	449652	transmembrane protein 56b	8,3	2,8E-16
<i>slc6a19b</i>	326030	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter) member 19b	7,9	4,1E-33
<i>col7a1l</i>	559516	collagen type VII alpha 1-like transcript variant X1	7,8	3,6E-13
<i>si</i>	100148922	sucrase-isomaltase (alpha-glucosidase)	7,7	2,7E-15
<i>slc15a1a</i>	100004272	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter) member 1a	7,7	4,3E-12

Tabla suplementaria 11. Top-50 de genes subexpresados en los ojos con fenotipo silvestre del pez cebra transgénico de miocilina identificados por el estudio transcriptómico. FC: diferencia de expresión (*fold change*). Condiciones para la expresión diferencial: fold-change <-2; número de lecturas >20. Valor p<0,05. Tg: transgénico; WTL: fenotipo silvestre; +/-: silvestre.

Símbolo gen	ID gen	Identificación	FC (Tg/+ WTL vs +/-)	P-valor
<i>opn1mw1</i>	30503	opsin 1 (cone pigments) medium-wave-sensitive 1	-28.7	2.3E-74
<i>gabrd</i>	571422	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor delta	-22.1	2.9E-60
<i>ggt1a</i>	393387	gamma-glutamyltransferase 1a	-17.6	1.1E-29
<i>lrp6</i>	100331388	low density lipoprotein receptor-related protein 6	-15.3	6.9E-34
<i>ppp4r1</i>	393230	protein phosphatase 4 regulatory subunit 1	-10.2	5.2E-42
<i>myocd</i>	100331725	myocardin transcript variant X4	-9.7	9.2E-28

Anexo I. Resultados suplementarios

<i>cx44.2</i>	114404	connexin 44.2	-9.4	9.3E-07
<i>LOC110439425</i>	110439425	NACHT LRR and PYD domains-containing protein 12-like transcript variant X1	-9.3	1.0E-20
<i>si:dkey-21h14.9</i>	100149673	si:dkey-21h14.9	-9.2	8.0E-26
<i>ghrhra</i>	541314	growth hormone releasing hormone receptor a	-9.1	3.2E-24
<i>cspg4bb</i>	557570	chondroitin sulfate proteoglycan 4bb	-8.9	8.3E-34
<i>march1</i>	797069	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1 transcript variant X1	-8.6	4.2E-19
<i>LOC101884382</i>	101884382	gastrula zinc finger protein XICGF57.1-like	-8.4	3.5E-12
<i>lingo3a</i>	567293	leucine rich repeat and Ig domain containing 3a	-8.3	9.4E-30
<i>necab2</i>	565258	N-terminal EF-hand calcium binding protein 2	-8.3	3.4E-09
<i>kcnc3a</i>	559096	potassium voltage-gated channel Shaw-related subfamily member 3a	-8.2	1.9E-28
<i>guca1e</i>	393629	guanylate cyclase activator 1e	-8.0	2.9E-18
<i>fosb</i>	492346	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	-7.9	1.4E-33
<i>mctp2b</i>	562526	multiple C2 domains transmembrane 2b transcript variant X2	-7.8	4.2E-26
<i>mtmr3</i>	393838	myotubularin related protein 3	-7.7	4.5E-34
<i>pcdh1g31</i>	554015	protocadherin 1 gamma 31	-7.7	1.4E-07
<i>ryr2b</i>	568463	ryanodine receptor 2b(cardiac) transcript variant X1	-7.6	8.4E-16
<i>nptxb</i>	100005257	neuronal pentraxin receptor b	-7.5	1.4E-19
<i>p3h3</i>	553311	prolyl 3-hydroxylase 3	-7.4	1.9E-25
<i>alx3</i>	566955	ALX homeobox 3 transcript variant X3	-7.3	7.7E-26
<i>LOC100333227</i>	100333227	carnitine O-palmitoyl transferase 1 liver isoform-like	-7.1	3.5E-10
<i>mhc1uma</i>	101883648	major histocompatibility complex class I UMA transcript variant X2	-7.0	1.2E-09
<i>LOC101885604</i>	101885604	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor-like	-6.6	1.3E-06
<i>loxl4</i>	100320658	lysyl oxidase-like 4	-6.5	5.9E-13
<i>drd2b</i>	378719	dopamine receptor D2b	-6.4	1.2E-12
<i>LOC101887118</i>	101887118	polyadenylate-binding protein 2-like transcript variant X12	-6.3	2.8E-17
<i>otog</i>	103911405	otogelin	-6.2	4.2E-12
<i>jdp2b</i>	436766	Jun dimerization protein 2b	-6.1	2.5E-22
<i>dsc2l</i>	560091	desmocollin 2 like	-6.0	5.5E-12
<i>rubcn</i>	100000896	RUN domain and cysteine-rich domain containing Beclin 1-interacting protein transcript variant X2	-6.0	6.4E-07
<i>LOC569340</i>	569340	interphotoreceptor matrix proteoglycan 1 transcript variant X4	-5.9	3.5E-20

Anexo I. Resultados suplementarios

<i>bnip1</i>	100149386	BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein like	-5.8	8.0E-26
<i>f3a</i>	567257	coagulation factor IIIa	-5.8	1.1E-05
LOC101887000	101887000	IgGfc-binding protein-like	-5.7	4.6E-03
<i>lmod2b</i>	664708	leiomodoin 2 (cardiac) b	-5.7	2.2E-08
<i>kcnk1a</i>	793480	potassium channel subfamily K member 1a	-5.6	6.6E-17
<i>pkp1b</i>	797838	plakophilin 1b	-5.6	2.8E-17
<i>ajap1</i>	101887016	adherens junctions associated protein 1	-5.5	2.3E-06
<i>flj13639</i>	677747	flj13639	-5.5	2.2E-20
<i>ftr34</i>	100301513	finTRIM family member 34	-5.5	4.1E-05
<i>stard9</i>	100149555	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 9	-5.4	3.7E-13
<i>lrrc4.2</i>	566572	leucine rich repeat containing 4.2	-5.3	9.6E-13
<i>slc29a2</i>	503537	solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter) member 2	-5.2	3.3E-07
<i>foxq1a</i>	100537750	forkhead box Q1a	-5.2	7.0E-17
<i>ptger2b</i>	570410	prostaglandin E receptor 2b (subtype EP2)	-5.2	2.2E-10

Tabla suplementaria 12. Análisis de enriquecimiento ontológico (GO) de los 50 genes más y menos expresados en el estudio transcriptómico de las muestras de ojos con fenotipo silvestre. El análisis se llevó a cabo mediante la plataforma de software basada en la web *Epistemic artificial intelligence*. BP: BioPlanet 2019; R: reactome; FDR: tasa de falso descubrimiento. KEGG; Enciclopedia de genes y genomas de Kioto; Overlap count: número de genes cargados que pertenecen a los diferentes grupos funcionales. Gene set count: número total de genes en el grupo funcional.

Name	Source	Overlap count	Gene set count	FDR adjusted p-value	Mapped gene symbols	Uploaded genes
atrial cardiac muscle cell action potential	BP	2	23	3,5E-02	<i>GJC1,RYR2</i>	<i>cx44,2,ryr2b</i>
cardiac vascular smooth muscle cell differentiation	BP	2	8	8,2E-03	<i>MYOCD,VEGFA</i>	<i>myocd,vegfab</i>
Metabolism of lipids	R	14	855	7,9E-03	<i>APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC2,APOE,CD36,CPT1A,CYP11B1,CYP46A1,FABP1,FABP2,GGT2,MTMR3</i>	<i>LOC100333227,afp4,apoa1a,apoa4b,1,apobb,1,apoc2,apoea,cd36,cyp11c1,cyp46a1,1,fabp1b,1,fabp2,gg1a,mtmr3</i>
regulation of multicellular organismal process	BP	28	2066	1,1E-03	<i>ACE,AJAP1,ANXA2,APOA1,APOA2,APOA4,APOC2,APOE,CD200,CD36,CHI3L1,CHIA,DRD2,F3,GHRHR,GJC1,GRN,HFE,HLA-B,HLA-E,LRP6,MYOCD,NPTXR,PCK1,PTK2B,RNH1,RYR2,VEGFA</i>	<i>ace,afp4,ajap1,anxa2b,apoa1a,apoa4b,1,apoc2,apoea,cd36,chia,2,chia,2,cx44,2,drd2b,f3a,ghrhra,grn1,lrp6,mhc1uma,myocd,nptxrb,pck1,ptk2ba,rnh1,ryr2b,vegfab,zgc:172122</i>
extracellular region	CC	43	3817	3,8E-04	<i>ACE,ANXA2,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC2,APOE,AZGP1,CD163,CD36,CFAP70,CHCHD3,CHI3L1,CHI3L2,CHIA,CHIT1,COL7A1,CSPG4,DSC1,F3,FABP1,FCGRT,GGT2,GRN,HFE,</i>	<i>ace,afp4,anxa2b,apoa1a,apoa4b,1,apobb,1,apoc2,apoea,cd36,cfa70,chchd3b,chia,2,chia,2,chia,2,chia,2,chiac,2,col7a1l,cspg4bb,dsc2l,f3a,fabp1b,1,gg1a,grn1,lqals2b,lingo3</i>

					<i>HLA-B,HLA-E,KRT79,LGALS1,LINGO3,LOXL4,LRP6,MICB,MR1,MUC3A,OTOG,OVGP1,PCK1,RNH1,S100A10,SLC6A19,VEGFA</i>	<i>a,loxl4,lrp6,mhc1uma,otog,pck1,rnh1,s100a10a,si:ch211-196f2,3,si:dkey-21h14,9,slc6a19b,vegfab,zgc:158846</i>
endosome	CC	18	782	3,1E+11	<i>ACE,ANXA2,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC2,APOE,GRN,HFE,HLA-B,HLA-E,LRP6,MARCHF1,MR1,OCIAD2,PMEL,RUBCN</i>	<i>ace,afp4,anxa2b,apoa1a,apoa4b,1,apobb,1,apoc2,apoea,grn1,lrp6,march1,mhc1uma,ociad2,rubcn,si</i>
catabolic process	BP	29	2130	7,4E-04	<i>ACE,ANXA2,APOA1,APOA2,APOA4,APOC2,APOE,BCO1,BNIPL,CD36,CHI3L1,CHI3L2,CHIA,CHIT1,CYP46A1,GGT2,HFE,MTMR3,OVGP1,PCK1,PKP1,PTK2B,RNF187,RNH1,RUBCN,TRIM17,TRIM39,TRIM40,TRIM5</i>	<i>ace,afp4,anxa2b,apoa1a,apoa4b,1,apoc2,apoea,bco1,bnipl,cd36,chia,2,chia,2,chia,2,chia,2,cyp46a1,1,ggta,mhc1uma,mtmr3,pck1,pkp1b,ptk2ba,rnh1,rubcn,si:dkey-219e21,2</i>
binding	BP	21	1466	3,6E-03	<i>ACE,ANXA2,APOA2,APOE,CCNA1,CD200,CD36,CHI3L1,HFE,LGALS1,LRP6,MYOCD,NPTXR,PTK2B,S100A10,TRIM31,TRIM39,TRIM40,TRIM41,TRIM5,VEGFA</i>	<i>ace,afp4,anxa2b,apoea,ccna1,cd36,chia,2,lgals2b,lrp6,mhc1uma,myocd,nptxrb,ptk2ba,s100a10a,si:dkey-219e21,2,vegfab,zgc:172122</i>
regulation of system process	BP	10	387	2,2E-03	<i>ACE,APOA1,APOA4,APOE,DRD2,GJC1,MYOCD,NPTXR,PTK2B,RYR2</i>	<i>ace,apoa1a,apoa4b,1,apoea,cx44,2,drd2b,myocd,nptxrb,ptk2ba,ryr2b</i>

cell population proliferation	BP	18	1373	1,8E-02	ACE,APOE,AZGP1,BNIP1,CD200,CLDN3,DRD2,ESM1,F3,GHRHR,GRN,HLA-E,LRP6,MYOCD,P3H3,PTK2B,RNF187,VEGFA	ace,apoea,bnipl,cldnc,drd2b,esm1,f3a,ghrhr a,grn1,lrp6,mhc1uma,myocd,p3h3,ptk2ba,si:dkey-219e21,2,vegfab,zgc:172122
cell junction organization	BP	10	521	1,1E-02	ACE,APOE,CLDN15,CLDN3,DRD2,GJC1,LRRCA4,PKP1,S100A10,VEGFA	ace,apoea,cldn15la,cldnc,cx44,2,drd2b,lrrc4,2,pkp1b,s100a10a,vegfab
membrane organization	BP	20	1395	4,8E-03	ANXA2,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC2,APOE,CD163,CD36,CHCHD3,DRD2,HFE,LRP6,LRRCA4,NECAB2,OCIA2,OPN1MW,RUBCN,S100A10,VEGFA	afp4,anxa2b,apoa1a,apoa4b,1,apobb,1,apoc2,apoea,cd36,chchd3b,drd2b,lrp6,lrrc4,2,mhc1uma,necab2,ociad2,opn1mw1,rubcn,s100a10a,si:dkey-21h14,9,vegfab
organic hydroxy compound transport	BP	10	231	7,6E+10	ANXA2,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC2,APOE,CD36,DRD2,LRP6	afp4,anxa2b,apoa1a,apoa4b,1,apobb,1,apoc2,apoea,cd36,drd2b,lrp6
regulation of cholesterol transport	BP	6	61	8,5E+10	ANXA2,APOA1,APOA2,APOA4,APOC2,APOE	afp4,anxa2b,apoa1a,apoa4b,1,apoc2,apoea
regulation of catabolic process	BP	14	831	5,8E-03	ANXA2,APOA1,APOA2,APOA4,APOC2,APOE,HFE,MTMR3,PKP1,PTK2B,RUBCN,TRIM39,TRIM40,TRIM5	afp4,anxa2b,apoa1a,apoa4b,1,apoc2,apoea,mhc1uma,mtmr3,pkp1b,ptk2ba,rubcn,si:dkey-219e21,2,
plasma lipoprotein particle disassembly	BP	7	38	8,8E+08	ANXA2,APOA1,APOA2,APOB,APOC2,APOE,CD36	afp4,anxa2b,apoa1a,apobb,1,apoc2,apoea,cd36

vesicle organization	BP	16	936	2,9E-03	ANXA2,APOA1,APOA2,APOB,APOC2,APOE,CD163,CD36,HFE,LRP6,NECAB2,OCIAD2,PME L,RUBCN,S100A10,VEGFA	afp4,anxa2b,apoa1a,apobb,1,apoc2,apo ea,cd36,lrp6,mhc1uma,necab2,ociad2,rubcn,s100a10a,si,si:dkey-21h14,9,vegfab
cellular component disassembly	BP	8	443	2,9E-02	ANXA2,APOA1,APOA2,APOB,APOC2,APOE,CD36,RUBCN	afp4,anxa2b,apoa1a,apobb,1,apoc2,apo ea,cd36,rubcn
positive regulation of multicellular organismal process	BP	17	1090	4,3E-03	ANXA2,APOA2,APOC2,APOE,CD200,CD36,CHI3L1,CHIA,DRD2,F3,GHRHR,GRN,HLA-E,MYOCD,PCK1,RYR2,VEGFA	afp4,anxa2b,apoc2,apo ea,cd36,chia,2,chia,2,drd2b,f3a,ghrhra,grn1,mhc1uma,myocd,pck1,ryr2b,vegfab,zgc:172122
negative regulation of molecular function	BP	14	929	1,2E-02	ANXA2,APOA2,APOC2,APOE,CD200,DRD2,FABP1,HFE,LRP6,MYOCD,RNH1,RUBCN,TRIM40,VEGFA	afp4,anxa2b,apoc2,apo ea,drd2b,fabp1b,1,lrp6,mhc1uma,myocd,rnh1,rubcn,si:dkey-219e21,2,vegfab,zgc:172122
Chylomicron assembly	R	6	10	9,7E+05	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC2,APOE	afp4,apoa1a,apoa4b,1,apobb,1,apoc2,apo ea
Sensory Perception	R	11	287	3,8E+11	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC2,APOE,BCO1,LOC118142757,OPN1MW,OTOG,RBP2	afp4,apoa1a,apoa4b,1,apobb,1,apoc2,apo ea,bco1,guca1e,opn1mw1,otog,rbp2a
Visual phototransduction	R	10	106	4,8E+08	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC2,APOE,BCO1,LOC118142757,OPN1MW,RBP2	afp4,apoa1a,apoa4b,1,apobb,1,apoc2,apo ea,bco1,guca1e,opn1mw1,rbp2a

Retinoid metabolism and transport	R	8	45	2,1E+07	APOA1,APOA2,APOA4 ,APOB,APOC2,APOE,B CO1,RBP2	afp4,apoa1a,apoa4b, 1,apobb,1,apoc2,apo ea,bco1,rbp2a
Transport of small molecules	R	13	805	1,1E-02	APOA1,APOA2,APOA4 ,APOB,APOC2,APOE,A ZGP1,HFE,RYR2,SLC15 A1,SLC29A2,SLC2A9,S LC6A19	afp4,apoa1a,apoa4b, 1,apobb,1,apoc2,apo ea,mhc1uma,ryr2b,slc 15a1a,slc29a2,slc2a9l 2,slc6a19b
sterol metabolic process	BP	7	105	1,4E-04	APOA1,APOA2,APOA4 ,APOB,APOE,CYP11B1 ,CYP46A1	afp4,apoa1a,apoa4b, 1,apobb,1,apoea,cyp1 1c1,cyp46a1,1
regulation of cytokine production	BP	11	620	1,2E-02	APOA1,APOA2,CD200 ,CD36,CHI3L1,CHIA,D RD2,F3,HFE,HLA-B,HLA-E	afp4,apoa1a,cd36,chi a,2,chia,2,drd2b,f3a, mhc1uma,zgc:172122
cell adhesion	BP	19	1201	2,1E-03	AJAP1,ANXA2,APOA1, APOA4,AZGP1,CD200, CD36,CLDN15,CLDN3, DSC1,HFE,HLA-E,LRRC4,PCDHGC5,PC K1,PKP1,PTK2B,S100A 10,VEGFA	ajap1,anxa2b,apoa1a ,apoa4b,1,cd36,cldn1 5la,cldnc,dsc2l,lrrc4,2, mhc1uma pcdh1g31,pck1,pkp1b ,ptk2ba,s100a10a,veg fab,zgc:172122
cell junction	CC	19	1587	2,3E-02	AJAP1,ANXA2,APOE,C LDN15,CLDN3,CSPG4, CYP46A1,DRD2,DSC1, GABRD,GJC1,LRP6,LR RC4,MCTP2,NPTXR,PK P1,PTK2B,SLC29A2,VE GFA	ajap1,anxa2b,apoea,c ldn15la,cldnc,cspg4bb ,cx44,2,cyp46a1,1,drd 2b,dsc2l,gabrd,lrp6,lrr c4,2,mctp2b,nptxrb,p kp1b,ptk2ba,slc29a2, vegfab
extracellular matrix	CC	14	506	4,8E+11	ANXA2,APOA1,APOA4 ,APOE,AZGP1,CHI3L1, COL7A1,CSPG4,F3,LG ALS1,LINGO3,OTOG,S 100A10,VEGFA	anxa2b,apoa1a,apoa 4b,1,apoea,chia,2,col 7a1,cspg4bb,f3a,lgal s2b,lingo3a,mhc1uma

						<i>,otog,s100a10a,vegfab</i>
circulatory system development	BP	11	747	3,0E-02	<i>ANXA2,CHI3L1,ESM1,F3,GRN,LRP6,MYOCD,PTK2B,RNH1,RYR2,VEGFA</i>	<i>anxa2b,chia,2,esm1,f3a,grn1,lrp6,myocd,ptk2ba,rnh1,ryr2b,vegfab</i>
positive regulation of cell adhesion	BP	7	355	2,9E-02	<i>APOA1,CD36,HLA-E,PCK1,PTK2B,S100A10,VEGFA</i>	<i>apoa1a,cd36,mhc1uma,pck1,ptk2ba,s100a10a,vegfab</i>
synapse	BP	10	687	3,9E-02	<i>APOE,CYP46A1,DRD2,GABRD,LRP6,LRRC4,MCTP2,NPTXR,PTK2B,SLC29A2</i>	<i>apoea,cyp46a1,1,drd2b,gabrd,lrp6,lrcc4,2,mctp2b,nptxrb,ptk2ba,slc29a2</i>
glutamatergic synapse	CC	4	70	5,7E-03	<i>APOE,DRD2,LRRC4,NPTXR</i>	<i>apoea,drd2b,lrcc4,2,nptxrb</i>
neuron death	BP	5	207	3,7E-02	<i>APOE,CD200,FOXQ1,GRN,PTK2B</i>	<i>apoea,foxq1a,grn1,ptk2ba,zgc:172122</i>
establishment of localization	BP	39	4231	2,9E-02	<i>ACE,ANXA2,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC2,APOE,AZGP1,CD163,CD200,CD36,CFAP70,CLDN3,COX6A2,CP11A,DRD2,FABP2,FCGRT,GABRD,GHRHR,GJC1,GRN,HFE,KCNC3,KCNK1,LRP6,MCTP2,NECAB2,OCIAD2,PTK2B,RUBCN,RYR2,S100A10,SLC15A1,SLC29A2,SLC2A9,SLC6A19,VEGFA</i>	<i>LOC100333227,ace,afp4,anxa2b,apoa1a,apoa4b,1,apobb,1,apoc2,apoea,cd36,cfap70,cldnc,cox6a2,cx44,2,drd2b,fabp2,f3a,gabrd,ghrhra,grn1,kcnc3a,kcnk1a,lrp6,mctp2b,mhc1umanecab2,ociad2,ptk2ba,rubcn,ryr2b,s100a10a,si:dkey-21h14,9,slc15a1a,slc29a2,slc2a9l2,slc6a19b,vegfab,zgc:172122</i>
lipid transport	BP	13	305	4,6E+09	<i>ACE,ANXA2,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,AP</i>	<i>LOC100333227, ace,afp4,anxa2b,apoa1a,</i>

					<i>OC2,APOE,CD36,CPT1A,DRD2,FABP2,LRP6</i>	<i>apoa4b,1,apobb,1,apoc2,apoea,cd36,drd2b,fabp2,lrp6</i>
immune system process	BP	30	2153	4,7E-04	<i>ACE,ANXA2,APOA1,APOA2,APOA4,AZGP1,C3AR1,CD200,CD36,CHIT1,CYP11B1,GGT2,GRN,HLA-B,HLA-E,MARCHF1,MICB,MR1,PCK1,PTK2B,RNF187,TRIM17,TRIM31,TRIM39,TRIM4,TRIM40,TRIM49B,TRIM5,TRIM51,VEGFA</i>	<i>LOC101885604, ace, afp4, anxa2b, apoa1a, apoa4b,1,cd36, chia,2, cyp11c1, ggt1a, grn1, march1, mhc1uma, pck1, ptk2ba, si:dkey-219e21,2, vegfab, zgc:172122</i>
negative regulation of macrophage activation	BP	2	17	2,3E-03	<i>CD200, GRN</i>	<i>grn1, zgc:172122</i>

Tabla suplementaria 13. Análisis ontológico de los 50 genes más sobre- y subexpresados en los ojos con fenotipo silvestre del pez cebra transgénico con miocilina en el estudio transcriptómico. El análisis se llevó a cabo mediante la plataforma de software basada en la web *ShinyGO*. Valor P <0,05.

N	High level GO category	Genes
20/1186	Localization	<i>drd2b, cd36, vegfab, kcnk1a, kcnc3a, slc6a19b, gabrd, rubcn, slc29a2, ryr2b, apoa1a, apobb.1, ptk2ba, loxl4, cx44.2, apoa4b.1, cox6a2, apoc2, slc15a1a, apoea</i>
18/340	Establishment of localization	<i>drd2b, cd36 kcnk1a kcnc3a slc6a19b gabrd rubcn slc29a2 ryr2b apoa1a apobb.1 loxl4 cx44.2 apoa4b.1 cox6a2 apoc2 slc15a1a apoea</i>
15/4501	Multicellular organismal process	<i>ptk2ba ggt1a cd36 vegfab lmod2b gabrd apoea otog opn1mw1 f3a guca1e lgals2b kcnk1a kcnc3a bco1</i>
12/60	Response to chemical	<i>drd2b ggt1a vegfab ptger2b cyp11c1 f3a fabp2 pah foxq1a cd36 ptk2ba kcnc3a</i>
10/1359	Catabolic process	<i>ggt1a cd36 rubcn mtmr3 chia.2 apoea bco1 cyp46a1.1 pah apoc2</i>
10/3584	Developmental process	<i>ptk2ba ggt1a foxq1a vegfab lmod2b lgals2b otog cldnc kcnc3a bco1</i>
9/42	Regulation of metabolic process	<i>foxq1a vegfab ccna1 fosb necab2 rubcn mtmr3 apoea jdp2b</i>
9/3407	Anatomical structure development	<i>ptk2ba foxq1a vegfab lmod2b lgals2b otog cldnc kcnc3a bco1</i>
9/51	Regulation of biological quality	<i>drd2b cd36 ptger2b cyp11c1 kcnk1a gabrd ryr2b lmod2b f3a</i>
8/52	Biosynthetic process	<i>pah foxq1a cyp11c1 fosb necab2 pck1 jdp2b ggt1a</i>
8/91	Anatomical structure morphogenesis	<i>ptk2ba foxq1a vegfab lmod2b lgals2b kcnc3a otog bco1</i>
8/628	Cellular component organization	<i>cldnc loxl4 lmod2b rubcn jdp2b ptk2ba nefmb kcnc3a</i>
8/97	Regulation of molecular function	<i>drd2b ccna1 rubcn apoea anxa2b cox6a2 apoc2 ppp4r1</i>
8/15	Cellular component organization or biogenesis	<i>cldnc loxl4 lmod2b rubcn jdp2b ptk2ba nefmb kcnc3a</i>
7/885	System process	<i>lmod2b gabrd otog opn1mw1 guca1e kcnk1a cd36</i>
6/379	Response to stress	<i>ptk2ba ggt1a vegfab ptger2b cd36 f3a</i>
6/518	Cell adhesion	<i>cldnc ptk2ba cd36 dsc2l pkp1b pcdh1g31</i>
6/290	Response to external stimulus	<i>ptk2ba ggt1a vegfab cd36 opn1mw1 kcnc3a</i>
6/141	Biological adhesion	<i>cldnc ptk2ba cd36 dsc2l pkp1b pcdh1g31</i>
6/44	Macromolecule localization	<i>cd36 apoa1a apobb.1 apoa4b.1 apoc2 apoea</i>
5/53	Immune system process	<i>ptk2ba ggt1a vegfab march1 cd36</i>
5/19	Response to endogenous stimulus	<i>drd2b ptger2b cyp11c1 pah cd36</i>
5/38	Regulation of localization	<i>drd2b vegfab rubcn ptk2ba kcnc3a</i>
5/45	Cellular component biogenesis	<i>cldnc lmod2b ptk2ba nefmb kcnc3a</i>
5/145	Anatomical structure formation involved in morphogenesis	<i>ptk2ba vegfab lmod2b lgals2b otog</i>
4/36	Negative regulation of biological process	<i>drd2b rubcn apoea lmod2b</i>
3/58	Regulation of immune system process	<i>ggt1a vegfab ptk2ba</i>

Anexo I. Resultados suplementarios

3/189	Immune response	<i>ptk2ba march1 cd36</i>
3/103	Response to biotic stimulus	<i>ptk2ba ggt1a cd36</i>
3/58	Locomotion	<i>vegfab ptk2ba kcnc3a</i>
3/51	Regulation of response to stimulus	<i>ggt1a vegfab ptk2ba</i>
3/51	Regulation of multicellular organismal process	<i>vegfab apoea ptk2ba</i>
2/679	Autophagy	<i>rubcn mtmr3</i>
2/1050	Cell population proliferation	<i>ptk2ba vegfab</i>
2/113	Response to abiotic stimulus	<i>vegfab opn1mw1</i>
2/51	Regulation of signaling	<i>drd2b ptk2ba</i>
2/33	Regulation of locomotion	<i>vegfab ptk2ba</i>
2/6425	Positive regulation of biological process	<i>vegfab apoea</i>
2/1075	Cell motility	<i>vegfab ptk2ba</i>

Tabla suplementaria 14. Confirmación por qRT-PCR de los genes seleccionados en el estudio transcriptómico de los peces transgénicos de *myoc*.

Gen	ID gen (GeneBank)	Transcriptoma		qRT-PCR	
		Diferencia de expresión	p-valor	Diferencia de expresión ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	p-valor
<i>Angptl3</i>	010817	28,5	2,4E-11	15,0	0,002
<i>Apoa1a</i>	30355	43,569016	6,4E-43	-31,4	0,001
<i>apoea</i>	553587	88,9	4,4E-22	-93,6	0,001
<i>Arhgef40</i>	100151026	-3,4	2,2E-08	-1,8	0,009
<i>Bfsp2</i>	494090	-206,4	6,1E-56	-9,1	0,001
<i>Cav2</i>	415240	-3,5	1,9E-12	-23,4	0,001
<i>Ccdc24</i>	541495	54,1	4,9E-08	56,8	0,001
<i>Col7a1l</i>	559516	22,6	4,7E-07	10,9	0,002
<i>Col28a1a</i>	555428	8,2	1,2E-16	6,8	0,003
<i>crybgx</i>	553474	-217,3	1,5E-50	-76,9	0,001
<i>gabbrd</i>	571422	-22,1	2,9E-60	-2,6	0,003
<i>lenep</i>	100002665	-153,8	1,8E-49	3,9	0,042
<i>lgsn</i>	567024	-156,5	3,9E-16	4,4	0,001
<i>nefmb</i>	100033387	143,2	1,7E-28	25,6	0,001
<i>Ociad2</i>	559516	24,6	1,6E-48	8,9	0,001
<i>Opn1mw1</i>	30503	-28,7	2,3E-74	2,9	0,001
<i>Rpe65a</i>	393724	2,8	1,2E-11	-2,6	0,061
<i>Vangl2</i>	245949	-4,8	3,3E-08	-1,6	0,002

11. Anexo II. Resumen de la producción científica

A continuación, se detallan parte de los resultados obtenidos durante la realización de la tesis doctoral, publicados en revistas científicas y presentados en congresos.

11.1 Publicaciones en revistas científicas

Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral

1. **Atienzar-Aroca, R.**, Aroca-Aguilar, J. D., Alexandre-Moreno, S., Ferre-Fernández, J. J., Bonet- Fernández, J. M., Cabañero-Varela, M. J., & Escribano, J. (2021). Knockout of myoc Provides Evidence for the Role of Myocilin in Zebrafish Sex Determination Associated with Wnt Signalling Downregulation. *Biology*, 10(2), 98.
2. **Raquel Atienzar-Aroca**, Jesús-José Ferre-Fernández, Ángel Tevar, Juan-Manuel Bonet Fernández, María-José Cabañero, María-José Ruiz-Pastor, Nicolás Cuenca, José-Daniel Aroca-Aguilar, Julio Escribano. (2022). Transgenic overexpression of myocilin leads to variable ocular anterior segment and retinal alterations associated with extracellular matrix abnormalities in adult zebrafish. *Frontiers in Cell and Development*

Otras publicaciones

1. Morales-Cámara, S., Alexandre-Moreno, S., Bonet-Fernández, J. M., **Atienzar-Aroca, R.**, Aroca-Aguilar, J. D., Ferre-Fernández, J. J., ... & Escribano, J. (2020). Role of GUCA1C in Primary Congenital Glaucoma and in the Retina: Functional Evaluation in Zebrafish. *Genes*, 11(5), 550.
2. Bonet-Fernández, J. M., Aroca-Aguilar, J. D., Corton, M., Ramírez, A. I., Alexandre-Moreno, S., García-Antón, M. T., ... & Escribano, J. (2020). CPAMD8 loss-of-function underlies non- dominant congenital glaucoma with variable anterior segment dysgenesis and abnormal extracellular matrix. *Human genetics*, 139(10), 1209-1231.
3. Alexandre-Moreno, S., Bonet-Fernández, J. M., **Atienzar-Aroca, R.**, Aroca-Aguilar, J. D., & Escribano, J. (2021). Null cyp1b1 activity in zebrafish leads to

variable craniofacial defects associated with altered expression of extracellular matrix and lipid metabolism genes. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6430.

11.2 Comunicaciones a congresos

Comunicaciones relacionadas con la tesis doctoral

1. **Raquel Atienzar-Aroca**. Myocilin expression in the eye and blood of zebrafish. Pan American Research Day (PARAD), 28 abril 2019, Canadá. (Comunicación oral)
2. **Raquel Atienzar-Aroca**, JD. Aroca-Aguilar, S. Alexandre-Moreno, J. Fere-Fernández, JM Bonet-Fernández, L. Fernández-Sánchez, N. Cuenca & J. Escribano. Myocilin expression in the eye and blood of zebrafish. ARVO 2019, abril-mayo 2019, Canadá. (Comunicación tipo póster).
3. **Raquel Atienzar-Aroca**, JD. Aroca-Aguilar, S. Alexandre-Moreno, J. Fere-Fernández, JM Bonet-Fernández, L. Fernández-Sánchez, N. Cuenca & J. Escribano. Analysis of myocilin expression in blood. XI jornadas de Jóvenes investigadores de Albacete, Facultad de medicina de Albacete, noviembre 2019. (Comunicación tipo póster).
4. **Raquel Atienzar-Aroca**, JD. Aroca-Aguilar, S. Alexandre-Moreno, J. Fere-Fernández, JM Bonet-Fernández, & J. Escribano. Analysis of myocilin in blood, IX Jornadas Doctorales de la Universidad de Castilla-La Mancha, 12 noviembre, Ciudad Real. (Comunicación tipo póster)
5. **Raquel Atienzar-Aroca**, JD. Aroca-Aguilar, S. Alexandre-Moreno, J. Fere-Fernández, JM Bonet-Fernández, & J. Escribano. Generation and characterization of a myocilin knock-out zebrafish line. VII Internacional Congress of Research in Retina and Vision, junio 2021, Madrid. (Comunicación oral).

Otras comunicaciones

1. Alexandre-Moreno Susana; **Atienzar-Aroca R.**; Aroca-Aguilar JD.; Bonet Fernández JM.; Ferre Fernandez J.; Escribano J. Characterization of expresión patterns and ocular defects of zebrafish bugeye lrp2a knock-out line. Joint congress' 17 SEGSEBC-SEBD (2017). (Comunicación tipo póster).
2. Bonet-Fernández Juan-Manuel; Morales-Cámara Samuel; Aroga-Aguilar Jose Daniel; Ferre-Fernández Jesús-José; **Atienzar-Aroca Raquel**; Alexandre-Moreno Susana; Escribano Julio. Generation and preliminary characterization of a zebrafish guca1c knock-out line by crispr/Cas9 genome editing: Implications in glaucoma pathogenesis. XLI Congreso de la Sociedad Española de Genética. Octubre 2017, Gijón. (Comunicación tipo póster).
3. **Raquel Atienzar-Aroca**; Susana Alexandre-Moreno; José Daniel Aroca Aguilar; Juan Manuel Bonet Fernández; Julio escribano Martínez. Análisis funcional del gen candidato de glaucoma LRP2 en embriones de pez cebrá mediante el establecimiento y caracterización de una línea knock-out. XI Jornadas de Jóvenes Investigadores, octubre 2017, Albacete. (Comunicación oral).
4. Morales-Cámara Samuel; Bonet-Fernández Juan-Manuel; Aroca-Aguilar José Daniel; Ferre Fernández Jesús-José; **Atienzar-Aroca Raquel**; Alexandre Susana; Escribano Julio. Establecimiento y caracterización de líneas knock-out en el pez cebrá para los genes guca1c y guca1d. XI Jornadas de Jóvenes Investigadores, octubre 2017, Albacete. (Comunicación tipo póster).
5. Susana Alexandre-Moreno; **R. Atienzar-Aroca**; JD. Aroca-Aguilar; JM. Bonet-Fernández; J. Ferre-Fernández; S. Morales-Cámara; Julio Escribano Caracterización de una línea knock-out para el gen implicado en glaucoma congénito cyp1b1 en el modelo de pez cebrá. XI Jornadas de Jóvenes Investigadores, octubre 2017, Albacete. (Comunicación oral).
6. JM Bonet Fernández; J.Ferre-Fernández; JD Aroca Aguilar; Susana Alexandre-Moreno; **Raquel Atienzar-Aroca**; S. Morales-Cámara & J. escribano Martínez. Generación y caracterización de una línea knock-out en pez cebrá para el gen gpatch3: implicación en glaucoma congénito. Jornadas de Jóvenes Investigadores,

- octubre 2017, Albacete. (Comunicación oral, premio mejor comunicación en neurociencias).
7. Susana Alexandre-Moreno; C. Medina-Trilo, JD. Aroca-Aguilar, J. Ferre-Fernández, **R. Atienzar-Aroca**, JM. Bonet Fernández, L. Morales, CD Méndez-Hernández, J. García-Feijo & J. Escribano. Role of rare FOXC2 and PITX2 variants in congenital glaucoma. ARVO 2019. 28/04/2019. Vancouver (Canadá). (Comunicación tipo póster).
 8. Susana Alexandre-Moreno; C. Medina-Trillo, JD. Aroca-Aguilar, J. Ferre-Fernández, **R. Atienzar-Aroca**, JM. Bonet Fernández, L. Morales, CD Méndez-Hernández, J. García-Feijo & J. Escribano. FOXC2 and PITX2: new role as modifier genes in congenital glaucoma. XI Jornadas de Jóvenes Investigadores de Albacete. Facultad de Medicina de Albacete, UCLM, 2019. (comunicación tipo póster).
 9. Susana Alexandre-Moreno; **R. Atienzar-Aroca**; JD. Aroca-Aguilar; JM. Bonet-Fernández; J. Ferre-Fernández; S. Morales-Cámara; Julio Escribano. Role of the cyp1b1 gene in glaucoma using a knock-out zebrafish line. II Congreso de Jóvenes Investigadores en Biomedicina, noviembre 2017, Valencia. (comunicación tipo póster).
 10. Susana Alexandre Moreno; Jesús José Ferre Fernández; José Daniel Aroca Aguilar; **Raquel Atienzar-Aroca**; Samuel Morales Cámara; Julio escribano Martínez. Glaucoma-like phenotypes in a cyp1b1 knockout zebrafish line. VI Internacional Congress of Research in Retina and Vision, junio 2018, Madrid. (Comunicación oral)
 11. **Raquel Atienzar-Aroca**; Susana Alexandre-Moreno; JD Aroca Aguilar; JM Bonet Fernández; J.Ferre-Fernández; S. Morales-Cámara & J. escribano Martínez. Characterization of knock-out lines for lrp2 gene involved in congenital glaucoma in zebrafish model. II Congreso de Jóvenes Investigadores en Biomedicina, noviembre 2017, Valencia. Póster
 12. **Raquel Atienzar-Aroca**; Susana Alexandre-Moreno; José Daniel Aroca Aguilar; Juan Manuel Bonet Fernández; Julio escribano Martínez. Ocular characterization of a lrp2a Mutant Zebrafish Line. VI Internacional Congress of Research in Retina and Vision, junio 2018, Madrid. (Comunicación oral)
 13. Ángel Tévar Saiz, José Daniel Aroca Aguilar, **Raquel Atienzar Aroca**, Juan-Manuel

- Bonet- Fernández, Susana Alexandre Moreno, Carmen Belén Gallardo Martínez, Maria José Cabañero Valera, Julio Escribano Martínez. Role of the ADAMTSL4 gene in a juvenile glaucoma family. Zebrafish functional análisis. XLII Congreso de la Sociedad Española de Genética. SEG 2021, junio. (Comunicación tipo póster).
14. José-Daniel Aroca-Aguilar, susana Alexandre-Moreno, Juan-Manuel Bonet-Fernández, **Raquel Atienzar-Aroca**, Nicolás Cuenca and Julio Escribano. Functional Evaluation in Zebrafish of the glaucoma candidate gene GUCA1C. VI International congress of Research in Retina and Vision (SIREV). Murcia, Junio 2021. (Comunicación oral).
15. Tévar-Saiz, J.D. Aroca-Aguilar, **R. Atiénzar-Aroca**, J.M. Bonet-Fernández, S. Alexandre Moreno, J. Escribano-Martínez. Role of the ADAMTSL4 gene in Juvenile Glaucoma Functional Analysis in zebrafish. VII International congress of Research in Retina and Vision, (SIREV), junio 2021. (Comunicación oral).

12. Anexo III. Publicaciones

Article

Knockout of *myoc* Provides Evidence for the Role of Myocilin in Zebrafish Sex Determination Associated with Wnt Signalling Downregulation

Raquel Atienzar-Aroca ^{1,2}, José-Daniel Aroca-Aguilar ^{1,2} , Susana Alexandre-Moreno ^{1,2},
Jesús-José Ferre-Fernández ^{1,2} , Juan-Manuel Bonet-Fernández ^{1,2} , María-José Cabañero-Varela ^{1,2}
and Julio Escribano ^{1,2,*} 

- ¹ Área de Genética, Facultad de Medicina de Albacete/Instituto de Investigación en Discapacidades Neurológicas (IDINE), Universidad de Castilla-La Mancha, 02006 Albacete, Spain; Raquel.Atienzar@uclm.es (R.A.-A.); JoseDaniel.Aroca@uclm.es (J.-D.A.-A.); Susana.Alexandre@uclm.es (S.A.-M.); ferrejesus@hotmail.com (J.-J.F.-F.); JuanM.Bonet@uclm.es (J.-M.B.-F.); mjosefa.cabanero@uclm.es (M.-J.C.-V.)
- ² Cooperative Research Network on Age-Related Ocular Pathology, Visual and Life Quality (OFTARED), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: julio.escribano@uclm.es



Citation: Atienzar-Aroca, R.; Aroca-Aguilar, J.-D.; Alexandre-Moreno, S.; Ferre-Fernández, J.-J.; Bonet-Fernández, J.-M.; Cabañero-Varela, M.-J.; Escribano, J. Knockout of *myoc* Provides Evidence for the Role of Myocilin in Zebrafish Sex Determination Associated with Wnt Signalling Downregulation. *Biology* **2021**, *10*, 98. <https://doi.org/10.3390/biology10020098>

Received: 23 December 2020
Accepted: 26 January 2021
Published: 30 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Myocilin is a protein with an incompletely understood function, mainly known because of its role in glaucoma. In this study we have analysed the normal role of this protein in vivo. To that end, we generated the first myocilin knockout zebrafish line reported to date. This zebrafish line did not show any apparent gross morphological anomaly, but unexpectedly, we observed that all knockout animals were males. Detailed analyses revealed the existence of apoptosis in the immature juvenile gonad, which is associated with male differentiation. Moreover, we demonstrate that adult knockout differentially expressed key genes involved both in male sex determination and the Wnt signalling pathway, which also plays a role in zebrafish gonad differentiation. Altogether, these results indicate that myocilin is a novel key protein involved in sex determination in zebrafish.

Abstract: Myocilin is a secreted glycoprotein with a poorly understood biological function and it is mainly known as the first glaucoma gene. To explore the normal role of this protein in vivo we developed a *myoc* knockout (KO) zebrafish line using CRISPR/Cas9 genome editing. This line carries a homozygous variant (c.236_239delinsAAAGGGGAAGGGGA) that is predicted to result in a loss-of-function of the protein because of a premature termination codon p.(V75EfsX60) that resulted in a significant reduction of *myoc* mRNA levels. Immunohistochemistry showed the presence of myocilin in wild-type embryonic (96 h post-fertilization) anterior segment eye structures and caudal muscles. The protein was also detected in different adult ocular and non-ocular tissues. No gross macroscopic or microscopic alterations were identified in the KO zebrafish, but, remarkably, we observed absence of females among the adult KO animals and apoptosis in the immature juvenile gonad (28 dpf) of these animals, which is characteristic of male development. Transcriptomic analysis showed that adult KO males overexpressed key genes involved in male sex determination and presented differentially expressed Wnt signalling genes. These results show that myocilin is required for ovary differentiation in zebrafish and provides in vivo support for the role of myocilin as a Wnt signalling pathway modulator. In summary, this *myoc* KO zebrafish line can be useful to investigate the elusive function of this protein, and it provides evidence for the unexpected function of myocilin as a key factor in zebrafish sex determination.

Keywords: myocilin; *myoc*; zebrafish sex determination; Wnt

1. Introduction

Myocilin is a 55–57 kDa extracellular glycoprotein with an enigmatic function and was identified in 1997 as the first glaucoma gene [1]. Glaucoma is a progressive and irreversible optic neuropathy that is caused by apoptosis of retinal ganglion cells, and it is generally associated with elevated intraocular pressure [2]. This protein was identified in human trabecular meshwork cell cultures that were treated with glucocorticoids, and it was initially called Trabecular Meshwork Inducible Glucocorticoid Response (TIGR) [3]. It was later called myocilin because of its amino acid sequence similarity with myosin [4]. The transcripts encoding myocilin were initially discovered in the ciliary body [5,6] and then in photoreceptor cells [4]. The gene is also expressed in other tissues of the ocular anterior segment such as the iris and the trabecular meshwork (TM) [6–9]. The protein is present in the aqueous humor [10,11], where it forms aggregates of 120–180 kDa [12], which are linked partially by disulphide bonds [13]. In addition, *MYOC* expression has been detected in non-ocular tissues such as skeletal and cardiac muscles [6], blood plasma, leukocytes and lymphoid tissues [14]. The protein has been reported to be secreted in association with exosomes in TM cells [15,16].

Although important structural properties of myocilin have been unveiled, they have not provided a definitive clue to elucidate its normal function. Thus, we know that the N-terminal region of myocilin is composed of two coiled-coil domains [17,18] with a leucine-zipper motif [6] in the second coiled-coil, which are involved in myocilin self-aggregation [12]. The N-terminal half is connected to the C-terminal part of the protein by a central region that contains a calpain II proteolytic site that is cleaved intracellularly [11,19]. The C-terminal region is homologous to olfactomedin [6], and identifies this protein as a member of the olfactomedin protein family. This family comprises a group of glycoproteins that are known to be involved in early development and functional organisation of the nervous system as well as haematopoiesis. Olfactomedin domains appear to facilitate protein–protein interactions, intercellular interactions and cell adhesion [20]. The olfactomedin domain of myocilin folds like a globular five-bladed β -propeller [21] and contains most glaucoma-causing variants [6]. The quaternary structure of myocilin is composed of a Y-shaped dimer-of-dimers in which the N-terminal coiled-coil region forms a tetrameric stem that is linked by disulphide bonds, and it is connected through the linker region to two pairs of olfactomedin domains [22]. We have proposed that extracellular myocilin may form a dynamic extracellular network that is composed of myocilin homoaggregates which may bind through the olfactomedin domain with matricellular proteins such as SPARC and hevin, as well as fibronectin, which suggests that myocilin might function as a putative matricellular protein [23,24].

Myocilin and other olfactomedin family members, such as photomedin-1 [25], gliomedin [26] and latrophilin [27] are proteolytically cleaved, splitting the proteins in two fragments. Though the role of this process is not completely understood, we have proposed that it regulates molecular interactions of this protein [23,24]. We have shown that it is affected by the extracellular concentration of bicarbonate [28]. C-terminal myocilin fragments have been identified in different ocular tissues and biological fluids such as the ciliary body, aqueous humor (AH) [11] and trabecular meshwork [9], indicating that the proteolytic cleavage of this protein also occurs *in vivo* and that it may be important in regulating its biological function. Interestingly, recombinant myocilin has been reported to modulate Wnt signalling in cell culture, suggesting that this pathway might also participate in its normal function [29,30]. Myocilin has anti-adhesive properties on trabecular meshwork cells [31,32] and reduces the adhesion of human circulating leukocytes to cultured endothelial cell monolayers [14].

The sex determination mechanisms of zebrafish remain largely unknown. Wild zebrafish strains use a ZZ/ZW genetic sex determination process, with the major sex locus located on chromosome 4. This genetic sex determinant seems to have been lost in domesticated strains, which are widely used in the laboratory [33]. Rather than a single master gene, multiple genes and possible weak secondary environmental factors have been

proposed to play a role as sex determining factors in zebrafish research strains [34]. Environmental factors that are known to influence zebrafish sex include temperature, density, hormones, food and hypoxia [34]. The zebrafish gonad, like the mammalian gonad, is bipotential before sex determination (<10 dpf), and it is composed of a mixture of male- and female-like cells [35,36]. Sex differences begin to be apparent when the number of oocytes tend to increase in females (20–30 dpf) [37]. This process is regulated by canonical Wnt/beta-catenin signalling, which acts as a pro-female pathway [38], and inhibition of this pathway results in male-biased sex ratios.

In this study, we developed a *myoc* knockout (KO) zebrafish model to explore the biological role of this interesting protein. We found that while this line did not show apparent morphological anomalies, unexpectedly, all KO animals were males, indicating that myocilin is required for ovary differentiation, acting as a novel key protein involved in sex determination in domesticated zebrafish. To the best of our knowledge, our results also provide the first in vivo evidence of myocilin as a Wnt signalling pathway modulator.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Wild-type AB zebrafish (*Danio rerio*) were maintained at 28 °C with a 14 h on/10 h off light cycle and were fed a standard diet according to established protocols [39]. Zebrafish embryos were raised at 28 °C in E3 medium (5 mM NaCl; 0.17 mM KCl; 0.33 mM CaCl₂; 0.33 mM MgSO₄ and 0.0001 % methylene blue, pH 7.2). Adult fishes and larvae were anesthetized with 0.04% and 0.02% tricaine methanesulfonate (MS222, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), respectively.

2.2. CRISPR/Cas 9 Gene Editing

Target selection and crRNA design were performed using custom Alt-R CRISPR-Cas9 guide RNA (https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA USA). Potential off-target sites and highest on-target activity of crRNAs were assessed with CRISPR-Cas9 guide RNA design checker (https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE, Integrated DNA Technologies). TracrRNA and crRNA targeting *myoc* exon 1 (myocE1g1 5'-GGTTGCTCGTCTCGTAGGAGGGG-3') were purchased from Integrated DNA Technologies. For Cas9/gRNA microinjections, crRNA (36 ng/μL) and tracrRNA (67 ng/μL) were mixed, incubated 5 min at 95 °C and cooled at room temperature to hybridise. Cas9 protein (Alt-R[®] CRISPR-Cas9 at 250 ng/μL, Integrated DNA Technologies) and crRNA/tracrRNA complex were mixed and incubated for 10 min at 37 °C to form the RNP complex. Approximately 3 nL of RNP complex was injected into the animal pole of one-cell stage embryos (50–250 embryos/experiment) using a Femtojet 5247 microinjector (Eppendorf, Hamburg, Germany) under a Nikon DS-Ri2 stereomicroscope. As a negative control, embryos were injected with Cas9/tracrRNA and no crRNA.

2.3. Zebrafish DNA Extraction

PCR-ready genomic DNA was isolated from whole zebrafish embryos (24 h post fertilization, hpf) and from the caudal fin of anesthetized larvae (144 hpf) or adult zebrafish using the HotSHOT method [40]. Briefly, tissue samples were incubated with 20 μL of base solution (25 mM KOH, 0.2 mM EDTA) at 95 °C for 30 min in a thermal cycler (BIORAD C100, BIORAD, Hercules, CA, USA), then 20 μL of neutralization buffer (40 mM TrisHCl, pH 5) was added.

2.4. Genotyping of CRISPR/Cas9-Induced Mutations by PAGE and Sanger Sequencing

To characterize the KO mutation, *myoc* exon 1 was amplified by PCR in a thermal cycler (BIORAD C100) using the following conditions: an initial denaturation step at 95 °C for 3 min followed by 35 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 66 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. A final extension step at 72 °C for 5 min was

also included. The primers (*myoc*Fw1, 5'-GGTCGCTGTCAGTACACCTTTAT-3'; *myoc*Rv1, 5'-GCAGGTCCTGAACTTGTCTGTCT-3') were designed using the IDT PrimerQuest Tool (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>, Integrated DNA Technologies) and the PCR products were analysed either by DNA PAGE (8%) or direct Sanger sequencing (Macrogen, Seoul, Korea). PAGE was carried out using the Mini-PROTEAN III gel electrophoresis system (BioRad). After electrophoresis, the gel was stained for 20 min in a Ethidium Bromide (46067, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution (0.5 µg/L).

2.5. Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR was carried out as previously described [41]. RNA was isolated from pools of 15 zebrafish larvae (144 hpf) or from pools of three adult male zebrafish (2.5 months) using the RNeasy Minikit (#74104, Qiagen, Germantown, MD, USA) and treated with RNase-free DNase I according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was used for cDNA synthesis using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits (#K1622, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The expression of *myoc* mRNA or of selected DEGs relative to *ef1α* mRNA was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [42] using the primer pairs described in Table S1. The PCR analysis was carried out with 1 µL of cDNA as a template in a reaction volume of 10 µL containing 5 µL of Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo-Fisher Scientific) and 200 nM of each primer. Thermocycling conditions included an initial denaturation step at 95° C for 10 min, followed by 40 cycles consisting of 15 s denaturation at 95° C for 60 s and a combined annealing and extension step at 60° C for 40 s. The PCR products and their dissociation curves were detected with a 7500 Fast real-time PCR system thermal cycler (Thermo-Fisher Scientific). The template cDNA was omitted in the qRT-PCR negative control. qRT-PCR results from three independent experiments were used for calculation of mean expression values in each sample.

2.6. Zebrafish Tissue Samples

For histological sections, wild-type and KO *myoc* zebrafish whole 96 hpf-embryos or adult zebrafish heads were fixed overnight in 4% PFA and cryoprotected two days at 4° C in 30% sucrose/PBS 0.1 M (Dulbecco, X0515-500C). Thereafter, the embryos and zebrafish heads were embedded in 10% porcine gelatin with 15% sucrose and stored at −80° C. Serial cryosections (10 µm for embryos and 14 µm for larvae and adult zebrafish) were obtained in a Leica CM3050 S cryostat (Leica Ltd., Wetzlar, Germany) and stored at −20° C for further use.

2.7. Fluorescent Whole Mount Immunohistochemistry (FWIHC)

Phenylthiourea-treated and fixed embryos (96 hpf) were incubated with a chicken primary antibody (1:50) raised against a N-terminal peptide of the human myocilin protein (anti-TNT) [14], followed by incubation with a Cy2 goat anti-chicken IgY (1:1000) secondary antibody (703-225-155, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Whole embryos were counterstained with DAPI (D8417, Sigma-Aldrich), mounted in low-melting agarose (1%) (8050, Pronadisa) with Fluoroshield Medium (F6182, Sigma-Aldrich) and visualized in an LSM710 Zeiss confocal microscope. Fluorescence emitted by DAPI, the Cy2-conjugated antibody and embryo autofluorescence was registered at the following wavelengths, respectively: 411–464 nm, 490–518 nm and 553–677 nm. Z-stacks were captured with sections spanning the entire embryo and maximum intensity projections and cross-sections of the confocal images were obtained with ZEN software (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.8. Fluorescence Immunohistochemistry

Fluorescence immunohistochemistry was performed as previously described [43,44]. Briefly, gelatin embedded histological sections of juvenile (28 dpf) or adult zebrafish (7 months) were treated with immunoblocking solution [10% fetal bovine serum (FBS), 1% DMSO and 1% Triton X-100 in DPBS] at room temperature for 1 h. Gonadal tissue and myocilin were identified using an antibody against the germ cell marker vasa

(1:200 [45], GTX128306, GeneTex, Hsinchu City, Taiwan) or the anti-myocilin (TNT, 1:150) antibody, followed, respectively, by incubation with a Cy2-conjugated anti-chicken IgY (1:1000) or anti-rabbit IgG secondary antibody (1:1000). After that, sections were incubated with a secondary antibody, counterstained, mounted and visualized as described earlier. The specificity of the anti-myocilin antibody was evaluated by incubation with the pre-immune antibody (1:200) and with a competitive assay using the antigenic peptide at a 1:5 (antibody:peptide) molar ratio.

Apoptotic cell death was evaluated by TUNEL assay using the In-Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (11684795910, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), following the manufacturer's instructions. As a positive control, tissue sections of wild-type zebrafish were incubated for two min with permeation solution (0.1% Tritón-X100, 0.1% sodium citrate) followed by incubation with DNase I solution (3 U/mL DNase, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mg/mL FBS) for 10 min [41]. DNase I treatment was omitted in the negative controls. Samples were stained with DAPI, mounted and visualized as described earlier. At least four animals from each experimental group were used for the microscopy analyses. Four tissue sections per fish were employed for each technique and three random fields per tissue section were examined by a single masked observer.

2.9. Hematoxylin and Eosin Staining

Tissue sections, previously washed in PBS, were stained with Harris hematoxylin solution (HHS80, Sigma-Aldrich) for 3 min. Then, sections were washed with water, dehydrated in ascending ethanol concentrations (15%, 30%, 50%, 70% and 90%) and stained with an alcoholic eosin solution (HT1101116-500ML, Sigma-Aldrich) for 2 min. Finally, the samples were again treated with increasing concentrations of ethanol (90 and 100%) before a final xylol wash at room temperature. Slides were then mounted with Cytoseal (8311-4, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.10. High Throughput RNA Sequencing

RNA was isolated from pools of three adult male zebrafish (2.5 months) using the RNeasy Minikit (Qiagen #74104) and treated with RNase-free DNase I according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined using a NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Duplicates of RNA samples were submitted to MacroGen Next Generation Sequencing Division (MacroGen) for high throughput sequencing. Libraries were generated using the TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina, Foster City, CA, USA), which captures both coding RNA and multiple forms of non-coding RNA that are polyadenylated. Sequencing was performed in a NovaSeq 6000 System (Illumina) according to the user guide (Document #1000000019358 v02). Trimmomatic 0.38 [46] was used to remove the Illumina adapter sequences and bases with base quality lower than three from the ends. HISAT2 aligner [47] was used to map sequence reads against the zebrafish genome reference (GRCz11). Expression profiles were calculated for each sample as read count and normalization value, which is based on transcript length and depth of coverage. DEG analysis of the *myoc* KO vs. wild-type zebrafish was performed using reads per kilobase of transcript per million mapped reads (RPKM). Genes with a fold change ≥ 2.0 and a *p*-value < 0.05 in the four possible comparisons of the two biological replicas were considered as DEGs (KO1 vs. WT1, KO1 vs. WT2, KO2 vs. WT1 and KO2 vs WT2). Functional gene enrichment analysis of DEGs was performed using GO (<http://geneontology.org/>), KEGG (<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) databases using the g:Profiler tool (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>) and ShinyGO [48].

2.11. Statistics

Statistical comparisons between groups were performed using the chi-squared, Fisher's tests or one-way ANOVA. Statistical analysis of the data was performed using the SigmaPlot 12.0 software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

3. Results

3.1. Generation of the KO *Myoc* Line in Zebrafish Using CRISPR/Cas9

To better understand the biological function of *MYOC* in vivo, we used the zebrafish as an animal model. As mentioned above, the human *MYOC* gene consists of three exons and it is located on the long arm of chromosome 1, whereas the orthologue zebrafish gene has four exons and it is located on chromosome 20 (Figure S1A). Comparison of DNA sequences showed 37.2% nucleotide identity in the coding regions of the human and zebrafish genes. The corresponding proteins present conserved olfactomedin domains with 45% amino acid sequence identity (Figure S1B). The N-terminal coiled-coils that are present in the human protein were not predicted in zebrafish myocilin.

To disrupt this gene using the CRISPR/Cas9 genome editing, we designed a CRISPR RNA (crRNA) targeting exon 1 (Figure 1A). The ribonucleoprotein (RNP) complexes (crRNAs/trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) and Cas9 protein) were microinjected into the animal pole of AB zebrafish embryos at the one-cell stage of development (Figure 1B). The injected embryos (F0) were raised to adulthood and screened using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Sanger sequencing for the presence of germline transmitted *myoc* deletions. Sanger sequencing identified mutant mosaic fishes transmitting an indel variant (c.236_239delinsAAAGGGGAAGGGGA), which was predicted to cause a frameshift in the coding region and a premature termination codon p.(V75EfsX60) (Figure 1D). These mosaics were selected as F0 founders and backcrossed with wild-type AB zebrafish to segregate off-targets, and the offspring (F1) was genotyped by PAGE (Figure 1B). Mutant F1 heterozygotes were outbred again with wild-type AB to further segregate off-target mutations in the F2 generation (Figure 1B). Finally, F3 homozygous *myoc* KO fish were obtained through inbreeding F2 heterozygotes. F3 genotyping by PAGE (Figure 1C) and Sanger sequencing (Figure 1D) showed agreement of the proportions of the three genotypes with the expected Mendelian ratios, indicating that *myoc* disruption does not affect zebrafish fertility and viability.

The mutation is predicted to result in degradation of the *myoc* mRNA by the non-sense mediated decay (NMD) pathway [49], leading to a loss-of-function (LoF) of the protein. To confirm this hypothesis, *myoc* mRNA levels were analysed by qRT-PCR in three pools of 15 larvae each per genotype. We observed a reduction of mRNA levels in heterozygous (+/−) and mutant homozygous (−/− or KO) larvae of approximately 50% and 80%, respectively, with respect to the value of their wild-type (+/+) littermates (Figure 1E). These results were in accordance with our hypothesis, and although there was a low level of residual mutant mRNA in the KO larvae, it would be likely translated into a non-functional truncated protein that contains only 74 normal amino acids. All these data support that the generated mutation produces a complete *myoc* LoF.

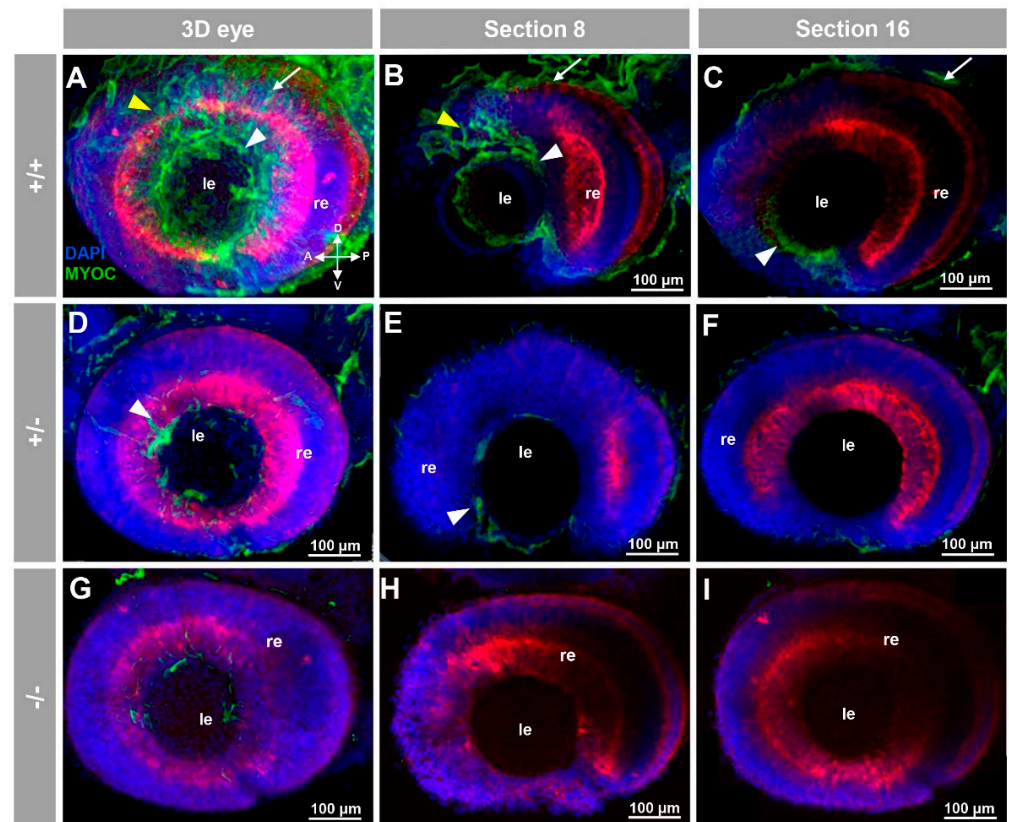


Figure 2. Fluorescent whole-mount immunohistochemical detection of myocilin in the eye of zebrafish embryos (96hpf). Wild-type (A–C), heterozygous (D–F) and homozygous (G–I) *myoc* mutant embryos were incubated with a chicken conjugated goat anti-chicken IgY secondary antibody. Three-dimensional reconstruction from z-stack scanned confocal microscopy images (A,D,G) of the eye. Optical sections (92 μm) 8 (B,E,H) and 16 (C,F,I), from the exterior ocular surface, were selected from z-stack images to show the precise localisation of the green signal in the external and internal surface of the optic cup (white arrows and yellow arrowheads, respectively), lens epithelium (white arrowhead), and dorsoposterior and ventral periocular tissues (yellow arrowheads) (A–C). Blue: DAPI nuclear staining. Green: Cy2-conjugated goat anti-chicken IgY secondary antibody. Red: tissue autofluorescence. The cross indicates the position of the embryonic axes (D: dorsal; P: posterior; V: ventral; A: anterior). The images are representative of the result observed in 10 embryos. le: lens. re: retina. The negative controls are shown in Figure S3A–C. Two-dimensional confocal image z-stacks are shown in Supplementary Video S1.

Positive immunolabeling was also detected apparently in the extracellular space of the yolk surface (Figure 3A–C and Supplementary Video S2) and in caudal muscular tissue (Figure 4A–C).

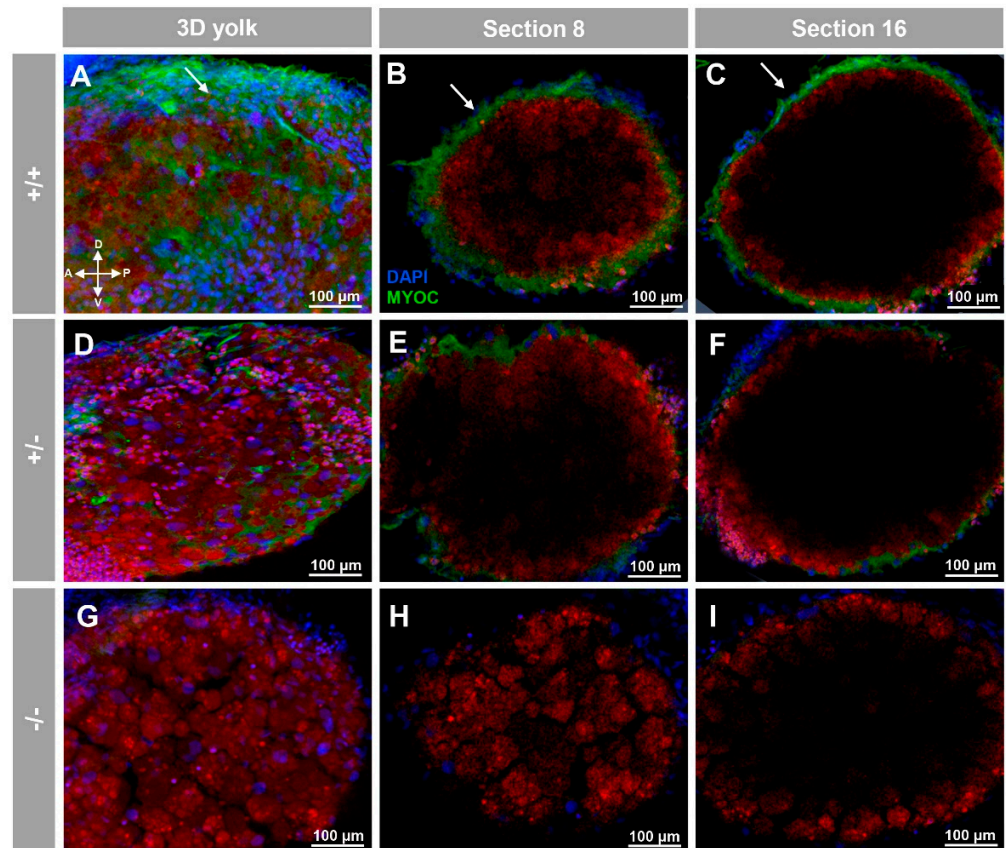


Figure 3. Fluorescent whole-mount immunohistochemical detection of myoc in the yolk of zebrafish larvae (96hpf). Wild-type (A–C), heterozygous (D–F) and homozygous (G–I) *myoc* mutant embryos were incubated with chicken anti-myocilin (TNT) primary antibody and a Cy2-conjugated goat anti-chicken IgY secondary antibody. Three-dimensional reconstruction from z-stack scanned confocal microscopy images (A,D,G) of the yolk (A,D,G) and sections (B,E,H) and (C,F,I) were selected from z-stack images to show the precise localization of the green signal on the yolk surface (arrows) (A–C) and DAPI nuclear staining (A–C). Blue: DAPI nuclear staining; Green: Cy2-conjugated goat anti-chicken IgY secondary antibody; Red: tissue autofluorescence. The cross indicates the position of the embryonic axes (D: dorsal, P: posterior; V: ventral; A: anterior). The images are representative of the result observed in 10 embryos. The negative controls are shown in Figures S3D–F. Two-dimensional confocal image z-stacks are shown in Supplementary Video S2.

These immunosignals were reduced in heterozygous embryos (Figures 2D–F, 3D–F and 4D–F), and they were undetectable in $-/-$ embryos (Figures 2G–I, 3G–I and 4G–I), which supports their specificity. The absence of green signals in the control sections that were incubated with preimmune antibody also supported the specificity of the immunoreactivity (Figure S3).

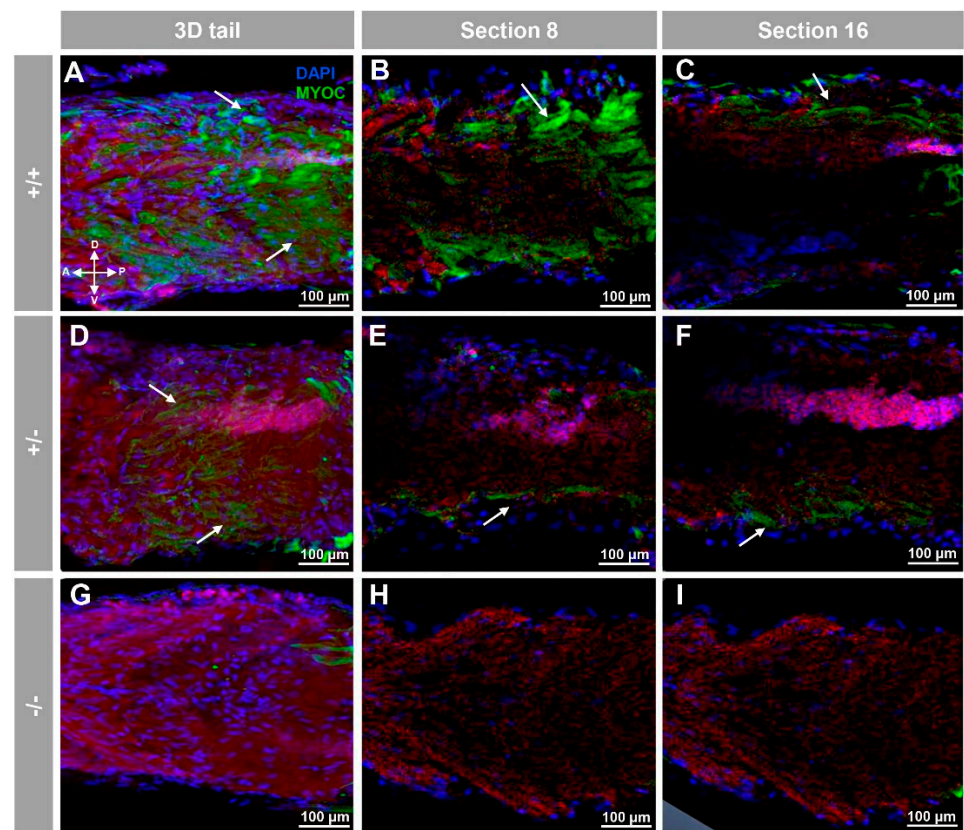


Figure 4. Fluorescent whole-mount immunohistochemical detection of myoc in the tail of zebrafish embryos (96hpf). Wild-type (A–C), heterozygous (D–F) and homozygous (G–I) *myoc* mutant embryos were incubated with a chicken anti-myocilin (TNT) primary antibody and a Cy2-conjugated goat anti-chicken IgY secondary antibody. Three-dimensional reconstruction from z-stack scanned confocal microscopy images (A,D,G) of the tail. Sections (92 μm) 8 (B,E,H) and 16 (C,F,I) were selected from z-stack images to show the precise localisation of the green signal in the tail's skin (arrow) (A–C). Blue: DAPI nuclear staining. Green: Cy2-conjugated goat anti-chicken IgY secondary antibody. Red: tissue autofluorescence. The cross indicates the position of the embryonic axes (D: dorsal; P: posterior; V: ventral; A: anterior). The images are representative of the results observed in ten embryos. The negative controls are shown in Figure S3G–I.

Next, we investigated the presence of myocilin in adult zebrafish ocular tissues using immunohistochemistry. We detected positive immunoreactivity in the non-pigmented ciliary epithelium, blood vessels and stroma of the iris (Figure 5A), corneal epithelium (Figure 5B), and retinal ganglion cells (Figure 5C,D). These signals were absent in $-/-$ zebrafish (Figure 5E–G), as well as in samples treated with the preimmune antibody or blocked with the antigenic peptide (Figure S4). This also supports their specificity.

To investigate the presence of myocilin in representative non-ocular adult tissues we selected skeletal muscle (pharyngeal muscle) and the digestive (intestinal bulb, and middle intestine) and reproductive (testis and ovary) systems. Analysis of tissue sections revealed myocilin immunoreactivity in the periphery of pharyngeal muscular fibres (Figure 6A,B). In the dilated portion of the proximal intestine, i.e., the intestinal bulb, we observed immunolabeling in the enterocyte apical side (Figure 6C,D), and, in contrast, epithelial cells of the middle intestine were intracellularly stained (Figure 6E,F), showing distinctive brush border staining (Figure 6E,F, arrows). These immunosignals were almost absent in the $-/-$ (Figure 6G–L), and in additional negative controls, i.e., the preimmune antibody (Figure S5A–C) and the competitive assay with the immunising peptide (Figure S5D–F).

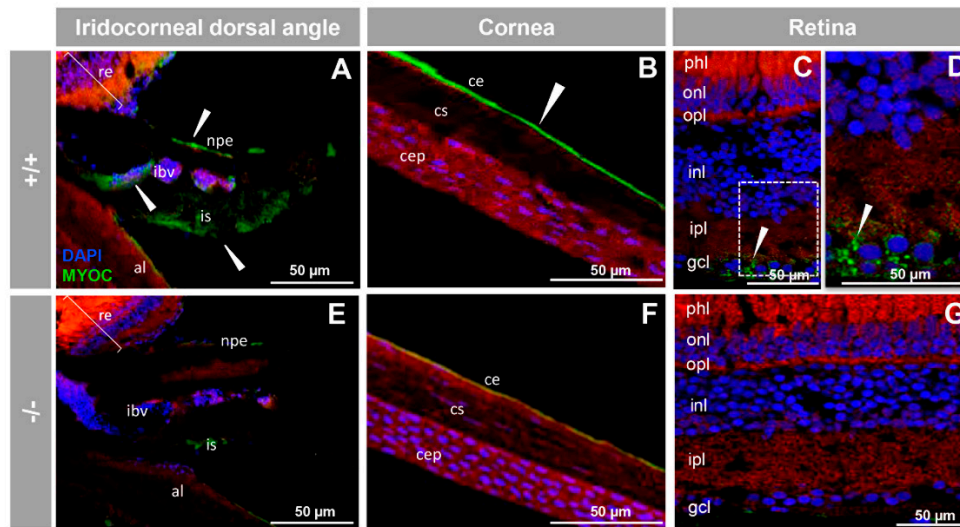


Figure 5. Immunohistochemistry of myocilin in ocular structures of adult zebrafish. Fluorescent immunohistochemistry of iridocorneal dorsal angle (A,E), cornea (B,F) and retina (C,D,G) sections (14 μ m) of wild-type and KO *myoc* adult zebrafish (7 months). Samples were incubated with an anti-myocilin primary antibody (TNT), followed by Cy2-conjugate goat anti-chicken IgY secondary antibody (green signals). The TNT antibody recognises the N-terminal part of myocilin protein. Expression is seen in the non-pigmented epithelium of the ciliary body and in the iris stroma and iris vessels (A), in the corneal endothelium (B), and in the ganglion cell layer in the retina (C,D) (arrowhead) in wild-type. Red signals correspond to tissue autofluorescence and blue signals correspond to DAPI nuclear staining. al: annular ligament. npe: non-pigmented ciliary epithelium; ibv: iris blood vessels; is: iris stroma. cep: corneal epithelium; cs: corneal stroma; ce: corneal endothelium glc: ganglion cell layer; ipl: inner plexiform layer; inl; inner nuclear layer; opl: outer plexiform layer; onl: outer nuclear layer; phl: photoreceptor layer. re: retina +/+ : wild-type; -/- : *myoc* KO. The negative controls are shown in Figure S4.

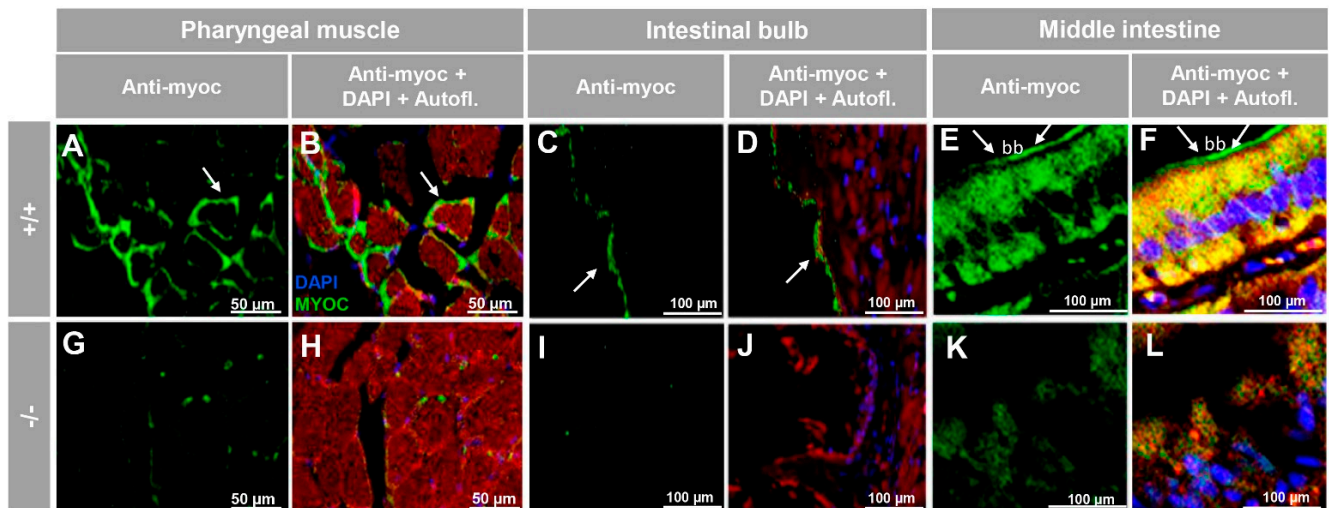


Figure 6. Immunohistochemistry of myocilin in non-ocular tissues of adult zebrafish. Wild-type and *myoc* KO adult (7 months) zebrafish tissue sections (14 μ m) were incubated with a chicken anti-myocilin (TNT) primary antibody and a Cy2-conjugate goat anti-chicken IgY secondary antibody. Arrows show immunostaining in the periphery of pharyngeal muscular fibres (A,B,G,H), the enterocyte apical side in the intestinal bulb (C,D,I,J) and in the brush border of the epithelial cells in the middle intestine (E,F,K,L). Red signals correspond to tissue autofluorescence. bb: brush border. The images are representative of the results observed in three tissue sections from three animals. +/+ : wild-type; -/- : *myoc* KO. Negative controls are shown in Figure S5.

For the reproductive system, positive immunolabeling was observed in the follicular epithelium of the ovary and cortical granules of vitellogenic oocytes (Figure 7A,B, yellow and white arrows, respectively), as well as likely in the seminiferous epithelium, but apparently not in sperm (Figure 7C,D). As will be described in the next section, the absence of $-/-$ females precluded their use as negative immunohistochemistry controls. However, the immunosignal was absent in the testis of $-/-$ animals (Figure 7E,F), and significantly reduced in tissue sections of ovaries that were either treated with the preimmune antibody (Figure 6A) or blocked with the antigenic peptide (Figure S6B), indicating that the immunolabeling is specific.

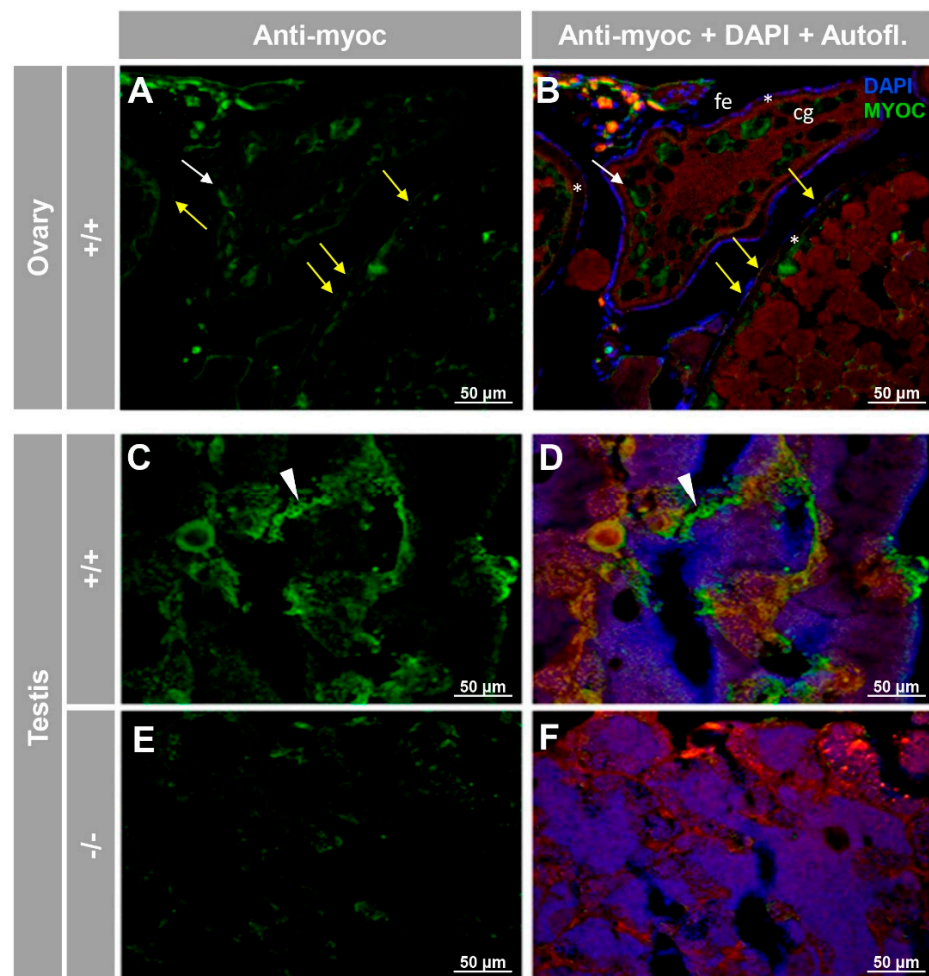


Figure 7. Immunohistochemical detection of myoc in the reproductive system of adult zebrafish. Tissue sections (14 μm) of adult (7 months) wild-type ovary (A,B) and testis (C,D) and KO *myoc* testis (E,F) were incubated with an anti-myocilin (TNT) primary antibody, followed by Cy2-conjugate goat anti-chicken IgY secondary antibody (green signals). Note that ovaries from $-/-$ animals were not available because of the absence of females with this genotype. White and yellow arrows indicate cortical granules and follicular epithelium-associated immunoreactivity, respectively. White arrowheads show immunolabeling in the seminiferous epithelium (C,D). Red signals correspond to tissue autofluorescence. The images are representative of the result observed in three tissue sections from three animals. $+/+$: wild-type; $-/-$: *myoc* KO. cg: cortical granules. fe: follicular epithelium. *: zona radiata. Negative controls are shown in Figure S6.

Because of the relationship between *myocilin* and glaucoma, the eyes were the principal focus of our phenotypic analysis. External morphological examination of both embryo (96 hpf) and adult (7 months) *myoc* KO zebrafish did not reveal any significant difference be-

tween the eyes and head of wild-type and KO zebrafish (Figure S7). Similarly, comparison of hematoxylin–eosin stained tissue sections between +/+ and -/- zebrafish embryos (96 hpf) showed no evident head (Figure S8A,C) or eye (Figure S8B,D) differences. The dorsal and ventral anterior segment structures of adult (7 months) -/- zebrafish were also similar to those of +/+ animals (Figure S9A,B), although, an apparently increased folding of the anterior retina was observed in mutant zebrafish (Figure S9D,E, arrow), compared to wild-type animals (Figure S9A,B). Finally, no gross alterations were observed in the retina of -/- zebrafish (Figure S9C,F). These data show that under our experimental conditions, *myoc* KO zebrafish are phenotypically indistinguishable from wild-type animals.

Throughout the breeding process we observed a consistent absence of females among -/- zebrafish. To confirm this observation, a total of eight different heterozygote sister-brother matings from three consecutive generations (F3 to F5) were performed. The offspring from each mating was raised to adulthood (3 months), genotyped using PAGE, and the male/female ratio corresponding to each genotype was calculated based on examination of multiple individual phenotypes including body shape and shape, coloration, and presence or absence of a genital papilla (Figure 8). We observed a significant decrease in female proportion associated with the KO genotype. *myoc* genotype was 41% of +/+ animals, whereas the percentage was reduced to 25% and 0% in +/- and -/- zebrafish, respectively (Figure 8A). This indicates that *myoc* might play a key role in sex determination in zebrafish. As a control, we evaluated the possible lethality that might be associated with the KO allele, the KO allele genotype and genotype proportions in the offspring of heterozygote heterozygotes. The genotype proportions did not differ significantly from the expected Mendelian 25%, 50%, and 25%, 25%, 50% (0.05) (Figure 8B) and survival at 24 and 96 hpf was similar to that of embryos that were obtained from wild-type progenitors ($p > 0.05$) (Figure 8C).

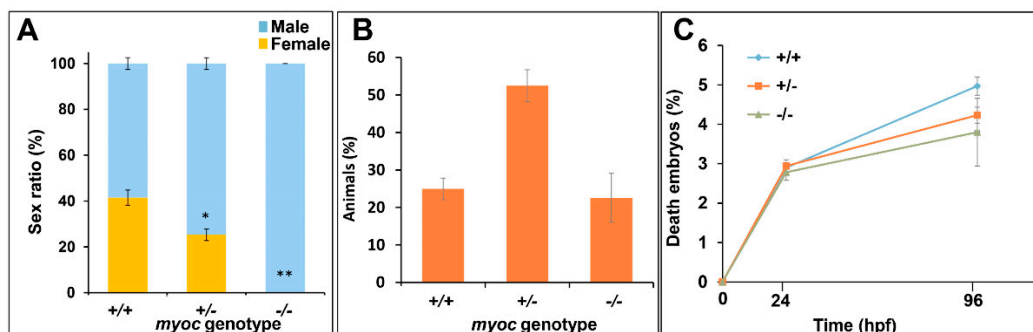


Figure 8. Absence of female in *myoc* KO zebrafish. Eight sibling sibs were mated and 30–35 embryos per cross were raised to adulthood and genotyped using PAGE. The sex ratio as a function of the *myoc* genotype was calculated (A). Observed genotype proportions (B) and embryo survival (C). Values are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Asterisks indicate statistical significance compared to +/+, $p = 0.00038$. ** $p = 0.00001$. +/+; wild-type; +/-; *myoc* KO.

These data show that there is not lethality associated with the KO genotype, ruling out that the sex proportion observed in KO animals is biased by sex-dependent lethality that is associated with a specific mutant *myoc* genotype. Moreover, 11 randomly selected -/- male siblings were mated with +/- females, and all of them fertilised eggs after spontaneous spawning, confirming the fertility and sex of these animals and ruling out errors in sex classification.

3.3. Histology and Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) of the Immature Gonad of the *Myoc* KO Zebrafish

Consecutive tissue sections were employed for immunohistochemical, and TUNEL analyses of the juvenile gonad of zebrafish gonad (28 dpf) in serial tissue sections from eight individuals (four +/+ and four -/-). Vasa immunostaining on tissue section one confirmed the presence of the juvenile gonad in the ventral side of the swim bladder and above the intestine of both +/+ (Figure 9A,B) and -/- (Figure 9E,F). Myocilin immunodetection on tissue section two revealed some positive cells in +/+ juvenile gonads (Figure 9C). At the same time, no immunostaining was observed in -/- juvenile gonads (Figure 9D).

tissue section one confirmed the presence of the juvenile gonad in the ventral side of the swim bladder and above the intestine of both $+/+$ (Figure 9A,B) and $-/-$ (Figure 9E,F). Myocilin immunodetection on tissue section two revealed some positive cells in $+/+$ juvenile gonads (Figure 9C, arrows). As expected, myocilin immunoreactivity was absent in $-/-$ gonadal tissue (Figure 9G), indicating that the signal was specific. Given that oocyte apoptosis participates in the mechanism of testicular and ovarian differentiation in the larval-juvenile zebrafish transition [51], we also investigated gonadal apoptosis in KO animals using a TUNEL assay on tissue section four. No positive cells were observed in none of the $+/+$ gonads obtained from four individuals (Figure 9D), indicating that they corresponded to juvenile females. In contrast, the germinal tissue of $-/-$ animals showed many TUNEL positive primordial germ-like cells, characterized by large and round nuclei (Figure 9H, arrows). Small nucleated cells that were located in the outer intestinal wall, were also positive for TUNEL staining (Figure 9H, arrowheads). The absence of labelling in the respective negative controls (tissue sections four to six) supported the specificity of the results (Figure S10A–C).

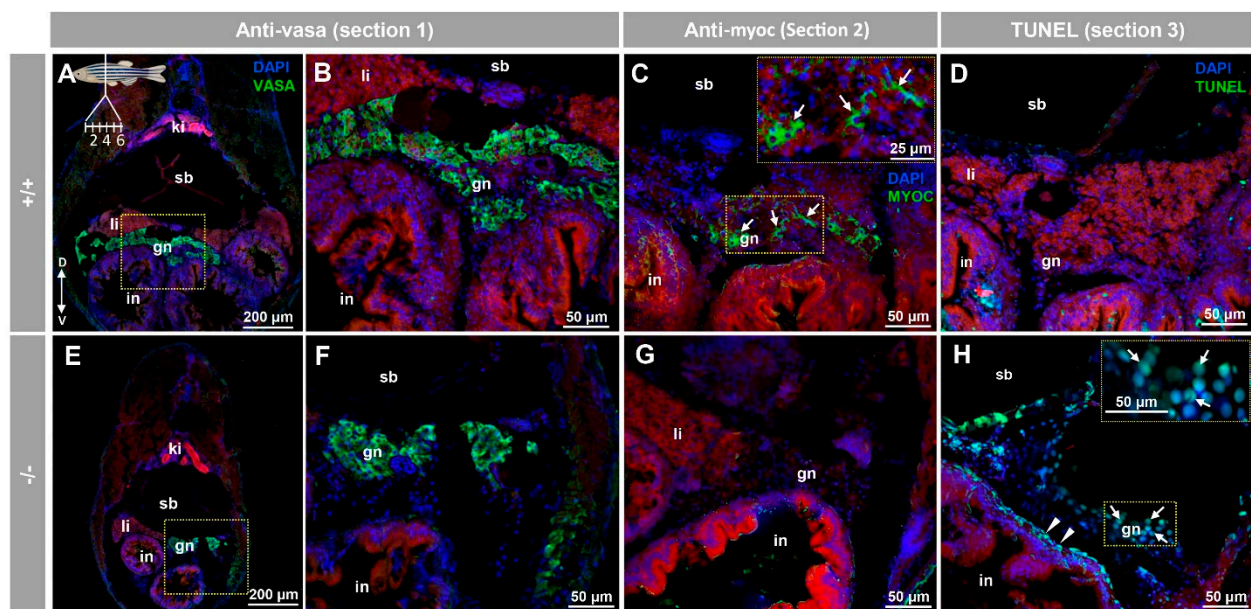


Figure 9. Myocilin expression and apoptosis analysis in the immature (28 dpf) gonad of zebrafish KO for *myoc*. Analyses were performed on three consecutive tissue sections (1 to 3, upper left insert in panel A). Vasa immunolabeling was carried out on section one (green, A,B,E,F). Areas indicated by yellow rectangles in (A,E) are magnified in (B,F), respectively. Tissue section two was incubated with an anti-myocilin (TNT) antibody (green signals) to localise myocilin expression (C,G). Apoptosis was assessed in tissue section three using terminal dUTP nick-end labeling (TUNEL) of fragmented DNA (D,H). Arrows in (C) indicate myocilin immunoreactivity. Arrows and arrowheads in H indicate TUNEL-positive cells in gonadal tissue and in the outer intestinal wall, respectively. Blue and red signals correspond to DAPI nuclear staining and tissue autofluorescence, respectively. gn: gonad. in: intestine. ki: kidney. li: liver. sb: swimbladder. The vertical double arrow in (A) indicate de dorsoventral axis (D: dorsal; V: ventral). The images are representative of the results observed in four fishes of each genotype. Negative controls of the juvenile gonad are shown in Figure S10 (tissue sections four to six).

Preliminary histological examination of the juvenile ovary-to-testis-transforming gonad (28 dpf) by hematoxylin-eosin staining did not show significant differences between wild type and KO zebrafish (data not shown), indicating that *myoc* LoF does not alter gonadal development at this stage. Further studies are required to confirm this observation.

3.4. Comparison of Transcriptomic Profiles of Adult Male $-/-$ and $+/+$ Zebrafish

To investigate differences in gene expression profiles associated with *myoc* LoF we performed comparative whole transcriptome sequencing of adult male *myoc* KO and adult

male wild-type zebrafish (2.5 months). Mutant and wild-type zebrafish siblings were obtained by inbreeding heterozygous F4 progenitors. To minimize the effect of individual variability, we pooled 3 fishes in each sample and two independent biological replicas of each experimental group were analysed.

A total of 10,168 genes with zero counts across all samples were excluded from the study, leaving 29,819 genes for further analysis (the transcriptomic analysis identified coding RNAs and multiple non-coding polyadenylated RNAs). The similarity between samples, evaluated using Pearson's coefficient, indicated that the replicas were similar (Figure S11). Hierarchical clustering analysis based on the criteria of fold change ≥ 2 and raw p -value < 0.05 for the comparison male KO vs. male wild-type of differentially expressed gene (DEG) patterns in the experimental replicas revealed similar clusters of DEGs between the two replicas of each experimental group, indicating that most identified gene expression patterns were reproducible (Figure S12).

We identified an average of 6184 genes significantly upregulated (fold change > 2 and raw $p < 0.05$) in the four comparisons (i.e., KO1 vs. WT1, KO1 vs. WT2, KO2 vs. WT1 and KO2 vs. WT2). Similarly, an average of 6023 genes were significantly down regulated (fold change < -2 and raw $p < 0.05$) in the four comparisons (Figure S13). Genes overrepresented in different biological processes, were identified by a KEGG enrichment analysis. We selected the top-20 regulated pathways that can be altered (absolute fold change > 2) in the absence of *myoc* activity (Figure S15). All pathways were significantly different in the four comparisons. Fourteen were metabolic related pathways and six pathways were related with genetic information processing (Figure S14).

We selected the top-50 down- (Figure 10A and Table S2) and upregulated (Figure 10B and Table S3) genes for further analyses. Complementary gene ontology functional enrichment analysis in the group of top-50 up-regulated genes using ShinyGO [48] showed significant DEGs in several categories including biosynthetic and catabolic processes and regulation of metabolic processes (Table S4), in accordance with the general KEGG analysis. In addition, categories such as developmental processes, anatomical structure development and reproduction were also significantly enriched in this group. On the other hand, the cluster of top-50 down regulated genes showed significant DEGs in categories mainly related with biosynthetic processes, reproduction, meiosis, SMAD signal transduction and cell cycle (Table S5). To validate the transcriptome results by qRT-PCR we selected the two most upregulated (*tuba7l* and *irg1l*) and the two most downregulated (*plpp4* and *grik3*). In addition, nine selected DEGs with absolute fold change values greater than 2.0, were also re-assessed by qRT-PCR. This group included five representative genes known to play key roles in zebrafish sexual differentiation (*dmrt1*, *amh*, *sycp3*, *cyp11a1* and *star*) and four Wnt genes that were also underexpressed in the *myoc* KO transcriptome (*dkk1a*, *lef1*, *ctnnbip1* and *dvl3a*). The Wnt genes were selected because of the role of Wnt signalling in zebrafish sex differentiation and the proposed role of myocilin as a Wnt modulator.

The qRT-PCR results (Figure 10C,D and Table S6) showed a good correlation with the transcriptome data and confirmed most expression differences, except that detected for *grik3* (Figure 10A,D and Table S6). The higher sensitivity of qRT-PCR compared with RNA-Seq and the technical differences between the two procedures may explain this discrepancy and the differences observed in absolute FC values between the two techniques. In addition, we found significant downregulated expression in the KO transcriptome of two additional relevant genes involved in these processes: *ctnnb2* (fold change: -3.6 ; p -value: 1.0×10^{-11}), which encodes beta-catenin 2, and *cyp19a1* (fold change: -18.1 ; p -value: 2.5×10^{-7}), that is proposed to be a key player in ovary differentiation [52]. As expected *myoc* expression was found significantly downregulated in the KO animals (fold change: -4.7 ; p -value: 1.2×10^{-18}).

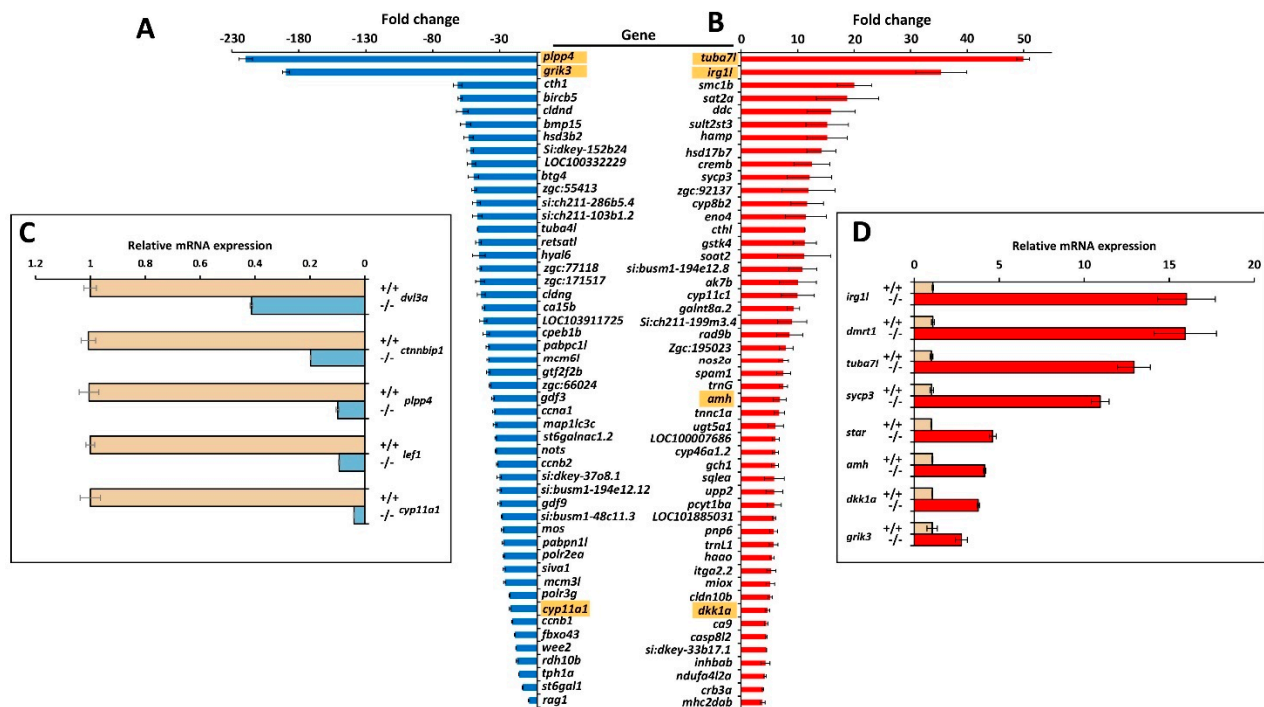


Figure 10. Top-50 DEGs in *myoc* KO male versus wild-type male zebrafish. Down- (A) and upregulated (B) genes identified by high throughput RNA sequencing with significant differences in the four comparisons (KO1 vs. WT1, KO1 vs. WT2, KO2 vs. WT1 and KO2 vs. WT2). The golden background indicates genes that were analysed by qRT-PCR. Confirmation by qRT-PCR of differential gene expression of selected down- (C) and upregulated (D) genes.

4. Discussion

Over the past two decades myocilin research has provided insight into the structure, expression and association with glaucoma of this protein. However, we still lack a clear understanding of its biological function and how mutant myocilin underlies glaucoma pathogenesis. Thus, these issues remain challenging scientific questions. To advance our knowledge on myocilin physiology, we generated a null *myoc* genotype in the zebrafish and assessed the resulting phenotypes. The obtained KO line is also a valuable control to investigate the specific histological localisation of myocilin by immunohistochemistry. The lack of well characterised anti-myocilin antibodies and suitable controls has hindered immunodetection of this protein and has provided controversial reports on myocilin expression. Our immunohistochemical analyses, which to the best of our knowledge, constitute the first report on myocilin expression in zebrafish, revealed the specific presence of myocilin in the eye and caudal muscles of zebrafish embryos (96 hpf). Myocilin was also detected in the secretory NPE cells of the adult zebrafish eye, mimicking the expression of the human gene [8,24]. These results also suggest that, similar to its human counterpart, the zebrafish protein may be secreted into the aqueous humour [10,11]. In addition, zebrafish myocilin was detected in the iris stroma, the corneal endothelium and the retinal ganglion cell layer, again resembling the localisation of the human protein [8]. However, and in contrast to humans, myocilin was almost undetectable in the zebrafish corneal epithelium [8]. Overall, parallels in myocilin expression between these two organisms indicate that zebrafish can be used as a model to study the role of myocilin in ocular physiology. In addition, myocilin expression was observed surrounding skeletal muscle cells in pharyngeal muscles, and intracellularly in epithelial cells of the middle intestine, with intense localisation in the brush border.

Consistent with our results, expression of myocilin at the mRNA level has been detected in the human skeletal muscle [6,53] and small intestine [54]. It is interesting that the myocilin-related protein olfactomedin-4, is present in intestinal stem cells and is apparently involved in mucosal defence [55]. These results suggest that myocilin, as a secreted protein, might play a role in the muscular and small intestinal extracellular matrix, although further work is required to reveal the role of myocilin in these tissues. The presence of myocilin in adult male and female gonads (i.e., follicular epithelium, cortical granules of vitellogenic oocytes, and seminiferous tubule cells) indicates that it may play a role in gamete production in zebrafish, which is a hitherto unsuspected function. In addition, the expression of myocilin in undifferentiated germinal tissue suggests that this protein may play a role in sex differentiation as will be discussed later.

Phenotype evaluation of the KO zebrafish showed neither gross macroscopic nor histological alterations in different organs that express *myoc*, such as the eye, skeletal muscle, brain, and digestive apparatus. These results indicate that *myoc* is not essential for normal body and tissue morphology, at least under normal conditions. Consistent with this conclusion, a previous report found that mouse *Myoc* is not required for either viability or for normal ocular morphology [56]. Moreover, and consistent with these results, it has been described that the homozygous premature termination codon p.(Arg46X) of human *MYOC*, a likely null variant, did not result in any identifiable pathogenic phenotype in a 77-year-old woman [57]. The apparently normal phenotype that is associated with *MYOC* LoF in different species, may result from a functional redundancy of other related gene products, which, at least under normal conditions, might balance the functional lack of myocilin in most *myoc*-expressing tissues. However, one striking finding of our study was the lack of KO female zebrafish, suggesting that this gene is required for female zebrafish sex determination. Known environmental factors that influence zebrafish sex, such as temperature, density, hormones, food and hypoxia [34], were controlled and homogeneous in our experimental crosses, making it highly unlikely that they biased the observed sex ratio. Moreover, none of the several *loci* identified in zebrafish that appeared to influence sex ratios in a strain-dependent manner [58–61], were located on the *myoc locus*, at chromosome 20. Thus, these data indicate that *myoc* may be a novel gene that is involved in zebrafish sex determination. This idea is supported by the expression of myocilin in the immature juvenile gonad (28 dpf). In addition, the fact that the absence of this protein in the KO zebrafish results in only males with normal testis, indicates that this protein is required for ovary differentiation, although the presence of myocilin in wild-type zebrafish does not block ovary development in all individuals, suggesting that additional factors might modulate the role of myocilin as a pro-female factor. Further studies, including detailed histological, immunohistochemical and gene expression analyses of both primordial germ cells and juvenile ovary-to-testis-transforming gonads are required to elucidate the mechanism underlying myocilin's role in gonad differentiation.

To characterize the KO phenotype at the gene expression level we performed a transcriptomic analysis, which revealed many DEGs, indicating the existence of marked differences between adult males, associated with the *myoc* KO genotype. The top-20 significant KEGG pathways were grouped into two broad functional categories, metabolic and genetic information processing-related. This likely identifies broad molecular processes involved in the male-biased sex ratio observed in the KO animals. Interestingly, detailed functional enrichment evaluation, focused on the top-50-up and -down DEGs, identified significant categories related with reproduction, meiosis, anatomical structure and development, indicating that these processes participate in the male-biased proportion associated with the null *myoc* genotype. Alpha-tubulin genes *tuba7l* and *tuba4l* were the most over- and under-expressed genes in *myoc* KO males, respectively. In accordance with our results, *tuba7l* is overrepresented in testes of sexually mature zebrafish [62] while *tuba4l* is the most downregulated gene in male gonads of zebrafish masculinized by treatment with high temperature [62,63].

Interestingly, we identified several highly DEGs in male zebrafish *myoc* KO that play key roles in male sexual differentiation, including *dmrt1*, *amh*, *sycp3*, *cyp11a1*, *cyp11c1* and *star*. *Dmrt1* regulates *amh* and *foxl2* and is necessary for zebrafish male sexual development [64]. The *amh* gene encodes the anti-Müllerian hormone, a member of the TGF-beta superfamily of growth factors. This hormone is upregulated in testis of sexually mature zebrafish [62] and promotes male development, although is not essential for this process [65]. *Sycp* is a pro-male gene, and a spermatocyte marker for meiotic cells [66]. *Cyp11a1* and *star* are two steroidogenic genes encoding rate limiting steps in steroid biogenesis androgen production [67,68]. In addition, *cyp11c1* is required for juvenile ovary-to-testis transition, Leydig cell development, and spermatogenesis in males because it participates in the synthesis of the major natural androgen in teleost fish (11-ketotestosterone) [69,70]. In accordance with our results, some of these genes have also been described to be upregulated (*dmrt1*, *amh*, *sycp3*, *cyp11c1* and *star*) or downregulated (*cyp11a1*) in male gonads of zebrafish masculinized by treatment with elevated water temperature (35 °C) [63]. Overall, these data reveal that *myoc* LoF results in over-expression of genes required for male development.

Remarkably, and in accordance with the role of the canonical Wnt/beta-catenin signalling as a pro-female pathway [38], we found that several Wnt signalling genes (*dvl3a*, *lef1*, *ctnnb2* and *ctnnbip1*) were under-expressed in KO male zebrafish. *Dvl3a* gene product is required for activation of zygotic Wnt/beta-catenin signalling and the Wnt/planar cell polarity pathway [71]. The transcription factor *lef1* associates with beta-catenin to activate gene expression [72] and *ctnnb2* encodes beta-catenin 2, which is the key transcription factor of this signalling pathway. Under-expression of *ctnnbip1*, a repressor of beta-catenin-TCF-4-mediated transactivation [73], might contribute to balance Wnt pathway attenuation, although the actual meaning of this expression change remains to be investigated. In addition, the Wnt secreted inhibitor *dkk1a* [74] was overexpressed, which may contribute to Wnt signalling depression. In accordance with our results, it has been reported that myocilin modulates the Wnt signalling pathway [29,30] and that it interacts with two secreted inhibitors of Wnt signalling (Frizzled-related proteins 1 and 3), and with various Frizzled receptors (Fzd1, Fzd7 and Fzd10) [29]. On the other hand, inhibition of Wnt/beta-catenin signalling results in an increased proportion of zebrafish males and downregulated expression of *cyp19a1a* and *lef1* genes [38]. Overall, these data support that *myoc* LoF downregulates the Wnt signalling pro-female pathway [38,75], inhibiting ovary differentiation and leading to testis formation. Moreover, it is known that beta-catenin is an essential transcriptional regulator of aromatase [76], a gene proposed to play a key role in directing ovarian differentiation and development [52]. In accordance with this fact, *cyp19a1* was also under-expressed in the KO zebrafish transcriptome. Therefore, decreased expression of both the Wnt signalling pathway and aromatase (*cyp19a1*) associated with myocilin LoF may block ovary differentiation of the juvenile zebrafish gonad, leading to testis development. Wnt signalling also plays a role in sex determination in other teleosts [77,78] and mammals [79], thus the possible role of myocilin in mammal and human sex determination remains to be investigated.

5. Conclusions

Our results show that the established *myoc* KO zebrafish line is a useful model to investigate the elusive function of this protein, mainly known for its association with glaucoma. In addition, this study provides evidence for a previously unsuspected role of myocilin as a novel protein required for ovary differentiation associated with downregulated gene expression of the Wnt signalling pathway.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/2/98/s1>, Figure S1: title, Table S1: title, Video S1: title. Table S1: Primers sequences used in RT-qPCR; Table S2: Top-50 downregulated genes identified by the transcriptomic study in the four comparisons (KO1 vs. WT1, KO1 vs. WT2, KO2 vs. WT1 and KO2 vs. WT2); Table S3: Top-50 upregulated genes identified by the transcriptomic study in the four comparisons (KO1 vs. WT1,

KO1 vs. WT2, KO2 vs. WT1 and KO2 vs. WT2); Table S4: ShinyGO ontological analysis of the top-50 upregulated genes in the transcriptomic study; Table S5: Ontological analysis of the top-50 downregulated genes in the transcriptomic study; Table S6. Confirmation by qPCR of selected DEGs identified in the transcriptome analysis; Figure S1: Conservation of gene structure and protein domain organization of human and zebrafish myocilin; Figure S2: Amino acid sequence comparison of Human and Zebrafish myocilin; Figure S3: Negative controls of fluorescent whole-mount immunohistochemistry of myoc in wild-type zebrafish embryos (96hpf) shown in Figure 2A–C, Figure 3A–C and Figure 4A–C; Figure S4: Negative controls of the immunohistochemical myoc analysis in the adult (7 months) wild-type zebrafish eye shown in Figure 5; Figure S5: Negative controls of the Immunohistochemistry of myocilin in non-ocular tissues of adult wild-type zebrafish shown in Figure 6A–F; Figure S6: Negative control of the Immunohistochemistry of myocilin in the ovary of adult wild-type zebrafish shown in Figure 7A,B; Figure S7: Head and eye macroscopic phenotypes in mutant myoc embryo and adult zebrafish; Figure S8: Microscopic head and eye phenotypes in mutant myoc zebrafish embryos (96 hpf); Figure S9: Histology of ocular anterior segment and retina from adult mutant myoc zebrafish; Figure S10: Negative controls of immunohistochemistry and TUNEL assay of the immature (28 dpf) zebrafish gonad shown in Figure 9; Figure S11: Correlation matrix showing the similarity between RNAseq replicas (male myoc KO vs. male wild type); Figure S12: Heatmap of hierarchical clustering analysis of significant DEG and replicas (male myoc KO vs. male wild type); Figure S13: Number of significant up and down regulated genes based on fold change of comparison pairs (male myoc KO vs. male wild type); Figure S14: Top-20 KEGG pathways differentially expressed in myoc knockout male zebrafish in the four comparisons (KO1 vs. WT1, KO1 vs. WT2, KO2 vs. WT1 and KO2 vs. WT2). Video S1: Two-dimensional confocal image z-stacks corresponding to whole-mount immunohistochemical detection of myocilin in the eye of 96 hpf-wild-type zebrafish embryos shown in Figure 2; Video S2: Two-dimensional confocal image z-stacks corresponding to whole-mount immunohistochemical detection of myocilin in the yolk of 96 hpf-wild-type zebrafish embryos shown in Figure 3.

Author Contributions: Conceptualization, J.E., J.-D.A.-A. and J.-J.F.-F.; methodology, R.A.-A., J.-D.A.-A., S.A.-M., J.-J.F.-F., J.-M.B.-F., and M.-J.C.-V.; formal analysis, R.A.-A., J.-D.A.-A. and J.E.; investigation, R.A.-A., J.-D.A.-A. and J.E.; resources, J.-D.A.-A. and J.E.; writing—original draft preparation, J.E.; writing—review and editing, R.A.-A., J.-D.A.-A. and J.E.; supervision, J.-D.A.-A. and J.E.; project administration, M.-J.C.-V. and J.E.; funding acquisition, J.-D.A.-A. and J.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by research grants from the “Instituto de Salud Carlos III/ European Regional Development Fund (ERDF)” (PI15/01193, PI19/00208 and RD16/0008/0019, OFTARED), the Regional Ministry of Science and Technology of the Board of the Communities of “Castilla-La Mancha” (SBPLY/17/180501/000404; <http://www.educa.jccm.es/idiuniv/es>) and research funds from Universidad de Castilla-La Mancha (2019-GRIN-26945). SA-M was sponsored by the Regional Ministry of Science and Technology of the Board of the Communities of “Castilla-La Mancha” (PREJCCM2016/28).

Institutional Review Board Statement: All animal husbandry and experiments were approved by the Institutional Animal Research Committee of the University of Castilla-La Mancha (approval number PR-2015-04-10). All zebrafish experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations set forth by the Institutional Animal Research Committee of the University of Castilla-La Mancha.

Informed Consent Statement: Not applicable.

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

Acknowledgments: We would like to thank José-Ramón Marín-Tebar for excellent microscopy technical assistance and American Manuscript Editors for English proofreading.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Stone, E.M.; Fingert, J.H.; Alward, W.L.M.; Nguyen, T.D.; Polansky, J.R.; Sunden, S.L.F.; Nishimura, D.; Clark, A.F.; Nystuen, A.; Nichols, B.E.; et al. Identification of a Gene That Causes Primary Open Angle Glaucoma. *Science* **1997**, *275*, 668–670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Quigley, H.A. Ganglion cell death in glaucoma: Pathology recapitulates ontogeny. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* **1995**, *23*, 85–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Polansky, J.R.; Fauss, D.J.; Chen, P.; Chen, H.; Lütjen-Drecoll, E.; Johnson, D.; Kurtz, R.M.; Ma, Z.-D.; Bloom, E.; Nguyen, T.D. Cellular Pharmacology and molecular Biology of the Trabecular Meshwork Inducible glucocorticoid Response Gene Product. *Ophthalmologica* **1997**, *211*, 126–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kubota, R.; Noda, S.; Wang, Y.; Minoshima, S.; Asakawa, S.; Kudoh, J.; Mashima, Y.; Oguchi, Y.; Shimizu, N. A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: Molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics* **1997**, *41*, 360–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Escribano, J.; Ortego, J.; Coca-Prados, M. Isolation and Characterization of Cell-Specific cDNA Clones from a Subtractive Library of the Ocular Ciliary Body of a Single Normal Human Donor: Transcription and Synthesis of Plasma Proteins. *J. Biochem.* **1995**, *118*, 921–931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ortego, J.; Escribano, J.; Coca-Prados, M. Cloning and characterization of subtracted cDNAs from a human ciliary body library encoding TIGR, a protein involved in juvenile open angle glaucoma with homology to myosin and olfactomedin. *FEBS Lett.* **1997**, *413*, 349–353. [[CrossRef](#)]
7. Huang, W.; Jaroszewski, J.; Ortego, J.; Escribano, J.; Coca-Prados, M. Expression of the TIGR gene in the iris, ciliary body, and trabecular meshwork of the human eye. *Ophthalmic Genet.* **2000**, *21*, 155–169. [[CrossRef](#)]
8. Karali, A.; Russell, P.; Stefani, F.H.; Tamm, E.R. Localization of myocilin/trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response protein in the human eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41*, 729–740.
9. Ezzat, M.-K.; Howell, K.G.; Bahler, C.K.; Beito, T.G.; Loewen, N.A.; Poeschla, E.M.; Fautsch, M.P. Characterization of monoclonal antibodies against the glaucoma-associated protein myocilin. *Exp. Eye Res.* **2008**, *87*, 376–384. [[CrossRef](#)]
10. Russell, P.; Tamm, E.R.; Grehn, F.J.; Picht, G.; Johnson, M. The presence and properties of myocilin in the aqueous humor. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42*, 983–986.
11. Aroca-Aguilar, J.D.; Sánchez-Sánchez, F.; Ghosh, S.; Coca-Prados, M.; Escribano, J. Myocilin Mutations Causing Glaucoma Inhibit the Intracellular Endoproteolytic Cleavage of Myocilin between Amino Acids Arg²²⁶ and Ile²²⁷. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 21043–21051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Fautsch, M.P.; Johnson, D.H. Characterization of myocilin-myocilin interactions. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42*, 2324–2331.
13. Fautsch, M.P.; Vrabel, A.M.; Peterson, S.L.; Johnson, D.H. In vitro and in vivo characterization of disulfide bond use in myocilin complex formation. *Mol. Vis.* **2004**, *10*, 417–425. [[PubMed](#)]
14. Aroca-Aguilar, J.-D.; Fernández-Navarro, A.; Ontañón, J.; Coca-Prados, M.; Escribano, J. Identification of myocilin as a blood plasma protein and analysis of its role in leukocyte adhesion to endothelial cell monolayers. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0209364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hardy, K.M.; Hoffman, E.A.; Gonzalez, P.; McKay, B.S.; Stamer, W.D. Extracellular Trafficking of Myocilin in Human Trabecular Meshwork Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28917–28926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hoffman, E.A.; Perkumas, K.M.; Highstrom, L.M.; Stamer, W.D. Regulation of Myocilin-Associated Exosome Release from Human Trabecular Meshwork Cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2009**, *50*, 1313–1318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Gobeil, S.; Letartre, L.; Raymond, V. Functional analysis of the glaucoma-causing TIGR/myocilin protein: Integrity of amino-terminal coiled-coil regions and olfactomedin homology domain is essential for extracellular adhesion and secretion. *Exp. Eye Res.* **2006**, *82*, 1017–1029. [[CrossRef](#)]
18. Stamer, W.D.; Perkumas, K.M.; Hoffman, E.A.; Roberts, B.C.; Epstein, D.L.; McKay, B.S. Coiled-coil targeting of myocilin to intracellular membranes. *Exp. Eye Res.* **2006**, *83*, 1386–1395. [[CrossRef](#)]
19. Sánchez-Sánchez, F.; Martínez-Redondo, F.; Aroca-Aguilar, J.D.; Coca-Prados, M.; Escribano, J. Characterization of the Intracellular Proteolytic Cleavage of Myocilin and Identification of Calpain II as a Myocilin-processing Protease. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 27810–27824. [[CrossRef](#)]
20. Anholt, R.R.H. Olfactomedin proteins: Central players in development and disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **2014**, *2*, 6. [[CrossRef](#)]
21. Donegan, R.K.; Hill, S.E.; Freeman, D.M.; Nguyen, E.; Orwig, S.D.; Turnage, K.C.; Lieberman, R.L. Structural basis for misfolding in myocilin-associated glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 2111–2124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hill, S.E.; Nguyen, E.; Donegan, R.K.; Patterson-Orazem, A.C.; Hazel, A.; Gumbart, J.C.; Lieberman, R.L. Structure and Misfolding of the Flexible Tripartite Coiled-Coil Domain of Glaucoma-Associated Myocilin. *Structure* **2017**, *25*, 1697–1707.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Aroca-Aguilar, J.-D.; Martínez-Redondo, F.; Sánchez-Sánchez, F.; Coca-Prados, M.; Escribano, J. Functional Role of Proteolytic Processing of Recombinant Myocilin in Self-Aggregation. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2010**, *51*, 72–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Aroca-Aguilar, J.-D.; Sánchez-Sánchez, F.; Ghosh, S.; Fernández-Navarro, A.; Coca-Prados, M.; Escribano, J. Interaction of Recombinant Myocilin with the Matricellular Protein SPARC: Functional Implications. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 179–189. [[CrossRef](#)]

25. Furutani, Y.; Manabe, R.-I.; Tsutsui, K.; Yamada, T.; Sugimoto, N.; Fukuda, S.; Kawai, J.; Sugiura, N.; Kimata, K.; Hayashizaki, Y.; et al. Identification and characterization of photomedins: Novel olfactomedin-domain-containing proteins with chondroitin sulphate-E-binding activity. *Biochem. J.* **2005**, *389*, 675–684. [[CrossRef](#)]
26. Maertens, B.; Hopkins, D.; Franzke, C.-W.; Keene, D.R.; Bruckner-Tuderman, L.; Greenspan, D.S.; Koch, M. Cleavage and Oligomerization of Gliomedin, a Transmembrane Collagen Required for Node of Ranvier Formation. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 10647–10659. [[CrossRef](#)]
27. Volynski, K.E.; Silva, J.P.; Lelianaova, V.G.; Atiqur Rahman, M.; Hopkins, C.; Ushkaryov, Y.A. Latrophilin fragments behave as independent proteins that associate and signal on binding of LTX(N4C). *EMBO J.* **2004**, *23*, 4423–4433. [[CrossRef](#)]
28. Aroca-Aguilar, J.-D.; Martínez-Redondo, F.; Martín-Gil, A.; Pintor, J.; Coca-Prados, M.; Escribano, J. Bicarbonate-Dependent Secretion and Proteolytic Processing of Recombinant Myocilin. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54385. [[CrossRef](#)]
29. Kwon, H.-S.; Lee, H.-S.; Ji, Y.; Rubin, J.S.; Tomarev, S.I. Myocilin Is a Modulator of Wnt Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 2139–2154. [[CrossRef](#)]
30. Shen, X.; Ying, H.; Yue, B.Y.J.T. Wnt Activation by Wild Type and Mutant Myocilin in Cultured Human Trabecular Meshwork Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44902. [[CrossRef](#)]
31. Wentz-Hunter, K.; Kubota, R.; Shen, X.; Yue, B.Y. Extracellular myocilin affects activity of human trabecular meshwork cells. *J. Cell. Physiol.* **2004**, *200*, 45–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wentz-Hunter, K.; Shen, X.; Okazaki, K.; Tanihara, H.; Yue, B.Y. Overexpression of myocilin in cultured human trabecular meshwork cells. *Exp. Cell Res.* **2004**, *297*, 39–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wilson, C.A.; High, S.K.; McCluskey, B.M.; Amores, A.; Yan, Y.-L.; Titus, T.A.; Anderson, J.L.; Batzel, P.; Carvan, M.J.; Scharfl, M.; et al. Wild Sex in Zebrafish: Loss of the Natural Sex Determinant in Domesticated Strains. *Genetics* **2014**, *198*, 1291–1308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Santos, D.; Luzio, A.; Coimbra, A.M. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. *Aquat. Toxicol.* **2017**, *191*, 141–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Leerberg, D.M.; Sano, K.; Draper, B.W. Fibroblast growth factor signaling is required for early somatic gonad development in zebrafish. *PLoS Genet.* **2017**, *13*, e1006993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rodríguez-Marí, A.; Yan, Y.-L.; BreMiller, R.A.; Wilson, C.; Cañestro, C.; Postlethwait, J.H. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (amh) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expr. Patterns* **2005**, *5*, 655–667. [[CrossRef](#)]
37. Wang, X.G.; Bartfai, R.; Sleptsova-Freidrich, I.; Orban, L. The timing and extent of ‘juvenile ovary’ phase are highly variable during zebrafish testis differentiation. *J. Fish Biol.* **2007**, *70*, 33–44. [[CrossRef](#)]
38. Sreenivasan, R.; Jiang, J.; Wang, X.; Bartfai, R.; Kwan, H.Y.; Christoffels, A.; Orbán, L. Gonad Differentiation in Zebrafish Is Regulated by the Canonical Wnt Signaling Pathway. *Biol. Reprod.* **2014**, *90*, 45. [[CrossRef](#)]
39. Monte, W. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 5th ed.; University of Oregon Press: Eugene, OR, USA, 2013.
40. Meeker, N.D.; Hutchinson, S.A.; Ho, L.; Trede, N.S. Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *Biotechniques* **2007**, *43*, 610, 612, 614. [[CrossRef](#)]
41. Morales-Cámara, S.; Alexandre-Moreno, S.; Bonet-Fernández, J.-M.; Atienzar-Aroca, R.; Aroca-Aguilar, J.-D.; Ferre-Fernández, J.-J.; Mendez, C.D.; Morales, L.; Fernández-Sánchez, L.; Cuenca, N.; et al. Role of GUCA1C in Primary Congenital Glaucoma and in the Retina: Functional Evaluation in Zebrafish. *Genes* **2020**, *11*, 550. [[CrossRef](#)]
42. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ferre-Fernández, J.-J.; Aroca-Aguilar, J.-D.; Medina-Trillo, C.; Bonet-Fernández, J.-M.; Méndez-Hernández, C.D.; Morales-Fernández, L.; Corton, M.; Cabañero-Valera, M.-J.; Gut, M.; Tonda, R.; et al. Whole-Exome Sequencing of Congenital Glaucoma Patients Reveals Hypermorphic Variants in GPATCH3, a New Gene Involved in Ocular and Craniofacial Development. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bonet-Fernández, J.-M.; Aroca-Aguilar, J.-D.; Corton, M.; Ramírez, A.-I.; Alexandre-Moreno, S.; García-Antón, M.-T.; Salazar, J.-J.; Ferre-Fernández, J.-J.; Atienzar-Aroca, R.; Villaverde, C.; et al. CPAMD8 loss-of-function underlies non-dominant congenital glaucoma with variable anterior segment dysgenesis and abnormal extracellular matrix. *Hum. Genet.* **2020**, *139*, 1209–1231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ye, D.; Zhu, L.; Zhang, Q.; Xiong, F.; Wang, H.; Wang, X.; He, M.; Zhu, Z.; Sun, Y. Abundance of Early Embryonic Primordial Germ Cells Promotes Zebrafish Female Differentiation as Revealed by Lifetime Labeling of Germline. *Mar. Biotechnol.* **2019**, *21*, 217–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kim, D.; Langmead, B.; Salzberg, S.L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 357–360. [[CrossRef](#)]
48. Ge, S.X.; Jung, D.; Yao, R. ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 2628–2629. [[CrossRef](#)]
49. Brogna, S.; Wen, J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 107–113. [[CrossRef](#)]

50. Parichy, D.M.; Elizondo, M.R.; Mills, M.G.; Gordon, T.N.; Engeszer, R.E. Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev. Dyn.* **2009**, *238*, 2975–3015. [[CrossRef](#)]
51. Uchida, D.; Yamashita, M.; Kitano, T.; Iguchi, T. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J. Exp. Biol.* **2002**, *205*, 711–718.
52. Lau, E.S.-W.; Zhang, Z.; Qin, M.; Ge, W. Knockout of Zebrafish Ovarian Aromatase Gene (cyp19a1a) by TALEN and CRISPR/Cas9 Leads to All-male Offspring Due to Failed Ovarian Differentiation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Nguyen, T.D.; Chen, P.; Huang, W.D.; Chen, H.; Johnson, D.; Polansky, J.R. Gene Structure and Properties of TIGR, an Olfactomedin-related Glycoprotein Cloned from Glucocorticoid-induced Trabecular Meshwork Cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 6341–6350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Fingert, J.H.; Ying, L.; Swiderski, R.E.; Nystuen, A.M.; Arbour, N.C.; Alward, W.L.; Sheffield, V.C.; Stone, E.M. Characterization and comparison of the human and mouse GLC1A glaucoma genes. *Genome Res.* **1998**, *8*, 377–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Liu, W.; Yan, M.; Liu, Y.; Wang, R.; Li, C.; Deng, C.; Singh, A.; Coleman, W.G.; Rodgers, G.P. Olfactomedin 4 down-regulates innate immunity against *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11056–11061. [[CrossRef](#)]
56. Kim, B.S.; Savinova, O.V.; Reedy, M.V.; Martin, J.; Lun, Y.; Gan, L.; Smith, R.S.; Tomarev, S.I.; John, S.W.M.; Johnson, R.L. Targeted Disruption of the Myocilin Gene (Myoc) Suggests that Human Glaucoma-Causing Mutations Are Gain of Function. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 7707–7713. [[CrossRef](#)]
57. Lam, D.S.; Leung, Y.F.; Chua, J.K.; Baum, L.; Fan, D.S.; Choy, K.W.; Pang, C.P. Truncations in the TIGR gene in individuals with and without primary open-angle glaucoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41*, 1386–1391.
58. Bradley, K.M.; Breyer, J.P.; Melville, D.B.; Broman, K.W.; Knapik, E.W.; Smith, J.R. An SNP-Based Linkage Map for Zebrafish Reveals Sex Determination Loci. *G3* **2011**, *1*, 3–9. [[CrossRef](#)]
59. Anderson, J.L.; Mari, A.R.; Braasch, I.; Amores, Á.; Hohenlohe, P.; Batzel, P.; Postlethwait, J.H. Multiple Sex-Associated Regions and a Putative Sex Chromosome in Zebrafish Revealed by RAD Mapping and Population Genomics. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40701. [[CrossRef](#)]
60. Liew, W.C.; Bartfai, R.; Lim, Z.; Sreenivasan, R.; Siegfried, K.R.; Orbán, L. Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34397. [[CrossRef](#)]
61. Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J.E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **2013**, *496*, 498–503. [[CrossRef](#)]
62. Santos, E.M.; Workman, V.L.; Paull, G.C.; Filby, A.L.; Van Look, K.J.W.; Kille, P.; Tyler, C.R. Molecular basis of sex and reproductive status in breeding zebrafish. *Physiol. Genom.* **2007**, *30*, 111–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Hosseini, S.; Ha, N.-T.; Simianer, H.; Falker-Gieske, C.; Brenig, B.; Franke, A.; Hörstgen-Schwark, G.; Tetens, J.; Herzog, S.; Sharifi, A.R. Genetic mechanism underlying sexual plasticity and its association with colour patterning in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Genom.* **2019**, *20*, 341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Webster, K.A.; Schach, U.; Ordaz, A.; Steinfeld, J.S.; Draper, B.W.; Siegfried, K.R. Dmrt1 is necessary for male sexual development in zebrafish. *Dev. Biol.* **2017**, *422*, 33–46. [[CrossRef](#)]
65. Yan, Y.-L.; Batzel, P.; Titus, T.; Sydes, J.; Desvignes, T.; BreMiller, R.; Draper, B.W.; Postlethwait, J.H. A Hormone That Lost Its Receptor: Anti-Müllerian Hormone (AMH) in Zebrafish Gonad Development and Sex Determination. *Genetics* **2019**, *213*, 529–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ozaki, Y.; Saito, K.; Shinya, M.; Kawasaki, T.; Sakai, N. Evaluation of Sycp3, Plzf and Cyclin B3 expression and suitability as spermatogonia and spermatocyte markers in zebrafish. *Gene Expr. Patterns* **2011**, *11*, 309–315. [[CrossRef](#)]
67. Miller, W.L. Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endocr. Rev.* **1988**, *9*, 295–318. [[CrossRef](#)]
68. Clark, B.J.; Wells, J.; King, S.R.; Stocco, D.M. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 28314–28322. [[CrossRef](#)]
69. Zhang, Q.; Ye, D.; Wang, H.; Wang, Y.; Hu, W.; Sun, Y. Zebrafish cyp11c1 Knockout Reveals the Roles of 11-ketotestosterone and Cortisol in Sexual Development and Reproduction. *Endocrinology* **2020**, *161*, 161. [[CrossRef](#)]
70. Borg, B. Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1994**, *109*, 219–245. [[CrossRef](#)]
71. Xing, Y.-Y.; Cheng, X.-N.; Li, Y.-L.; Zhang, C.; Saquet, A.; Liu, Y.-Y.; Shao, M.; Shi, D.-L. Mutational analysis of dishevelled genes in zebrafish reveals distinct functions in embryonic patterning and gastrulation cell movements. *PLoS Genet.* **2018**, *14*, e1007551. [[CrossRef](#)]
72. Cadigan, K.M.; Waterman, M.L. TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a007906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Tago, K.; Nakamura, T.; Nishita, M.; Hyodo, J.; Nagai, S.; Murata, Y.; Adachi, S.; Ohwada, S.; Morishita, Y.; Shibuya, H.; et al. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel β -catenin-interacting protein. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 1741–1749. [[PubMed](#)]
74. Krupnik, V.E.; Sharp, J.D.; Jiang, C.; Robison, K.; Chickering, T.W.; Amaravadi, L.; Brown, D.E.; Guyot, D.; Mays, G.; Leiby, K.; et al. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* **1999**, *238*, 301–313. [[CrossRef](#)]
75. Kossack, M.E.; High, S.K.; Hopton, R.E.; Yan, Y.-L.; Postlethwait, J.H.; Draper, B.W. Female Sex Development and Reproductive Duct Formation Depend on Wnt4a in Zebrafish. *Genetics* **2019**, *211*, 219–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

76. Parakh, T.N.; Hernandez, J.A.; Grammer, J.C.; Weck, J.; Hunzicker-Dunn, M.; Zeleznik, A.J.; Nilson, J.H. Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires beta-catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12435–12440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Nicol, B.; Guiguen, Y. Expression profiling of Wnt signaling genes during gonadal differentiation and gametogenesis in rainbow trout. *Sex. Dev.* **2011**, *5*, 318–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Amberg, J.J.; Goforth, R.R.; Sepúlveda, M.S. Antagonists to the Wnt Cascade Exhibit Sex-Specific Expression in Gonads of Sexually Mature Shovelnose Sturgeon. *Sex. Dev.* **2013**, *7*, 308–315. [[CrossRef](#)]
79. Vainio, S.; Heikkilä, M.; Kispert, A.; Chin, N.; McMahon, A.P. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* **1999**, *397*, 405–409. [[CrossRef](#)]

Transgenic overexpression of myocilin leads to variable ocular anterior segment and retinal alterations associated with extracellular matrix abnormalities in adult zebrafish

Raquel Atienzar-Aroca¹, Jesús-José Ferre-Fernández¹, Ángel Tevar¹, Juan-Manuel Bonet-Fernández^{1, 2}, María-José Cabañero^{1, 2}, María-José Ruiz-Pastor^{3, 2}, Nicolás Cuenca^{3, 2}, José-Daniel Aroca-Aguilar^{1, 2}, Julio Escribano^{1, 2*}

¹Área de Genética, Facultad de Medicina de Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain, ²Cooperative Research Network on Age-Related Ocular Pathology, Visual and Life Quality (OFTARED), Instituto de Salud Carlos III, Spain, ³Department of Physiology, Genetics and Microbiology, University of Alicante, Spain

Submitted to Journal:
Frontiers in Cell and Developmental Biology

Specialty Section:
Molecular and Cellular Pathology

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
923742

Received on:
19 Apr 2022

Revised on:
13 May 2022

Journal website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

J.E. and J.-D.A.-A. conceived and designed the study. R.A.-A., J.-D.A.-A., A.T., J.-J.F.-F., J.-M.B.-F. M.-J.C.-V, M.-J.R.-P., and N.C. performed the analyses. J.E. wrote the manuscript. J.E. supervised the study. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Keywords

myocilin, MYOC, Zebrafish, transgenic myoc, anterior segment alterations, Retinal Dysplasia

Abstract

Word count: 239

Myocilin is an enigmatic glaucoma-associated glycoprotein whose biological role remains incompletely understood. To gain novel insight into its normal function, we used transposon-mediated transgenesis to generate the first zebrafish line stably overexpressing myocilin [Tg(actb1:myoc-2A-mCherry)]. qPCR showed an approximately four-fold increased myocilin expression in transgenic zebrafish embryos (144 hpf). Adult (13 months old) transgenic animals displayed variable and age-dependent ocular anterior segment alterations. Almost 60% of two-years old male, but not female, transgenic zebrafish developed enlarged eyes with severe asymmetrical and variable abnormalities in the anterior segment, characterized by corneal limbus hypertrophy, and thickening of the cornea, iris, annular ligament and lens capsule. The most severe phenotype presented small or absent ocular anterior chamber and pupils, due to iris overgrowth along with dysplastic retinal growth and optic nerve hypertrophy. Immunohistochemistry revealed increased presence of myocilin in most altered ocular tissues of adult transgenic animals, as well as signs of retinal gliosis, and expanded ganglion cells and nerve fibers, indicating that these cells contributed to retinal dysplasia. Visual impairment was demonstrated in all old male transgenic zebrafish. Transcriptomic analysis of the abnormal transgenic eyes identified disrupted expression of genes involved in lens, muscular and extracellular matrix activities, among other processes. In summary, the developed transgenic zebrafish provides a new tool to investigate this puzzling protein and provides evidence for the role of zebrafish myocilin in ocular anterior segment and retinal biology, through the influence of extracellular matrix organization and cellular proliferation.

Contribution to the field

Myocilin is a protein with an incompletely understood function, mainly known because of its association with glaucoma. The primary goal of this study was to analyse the normal role of this protein in ocular biology, using zebrafish as an animal model. To that end, and to the best of our knowledge, we have generated the first myocilin transgenic zebrafish line. In vivo overexpression of transgenic myocilin was associated with characteristic anterior segment alterations and retinal dysplasia in adult male zebrafish. Hypertrophy of extracellular matrix and altered expression of genes involved in lens, muscular, and extracellular matrix activities were also present in the developed zebrafish line. Our results provide further support for the function of myocilin as a matricellular protein, influencing cellular growth and tissular organization, at least in zebrafish. In addition, this study provides new insights into the complex biological activities of this interesting protein.

Funding statement

This research was funded by research grants from the "Instituto de Salud Carlos III/European Regional Development Fund (ERDF)" (PI19/00208 and RD16/0008/0019, OFTARED), the Regional Ministry of Science and Technology of the Board of the Communities of "Castilla-La Mancha" (SBPLY/17/180501/000404; <http://www.educa.jccm.es/idiuniv/es>) and research funds from Universidad de Castilla-La Mancha (2019-GRIN-26945). A.T. was recipient of a predoctoral contract from Castilla-La Mancha University (Ref.: 2020-PREDUCLM-16605).

Ethics statements

Studies involving animal subjects

Generated Statement: The animal study was reviewed and approved by Animal Research Committee of the University of Castilla-La Mancha.

Studies involving human subjects

Generated Statement: No human studies are presented in this manuscript.

Inclusion of identifiable human data

Generated Statement: No potentially identifiable human images or data is presented in this study.

In review

Data availability statement

Generated Statement: The authors acknowledge that the data presented in this study must be deposited and made publicly available in an acceptable repository, prior to publication. Frontiers cannot accept a manuscript that does not adhere to our open data policies.

In review

Transgenic overexpression of myocilin leads to variable ocular anterior segment and retinal alterations associated with extracellular matrix abnormalities in adult zebrafish

1 **Raquel Atiénzar-Aroca^{1,2}, Jesús-José Ferre-Fernández¹, Angel Tevar^{1,2}, Juan-Manuel Bonet-**
2 **Fernández^{1,2,3}, María-José Cabañero^{1,2,3}, María-José Ruiz-Pastor^{3,4}, Nicolás Cuenca^{3,4}, José-**
3 **Daniel Aroca-Aguilar^{1,2,3} and Julio Escribano^{1,2,3}**

4 ¹Área de Genética, Facultad de Medicina de Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete,
5 Spain

6 ²Instituto de Investigación en Discapacidades Neurológicas (IDINE), Universidad de Castilla-La
7 Mancha, Albacete, Spain

8 ³Cooperative Research Network on Age-Related Ocular Pathology, Visual and Life Quality
9 (OFTARED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

10 ⁴ Department of Physiology, Genetics and Microbiology, University of Alicante, Alicante, Spain

11

12 *** Correspondence:**
13 Julio Escribano

14 julio.escribano@uclm.es

15 **Keywords: myocilin, myoc, zebrafish, transgenic *myoc*, anterior segment alterations, retinal**
16 **dysplasia, matricellular protein.**

17 Number of words: 9887. Number of Figures: 13. Number of tables: 0.

18

19 **Abstract**

20 Myocilin is an enigmatic glaucoma-associated glycoprotein whose biological role remains
 21 incompletely understood. To gain novel insight into its normal function, we used transposon-
 22 mediated transgenesis to generate the first zebrafish line stably overexpressing myocilin
 23 [*Tg(actb1:myoc-2A-mCherry)*]. qPCR showed an approximately four-fold increased myocilin
 24 expression in transgenic zebrafish embryos (144 hpf). Adult (13 months old) transgenic animals
 25 displayed variable and age-dependent ocular anterior segment alterations. Almost 60% of two-years
 26 old male, but not female, transgenic zebrafish developed enlarged eyes with severe asymmetrical and
 27 variable abnormalities in the anterior segment, characterized by corneal limbus hypertrophy, and
 28 thickening of the cornea, iris, annular ligament and lens capsule. The most severe phenotype
 29 presented small or absent ocular anterior chamber and pupils, due to iris overgrowth along with
 30 dysplastic retinal growth and optic nerve hypertrophy. Immunohistochemistry revealed increased
 31 presence of myocilin in most altered ocular tissues of adult transgenic animals, as well as signs of
 32 retinal gliosis, and expanded ganglion cells and nerve fibers. The preliminary results indicate that
 33 these cells contributed to retinal dysplasia. Visual impairment was demonstrated in all old male
 34 transgenic zebrafish. Transcriptomic analysis of the abnormal transgenic eyes identified disrupted
 35 expression of genes involved in lens, muscular and extracellular matrix activities, among other
 36 processes. In summary, the developed transgenic zebrafish provides a new tool to investigate this
 37 puzzling protein and provides evidence for the role of zebrafish myocilin in ocular anterior segment
 38 and retinal biology, through the influence of extracellular matrix organization and cellular
 39 proliferation.

40 **1 Introduction**

41 The *MYOC* gene encodes myocilin, a secreted glycoprotein build-up of 504 amino acids. The normal
 42 function of this protein is not well known, although its role in autosomal dominant juvenile
 43 glaucoma, an optic neuropathy caused by apoptosis of retinal ganglion cells (Quigley, 1995), is well
 44 established (Stone et al., 1997). Myocilin, initially called Trabecular Meshwork Inducible
 45 Glucocorticoid Response (TIGR), was identified as an overexpressed protein in glucocorticoid-
 46 treated human trabecular meshwork cells (Polansky et al., 1997). Transcripts encoding myocilin were
 47 independently discovered by subtractive cDNA cloning in the human ciliary body (Escribano et al.,
 48 1995; Ortego et al., 1997) and in photoreceptor cells (Kubota et al., 1997). Kubota et al denominated
 49 this protein myocilin based on the amino acid sequence similarity of its N-terminal region with
 50 myosin (Kubota et al., 1997). *MYOC* is expressed in some parts of ocular anterior segment, e.g., iris
 51 and trabecular meshwork (Ortego et al., 1997; Huang et al., 2000; Karali et al., 2000; Ezzat et al.,
 52 2008), and the protein is also present in the aqueous humor (Russell et al., 2001; Aroca-Aguilar et al.,
 53 2005), where it may be secreted from the ciliary body and the trabecular meshwork in association
 54 with exosomes (Hardy et al., 2005; Hoffman et al., 2009). Non-ocular tissues, such as skeletal and
 55 cardiac muscles (Ortego et al., 1997), leukocytes and lymphoid tissues (Aroca-Aguilar et al., 2018)
 56 also express this gene, and the protein is present in blood plasma (Aroca-Aguilar et al., 2018).

57 Structurally, myocilin is organized into three different regions: the N-terminal part which in the
 58 secreted protein is composed of two coiled-coil domains (Gobeil et al., 2006; Stamer et al., 2006) and
 59 a leucine-zipper motif (Ortego et al., 1997) located in the second coiled-coil; the central region
 60 containing a calpain II proteolytic site (Aroca-Aguilar et al., 2005; Sanchez-Sanchez et al., 2007);
 61 and the olfactomedin homologue C-terminal region (Ortego et al., 1997) which is characteristic of the
 62 olfactomedin protein family. Olfactomedins are glycoproteins with roles in the nervous system, early
 63 development and haematopoiesis (Anholt, 2014). The olfactomedin domain of myocilin presents a

64 five-bladed β -propeller globular structure (Donegan et al., 2015) and is affected by most glaucoma-
65 related mutations (Ortego et al., 1997). A singular quaternary structure has been reported for
66 myocilin, consisting of a Y-shaped dimer-of-dimers (Hill et al., 2017). The interaction of myocilin
67 through its olfactomedin domain with proteins such as SPARC, hevin (Li et al., 2006; Aroca-Aguilar
68 et al., 2011), and fibronectin (Filla et al., 2002) suggests that myocilin might function as a
69 matricellular protein (Chatterjee et al., 2014), and as such, it may participate in regulating cell-matrix
70 interactions, rather than being structural part of the extracellular matrix (ECM). The anti-adhesive
71 properties of myocilin on trabecular meshwork cells (Wentz-Hunter et al., 2004a; Wentz-Hunter et
72 al., 2004b) and on human circulating leukocytes (Aroca-Aguilar et al., 2018) also support this
73 concept. Myocilin undergoes an intracellular proteolytic cleavage releasing two similar size
74 fragments that may be required to tune its molecular interactions (Aroca-Aguilar et al., 2010; Aroca-
75 Aguilar et al., 2011; Aroca-Aguilar et al., 2013).

76 Growing experimental evidence indicates that myocilin plays a role in different cell signalling
77 pathways including Wnt (Kwon et al., 2009; Shen et al., 2012), through which it can regulate
78 biological processes such as zebrafish sexual differentiation (Atienzar-Aroca et al., 2021) and the
79 ligand-mediated endocytosis of the G-protein-coupled receptor GPR-143 (McKay et al., 2013; Locke
80 et al., 2014), that is involved in the pigmentation pathway taking place in the retinal pigment
81 epithelium (RPE).

82 Loss-of-function, overexpression and/or misexpression of myocilin in mouse models have been used
83 to investigate its role in glaucoma pathogenesis and the biological pathways in which this protein is
84 involved. A myocilin knockout mouse revealed that this protein is not required for normal intraocular
85 pressure or normal ocular morphology and suggested that disease-causing mutations in humans likely
86 act by gain of function (Kim et al., 2001). Transgenic mice expressing pathogenic variants of human
87 or mouse myocilin reproduced glaucoma phenotypes observed in patients (i.e., elevated intraocular
88 pressure, retinal ganglion cell death, and axonal degeneration) and provided evidence for the role in
89 the disease of endoplasmic reticulum stress induced by accumulation of the mutant protein
90 (Senatorov et al., 2006; Zhou et al., 2008; Joe et al., 2012; Joe et al., 2015; Zode et al., 2015).
91 However, other transgenic mouse lines expressing either mutant (Zillig et al., 2005; Gould et al.,
92 2006) or wild type myocilin (Gould et al., 2004; Zillig et al., 2005) did not develop glaucoma. In
93 addition, the study of a transgenic *Drosophila* line also supported a role for aggregation of myocilin
94 in the endoplasmic reticulum and activation of the unfolded protein response in myocilin-associated
95 glaucoma (Carbone et al., 2009). On the other hand, overexpression of wild type mouse myocilin by
96 a transgenic mouse resulted in a 36% increased average size of muscle fibers and revealed that
97 myocilin interacts with syntrophin, a component of dystrophin-associated protein complex, indicating
98 that it is involved in muscle hypertrophy pathways (Joe et al., 2012).

99 Herein, we report the first *myoc* transgenic zebrafish model as an additional tool to investigate the
100 function of this protein. Characterization of this transgenic line provides new evidence for the role of
101 zebrafish myocilin as a regulator of ECM and cell proliferation in the anterior segment of the eye and
102 the retina.

103 **Materials and Methods**

104 **Animals**

105 Wild-type AB zebrafish (*Danio rerio*) were maintained at 28° C with a 14 h on/10 h off light cycle
106 and were fed a standard diet according to established protocols (Monte, 2013). Zebrafish embryos

107 were raised at 28° C in E3 medium (5 mM NaCl; 0.17 mM KCl; 0.33 mM CaCl₂; 0.33 mM MgSO₄
 108 and 0.0001 % methylene blue, pH 7.2). larvae and adult fishes were anesthetized with 0.02% and
 109 0.04% tricaine methanesulfonate (#886-86-2, MS222, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
 110 respectively, and immobilised in 3% methylcellulose solution for analysis and photography. Animal
 111 husbandry and experiments were approved by the Institutional Animal Research Committee of the
 112 University of Castilla-La Mancha (approval number PR-2015-04-10). Zebrafish experiments were
 113 performed in accordance with guidelines and regulations established by the Institutional Animal
 114 Research Committee of the University of Castilla-La Mancha.

115 **Zebrafish DNA Extraction**

116 Genomic DNA (gDNA) was isolated from whole zebrafish embryos (24 and 96 h post fertilization,
 117 hpf) using the HotSHOT method (Meeker et al., 2007). Tissue samples were incubated with 20 µL of
 118 base solution (25 mM KOH, 0.2 mM EDTA) at 95° C for 30 min in a thermal cycler (BIORAD
 119 C100, BIORAD, Hercules, CA, USA), then 20 µL of neutralization buffer (40 mM TrisHCl, pH 5)
 120 was added.

121 **Plasmid construction entry clones and microinjection of zebrafish embryos**

122 Entry vectors and the bicistronic construct to generate the transgenic zebrafish line expressing
 123 myocilin and mCherry under the constitutive promoter of beta actin was obtained using the MultiSite
 124 Gateway system (Invitrogen) and the tol2kit plasmids (Kwan et al., 2007), following the
 125 manufacture's indications. Briefly, a zebrafish *myoc* cDNA clone (Bioscience, ref:
 126 IRBOp991C0979D) was amplified using the following primers: 5'-
 127 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCCAACATGTGGTTTTAGC-3' and 5'-
 128 GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCCTGCTTGCCAAGTCTCA-3'. These two
 129 oligonucleotides contained the adapter primer sequences *attB1* and *attB2*, respectively, which are
 130 underlined in the above nucleotide sequences. The PCR product was cloned by recombination into
 131 the *attP* containing pDONR221 vector (Invitrogen), using BP Clonase (Invitrogen). The recombinant
 132 DNA was transformed into One Shot Mach1 competent cells (Invitrogen) and transformed cell were
 133 grown in the presence of kanamycin to obtain the middle entry plasmid (pME) containing zebrafish
 134 *myoc* cDNA. Plasmids p5E-bactin2, containing 5.3kb of the bactin2 promoter, pME-myoc, and p3E-
 135 P2A-mCherry, containing the viral peptide P2A and mCherry cDNA, were recombined and cloned
 136 into the destination vector pDestTol2pA using LR clonase (10134992, Invitrogen). Competent cells
 137 were transformed with the recombinant DNA and grown in the presence of ampicillin to obtain the
 138 plasmid containing the whole construct flanked by the Tol2 recombination sites.

139 One-cell stage zebrafish embryos were co-injected with 15 pg of the construct plasmid and 300 pg of
 140 the *in vitro* synthesized capped RNA (AM1340, mMACHINE™ SP6, Ambion) of
 141 Tol2 transposase (Kawakami et al., 2004). Fluorescent embryos expressing mCherry were selected
 142 and raised into adulthood and they were screened to obtain the F0 founder fish carrying the
 143 bicistronic transgene in the germ line.

144 **Nested PCR.**

145 Identification of the transgene integration site was carried out by nested PCR (Ochman et al., 1988).
 146 Pools of 30 F4 zebrafish embryos (144 hpf) positive for mCherry fluorescence were employed to
 147 purify genomic DNA using the Wizard SV Genomic DNA Purification System (A2360, Promega),
 148 following the manufacture's recommendations. Eight hundred nanograms of genomic DNA were
 149 digested for 16 h at 37 °C with *AluI* (ER0011, ThermoFisher Scientific) in Tango buffer. The

150 samples were incubated for 10 min at 70 °C to inactivate restriction enzymes. Digested DNA (25 ng)
 151 was self-ligated with T4 DNA ligase (EL0011, ThermoFisher Scientific) overnight at 16 °C. Each
 152 half of the ligated sample (25 µl) was used to determine the 5'- or 3' junction by two PCR rounds,
 153 using nested primers. The nested primers used to amplify the 5' junction were: first round, Tol2-5'/f1
 154 (5'-AGTACTTTTTACTCCTTACA-3') and Tol2-5'/r1 (5'-GATTTTAAATTGTACTCAAG-3');
 155 second round, Tol2-5'/f2 (5'-TACAGTCAAAAAGTACT-3') and Tol2-5'/r2 (5'-
 156 AAGTAAAGTAAAATCC-3') (Kawakami et al., 2004). Nested primers employed to amplify the
 157 3' junction were: first round, Tol2-3'/f1 (5'-TTTACTCAAGTAAGATTCTAG-3') and Tol2-3'/r1 (5'-
 158 CTCATTAAAATTGTACTTGA-3'); second round: Tol2-3'/f2 (5'-
 159 ACTTGTACTTTCCTTGGAGTA-3') and Tol2-3'/r2 (5'-GCAAGAAAGAAAAGTAGAGA-3')
 160 (Kawakami et al., 2004). Two primers derived from chromosome 11 sequences, were used to confirm
 161 the transgenic insertion site: 5'-GATTAATTTTGGCGTTATGAG-3' (forward) and 5'-
 162 GAATGTGAACAGGAAAAAGA-3' (reverse). The PCR consisted of an initial step of 95 °C for 2
 163 min followed by 30 amplification cycles (95 °C for 15 s; 48 °C for 30 s; 72 °C for 2min). The
 164 nucleotide sequence of the PCR products was determined by automatic Sanger sequencing.

165 **Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)**

166 qRT-PCR was carried out as previously described (Atienzar-Aroca et al., 2021). RNA was isolated
 167 using the RNeasy Minikit (#74104, Qiagen, Germantown, MD, USA) and treated with RNase-free
 168 DNase I according to the manufacturer's instructions, from pools of 50 zebrafish larvae (144 hpf, two
 169 independent biological replicas) or from a pool of altered eyes (six eyes) obtained from three adult
 170 male transgenic zebrafish (two years). As a control of ocular RNA, we used RNA from two
 171 independent biological replicas of an equivalent eye pool (six eyes) from three two-year old wild type
 172 male zebrafish. cDNA synthesis was carried out using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis
 173 Kits (#K1622, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the purified RNA as a template.
 174 mRNA expression relative to *eflα* mRNA was determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and
 175 Schmittgen, 2001) using the primer pairs described in **Supplementary Table S1**.

176 **Zebrafish Tissue Samples**

177 Adult transgenic and wild type zebrafish heads were fixed overnight in 4% PFA and cryoprotected
 178 for two days at 4° C in 30% sucrose/PBS 0.1 M (Dulbecco, X0515-500C). Thereafter, zebrafish
 179 heads were embedded in 10% porcine gelatin with 15% sucrose and stored at -80° C. A cryostat
 180 (Leica CM3050 S, Leica Ltd., Wetzlar, Germany) was used to obtain serial cryosections (14 µm).

181 **Fluorescence Immunohistochemistry**

182 Fluorescence immunohistochemistry was carried out as previously described (Atienzar-Aroca et al.,
 183 2021), using tissue sections from two zebrafish of each phenotype. Briefly, tissue sections (14 µm)
 184 were incubated with the following primary antibodies: chicken anti-myocilin (TNT, 1:150)
 185 (Atienzar-Aroca et al., 2021), mouse anti-GFAP (1:100) (sc-33673, Santa Cruz Biotechnology) and
 186 rabbit anti-ki67 (1:150) (GeneTex)]. The corresponding secondary antibodies were, respectively,
 187 [Cy2-conjugated donkey anti-chicken IgY (1:1000), Cy2-conjugated donkey anti-mouse (1:1000)
 188 and Cy2-conjugated donkey anti-rabbit IgY (1:1000) (Jackson ImmunoResearch)]. For double
 189 calretinin and Brn3a immunolabeling, tissue sections were incubated overnight at room temperature
 190 with a mix of anti-Brn3a (1:500, Santa Cruz, sc-31984) and anti-calretinin (1:500, SWANT, CG1) in
 191 phosphate buffer (PB) with 0.1% of Tritón-X and 10% donkey serum. Sections were rinsed 3 times
 192 for 10 min in 0.1M PB and incubated for 1 h with a proper secondary mix (anti-rabbit Alexa-555 and

193 anti-goat Alexa-633, Molecular Probes). Secondary antibody controls were made to test the specificity
194 of the immunolabeling.

195 The In-Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (11684795910, Roche Diagnostics, Mannheim,
196 Germany), was employed for TUNEL apoptotic cell death detection in tissue sections, following the
197 manufacturer's instructions. Positive controls were carried out as previously described (Atienzar-
198 Aroca et al., 2021). Two to four animals from each experimental group were used for the microscopy
199 analyses. Four tissue sections (14 μ m) per fish were employed for each technique and four random
200 fields per tissue section were examined. The nuclei were stained either with DAPI (4',6-diamidino-2-
201 phenylindole, D8417, Sigma-Aldrich) at a 1:100 dilution in immunobuffer (10% fetal bovine serum,
202 1% dimethyl sulfoxide and 1% Triton X-100 in PB) for two min at room temperature as the last step
203 of the process, or with TO-PRO-3 iodide (R37113, Invitrogen) at a 1:1000 dilution for 1h at room
204 temperature, together with the corresponding secondary antibody.

205 **Histological staining**

206 Hematoxylin-eosin staining of histological sections of adult *myocilin* transgenic fish was carried out
207 as previously described (Atienzar-Aroca et al., 2021). Head adult zebrafish sections were stained
208 with Picro-Sirius Red (365548-5G, Sigma Aldrich) solution for 1 h, washed two times with 0.5%
209 acetic acid for 5 min, dehydrated with 100% ethanol and washed with xylol at room temperature. The
210 slides were mounted with Cytoseal (8311-4, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

211 **Visual function assay**

212 The test employed to evaluate vision relies on the social preferences of zebrafish (Oliveira, 2013).
213 We used a large tank divided in two parts by a plate with a small transparent window. Fifteen wild
214 type zebrafish were introduced in one part of the tank and the fish to be evaluated was situated in the
215 other part. The experiments were conducted in the morning under constant illumination and water
216 temperature (27 °C). All zebrafish swam and roamed freely all time. The fish to be tested was gently
217 released into the tank and acclimatized for 30 min, then fish movements were recorded for 10 min
218 with a camera and tracked using Tracker software (Open Source Physics). The time spent near the
219 window proximal to the social stimulus was measured in three intervals of one min.

220 **Ocular Transcriptome Analysis by RNAseq**

221 RNA was extracted from a pool of six eyes with macroscopic alterations obtained from three
222 transgenic siblings of the F3 generation (two-years old males), as described earlier. Six eyes from
223 three wild type zebrafish of the same sex and age were treated in parallel as controls. We were able to
224 carry out two independent biological replicas of wild type eyes, but only one of transgenic eyes. The
225 purified mRNA from each experimental group was pooled to minimize the effect of individual
226 variability. Duplicates of RNA samples were outsourced to MacroGen Next Generation Sequencing
227 Division (MacroGen) for high throughput sequencing. Libraries were generated using the TruSeq
228 Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina, Foster City, CA, USA), which captures both coding
229 RNA and multiple forms of polyadenylated non-coding RNA. Paired-end sequencing (150 bp) was
230 performed using a NovaSeq 6000 System (Illumina). Trimmomatic 0.38 (Bolger et al., 2014) was
231 used to remove bases with low-quality and adapter sequences. Reads were mapped to the zebrafish
232 genome reference (GRCz11) with HISAT2 aligner (Kim et al., 2015). The expression profile was
233 calculated as read count and normalization value, which is based of transcript length and depth of
234 coverage. DEG analysis of the myoc Tg vs. wild type zebrafish eyes was performed using reads per

235 kilobase of transcript per million mapped reads (RPKM). Genes with a fold change ≥ 2.0 and a p-
236 value < 0.05 in the comparisons of the transgenic transcriptome with each of the two biological
237 replicas of wild type transcriptomes were considered as DEGs (Tg *myoc* OA vs. WT1 and Tg *myoc*
238 OA vs. WT2). Functional gene enrichment analysis of DEGs was performed using the Epistemic
239 Artificial Intelligence web-based software platform (Da Chen Emily Koo, 2022) and ShinyGO (Ge et
240 al., 2020).

241 **Statistics.**

242 Student's t-test was employed for evaluation of statistical comparisons between groups using the
243 SigmaPlot 12.0 software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

244 **Results**

245 **Generation of *Tg(actb1:myoc-2A-mCherry)* bicistronic F0 zebrafish**

246 The *myoc-2A-mCherry* plasmid was obtained as described in materials and methods
247 (**Supplementary Figure S1A**) and co-injected with transposase mRNA into the yolk of 1-cell
248 zebrafish embryos (**Supplementary Figure S1B**). As expected, most F0 animals showed mosaic
249 mCherry fluorescence (**Supplementary Figure S1C**) and the offspring (F1) was screened by
250 fluorescence microscopy to identify founders transmitting the *myoc-2A-mCherry* bicistronic protein.
251 To increase the probability of obtaining fishes carrying reliable single transgene insertions with
252 predictable Mendelian inheritance of the functional transgene, we carried out two consecutive
253 outcrosses of transgenic animals with wild-type AB zebrafish (F1-F3, **Supplementary Figure S1B**).
254 F3 animals showed an approximately 50% fluorescence segregation, supporting the successful
255 integration of the transgene in the founder's germline and the existence of a single genomic insertion
256 in the obtained transgenic line. qPCR using as a template mRNA from 144 hpf F4 transgenic larvae
257 showed an approximately four-fold *myoc* increased compared with the wild type (**Supplementary**
258 **Figure S1D**), supporting transgene overexpression.

259 **Mapping transgene integration sites**

260 To identify the Tol2-mediated genomic insertion site of the transgene we used nested PCR. Tailfin
261 genomic DNA was digested with *AluI* to generate transgene-derived DNA fragments ending in the
262 *AluI* sequences located at the Tol-2 flanking sequences (**Supplementary Figure S2A**). Then the
263 restriction fragments were self-ligated and amplified by PCR using two nested primer pairs specific
264 for 3'- and 5'-Tol2 sequences (**Supplementary Figure S2A**, arrowheads). The amplification yielded
265 characteristic bands (A5-1 and A5-2 5' from the Tol2-5'-end and A3-1 and A5-3 from the Tol2-3'-
266 end) that were different from those present in the wild type genomic DNA used as a control
267 (**Supplementary Figure S2B**). The bands amplified from each end correspond to self-ligation of
268 different fragments that resulted from cleavage at different *AluI* targets located in the proximity of the
269 transgenic insertion sites. Sanger sequencing of the amplicons using the nested Tol-2 specific primers
270 revealed genomic sequences surrounding the insertion site of the transgene, that although were not
271 clean in all cases, identified a region from chromosome 11 in the proximity of the insertion site.
272 Additional sequencing primers were designed using these sequences from chromosome 11
273 (**Supplementary Figure S2A**, arrows), and the new electropherograms revealed the 5'- and 3'-Tol2
274 sequences placed at the end of the transgenic construction, followed by a eight bp duplication
275 (**Supplementary Figure S2C**, underlined sequence), which is characteristic of Tol2-mediated
276 transposition (Kawakami et al., 2000). The electropherograms also showed the genomic nucleotides
277 flanking Tol2 sequences in the integration site. Blast analysis of the identified genomic sequences

278 demonstrated that the integration site was located on chromosome 11, in an intergenic region
 279 upstream of the *tbl1xr1a* gene (**Supplementary Figure S2D**).

280 **Phenotypic characterisation of the *Tg(actb1:myoc-2A-mCherry)* zebrafish line**

281 We did not observe significant gross external macroscopic alterations in larvae (96 hpf) or adult (5, 7
 282 and 11 months) *Tg(actb1:myoc-2A-mCherry)* F3 heterozygous zebrafish (data not shown). In
 283 addition, analysis of histological eye sections stained either with hematoxylin-eosin or Sirius red did
 284 not reveal any meaningful difference between transgenic and wild type animals (data not shown). A
 285 total of 21 animals (14 males and 7 females) survived to the age of two years, and of them, eight
 286 males (57.15%), but none of the females (**Supplementary Figure S3**), developed variable ocular
 287 phenotypes affecting the anterior segment and/or the eyeball. Three of the transgenic males presented
 288 bilateral iris overgrowth that resulted in small or absent pupils (**Figures 1B-E, J and L**, yellow
 289 arrows) with cloudy and, in some eyes, flattened corneas (**Figures 1F-G**, black arrows), suggesting
 290 the existence of corneal stroma abnormalities. Reduced anterior chamber size (**Figures 1A, F and G**)
 291 and unilaterally enlarged eyeballs (**Figure 1A**, asterisk) were also observed. The remaining five
 292 transgenic zebrafish showed similar unilateral iris, cornea and anterior segment alterations (**Figures**
 293 **1H-N**), and three of them also exhibited unilaterally enlarged eyes (**Figure 1H**, asterisk). These
 294 alterations were not observed in control wild type zebrafish of the same age and sex (Figure 1O-U).

295 Head sections of transgenic zebrafish with bilateral or unilateral ocular alterations were stained with
 296 hematoxylin-eosin for histological evaluation. A general observation of these preparations revealed
 297 remarkable corneal thickening and fusion between the cornea and iris (**Figures 2A and B**, black
 298 arrowhead and black arrow, respectively) and confirmed the presence of reduced or absent anterior
 299 chamber in the most severe ocular phenotypes (**Figures 2A and B**, black arrows), correlating with *in*
 300 *vivo* observations (**Figures 1F, G and N**). The lens capsule showed variable thickening and folding
 301 (**Figures 2A and B**, green arrows). The transgenic lens capsule presented more than two-fold
 302 increase in average thickness compared to the wild type lens capsule (**Supplementary Figure S4A**).
 303 Sirius red staining confirmed these findings and demonstrated the intense red decoration in the
 304 corneal stroma and annular ligament (**Supplementary Figure S5**, arrowheads) and lens capsule
 305 (**Supplementary Figure S5**, green arrows), indicating increased collagen deposition. Large
 306 accumulations of vitreous-like material were present in some eyes (**Figures 2A and B**, black
 307 asterisks). Retinal pigment epithelial (RPE) cells at the iridocorneal angle were disorganized, with
 308 irregularly folded layers and invading the anterior part of the retinal mass (**Figure 2A**, white
 309 arrowhead). In addition, we observed variable neuroretinal alterations that in the most severe
 310 phenotype were characterized by a retinal mass occupying the vitreous cavity and displacing
 311 ventrally the lens (**Figure 2A**, red asterisk), associated with an extremely enlarged choroid body
 312 (**Figure 2A**, yellow asterisk). This unexpected retinal structure was apparently dominated by folded
 313 and hypertrophic extensions of the retinal nerve fiber layer (**Figure 2A**, white arrows), which
 314 converged in a hypertrophic optic nerve. Abnormal photoreceptors, retinal folding (**Figure 2B**,
 315 yellow and blue arrowheads, respectively) and hypertrophic optic nerve (**Figures 2A and B**, ON)
 316 were present as well. Control wild type zebrafish of the same age and sex did not show these features
 317 (Figure 2C).

318 Detailed microscopic examination of the ocular anterior segment at a higher magnification,
 319 confirmed the abnormalities consisting of variable thickening of the corneal epithelium, corneal
 320 stroma and annular ligament specially in the central cornea (**Figures 3A-D and Supplementary**
 321 **Figures S4B-D**). Formation of large collagen cords in the corneal epithelium (**Figure 3B**, blue
 322 arrow) and presence of cavities between the corneal stroma and annular ligament (**Figures 3A and B**,

323 yellow arrowheads) were also observed. In the central cornea we also observed areas of close contact
324 between the hypertrophic annular ligament and iris (**Figures 3F, G, and I**). In some eyes the corneal
325 stroma also presented an apparently increased number of keratocytes and cavities (**Figure 3G**, blue
326 and green arrowheads, respectively). The corneal limbus was also remarkably enlarged
327 (**Supplementary Figure S4E**) and presented a likely expanded number of melanocytes (**Figures 3A**
328 **and B**, yellow arrows). In the extreme phenotype, RPE cells accumulated in the iridocorneal angle,
329 infiltrating the anterior retinal mass (**Figures 3A and B**, yellow asterisks). Wild type-like eyes of
330 transgenic zebrafish with unilateral ocular alterations did not show these features, although the
331 corneal stroma was thickened compared with wild type eyes (**Figures 3C and H**), which might
332 correspond to an initial stage of ocular alterations. The described anomalies were not observed in the
333 ocular anterior segment wild type zebrafish of the same age and sex (**Figures 3E and J**).

334 Histological examination of the retinas revealed variable alterations that in the most severe phenotype
335 was characterized by a disorganized neuroretinal mass, invading the vitreous cavity, although some
336 layers were recognizable in the peripheral retina (**Figure 4A**, RPE to inner nuclear layer, INL).
337 Apparently, an increased nuclei number was present both in the inner plexiform layer (IPL) and the
338 ganglion cell layer (GCL), along with retinal fiber layer (RFL) hypertrophy (**Figure 4A**). These
339 preliminary observations, that require further confirmation, suggest the existence of retinal ganglion
340 cell proliferation. Variable photoreceptor disruption as well as disorganized plexiform and nuclear
341 layers were also observed (**Figures 4B-D**). Similarly, the central retina was highly degenerated, with
342 disorganized photoreceptors, unstructured plexiform and nuclear layers and absence of the RPE
343 (**Figures 4F, G and I**). However, the retinal layers were recognizable in some eyes (**Figure 4H**). The
344 eyeball presented thickened scleral cartilage with increased number of chondrocytes and surrounding
345 ECM in the most severe phenotypes (**Figures 4A-D**, arrows). These alterations were not observed in
346 wild type retinas (**Figures 4E and J**). Altogether these data show the existence of variable alterations
347 in the ocular anterior segment and retina of old transgenic male zebrafish with characteristic
348 hypertrophy and/or dysplasia and increased ECM deposition.

349 **Immunohistochemical analysis of ocular tissues.**

350 To evaluate the correlation of ocular alterations with the presence of transgenic myocilin we analysed
351 the bicistronic transgene expression in eye tissues of old transgenic zebrafish. Myocilin was detected
352 by fluorescence immunocytochemistry using a chicken anti-myocilin antibody targeted against the
353 N-terminal region of the human protein (TNT antibody) (Huang et al., 2000; Atienzar-Aroca et al.,
354 2021). Fluorescence microscopy was employed to identify the presence of the reporter protein
355 mCherry. In accordance with previous reports (Atienzar-Aroca et al., 2021), analysis of the anterior
356 segment of control wild type eyes showed myocilin immunoreactivity in the non-pigmented ciliary
357 epithelium (NPCE), iris pigment cells (IPC) (**Figure 5A**) and corneal endothelium (**Figure 5B**).
358 Blood cells in the iris were also positive for myocilin immuno labelling (**Figure 5A**). Representative
359 areas of the anterior segment were selected for the immunohistochemical analysis of transgenic
360 zebrafish (**Figure 5C and D**). The eyes of transgenic animals presented clear myocilin signals in the
361 altered tissues of the iridocorneal angle, i.e., NPCE, IPC, annular ligament, and corneal stroma
362 (**Figures 5E, F, I, and J**). Blood cells in the iris also showed anti-myocilin staining (**Figure 5I**).
363 Remarkably, the area where RPE cells accumulated (see **Figures 3A and B**, yellow asterisk) was
364 positive for myocilin staining (**Figure 5F**, RPE). The central cornea of altered eyes showed variable
365 and diffuse extracellular anti-myocilin labelling in the corneal stroma and annular ligament (**Figures**
366 **5G and H**) with areas of intense accumulation in the iris stroma (**Figure 5H**, asterisk). The anti-
367 myocilin antibody also decorated the corneal endothelium and especially the most superficial layer of
368 the corneal epithelium (**Figures 5G, H, K, and L**, arrows). The vitreous was positive for myocilin

369 immunoreactivity (**Figure 5F**, asterisk). Although mCherry fluorescence was not very intense,
370 yellowish areas were detected in the NPCE (**Figure 5E**), showing co-localization of this protein with
371 myocilin in this epithelial layer. In addition, a diffuse red background was present both in the altered
372 annular ligament and corneal stroma (**Figures 5G and H**), as well as in the corneal epithelium
373 (**Figures 5G, H, I, K, and L**). The lack of precise anti-myocilin and mCherry signal overlapping in
374 some places may be due to the different cellular fate of the two proteins (myocilin is a secreted
375 protein and mCherry remains in the intracellular space). Chondrocytes and perichondrium of the
376 scleral cartilage in wild type zebrafish showed anti-myocilin decoration (**Supplementary Figure**
377 **S6A**, arrowheads and arrows, respectively). Dorsal areas of transgenic eyeballs were selected for
378 immunocytochemical analysis (**Supplementary Figures 6C and D**). The transgenic hypertrophic
379 scleral cartilage presented increased anti-myocilin staining, along with weak mCherry fluorescence
380 (**Supplementary Figures S6E-H**), showing that transgenic myocilin overexpression is associated
381 with hypertrophy of this cartilage. Notably, DAPI staining revealed an increased number of nuclei in
382 the stroma of both cornea (**Figures 5G, H, and K and Supplementary Figure S4F**) and annular
383 ligament (**Figures 5G and H and Supplementary Figure S4G**), IPC, and the region of RPE
384 accumulation (**Figure 5F, Supplementary Figure S4H**), suggesting the existence of cellular
385 proliferation in these structures. The specificity of fluorescent mCherry and anti-myocilin signals was
386 supported by absence of mCherry labelling in wild type tissues of the anterior segment (**Figures 5A**
387 **and B and Supplementary Figures S6A**), as well as lack of positive signals in the negative controls
388 (**Supplementary Figures S6B and Supplementary Figures S7A and B**).

389 We also analysed the correlation of bicistronic transgene expression with eye lens and retinal
390 alterations. In control wild type zebrafish, the lens epithelium and the external surface of the lens
391 capsule (**Figure 6A**), as well as the retinal GCL, IPL, and photoreceptors (**Figure 6B**), were labelled
392 with the anti-myocilin antibody. These signals likely correspond to the endogenous protein.
393 Representative areas of the lens and retina were selected for the immunohistochemical analysis of
394 transgenic zebrafish (**Figure 6C and D**). The severely affected transgenic eyes presented clear anti-
395 myocilin signals, together with mCherry fluorescence, in the lens epithelium (**Figures 6E and F**),
396 confirming the expression of the transgenic protein. The anti-myocilin antibody also painted the
397 superficial layer of the lens capsule (**Figure 6F**). On the other hand, the retinal mass exhibited an
398 intense and diffuse anti-myocilin labelling in the hypertrophic retinal fiber layer (**Figure 6G**). Retinal
399 regions where the different layers were recognizable presented GCL and IPL diffuse myocilin
400 immunolabelling (**Figures 6H-J**). Photoreceptors also showed anti-myocilin immunoreactivity,
401 particularly in the area likely corresponding to the external segment of rods (**Figures 6H-J**). Diffuse
402 mCherry signals coinciding with myocilin immunolabeling, were present in the retinal mass (**Figure**
403 **6G**), photoreceptors and IPL (**Figure 6H**), supporting the expression of the transgenic proteins. The
404 wild type retina lacked mCherry signals, although weak photoreceptor autofluorescence was seen
405 (**Figure 6B**), and the negative controls did not show any signal (**Supplementary Figures S7C and**
406 **D**), indicating that the observed mCherry and anti-myocilin fluorescent labelling in the lens and
407 retina were specific. These data clearly show the correlation between the presence of transgenic
408 myocilin and lens and retinal alterations.

409 To evaluate the presence of apoptosis associated with the ocular alterations of transgenic zebrafish
410 we carried out a TUNEL assay. Both, control wild type retina and cornea presented a reduced
411 number of TUNEL positive cells in the GCL and the most superficial layer of the corneal epithelium
412 (**Figures 7A and B**, arrowheads). However, representative areas of transgenic zebrafish (**Figure 7C**
413 **and D**) presented an increased number of positive cells in the corneal epithelium, mainly located in
414 the most superficial layer (**Figures 7E-H, arrowheads**), but also in the interior epithelial layers of
415 the most severely affected eyes (**Figure 7E, arrowheads**). Apoptotic cells were not observed in any

416 other part of the anterior segment. TUNEL positive cells were also detected in the retinal mass
417 (**Figure 7I, arrowheads**), as well as in the GCL of transgenic eyes with less severe phenotypes
418 (**Figures 7J-L**). The quantitative analysis revealed a significant five- to 10-fold increase in apoptotic
419 cells in the corneal epithelium and retina of transgenic zebrafish, compared with the corresponding
420 tissues of wild type animals (**Figure 7M**). The specificity of the TUNEL assay was supported by
421 positive nuclear staining in the cornea and retina of the positive controls (**Supplementary Figures**
422 **S8A and C**), and the absence of signals in the corresponding negative controls (**Supplementary**
423 **Figures S8B and D**).

424 Retinal and optic nerve gliosis was also assessed immunohistochemically using an anti-GFAP
425 antibody. As we anticipated, control wild type retina and optic nerve showed weak GFAP
426 immunoreactivity, mainly localized in the GCL and also in the optic nerve surface (**Figures 8A and**
427 **B, arrowheads**). In contrast, the retinas from transgenic animals exhibited increased retinal GFAP
428 immunoreactivity dominated by a granular pattern in the retinal mass that did not associate with any
429 identifiable cell layer (**Figure 8E, arrowheads**). In eyes with better-preserved retinal structure strong
430 anti-GFAP signals were mainly localized in the GCL (**Figures 8F-H, arrowheads**), supporting Müller
431 cell activation. Variable GFAP immunoreactivity was observed in the optic nerve of transgenic
432 animals, ranging from undetectable or weak (**Figures 8I and K, respectively**) to intense (**Figures 8J**
433 **and L**). Although it has been found that GFAP is expressed only in Müller glial cells of the zebrafish
434 retina (Koke et al., 2010), we did not observe the typical morphology of these cells in the altered
435 transgenic zebrafish, which might be due to severe structural and cellular retinal alterations present in
436 these animals. Anti-GFAP staining was negative in the most affected optic nerve (**Figure 8I**), which
437 might indicate a complete loss of Müller cells because of advanced optic nerve degeneration. The
438 specificity of the GFAP immunoreactivity was supported by the absence of signals in the negative
439 control (**Supplementary Figure S9**).

440 To identify the contribution of retinal ganglion cells to the retinal mass that characterized the most
441 severe transgenic zebrafish ocular phenotype, double immunolabeling against calretinin (Garcia-
442 Crespo and Vecino, 2004) and Brn3a (Xiang et al., 1995) was used. Control retinas showed clear
443 calretinin immunoreactivity in the retinal ganglion cell layer and optic nerve fibers. Also, a
444 subpopulation of amacrine and bipolar cells in the inner nuclear layer showed positive
445 immunoreactivity for calretinin (**Figures 9A and B**). Most ganglion cells, in addition to bipolar cells
446 and cone photoreceptors, showed Brn3a immunoreactivity (**Figures 9A and B**). Ganglion cells were
447 identified by their double immunolabeling for calretinin and Brn3a (**Figures 9B, arrowheads**). TO-
448 PRO-3-iodide was used for nuclei staining. In accordance with the previous histological analysis (see
449 **Figure 2A**), overview of the immunostained transgenic eyes showed the loss of retinal organization
450 (**Figures 9C, E**). In addition, several axon bundles (asterisks) and increased calretinin-positive cells
451 were observed (**Figures 9C, D**). The abundance of double-positive cells indicated the expansion of
452 retinal ganglion cells in the dysplastic retina (**Figures 9E, F, arrowheads**). These data support the
453 contribution of increased retinal ganglion cells and nerve fibers to the highly unstructured retina of
454 zebrafish overexpressing myocilin. No positive signals were observed in the negative controls,
455 showing the specificity of the immunolabeling (**Supplementary Figure S10**).

456 **Visual function.**

457 The visual function of the transgenic zebrafish line was evaluated using the social preference test
458 described in materials and methods. We tested a total of 13 available transgenic *myoc* male zebrafish
459 of which six presented wild type-like ocular phenotypes and 7 showed uni- or bilateral ocular
460 alterations. Four male wild type zebrafish of the same age and sex were used as controls.

461 Interestingly, all transgenic animals showed a significant reduction of the time spent at the window
 462 proximal to the social stimulus (approximately four-times shorter for wild type-like transgenic
 463 animals and 10-times shorter for transgenic zebrafish with ocular alterations, **Supplementary Figure**
 464 **S11**). These results indicate that all old transgenic zebrafish has impaired visual function, even those
 465 with wild type-like ocular phenotypes.

466 **Ocular transcriptomic profile.**

467 To characterize ocular gene expression changes associated with *myoc* overexpression and ocular
 468 alterations in old transgenic zebrafish we carried out RNAseq as described in Materials and Methods.
 469 The purified mRNA from each experimental group was pooled to minimize the effect of individual
 470 variability. From a total of 39987 coding RNAs and multiple non-coding polyadenylated RNAs
 471 identified in the transcriptomic analysis, we excluded 18954 genes with zero counts, selecting 21033
 472 genes for differential expression analysis. Pearson's coefficient used to assess the similarity between
 473 samples indicated a high similarity among samples, with the highest value obtained between the two
 474 wild type replicas (**Supplementary Figure S12A**). On the other hand, comparison of DEG patterns
 475 (fold change ≥ 2 and raw p-value < 0.05) by hierarchical clustering analysis also showed the higher
 476 similarity between the two wild type replicas (**Supplementary Figure S12B**), indicating that many
 477 detected wild type gene expression patterns were reproducible.

478 To identify DEGs in the altered eyes of transgenic zebrafish we compared gene expression of each
 479 transgenic ocular transcriptome with each of the two independent biological replicas of the ocular
 480 wild type transcriptome (Tg/+ OA vs. +/+1 and Tg/+ OA vs. +/+2). We found that an average of
 481 2422 genes were significantly upregulated (fold change > 2 and raw $p < 0.05$) and 2652 genes were
 482 significantly downregulated (fold change < -2 and raw $p < 0.05$, **Supplementary Figure S13**). As
 483 expected, we found a significant increased myocilin expression in the transgenic eyes (2,83-fold; $p =$
 484 1.3×10^{-5}).

485 We selected for further analyses the significant top-50 down- and up-regulated genes that coincided
 486 in the two comparisons of the ocular transgenic transcriptome with each of the two wild type ocular
 487 transcriptomes (**Figure 10** and **Supplementary Tables S2 and 3**). The absolute gene expression
 488 differences were remarkable for eyes with ocular alterations, ranging from approximately 10-fold to
 489 more than 200-fold for down-regulated genes (**Figure 10A** and **Supplementary Table S2**). and from
 490 six-fold to more than 50-fold for up-regulated genes (**Figure 10B** and **Supplementary Table S3**).

491 To evaluate the reliability of the identified DEGs we evaluated by qRT-PCR expression differences
 492 of some selected representative genes. First, we selected the two most up- (*coiled-coil domain*
 493 *containing 24*, *ccdc24*; and *angiopoietin-like protein 3*, *agptl3*) or down-regulated (*crystallin beta*
 494 *gamma X*, *crybgx*; and *beaded filament structural protein 2*, *phakinin*, *bfsp2*) genes. Interestingly,
 495 three of these genes encoded lens proteins. The qRT-PCR results confirmed the differential
 496 expression differences, although absolute fold-change values were smaller than those obtained in the
 497 transcriptomic analysis (**Figures 10C and D** and **Supplementary Table S4**). This discrepancies
 498 between RNAseq and qRT-PCR are not unusual and may be explained by the methodological
 499 differences of the two procedures.

500 Second, we also re-evaluated by qRT-PCR a group of DEGs that were not in the top-50 DEGs but
 501 presented absolute expression difference values higher than 2 and were considered functionally
 502 interesting. These genes included *lgsn* (*lengsin*, *lens protein with glutamine synthetase domain*), *cav2*
 503 (*caveolin 2*), *arhgef40* (*rho guanine nucleotide exchange factor 40*), and *vangl2* (*VANGL planar cell*

504 *polarity protein 2*). *Lgsn* is expressed in the lens (Harding et al., 2008), *cav2* is a glaucoma-related
 505 gene (Thorleifsson et al., 2010), like *myoc*, *vangl2* encode a wnt-related protein (Gao et al., 2011)
 506 and *arhgef40* plays a role in cell adhesion (Isozaki et al., 2020). The qRT-PCR also confirmed the
 507 RNAseq results (**Figures 10 C and D** and **Supplementary Table S4**).

508 Next, to unveil functional relationships in the group of top-100 DEGs (top-50 up- plus top-50 down-
 509 regulated genes), we carried out a comprehensive enrichment analysis using Epistemic AI, an
 510 artificial intelligence web-based software platform (Da Chen Emily Koo, 2022) and three different
 511 databases (Elsevier pathway collection, BioPlanet 2019 and KEGG pathway database). The results
 512 revealed that at least 12 of these genes (12% of top DEGs) encoded lens and cataract-related proteins,
 513 e.g., beta-, gamma- and beta-gamma-crystallins, lens intrinsic protein, lens epithelial protein and
 514 lactase-like proteins (**Supplementary Table S5**). At least six muscle-related genes (6% of top DEGs,
 515 including myosin, actin, tropomyosin and troponin), were also significantly overexpressed in the
 516 abnormal eyes of old male transgenic zebrafish overexpressing myocilin (**Supplementary Table S5**).
 517 In addition, genes involved in metabolism of endogenous sterols (*cyp39a1* and *cyp11c1*) and folate
 518 (*zgc:153031* and *zgc:153031*), visual cycle (*zgc:112332* and *zgc:112332*) and leukocyte
 519 transendothelial migration (*myl10*, *mylpfb*, and *ptk2ba*), were also enriched among these DEGs.

520 A complementary functional enrichment evaluation of the same group of DEGs using the gene
 521 ontology enrichment analysis web tool ShinyGO [48], showed similar results. The different
 522 categories that resulted from this analysis were classified into two major functional groups: 1) ocular
 523 and lens related development and 2) skeletal muscle contraction (**Supplementary Table S6**). These
 524 groups were composed, respectively, of the lens- and muscle-related genes identified in the previous
 525 analysis.

526 Interestingly, two alpha collagen genes, *col7a11* and *col28a1a*, were upregulated in altered eyes of
 527 transgenic zebrafish. *Col7a11* was the third most overexpressed gene (**Figure 10B** and
 528 **Supplementary Table S3**). These changes support the increased deposition of extracellular matrix
 529 observed in the altered eyes of transgenic zebrafish.

530 **Confirmation of the ocular phenotypes in a new generation of transgenic *myoc* zebrafish.**

531 We obtained a new generation (F4) of heterozygous transgenic animals to corroborate the ocular
 532 alterations identified in the old transgenic zebrafish and to determine more precisely their onset. Due
 533 to the advanced age of F3 transgenic zebrafish the F4 generation was obtained by *in vitro*
 534 fertilization. To that end, we employed the sperm of three wild type-like transgenic F3 males and
 535 oocytes from two wild type female zebrafish. The male and female gametes were pooled. Eighteen
 536 out of 40 embryos were positive for mCherry fluorescence, indicating that they were transgenic.
 537 These animals were examined for macroscopic and histological (hematoxylin-eosin and Sirius red
 538 staining) ocular alterations at the ages of five (four individuals), seven (six individuals) and 13
 539 months (seven individuals). Macroscopic ocular abnormalities were not evident until the 13th month
 540 of life. The seven zebrafish that remained alive at this age were males, and in six of them (85.7%) the
 541 lens was variably cloudy, indicating the existence of cataract (**Figures 11A-C, and I and J, asterisk**).
 542 The lens abnormalities were not visible in lateral views (**Figures 11D-G and K-N**). Three siblings
 543 showed additional variable alterations of the anterior segment of the eye, affecting the cornea and
 544 iris. Corneal phenotypes ranged from apparently normal (**Figure 11B**) to corneas with large
 545 hyperplasia (**Figure 11C, yellow arrow**), thickened (**Figure 11I, yellow arrows**), and flattened areas
 546 (**Figure 11J, yellow arrows**). Iris overgrowth with reduced and irregular pupil (**Figures 11E and G,**
 547 white arrowhead) and decreased anterior chamber size (**Figures 11E and G, white arrowhead**) was

548 also present in the eye with corneal hyperplasia (**Figure 11G**, black arrowhead). In addition, this
 549 same zebrafish also presented shortened and outwardly curved operculums (**Figures 11D and E**).
 550 Two transgenic individuals (28%) presented lower jaw shortening (**Figures 11H, K and L**, white
 551 arrow). All these alterations were not present in control wild type zebrafish of the same sex and age
 552 (**Figures 11O-U**).

553 Histological analysis of hematoxylin-eosin-stained eye tissue sections from five transgenic and two
 554 13-month-old wild type zebrafish (control) confirmed the main variable alterations of the anterior
 555 ocular segment detected in their F3 siblings. A general observation revealed variable alterations in
 556 the anterior segment of three animals, with no evident retinal alterations (**Figures 12A and B**). The
 557 lens capsule and epithelium were apparently unaffected at this stage and no other significant lens
 558 abnormalities were observed in hematoxylin-eosin stained sections from zebrafish with lens clouding
 559 (**Figures 12A and B**). Detailed histological examination of the anterior segment clearly showed
 560 variable degrees of thickened corneal epithelium, corneal stroma and annular ligament in all eyes
 561 (**Figures 12D-G**). The most severe phenotype presented an extremely hypertrophic anterior segment,
 562 with remarkable increased number of cells and cell layers of the corneal epithelium, and strong
 563 corneal stroma and annular ligament thickening, and iris overgrowth with absence of the anterior
 564 chamber (**Figures 12A, LE and E**). Additional features of this severe phenotypes were the presence
 565 of abundant cells, probably keratocytes, in the thickened corneal stroma (**Figure 12E**, blue arrows),
 566 formation of cavities between the corneal epithelium and stroma, as well as in the contact points
 567 between the cornea and iris (**Figure 12E**) (**Figures 12B and G**), enlargement of corneal limbus,
 568 increased number of limbal melanocytes (**Figures 12E-G**, yellow arrows), and thickening and
 569 hypertrophy of the NPCE (**Figure 12E**). Wild type zebrafish did not show any of these ocular
 570 alterations (**Figures 12C and H**) indicating that they are specific of transgenic animals. Overall,
 571 these results reveal that 13 months old F4 transgenic *myoc* zebrafish anticipate most of the main
 572 variable macroscopic and histologic ocular alterations identified in old (two years) F3 transgenic
 573 zebrafish. In addition, the ocular phenotypes of these transgenic zebrafish show that the alterations
 574 begin in the anterior segment and in more advance stages they extend to the retina.

575 Immunodetection of the cell proliferation marker Ki-67 (Gerdes et al., 1984) was used to determine
 576 the existence of dividing cells in the eyes of both adult (13 months) and old (two years) transgenic
 577 zebrafish. Irregularly distributed groups of Ki-67 positive cells were identified in the retinal ganglion
 578 cell layer of 13 months transgenic zebrafish (**Figure 13A**). In contrast, wild type zebrafish of the
 579 same age presented a small number of isolated Ki-67 immunoreactive cells in this retinal layer
 580 (**Figure 13B**), and the signals were not seen in the negative control (**Figure 13C**), indicating that
 581 they were specific. Representative areas of the retina were selected for the immunohistochemical
 582 analysis of transgenic and wildtype zebrafish (Figure 13D and E, respectively). The quantitative
 583 analysis showed an approximately four-fold increased number of Ki-67 positive cells in the retinal
 584 ganglion cell layer of transgenic animals, compared with wild type zebrafish (**Figure 13F**). These
 585 results indicate that retinal ganglion cell proliferation begins at least at the age of 13 months and
 586 provide further support for the idea that these cells contribute to the severe retinal alterations detected
 587 in old zebrafish overexpressing myocilin.

588 No other cell proliferation differences were observed in ocular tissues of adult transgenic zebrafish.
 589 Ki-67 immunohistochemistry of old transgenic zebrafish eyes (two years) did not reveal significant
 590 differences with the wild type eyes (**Supplementary Figure S14**), showing that at this age there was
 591 not detectable increased cellular proliferation in the hypertrophic anterior segment and retina.

592 Discussion

593 The biological function of the glaucoma-associated protein myocilin remains poorly known. Both, *in*
594 *vitro* and *in vivo* (knockout and transgenic) models developed over more than 20 years have partially
595 elucidated its biological function. Zebrafish can be used as a model organism to study the function of
596 human myocilin because of the relatively good evolutionary conservation of these two orthologue
597 genes. In fact, the *myoc* gene has four exons whereas its human orthologue consists of three exons.
598 Both genes present 37.2% nucleotide identity in their coding regions and encode proteins with a
599 relatively well conserved olfactomedin domain that presents 45% amino acid sequence identity,
600 although the N-terminal coiled-coils of the human protein are not predicted in zebrafish myocilin
601 (Atienzar-Aroca et al., 2021). On the other hand, overexpression and/or misexpression of wild type
602 gene products represent a powerful tool to identify biological pathways in which the corresponding
603 genes are involved, and that may remain undetected by loss-of-function analysis (Prelich, 2012). To
604 obtain new clues on myocilin's biological role, in this study we generated, to the best of our
605 knowledge, the first reported transgenic zebrafish line overexpressing myocilin. The established
606 zebrafish line integrated the bicistronic transgene [*Tg(actb1:myoc-2A-mCherry)*] on chromosome 11,
607 in an intergenic region upstream of the *tbl1xr1a* gene, resulting in an approximately four-fold
608 myocilin overexpression compared with wild type zebrafish.

609 Taking into account the expression of *myoc* in human and zebrafish ocular tissues (Ortego et al.,
610 1997; Huang et al., 2000; Atienzar-Aroca et al., 2021) and the role of this gene in glaucoma, in this
611 initial study we focused our analyses on ocular phenotypes associated with myocilin overexpression.
612 Larvae and young adult transgenic zebrafish did not manifest any detectable macroscopic or
613 histological ocular alterations. This finding was not surprising since previous reports have shown that
614 vertebrate animal models under standard conditions do not develop ocular alterations as a result of
615 either *myoc* knockout loss-of-function (Kim et al., 2001; Atienzar-Aroca et al., 2021) or transgenic
616 myocilin overexpression (Gould et al., 2004). Nevertheless, elevated expression of this gene in the
617 invertebrate *Drosophila* led to ocular alterations (Borras et al., 2003; Carbone et al., 2009).
618 Interestingly, at the age of 13 months we detected the presence of variable and incompletely
619 penetrant ocular phenotypes in the anterior segment of transgenic zebrafish, affecting predominantly
620 the cornea, annular ligament iris and lens. The most severe anterior segment abnormalities were
621 characterized by enlargement of the corneal limbus, remarkable thickening of both corneal
622 epithelium and stroma, and overgrowth of the annular ligament and iris, that in the most severe
623 phenotype resulted in reduced size of the anterior chamber and pupil. The ECM of most of these
624 tissues was hypertrophic and, in some cases, showed striking thickening of the corneal stroma with
625 the presence of cysts containing amorphous collagen deposits associated with abundant keratocytes.
626 Expanded stromal keratocytes might indicate a defect in the limbal stem cell niche, the place of
627 corneal and stromal cells formation in mature animals (Funderburgh et al., 2016). At this age we also
628 found hypertrophic NPCE and signs of retinal alterations consisting of variable nerve fiber layer
629 thickening and increased ganglion cell proliferation. These changes might precede the severe
630 dysplastic retinal alterations present in old transgenic zebrafish. Although different degrees of lens
631 clouding were observed in alive transgenic zebrafish at this age, no significant histological alterations
632 were detected with hematoxylin-eosin-staining. An additional feature was the presence of variable
633 choroid body hypertrophy. These ocular anomalies were also present in two-years-old male
634 transgenic zebrafish which, in some eyes also showed increased collagen deposition and hypertrophy
635 of the lens capsule. Moreover, the scleral cartilage exhibited increased number of chondrocytes and
636 ECM, and very abundant vitreous material was associated with in the most severe phenotypes. The
637 reduced number of 13-month-old transgenic zebrafish precluded a systematic follow-up of the
638 phenotype progression until the age of two years. Further work is required to assess the evolution of
639 ocular alterations between 13 and 48 months. Overall, these results show that myocilin
640 overexpression associates with severe ECM alterations in different regions of the eye and increased

641 number of ocular cells involved in ECM synthesis, i.e., keratocytes, epithelial lens cells, scleral
642 cartilage chondrocytes, and NPCE cells, in accordance with its role as a matricellular protein.

643 The variable retinal alterations associated with *in vivo* myocilin overexpression were characterized by
644 areas of retinal degeneration. The most severe phenotype presented a remarkable retinal overgrowth
645 that resulted in disorganization of the retinal layers and invasion of the vitreous cavity and optic
646 nerve hypertrophy. Preliminary immunohistochemistry of calreticulin and Brn3a supports that
647 ganglion cells may play key roles in these dysplastic retinal alterations. Analysis of the cell
648 proliferation marker Ki-67 did not identify dividing cells in the dysplastic retina, indicating the slow
649 progression of the phenotype and/or that the phenotype approached its final stage. However, a
650 significant increased number of proliferating cells (Ki-67 positive) was observed in the retinal
651 ganglion cell layer of 13 months-old transgenic zebrafish, suggesting that over-proliferation of these
652 cells begins at least at this time, and supporting the contribution of the GCL to the phenotype. These
653 findings need further confirmation.

654 The observed phenotypic variability might reflect, at least partially, different developmental stages of
655 ocular alterations, which starting in the anterior segment of the eye may extend to the retina and the
656 posterior pole. We hypothesize that the evolution of the phenotype may differ between the two eyes
657 in the same zebrafish, depending on distinct exposure to environmental factors, generating
658 intraindividual variability. In line with this hypothesis, individual genetic and/or environmental
659 factors could generate inter-individual variability in ocular alterations.

660 The upregulation of the intermediate filament protein GFAP, which is a cellular marker for retinal
661 injury (Bringmann et al., 2006), and the expansion of Müller cells, demonstrated the existence of
662 severe retinal damage and gliosis in the transgenic zebrafish line overexpressing myocilin. Increased
663 apoptosis in the GCL associated with retinal alterations further supported the role of this retinal layer
664 in the phenotype. Functional evaluations demonstrated that these retinal alterations resulted in
665 important visual impairment of transgenic zebrafish. Remarkably, transgenic zebrafish with no
666 apparent ocular alterations, also manifested visual loss, indicating the existence of molecular changes
667 that affect sight before the damage is detectable at the histological and macroscopic levels. Future
668 investigations are needed to determine molecular mechanisms leading to the initial loss of vision
669 associated with myocilin overexpression.

670 Curiously, many of the described anterior segment defects resemble those caused by loss-of-function
671 of the long form of the zebrafish gene *crumbs2b* (*crb2b-lf*), which are characterized by variable and
672 incompletely penetrant expansion of the iris and tissues of the iridocorneal angle, resulting in small
673 pupils, increased number of corneal stromal keratocytes, altered corneal endothelium and expanded
674 lens capsule (Kujawski et al., 2020). Crumbs are apical transmembrane proteins involved in epithelial
675 organization and cell polarity processes (Bazellieres et al., 2009), and its dysfunction is associated
676 with loss of cell polarity and adhesion, increased early retinal apoptosis, disruption of lamination
677 (Quinn and Wijnholds, 2019), and variable retinal degeneration (Alves et al., 2013; Pellissier et al.,
678 2013). The crumbs protein complex also coordinates multiple downstream signaling pathways, such
679 as Notch and Hippo pathways, with roles in different developmental processes including cell self-
680 renewal, proliferation, differentiation, mitosis, and apoptosis (Genevet et al., 2009; Thompson et al.,
681 2013). Overall, these data may suggest a possible mechanism to explain the observed phenotypes,
682 i.e., as a matricellular protein, myocilin overexpression might impair cell adhesion through the
683 crumbs complex, contributing to the observed retinal alterations. In this line, it is also interesting that
684 different reports have provided evidence on the cell adhesion role of myocilin, although probably by
685 different mechanisms (Goldwich et al., 2009; Aroca-Aguilar et al., 2018). In line with this idea, it has

686 been proposed that olfactomedin domains facilitate protein–protein interactions, intercellular
687 interactions, and cell adhesion (Anholt, 2014). Although all these data suggest a functional link
688 between myocilin and crumbs pathways, further investigations are required to assess this hypothesis.

689 Another interesting finding was that adult male, but not female, transgenic zebrafish showed ocular
690 alterations, indicating that long-term interplay of male physiological factors with overexpressed
691 myocilin is required for developing the ocular alterations present in transgenic zebrafish. In this line,
692 our previous work has proposed a role for myocilin in zebrafish sex determination (Atienzar-Aroca et
693 al., 2021). Nevertheless, because of the relatively small sample of transgenic zebrafish we cannot
694 completely rule out a sampling sex-bias in these observations. Thereby, additional work is required to
695 confirm the result.

696 Our transcriptomic analysis revealed that many top DEGs in the altered eyes of transgenic zebrafish
697 were characteristic of the lens, muscle, and ECM. Genes involved in metabolism, inflammation,
698 photoreceptor physiology, and cell division were also differentially expressed, showing that these
699 processes were affected by *in vivo* myocilin overexpression. Nevertheless, it could be difficult to
700 determine whether these changes are cause or effect of the ocular phenotypes.

701 Crystallins differentially expressed in the transgenic eyes are predicted to be structural constituents of
702 the eye lens, with roles in lens development in camera-type eyes and visual perception
703 (<https://zfin.org/>), and are expressed in the lens epithelium (Wang et al., 2004). Human orthologs of
704 some of DEGs identified in this study, including *mipa* (major intrinsic protein of lens fiber, also
705 known as aquaporin 0 or *aqp0*) and *bfsp2* (beaded filament structural protein 2, phakinin) are
706 implicated in cataracts (Berry et al., 2000; Jakobs et al., 2000) and therefore, its dysregulated
707 expression might contribute to lens cloudiness present in the eyes of some adult transgenic zebrafish.
708 Mipa is a water channel and the most abundant protein in the cell membrane of lens fiber (Varadaraj
709 et al., 1999) and *bfs2* participates in intermediate filament organization in the eye lens (Song et al.,
710 2009). Disruption of lens cell differentiation and interactions promoted by overexpression of two
711 other lens genes, *lgsn* (*lengsin*) and *lenep* (*lens epithelial protein*) with roles in these biological
712 processes (Wen et al., 2000; Harding et al., 2008), may influence the lens phenotypes. Interestingly,
713 alpha crystallins, which are small heat shock proteins (de Jong et al., 1989) that protect other proteins
714 against stress-induced aggregation (Horwitz, 1992; Xi et al., 2003), were not found into the top
715 DEGs. In addition, the only two alpha crystallins, *cryaa* and *cryabb*, that were differentially
716 expressed were downregulated with expression fold changes of -3.8 and -3.6, respectively. These
717 data indicate that the detected lens phenotypes are not connected with cellular stress induced by
718 overexpression of the transgenic protein.

719 The muscular-related DEGs encoded proteins that were either structural (*myl1* and *myl10*) or
720 regulatory (myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle b, *mylpfb*) constituents of the
721 myosin light chain. Regulatory proteins of muscle contraction, such as troponin C2 (*tnnc2*), troponin
722 I type 2a (skeletal, fast), tandem duplicate 4, (*tnni2a.4*), and alpha-tropomyosin (*tpma*), were also
723 components of this group. Interestingly, two of these genes (*myl10* and *mylpfb*), along with protein
724 tyrosine kinase 2 beta, a (*ptk2ba*), also belonged to functional enriched group related with leukocyte
725 transendothelial migration (**Supplementary Table S5**), in line with the reported role of myocilin in
726 adhesion of human leukocytes to endothelial monolayers (Aroca-Aguilar et al., 2018). These data
727 indicate the possible existence of muscular phenotypes associated with myocilin overexpression in
728 zebrafish. In accordance with this concept, it has been reported that the average size of muscle fibers
729 of transgenic mice overexpressing myocilin increased by 36% relative to controls, suggesting that
730 intracellular myocilin plays a role as a regulator of muscle hypertrophy pathways, acting through the

731 components of dystrophin-associated protein complex (Joe et al., 2012). Although in this study we
 732 did not evaluate non-ocular alterations, further investigations are required to assess the presence of
 733 muscular abnormalities associated with myocilin overexpression in zebrafish.

734 Several DEGs identified putative functional connections of myocilin with metabolism of folate and
 735 aldosterone, as well as sterols. Two folate-related genes were down-expressed in the eyes of
 736 transgenic zebrafish: phenylalanine hydroxylase (*pah*) and *zgc:153031*. The latter gene was identified
 737 by epistemic as orthologous to human dihydrofolate reductase and dihydrofolate reductase 2 (*DHFR*
 738 and *DHFR2*). On the other hand, *Cyp11c1* and *cyp39a1*, which are involved in sterol metabolism,
 739 were overexpressed. The former gene encodes a CYP450 enzyme that mainly catalyzes the formation
 740 of cortisol and the zebrafish androgen 11-Ketotestosterone (Zhang et al., 2020; Zheng et al., 2020).
 741 Interestingly, *cyp11c1* is also upregulated in a *myoc* knockout zebrafish line, which differentiates all
 742 individuals as males (Atienzar-Aroca et al., 2021). These data indicate the existence of a possible
 743 functional linkage between *cyp11c1* and *myoc* and the male-associated phenotypes observed in this
 744 study. The second gene, *cyp39a1*, is involved in bile acid biosynthesis (Pandak and Kakiyama, 2019)
 745 and cholesterol homeostasis (Li-Hawkins et al., 2000). These data reveal interesting connections of
 746 myocilin with biological processes, although additional experimental work is essential for a complete
 747 functional interpretation.

748 Overexpression of *spice1* (spindle and centriole associated protein 1), a gene required for centriole
 749 duplication and mitotic chromosome congression (Archinti et al., 2010), supports the existence of
 750 increased cell proliferation and dysplasia in the altered eyes of the transgenic zebrafish.

751 Some of the gene expression changes detected in the altered eyes of transgenic zebrafish may be
 752 consequence or response to inflammation and tissular damage. In fact, the overexpressed genes *irg1l*
 753 (immunoresponsive gene 1-like) and *nos2b* (nitric oxide synthase 2b, inducible) are involved in
 754 inflammatory response to different insults (Okamoto et al., 2004; Hall et al., 2013; Wittmann et al.,
 755 2015). Other interesting findings were difficult to interpret. For instance, two upregulated genes,
 756 *zgc:112332* and *zgc:112332*, were identified by epistemic as orthologous to human retinol
 757 dehydrogenases 11 and 12 (*RDH11* and *RDH12*) and human *LOC118142757*, respectively. The latter
 758 gene encodes a transcript resulting from readthrough between neighbor genes *GUCAIANB*
 759 (*GUCAIA* neighbor) and a *GUCAIA* (guanylate cyclase activator 1A), that is translated into the same
 760 protein as *GUCA1A* (www.genecards.org). These data indicate that *zgc:112332* and *zgc:112332* play
 761 roles in the visual cycle and their upregulation in the transgenic zebrafish might be a consequence of
 762 photoreceptor alterations present in the eyes of transgenic zebrafish.

763 Given the evolutionary differences between the zebrafish and human proteins, further research is
 764 required to confirm whether the effects of myocilin overexpression in zebrafish may have a general
 765 biological meaning or if they are limited to this species. One limitation of the present study was the
 766 relatively small number of two-year old transgenic zebrafish with ocular alterations. Having this in
 767 mind and to minimize the effect of individual gene expression variability, we pooled six altered eyes
 768 obtained from three old F3 siblings. Therefore, the RNA sample used for transcriptomics represents
 769 the average gene expression in three independent biological replicas. A parallel approach was
 770 followed with the two wild type ocular RNA preparations used as reference. qPCR analysis of
 771 selected genes supported that gene expression differences detected in the transcriptomic analysis
 772 were reliable. On the other hand, two-year-old male wild type zebrafish used as controls were bred in
 773 parallel with F3 transgenic animals, but they were not siblings of the F3 transgenic animals. Thus,
 774 additional replication of transcriptomic analysis, using wild type siblings of transgenic zebrafish,
 775 would contribute to firmly demonstrate the identified gene expression differences.

776 In conclusion, and to the best of our knowledge, in this study we report the first *myoc* transgenic
777 zebrafish line. Characteristic anterior segment and retinal alterations appeared in adult male
778 transgenic animals correlating with overexpression of the transgenic protein. These phenotypes were
779 associated with disruption of ECM and altered expression of genes involved in lens, muscular and
780 ECM activities, which may be cause or effect of the phenotype. This study provides further support
781 for the function of myocilin in matricellular activities influencing cellular growth and tissular
782 organization, at least in zebrafish. In addition, our results shed new insights into the complex
783 biological activities of this fascinating and puzzling protein.

784 **Conflict of Interest**

785 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial
786 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

787 **Author Contributions**

788 J.E. and J.-D.A.-A. conceived and designed the study. R.A.-A., J.-D.A.-A., A.T., J.-J.F.-F., J.-M.B.-
789 F. M.-J.C.-V, M.-J.R.-P., and N.C. performed the analyses. J.E. wrote the manuscript. J.E. supervised
790 the study. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

791 **Funding**

792 This research was funded by research grants from the “Instituto de Salud Carlos III/European
793 Regional Development Fund (ERDF)” (PI19/00208 and RD16/0008/0019, OFTARED), the Regional
794 Ministry of Science and Technology of the Board of the Communities of “Castilla-La Mancha”
795 (SBPLY/17/180501/000404; <http://www.educa.jccm.es/idiuniv/es>) and research funds from
796 Universidad de Castilla-La Mancha (2019-GRIN-26945). A.T. was recipient of a predoctoral contract
797 from Castilla-La Mancha University (Ref.: 2020-PREDUCLM-16605).

798 **Acknowledgments**

799 We thank Epistemic AI for the kind access to the artificial intelligence web-based software platform.

800

801 **References**

- 802 Alves, C.H., Sanz, A.S., Park, B., Pellissier, L.P., Tanimoto, N., Beck, S.C., et al. (2013). Loss of
 803 CRB2 in the mouse retina mimics human retinitis pigmentosa due to mutations in the CRB1
 804 gene. *Hum Mol Genet* 22(1), 35-50. doi: 10.1093/hmg/dds398.
- 805 Anholt, R.R. (2014). Olfactomedin proteins: central players in development and disease. *Front Cell*
 806 *Dev Biol* 2, 6. doi: 10.3389/fcell.2014.00006.
- 807 Archinti, M., Lacasa, C., Teixido-Travesa, N., and Luders, J. (2010). SPICE--a previously
 808 uncharacterized protein required for centriole duplication and mitotic chromosome
 809 congression. *J Cell Sci* 123(Pt 18), 3039-3046. doi: 10.1242/jcs.069963.
- 810 Aroca-Aguilar, J.-D., Martinez-Redondo, F., Martin-Gil, A., Pintor, J., Coca-Prados, M., and
 811 Escribano, J. (2013). Bicarbonate-Dependent Secretion and Proteolytic Processing of
 812 Recombinant Myocilin. *Plos One* 8(1). doi: 10.1371/journal.pone.0054385.
- 813 Aroca-Aguilar, J.-D., Martinez-Redondo, F., Sanchez-Sanchez, F., Coca-Prados, M., and Escribano,
 814 J. (2010). Functional Role of Proteolytic Processing of Recombinant Myocilin in Self-
 815 Aggregation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51(1), 72-78. doi:
 816 10.1167/iovs.09-4118.
- 817 Aroca-Aguilar, J.D., Fernández-Navarro, A., Ontañón, J., Coca-Prados, M., and Escribano, J. (2018).
 818 Identification of myocilin as a blood plasma protein and analysis of its role in leukocyte
 819 adhesion to endothelial cell monolayers. *PLoS One* 13(12), e0209364. doi:
 820 10.1371/journal.pone.0209364.
- 821 Aroca-Aguilar, J.D., Sanchez-Sanchez, F., Ghosh, S., Coca-Prados, M., and Escribano, J. (2005).
 822 Myocilin mutations causing glaucoma inhibit the intracellular endoproteolytic cleavage of
 823 myocilin between amino acids Arg226 and Ile227. *J.Biol.Chem.* 280(22), 21043-21051.
- 824 Aroca-Aguilar, J.D., Sanchez-Sanchez, F., Ghosh, S., Fernandez-Navarro, A., Coca-Prados, M., and
 825 Escribano, J. (2011). Interaction of Recombinant Myocilin with the Matricellular Protein
 826 SPARC: Functional Implications. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 52(1), 179-189.
- 827 Atienzar-Aroca, R., Aroca-Aguilar, J.D., Alexandre-Moreno, S., Ferre-Fernandez, J.J., Bonet-
 828 Fernandez, J.M., Cabanero-Varela, M.J., et al. (2021). Knockout of myoc Provides Evidence
 829 for the Role of Myocilin in Zebrafish Sex Determination Associated with Wnt Signalling
 830 Downregulation. *Biology (Basel)* 10(2). doi: 10.3390/biology10020098.
- 831 Bazellieres, E., Assemat, E., Arsanto, J.P., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. (2009). Crumbs
 832 proteins in epithelial morphogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 2149-2169. doi:
 833 10.2741/3368.
- 834 Berry, V., Francis, P., Kaushal, S., Moore, A., and Bhattacharya, S. (2000). Missense mutations in
 835 MIP underlie autosomal dominant 'polymorphic' and lamellar cataracts linked to 12q. *Nat*
 836 *Genet* 25(1), 15-17. doi: 10.1038/75538.
- 837 Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina
 838 sequence data. *Bioinformatics* 30(15), 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- 839 Borrás, T., Morozova, T.V., Heinsohn, S.L., Lyman, R.F., Mackay, T.F., and Anholt, R.R. (2003).
 840 Transcription profiling in Drosophila eyes that overexpress the human glaucoma-associated
 841 trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response protein/myocilin (TIGR/MYOC).
 842 *Genetics* 163(2), 637-645.
- 843 Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S.N., et al.
 844 (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25(4), 397-424.
 845 doi: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.003.
- 846 Carbone, M.A., Ayroles, J.F., Yamamoto, A., Morozova, T.V., West, S.A., Magwire, M.M., et al.
 847 (2009). Overexpression of myocilin in the Drosophila eye activates the unfolded protein

- 848 response: implications for glaucoma. *PLoS One* 4(1), e4216. doi:
849 10.1371/journal.pone.0004216.
- 850 Chatterjee, A., Villarreal, G., Jr., and Rhee, D.J. (2014). Matricellular proteins in the trabecular
851 meshwork: review and update. *J Ocul Pharmacol Ther* 30(6), 447-463. doi:
852 10.1089/jop.2014.0013.
- 853 Da Chen Emily Koo, H.B., Kenneth Ashworth, David J. Heeger, Stefano Pacifico (2022). Epistemic
854 AI platform accelerates innovation by connecting biomedical knowledge
855 *arXiv:2201.11331v2 [cs.AI]*. doi: <https://doi.org/10.48550/arXiv.2201.11331>.
- 856 de Jong, W.W., Hendriks, W., Mulders, J.W., and Bloemendal, H. (1989). Evolution of eye lens
857 crystallins: the stress connection. *Trends Biochem Sci* 14(9), 365-368. doi: 10.1016/0968-
858 0004(89)90009-1.
- 859 Donegan, R.K., Hill, S.E., Freeman, D.M., Nguyen, E., Orwig, S.D., Turnage, K.C., et al. (2015).
860 Structural basis for misfolding in myocilin-associated glaucoma. *Hum Mol Genet* 24(8),
861 2111-2124. doi: 10.1093/hmg/ddu730.
- 862 Escribano, J., Ortego, J., and Coca-Prados, M. (1995). Isolation and characterization of cell-specific
863 cDNA clones from a subtractive library of the ocular ciliary body of a single normal human
864 donor: transcription and synthesis of plasma proteins. *J.Biochem.(Tokyo)* 118(5), 921-931.
- 865 Ezzat, M.K., Howell, K.G., Bahler, C.K., Beito, T.G., Loewen, N., Poeschla, E.M., et al. (2008).
866 Characterization of monoclonal antibodies against the glaucoma-associated protein myocilin.
867 *Exp.Eye Res.* 87(4), 376-384.
- 868 Filla, M.S., Liu, X., Nguyen, T.D., Polansky, J.R., Brandt, C.R., Kaufman, P.L., et al. (2002). In
869 Vitro Localization of TIGR/MYOC in Trabecular Meshwork Extracellular Matrix and
870 Binding to Fibronectin. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 43(1), 151-161.
- 871 Funderburgh, J.L., Funderburgh, M.L., and Du, Y. (2016). Stem Cells in the Limbal Stroma. *Ocul*
872 *Surf* 14(2), 113-120. doi: 10.1016/j.jtos.2015.12.006.
- 873 Gao, B., Song, H., Bishop, K., Elliot, G., Garrett, L., English, M.A., et al. (2011). Wnt signaling
874 gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2.
875 *Dev Cell* 20(2), 163-176. doi: 10.1016/j.devcel.2011.01.001.
- 876 Garcia-Crespo, D., and Vecino, E. (2004). Differential expression of calretinin in the developing and
877 regenerating zebrafish visual system. *Histol Histopathol* 19(4), 1193-1199. doi:
878 10.14670/HH-19.1193.
- 879 Ge, S.X., Jung, D., and Yao, R. (2020). ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals
880 and plants. *Bioinformatics* 36(8), 2628-2629. doi: 10.1093/bioinformatics/btz931.
- 881 Genevet, A., Polesello, C., Blight, K., Robertson, F., Collinson, L.M., Pichaud, F., et al. (2009). The
882 Hippo pathway regulates apical-domain size independently of its growth-control function. *J*
883 *Cell Sci* 122(Pt 14), 2360-2370. doi: 10.1242/jcs.041806.
- 884 Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., and Stein, H. (1984). Cell cycle
885 analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal
886 antibody Ki-67. *J Immunol* 133(4), 1710-1715.
- 887 Gobeil, S., Letartre, L., and Raymond, V. (2006). Functional analysis of the glaucoma-causing
888 TIGR/myocilin protein: integrity of amino-terminal coiled-coil regions and olfactomedin
889 homology domain is essential for extracellular adhesion and secretion. *Exp.Eye Res.* 82(6),
890 1017-1029.
- 891 Goldwich, A., Scholz, M., and Tamm, E.R. (2009). Myocilin promotes substrate adhesion, spreading
892 and formation of focal contacts in podocytes and mesangial cells. *Histochem.Cell Biol.*
893 131(2), 167-180.
- 894 Gould, D.B., Miceli-Libby, L., Savinova, O.V., Torrado, M., Tomarev, S.I., Smith, R.S., et al.
895 (2004). Genetically increasing Myoc expression supports a necessary pathologic role of
896 abnormal proteins in glaucoma. *Mol.Cell Biol.* 24(20), 9019-9025.

- 897 Gould, D.B., Reedy, M., Wilson, L.A., Smith, R.S., Johnson, R.L., and John, S.W. (2006). Mutant
898 myocilin nonsecretion in vivo is not sufficient to cause glaucoma. *Mol. Cell Biol.* 26(22),
899 8427-8436.
- 900 Hall, C.J., Boyle, R.H., Astin, J.W., Flores, M.V., Oehlers, S.H., Sanderson, L.E., et al. (2013).
901 Immunoresponsive gene 1 augments bactericidal activity of macrophage-lineage cells by
902 regulating beta-oxidation-dependent mitochondrial ROS production. *Cell Metab* 18(2), 265-
903 278. doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.018.
- 904 Harding, R.L., Howley, S., Baker, L.J., Murphy, T.R., Archer, W.E., Wistow, G., et al. (2008).
905 Lengsin expression and function during zebrafish lens formation. *Exp Eye Res* 86(5), 807-
906 818. doi: 10.1016/j.exer.2008.02.009.
- 907 Hardy, K.M., Hoffman, E.A., Gonzalez, P., McKay, B.S., and Stamer, W.D. (2005). Extracellular
908 trafficking of myocilin in human trabecular meshwork cells. *J. Biol. Chem.* 280(32), 28917-
909 28926.
- 910 Hill, S.E., Nguyen, E., Donegan, R.K., Patterson-Orazem, A.C., Hazel, A., Gumbart, J.C., et al.
911 (2017). Structure and Misfolding of the Flexible Tripartite Coiled-Coil Domain of Glaucoma-
912 Associated Myocilin. *Structure* 25(11), 1697-1707.e1695. doi: 10.1016/j.str.2017.09.008.
- 913 Hoffman, E.A., Perkumas, K.M., Highstrom, L.M., and Stamer, W.D. (2009). Regulation of
914 myocilin-associated exosome release from human trabecular meshwork cells. *Invest*
915 *Ophthalmol. Vis. Sci.* 50(3), 1313-1318.
- 916 Horwitz, J. (1992). Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*
917 89(21), 10449-10453. doi: 10.1073/pnas.89.21.10449.
- 918 Huang, W., Jaroszewski, J., Ortego, J., Escibano, J., and Coca-Prados, M. (2000). Expression of the
919 TIGR gene in the iris, ciliary body, and trabecular meshwork of the human eye. *Ophthalmic*
920 *Genet* 21(3), 155-169.
- 921 Isozaki, Y., Sakai, K., Kohiro, K., Kagoshima, K., Iwamura, Y., Sato, H., et al. (2020). The Rho-
922 guanine nucleotide exchange factor Solo decelerates collective cell migration by modulating
923 the Rho-ROCK pathway and keratin networks. *Mol Biol Cell* 31(8), 741-752. doi:
924 10.1091/mbc.E19-07-0357.
- 925 Jakobs, P.M., Hess, J.F., FitzGerald, P.G., Kramer, P., Weleber, R.G., and Litt, M. (2000).
926 Autosomal-dominant congenital cataract associated with a deletion mutation in the human
927 beaded filament protein gene BFSP2. *Am J Hum Genet* 66(4), 1432-1436. doi:
928 10.1086/302872.
- 929 Joe, M.K., Kee, C., and Tomarev, S.I. (2012). Myocilin interacts with syntrophins and is member of
930 dystrophin-associated protein complex. *J Biol Chem* 287(16), 13216-13227. doi:
931 10.1074/jbc.M111.224063.
- 932 Joe, M.K., Nakaya, N., Abu-Asab, M., and Tomarev, S.I. (2015). Mutated myocilin and
933 heterozygous Sod2 deficiency act synergistically in a mouse model of open-angle glaucoma.
934 *Hum Mol Genet* 24(12), 3322-3334. doi: 10.1093/hmg/ddv082.
- 935 Karali, A., Russell, P., Stefani, F.H., and Tamm, E.R. (2000). Localization of myocilin/trabecular
936 meshwork--inducible glucocorticoid response protein in the human eye. *Invest*
937 *Ophthalmol. Vis. Sci.* 41(3), 729-740.
- 938 Kawakami, K., Shima, A., and Kawakami, N. (2000). Identification of a functional transposase of the
939 Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the
940 zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21), 11403-11408. doi:
941 10.1073/pnas.97.21.11403.
- 942 Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., and Mishina, M. (2004). A
943 transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in
944 zebrafish. *Dev Cell* 7(1), 133-144. doi: 10.1016/j.devcel.2004.06.005.

- 945 Kim, B.S., Savinova, O.V., Reedy, M.V., Martin, J., Lun, Y., Gan, L., et al. (2001). Targeted
946 Disruption of the Myocilin Gene (Myoc) Suggests that Human Glaucoma-Causing Mutations
947 Are Gain of Function. *Mol. Cell Biol.* 21(22), 7707-7713.
- 948 Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory
949 requirements. *Nat Methods* 12(4), 357-360. doi: 10.1038/nmeth.3317.
- 950 Koke, J.R., Mosier, A.L., and Garcia, D.M. (2010). Intermediate filaments of zebrafish retinal and
951 optic nerve astrocytes and Muller glia: differential distribution of cytokeratin and GFAP.
952 *BMC Res Notes* 3, 50. doi: 10.1186/1756-0500-3-50.
- 953 Kubota, R., Noda, S., Wang, Y., Minoshima, S., Asakawa, S., Kudoh, J., et al. (1997). A novel
954 myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor:
955 molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics* 41(3), 360-369.
- 956 Kujawski, S., Crespo, C., Luz, M., Yuan, M., Winkler, S., and Knust, E. (2020). Loss of Crb2b-1f
957 leads to anterior segment defects in old zebrafish. *Biol Open* 9(2). doi: 10.1242/bio.047555.
- 958 Kwan, K.M., Fujimoto, E., Grabher, C., Mangum, B.D., Hardy, M.E., Campbell, D.S., et al. (2007).
959 The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis
960 constructs. *Dev Dyn* 236(11), 3088-3099. doi: 10.1002/dvdy.21343.
- 961 Kwon, H.S., Lee, H.S., Ji, Y., Rubin, J.S., and Tomarev, S.I. (2009). Myocilin is a modulator of Wnt
962 signaling. *Mol Cell Biol* 29(8), 2139-2154. doi: 10.1128/MCB.01274-08.
- 963 Li-Hawkins, J., Lund, E.G., Bronson, A.D., and Russell, D.W. (2000). Expression cloning of an
964 oxysterol 7alpha-hydroxylase selective for 24-hydroxycholesterol. *J Biol Chem* 275(22),
965 16543-16549. doi: 10.1074/jbc.M001810200.
- 966 Li, Y., Aroca-Aguilar, J.D., Ghosh, S., Sanchez-Sanchez, F., Escribano, J., and Coca-Prados, M.
967 (2006). Interaction of myocilin with the C-terminal region of hevin.
968 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339(3), 797-804.
- 969 Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time
970 quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4), 402-408. doi:
971 10.1006/meth.2001.1262.
- 972 Locke, C.J., Congrove, N.R., Dismuke, W.M., Bowen, T.J., Stamer, W.D., and McKay, B.S. (2014).
973 Controlled exosome release from the retinal pigment epithelium in situ. *Exp Eye Res* 129, 1-4.
974 doi: 10.1016/j.exer.2014.10.010.
- 975 McKay, B.S., Congrove, N.R., Johnson, A.A., Dismuke, W.M., Bowen, T.J., and Stamer, W.D.
976 (2013). A role for myocilin in receptor-mediated endocytosis. *PLoS One* 8(12), e82301. doi:
977 10.1371/journal.pone.0082301.
- 978 Meeker, N.D., Hutchinson, S.A., Ho, L., and Trede, N.S. (2007). Method for isolation of PCR-ready
979 genomic DNA from zebrafish tissues. *Biotechniques* 43(5), 610, 612, 614. doi:
980 10.2144/000112619.
- 981 Monte, W. (2013). *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*
982 University of Oregon Press, Eugene.
- 983 Ochman, H., Gerber, A.S., and Hartl, D.L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase
984 chain reaction. *Genetics* 120(3), 621-623.
- 985 Okamoto, T., Gohil, K., Finkelstein, E.I., Bove, P., Akaike, T., and van der Vliet, A. (2004). Multiple
986 contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *Am J Physiol*
987 *Lung Cell Mol Physiol* 286(1), L198-209. doi: 10.1152/ajplung.00136.2003.
- 988 Oliveira, R.F. (2013). Mind the fish: zebrafish as a model in cognitive social neuroscience. *Front*
989 *Neural Circuits* 7, 131. doi: 10.3389/fncir.2013.00131.
- 990 Ortego, J., Escribano, J., and Coca-Prados, M. (1997). Cloning and characterization of subtracted
991 cDNAs from a human ciliary body library encoding TIGR, a protein involved in juvenile
992 open angle glaucoma with homology to myosin and olfactomedin. *FEBS Lett.* 413(2), 349-
993 353.

- 994 Pandak, W.M., and Kakiyama, G. (2019). The acidic pathway of bile acid synthesis: Not just an
 995 alternative pathway(). *Liver Res* 3(2), 88-98. doi: 10.1016/j.livres.2019.05.001.
- 996 Pellissier, L.P., Alves, C.H., Quinn, P.M., Vos, R.M., Tanimoto, N., Lundvig, D.M., et al. (2013).
 997 Targeted ablation of CRB1 and CRB2 in retinal progenitor cells mimics Leber congenital
 998 amaurosis. *PLoS Genet* 9(12), e1003976. doi: 10.1371/journal.pgen.1003976.
- 999 Polansky, J.R., Fauss, D.J., Chen, P., Chen, H., Lutjen-Drecoll, E., Johnson, D., et al. (1997).
 1000 Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible
 1001 glucocorticoid response gene product. *Ophthalmologica* 211(3), 126-139.
- 1002 Prelich, G. (2012). Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics* 190(3), 841-
 1003 854. doi: 10.1534/genetics.111.136911.
- 1004 Quigley, H.A. (1995). Ganglion cell death in glaucoma: pathology recapitulates ontogeny.
 1005 *Aust.N.Z.J.Ophthalmol.* 23(2), 85-91.
- 1006 Quinn, P.M.J., and Wijnholds, J. (2019). Retinogenesis of the Human Fetal Retina: An Apical
 1007 Polarity Perspective. *Genes (Basel)* 10(12). doi: 10.3390/genes10120987.
- 1008 Russell, P., Tamm, E.R., Grehn, F.J., Picht, G., and Johnson, M. (2001). The Presence and Properties
 1009 of Myocilin in the Aqueous Humor. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42(5), 983-986.
- 1010 Sanchez-Sanchez, F., Martinez-Redondo, F., Aroca-Aguilar, J.D., Coca-Prados, M., and Escribano, J.
 1011 (2007). Characterization of the intracellular proteolytic cleavage of myocilin and
 1012 identification of calpain II as a myocilin-processing protease. *Journal of Biological Chemistry*
 1013 282(38), 27810-27824. doi: 10.1074/jbc.M609608200.
- 1014 Senatorov, V., Malyukova, I., Fariss, R., Wawrousek, E.F., Swaminathan, S., Sharan, S.K., et al.
 1015 (2006). Expression of mutated mouse myocilin induces open-angle glaucoma in transgenic
 1016 mice. *J Neurosci.* 26(46), 11903-11914.
- 1017 Shen, X., Ying, H., and Yue, B.Y. (2012). Wnt activation by wild type and mutant myocilin in
 1018 cultured human trabecular meshwork cells. *PLoS One* 7(9), e44902. doi:
 1019 10.1371/journal.pone.0044902.
- 1020 Song, S., Landsbury, A., Dahm, R., Liu, Y., Zhang, Q., and Quinlan, R.A. (2009). Functions of the
 1021 intermediate filament cytoskeleton in the eye lens. *J Clin Invest* 119(7), 1837-1848. doi:
 1022 10.1172/JCI38277.
- 1023 Stamer, W.D., Perkumas, K.M., Hoffman, E.A., Roberts, B.C., Epstein, D.L., and McKay, B.S.
 1024 (2006). Coiled-coil targeting of myocilin to intracellular membranes. *Exp. Eye Res.* 83(6),
 1025 1386-1395.
- 1026 Stone, E.M., Fingert, J.H., Alward, W.L., Nguyen, T.D., Polansky, J.R., Sunden, S.L., et al. (1997).
 1027 Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275(5300), 668-
 1028 670.
- 1029 Thompson, B.J., Pichaud, F., and Roper, K. (2013). Sticking together the Crumbs - an unexpected
 1030 function for an old friend. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(5), 307-314. doi: 10.1038/nrm3568.
- 1031 Thorleifsson, G., Walters, G.B., Hewitt, A.W., Masson, G., Helgason, A., DeWan, A., et al. (2010).
 1032 Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma.
 1033 *Nat Genet* 42(10), 906-909. doi: 10.1038/ng.661.
- 1034 Varadaraj, K., Kushmerick, C., Baldo, G.J., Bassnett, S., Shiels, A., and Mathias, R.T. (1999). The
 1035 role of MIP in lens fiber cell membrane transport. *J Membr Biol* 170(3), 191-203. doi:
 1036 10.1007/s002329900549.
- 1037 Wang, X., Garcia, C.M., Shui, Y.B., and Beebe, D.C. (2004). Expression and regulation of alpha-,
 1038 beta-, and gamma-crystallins in mammalian lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*
 1039 45(10), 3608-3619. doi: 10.1167/iovs.04-0423.
- 1040 Wen, Y., Sachs, G., and Athmann, C. (2000). A novel lens epithelium gene, LEP503, is highly
 1041 conserved in different vertebrate species and is developmentally regulated in postnatal rat
 1042 lens. *Exp Eye Res* 70(2), 159-168. doi: 10.1006/exer.1999.0770.

- 1043 Wentz-Hunter, K., Kubota, R., Shen, X., and Yue, B.Y. (2004a). Extracellular myocilin affects
1044 activity of human trabecular meshwork cells. *J.Cell Physiol* 200(1), 45-52.
- 1045 Wentz-Hunter, K., Shen, X., Okazaki, K., Tanihara, H., and Yue, B.Y. (2004b). Overexpression of
1046 myocilin in cultured human trabecular meshwork cells. *Exp.Cell Res.* 297(1), 39-48.
- 1047 Wittmann, C., Reischl, M., Shah, A.H., Kronfuss, E., Mikut, R., Liebel, U., et al. (2015). A Zebrafish
1048 Drug-Repurposing Screen Reveals sGC-Dependent and sGC-Independent Pro-Inflammatory
1049 Activities of Nitric Oxide. *PLoS One* 10(10), e0137286. doi: 10.1371/journal.pone.0137286.
- 1050 Xi, J.H., Bai, F., and Andley, U.P. (2003). Reduced survival of lens epithelial cells in the alphaA-
1051 crystallin-knockout mouse. *J Cell Sci* 116(Pt 6), 1073-1085. doi: 10.1242/jcs.00325.
- 1052 Xiang, M., Zhou, L., Macke, J.P., Yoshioka, T., Hendry, S.H., Eddy, R.L., et al. (1995). The Brn-3
1053 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in
1054 subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J Neurosci* 15(7 Pt 1), 4762-
1055 4785.
- 1056 Zhang, Q., Ye, D., Wang, H., Wang, Y., Hu, W., and Sun, Y. (2020). Zebrafish *cyp11c1* Knockout
1057 Reveals the Roles of 11-ketotestosterone and Cortisol in Sexual Development and
1058 Reproduction. *Endocrinology* 161(6). doi: 10.1210/endo/bqaa048.
- 1059 Zheng, Q., Xiao, H., Shi, H., Wang, T., Sun, L., Tao, W., et al. (2020). Loss of *Cyp11c1* causes
1060 delayed spermatogenesis due to the absence of 11-ketotestosterone. *J Endocrinol* 244(3), 487-
1061 499. doi: 10.1530/JOE-19-0438.
- 1062 Zhou, Y., Grinchuk, O., and Tomarev, S.I. (2008). Transgenic mice expressing the Tyr437His mutant
1063 of human myocilin protein develop glaucoma. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 49(5), 1932-1939.
- 1064 Zillig, M., Wurm, A., Grehn, F.J., Russell, P., and Tamm, E.R. (2005). Overexpression and
1065 properties of wild-type and Tyr437His mutated myocilin in the eyes of transgenic mice.
1066 *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 46(1), 223-234.
- 1067 Zode, G.S., Kuehn, M.H., Nishimura, D.Y., Searby, C.C., Mohan, K., Grozdanic, S.D., et al. (2015).
1068 Reduction of ER stress via a chemical chaperone prevents disease phenotypes in a mouse
1069 model of primary open angle glaucoma. *J Clin Invest* 125(8), 3303. doi: 10.1172/JCI82799.
- 1070
1071

1072 **Legends to Figures**

1073 **Figure 1.** Variable ocular phenotypes in old (two-years-old) transgenic *myoc* zebrafish. Brightfield
 1074 images of representative male *myoc* transgenic zebrafish with bilateral (A-G) or unilateral (H-N)
 1075 ocular alterations. (O-U) A wild type zebrafish of the same age is shown as a control. Yellow arrows:
 1076 iris overgrowth and reduced or absent pupil; black arrows: cloudy corneas and reduced anterior
 1077 chamber size; asterisk: enlarged eyeballs; scale bar in panels A-C, H-J, and O-Q: 200 μm ; scale bar
 1078 in panels D-G, K-N and R-U: 50 μm . LE: left eye. OA: ocular alterations; RE: right eye. Tg/+:
 1079 transgenic. +/+ : wild type.

1080 **Figure 2.** Histology of head sections of adult male transgenic zebrafish (two years old).
 1081 Hematoxylin-eosin stained tissue sections of transgenic zebrafish with bilateral (A) or unilateral
 1082 macroscopic ocular alterations (B). Control tissue sections from wild type zebrafish of the same age
 1083 and sex (C). Black arrows: contacts between iris and cornea; black arrowheads: increased thickness
 1084 of the corneal stroma; black asterisks: increased vitreous-like material; green arrows: folded and
 1085 thickened lens capsule; blue arrowhead: overgrowth and folding of the retina; red asterisk: displaced
 1086 lens; white arrows: hypertrophy of the retinal fiber layer and optic nerve; yellow arrowheads:
 1087 abnormal photoreceptors; yellow asterisks: overgrowth of the choroid body. Scale bar: 800 μm . Cor:
 1088 cornea; OA: ocular alterations; ON: optic nerve; L: lens; R: retina; +/+ : wild type; Tg/+ : transgenic.

1089 **Figure 3.** Histology of ocular anterior segment from old (two years) *myoc* transgenic zebrafish.
 1090 Hematoxylin-eosin-stained tissue sections of transgenic zebrafish with bilateral (A, B, F and G) or
 1091 unilateral (C, D, H and I) macroscopic ocular alterations. Control tissue sections from wild type
 1092 zebrafish of the same age and sex (E and J). Head tissue sections in the inserts indicate the
 1093 localization of the images shown in the different panels. Scale bars: 50 μm . The images are
 1094 representative of two individuals of each genotype. AL: annular ligament; CEN: corneal
 1095 endothelium; CEP: corneal epithelium; CST: corneal stroma; R: retina; IPC: iris pigment cells; L:
 1096 lens; LC: lens capsule; LE: left eye; OA: ocular alterations; RE: right eye; ZF: zonular fiber; blue
 1097 arrowheads: cavities in the CST; green arrowhead: keratocytes; yellow arrows: limbal melanocytes;
 1098 yellow arrowheads: cavities between IPC and AL; yellow asterisk: increased RPE cells; Tg/+ :
 1099 transgenic; +/+ : wild type.

1100 **Figure 4.** Histology of retinas from old (two years) male *myoc* transgenic zebrafish. Tissue sections
 1101 were stained with hematoxylin-eosin. Variable retinal disorganization and dysplasia, ranging from
 1102 the presence of a neuroretinal mass (A and F) to different degrees of photoreceptor degeneration and
 1103 increased number of nuclei in different layers (B, D, G, and I) or no evident alterations (C and H).
 1104 Head tissue sections in the inserts indicate the localization of the images shown in the different
 1105 panels. The images are representative of two individuals per phenotype. Arrows: chondrocytes in the
 1106 scleral cartilage. Scale bars: 50 μm . Only clearly identifiable retinal layers are indicated. GCL:
 1107 ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer; LE: left eye; OA: ocular
 1108 alterations; OPL: outer plexiform layer; ONL: outer nuclear layer; PHL: photoreceptor layer; RE:
 1109 right eye; RFL: retinal fiber layer; Tg/+ : transgenic; +/+ : wild type.

1110 **Figure 5.** Fluorescent immunohistochemistry expression analysis of myocilin and mCherry in the
 1111 anterior segment of old (two years) *myoc* transgenic zebrafish. A chicken anti-myocilin primary
 1112 antibody was used to detected myocilin (green signal). Representative transgenic head sections in
 1113 panels (C and D) indicate the regions analyzed by immunohistochemistry. Asterisk in F and H:
 1114 myocilin immunoreactivity in the vitreous and iris stroma, respectively. Arrows in G, H, K and L:
 1115 myocilin immunoreactivity in the most superficial layer of the corneal epithelium. Scale bars: 50 μm ;

1116 AL: annular ligament; CEN: corneal endothelium; CEP: corneal epithelium; CST: corneal stroma;
 1117 IBC: iris blood cells; IPC: iris pigment cells; LE: left eye; NPCE: non-pigmented ciliary epithelium;
 1118 OA: ocular alterations; PCE: pigmented ciliary epithelium; R: retina; RE: right eye; RPE: retinal
 1119 pigment epithelial cells; +/+ : wild type; Tg/+ : transgenic.

1120 **Figure 6.** Fluorescent immunohistochemistry expression analysis of myocilin and mCherry in the
 1121 lens and retina of old (two years) *myoc* transgenic zebrafish. A chicken anti-myocilin primary
 1122 antibody was used to detected myocilin (green signal). Representative transgenic head tissue sections
 1123 in panels (C and D) indicate the regions analyzed by immunohistochemistry. Scale bars: 50 μ m.
 1124 GCL: ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer; LC: lens capsule;
 1125 LEP: lens epithelium; OA: ocular alterations; OPL: outer plexiform layer; ONL; outer nuclear layer;
 1126 PHL: photoreceptor layer; +/+ : wild type; Tg/+ : transgenic.

1127 **Figure 7.** Corneal epithelium and retinal ganglion cell apoptosis in old (two years) *myoc* transgenic
 1128 zebrafish. Apoptosis was assessed using terminal dUTP nick-end labelling (TUNEL) of fragmented
 1129 DNA. Wild type retina (A) and cornea (B). (C and D) Representative transgenic head tissue sections
 1130 indicate the regions analysed by immunohistochemistry. (E-H) transgenic cornea. (I-L) Transgenic
 1131 retina. Scale bar in A, I-L: 25 μ m. Scale bar in B, E-H: 50 μ m. (M) Quantification of TUNEL
 1132 positive cells. Four microscopic fields per eye were analyzed (n= four eyes). ***: p<0.001, Student's
 1133 t-test. White arrowheads: TUNEL positive cells. Autofl.: tissue autofluorescence used for image
 1134 contrast and anatomical reference. CEP: corneal epithelium; CST: corneal stroma; CEN: corneal
 1135 endothelium; GCL: ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer; OA:
 1136 ocular alterations; OPL: outer plexiform layer; ONL; outer nuclear layer; PHL: photoreceptor layer;
 1137 Tg/+ : transgenic; +/+ : wild type. The images are representative of the results observed in two fishes
 1138 of each genotype.

1139 **Figure 8.** Retinal and optic nerve gliosis in old (two years) *myocilin* transgenic zebrafish. A rabbit
 1140 anti-GFAP primary antibody was used to detected Müller glial cells. Wild type retina (A) and optic
 1141 nerve (B). (C and D) Representative transgenic head tissue sections indicating the regions analysed
 1142 by immunohistochemistry. (E-H) Transgenic retina. (I-L) Transgenic optic nerve. (M) Quantification
 1143 of GFAP positive cells in the ganglion cell layer and optic nerve. Four microscopic fields per eye
 1144 were analyzed (n= four eyes). ***: p<0.001, Student's t-test. Arrowheads: GFAP labelling of Müller
 1145 cells. Scale bars: 50 μ m. Autofl.: tissue autofluorescence used for image contrast and anatomical
 1146 reference; GCL: ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer; OA: ocular
 1147 alterations; OPL: outer plexiform layer; ONL; outer nuclear layer; PHL: photoreceptor layer; R:
 1148 retina. Tg/+ : transgenic; +/+ : wild-type. The images are representative of the results observed in two
 1149 zebrafish of each type.

1150 **Figure 9.** Increased number of retinal ganglion cells in the retinal mass present in the most severe
 1151 phenotype of old (two years) *myocilin* transgenic zebrafish. Overview and detailed images of wild-
 1152 type zebrafish eye (A and B) and *myocilin* transgenic zebrafish eye (C-F). Images in B, D and F are
 1153 details from A, C and E, respectively. (A and B) Double immunostaining for calretinin (CR), a
 1154 calcium-binding protein, and the transcription factor Brn3a was used for the identification of
 1155 ganglion cells (arrowheads). Optic nerve fibers were immunopositive for calretinin. TO-PRO-3-
 1156 iodide was used for nuclei staining. (C-F). Asterisks: axon bundles. Scale bars in A, C, E: 200 μ m;
 1157 scale bars in B, D, F: 20 μ m. ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner
 1158 nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; NFL: nerve fiber layer; Tg/+ :
 1159 transgenic; +/+ : wild type.

1160 **Figure 10.** Top-50 DEGs in altered eyes of old (two years) male *myoc* transgenic zebrafish. Down-
 1161 (A) and upregulated (B) genes identified by high throughput RNA sequencing with significant
 1162 differences coinciding in the comparison with the two wild type ocular transcriptomes (Tg/+ OA vs.
 1163 +/-1 and Tg/+ OA vs. +/-2). Confirmation by qRT-PCR of differential gene expression of selected
 1164 down- (C) and upregulated (D) genes. Aliquots of RNA preparations used for transcriptomic analyses
 1165 were used as templates in qRT-PCR. Values represent the average of six experimental replicas. **:
 1166 $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, Student's t-test.

1167 **Figure 11.** Variable ocular phenotypes in adult (13-months-old) F4 transgenic *myoc* zebrafish.
 1168 Brightfield images of representative *myoc* F4 transgenic male zebrafish with ocular alterations. (A-N)
 1169 and wildtype (O-U) as a control. Asterisks: cloudy corneas; black arrowhead: corneal hyperplasia;
 1170 yellow arrows: corneal hyperplasia; white arrowhead: reduced pupil size. Scale bars in A, D, E, H, K,
 1171 L, O, R, and S: 200 μm ; Scale bars in B, C, F, G, I, J, M, NP, Q, T, U, and L: 50 μm ; LE: left eye;
 1172 RE: right eye; Tg/+: transgenic; +/-: wild type.

1173 **Figure 12.** Histology of the anterior ocular segment of F4 adult male transgenic zebrafish (13
 1174 months). Tissue sections were stained with hematoxylin-eosin. Scale bars in A-C: 800 μm . Scale bars
 1175 in D-H: 50 μm . The images are representative of five transgenic zebrafish. AL: annular ligament;
 1176 CEP: corneal epithelium; CST: corneal stroma; CEN: corneal endothelium; R: retina; IPC: iris
 1177 pigment cells; L: lens; LC: lens capsule; NPCE: nonpigmented ciliary; ZF: zonular fiber; LE: left
 1178 eye; RE: right eye; Tg/+: transgenic; +/-: wild type; blue arrows: increased keratocytes; green
 1179 arrowhead: altered annular ligament; yellow arrows: limbal melanocytes; yellow arrowheads: cavities
 1180 between the AL and CST.

1181 **Figure 13.** Proliferation of retinal ganglion cells in adult (13 month) *myocilin* transgenic zebrafish.
 1182 (A-B) An anti-Ki-67 primary antibody was used to detect proliferating cells. Digital magnification of
 1183 the positive cells indicted with white dashed squares are shown in the inserts. The inserts show (C)
 1184 The negative control consisted of tissue sections incubated only with the secondary antibody. (D and
 1185 E) Black rectangles in two representative eye sections indicate the location of microscopic fields
 1186 shown in the different panels. (F) Quantification of Ki-67 positive cells. Four microscopic fields per
 1187 eye were analyzed (n=four eyes). ***: $p < 0.001$, Student's t-test. Scale bars: 50 μm . Arrowheads: ki-
 1188 67 positive cells. Scale bars: 50 μm . GCL: ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner
 1189 nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; ONL: outer nuclear layer; PHL: photoreceptor layer. The
 1190 images are representative of the results observed in two fishes of each genotype.

Figure 1.JPEG

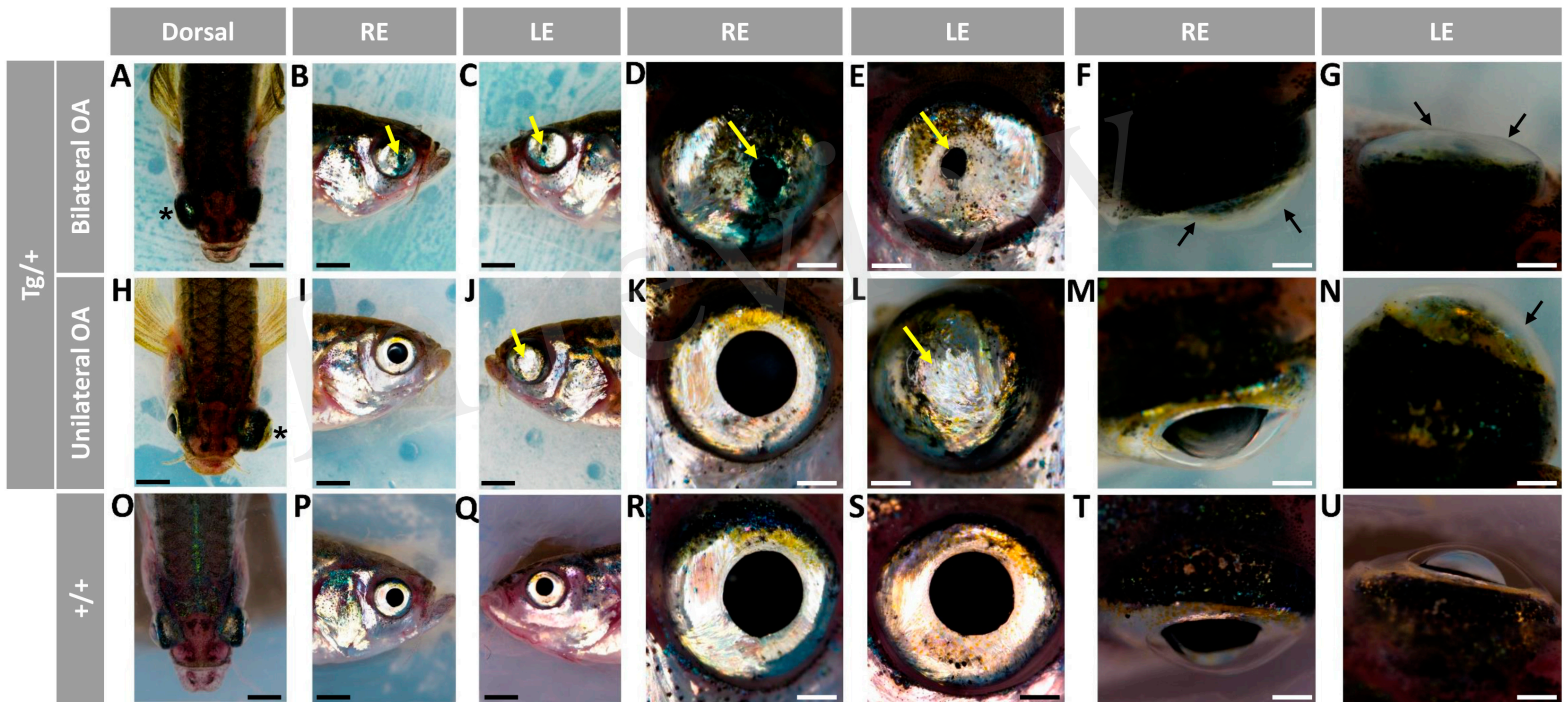


Figure 2.JPEG

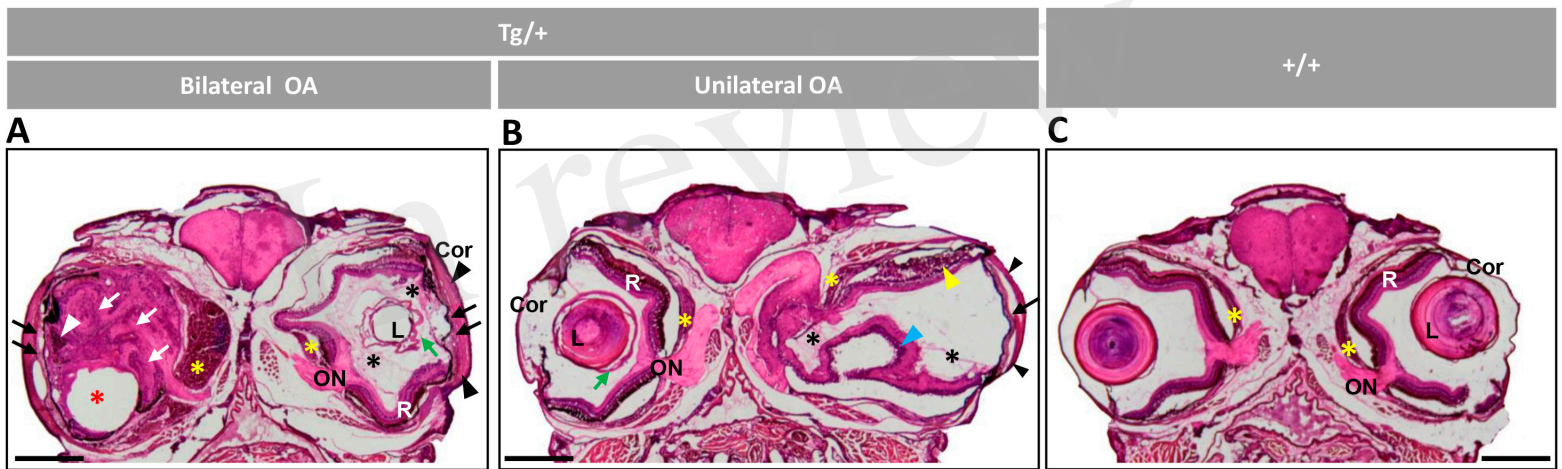


Figure 3.JPEG

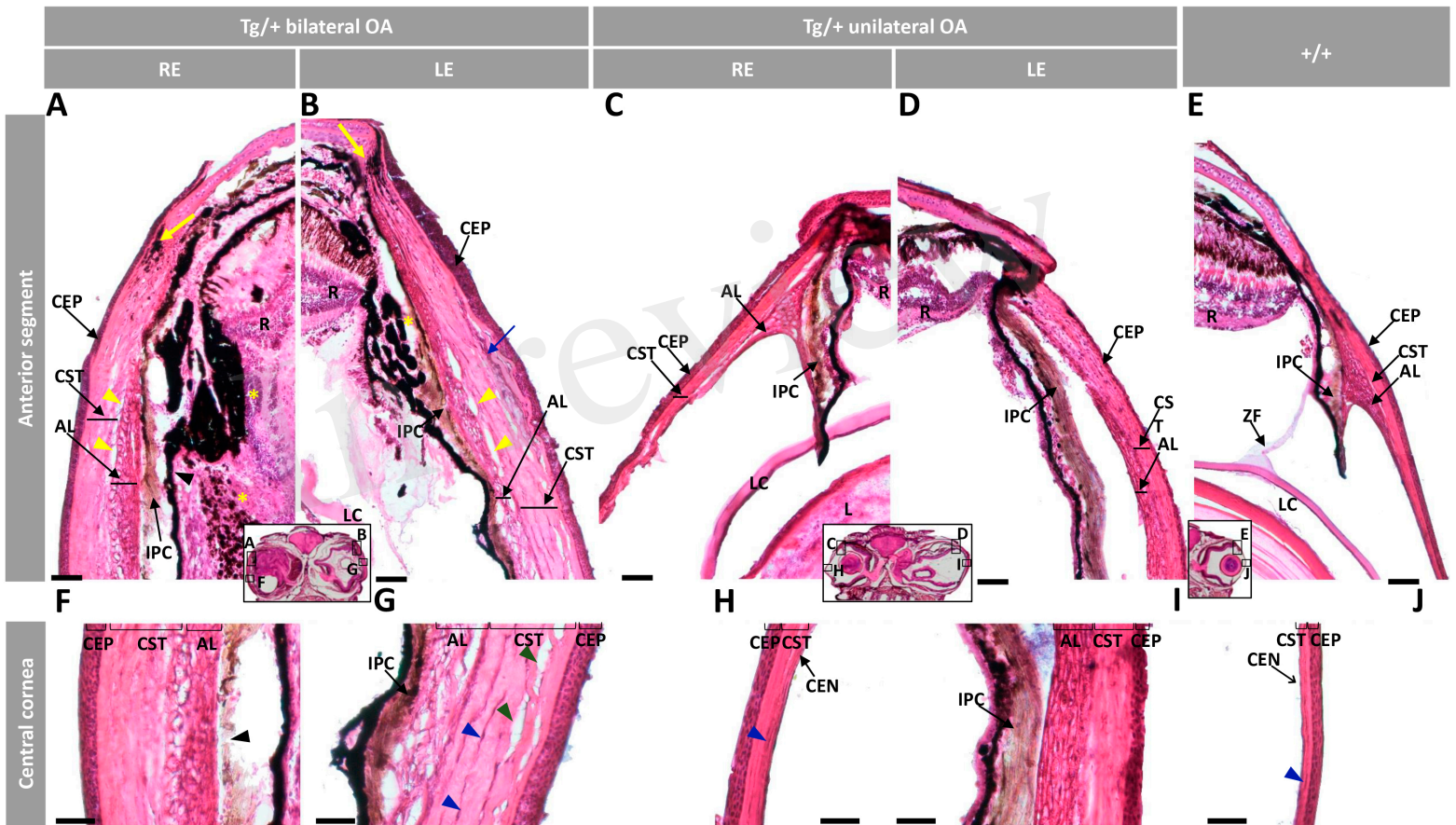


Figure 4.JPEG

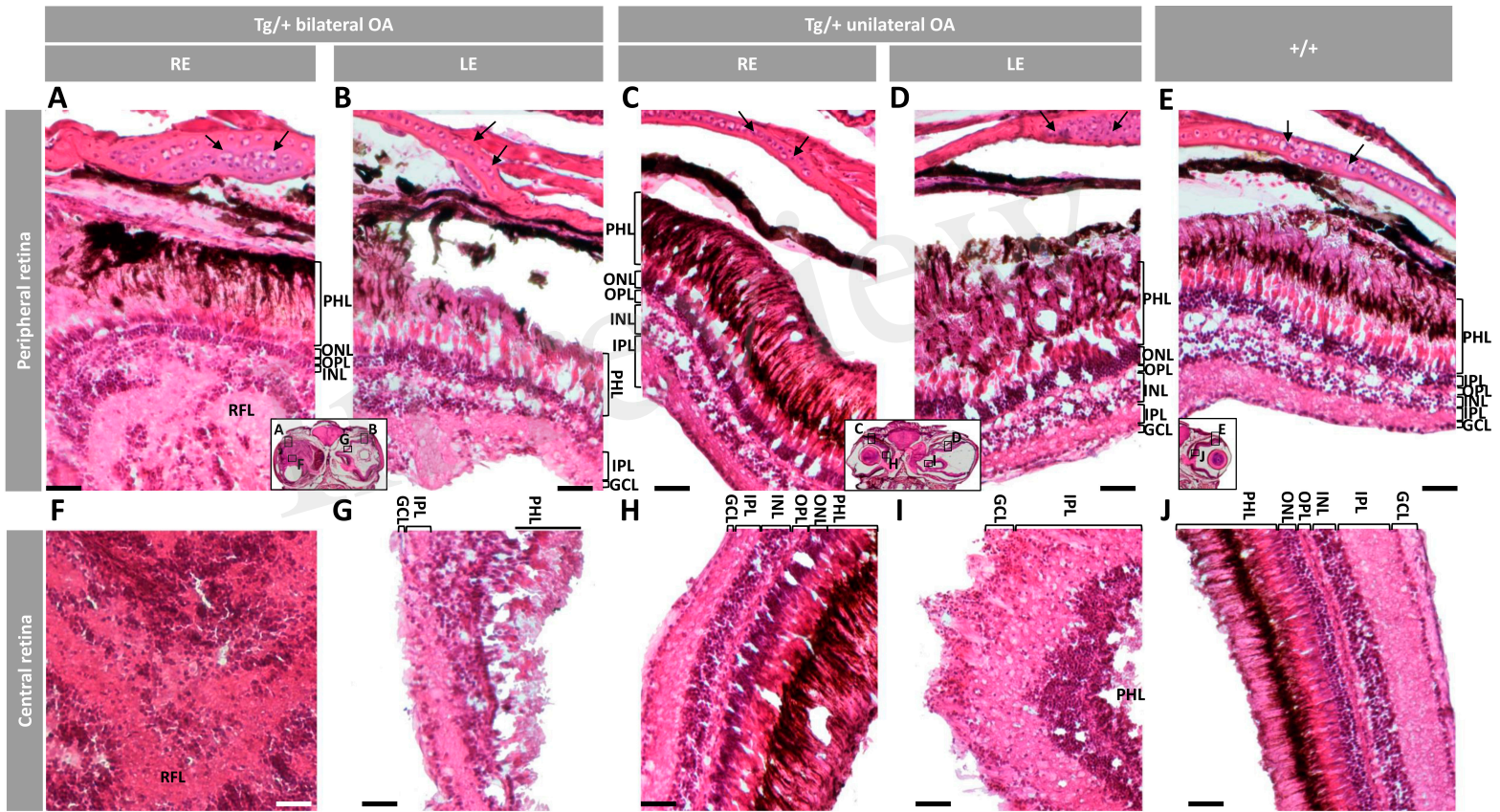


Figure 5.JPEG

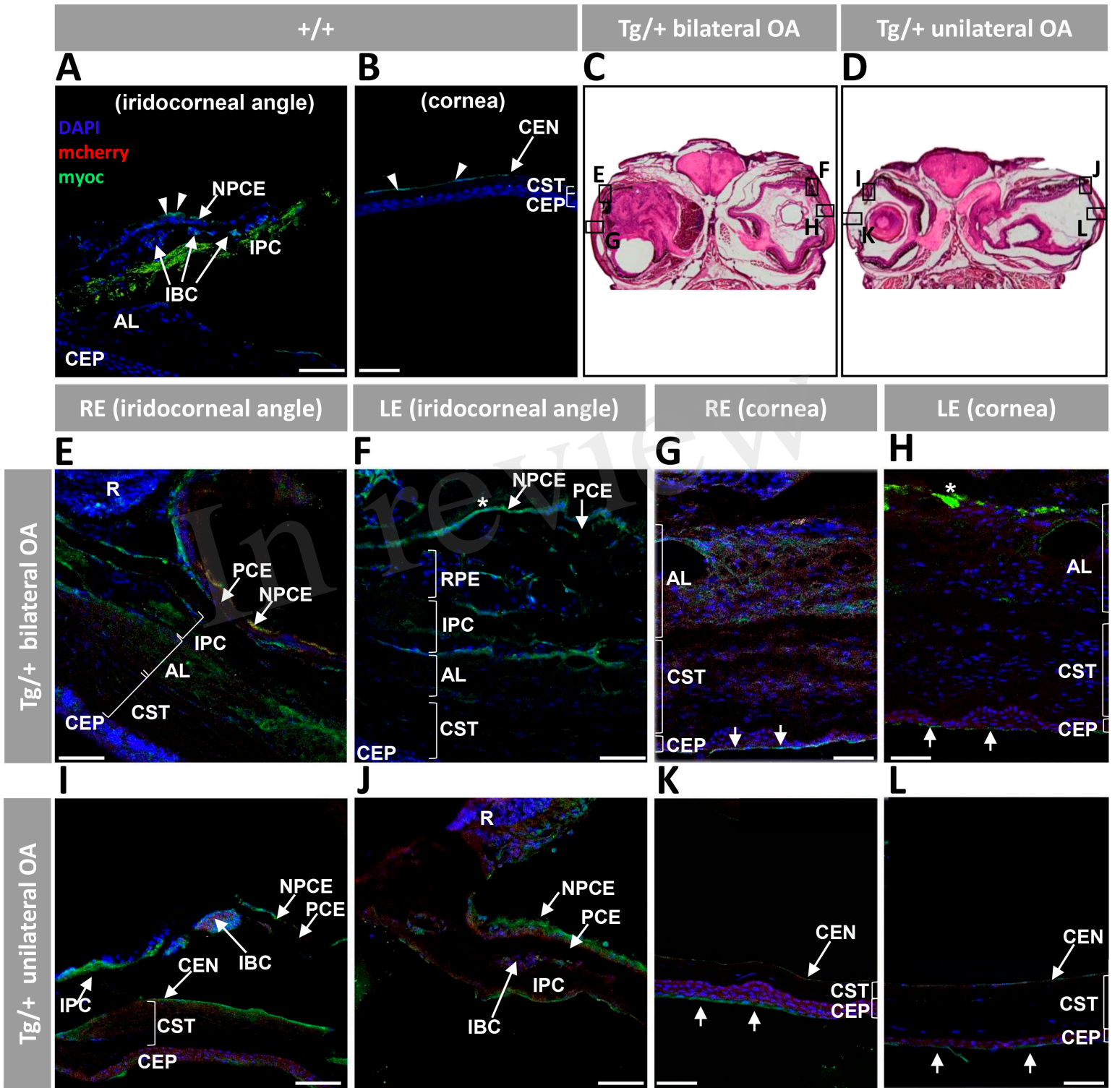


Figure 6.JPEG

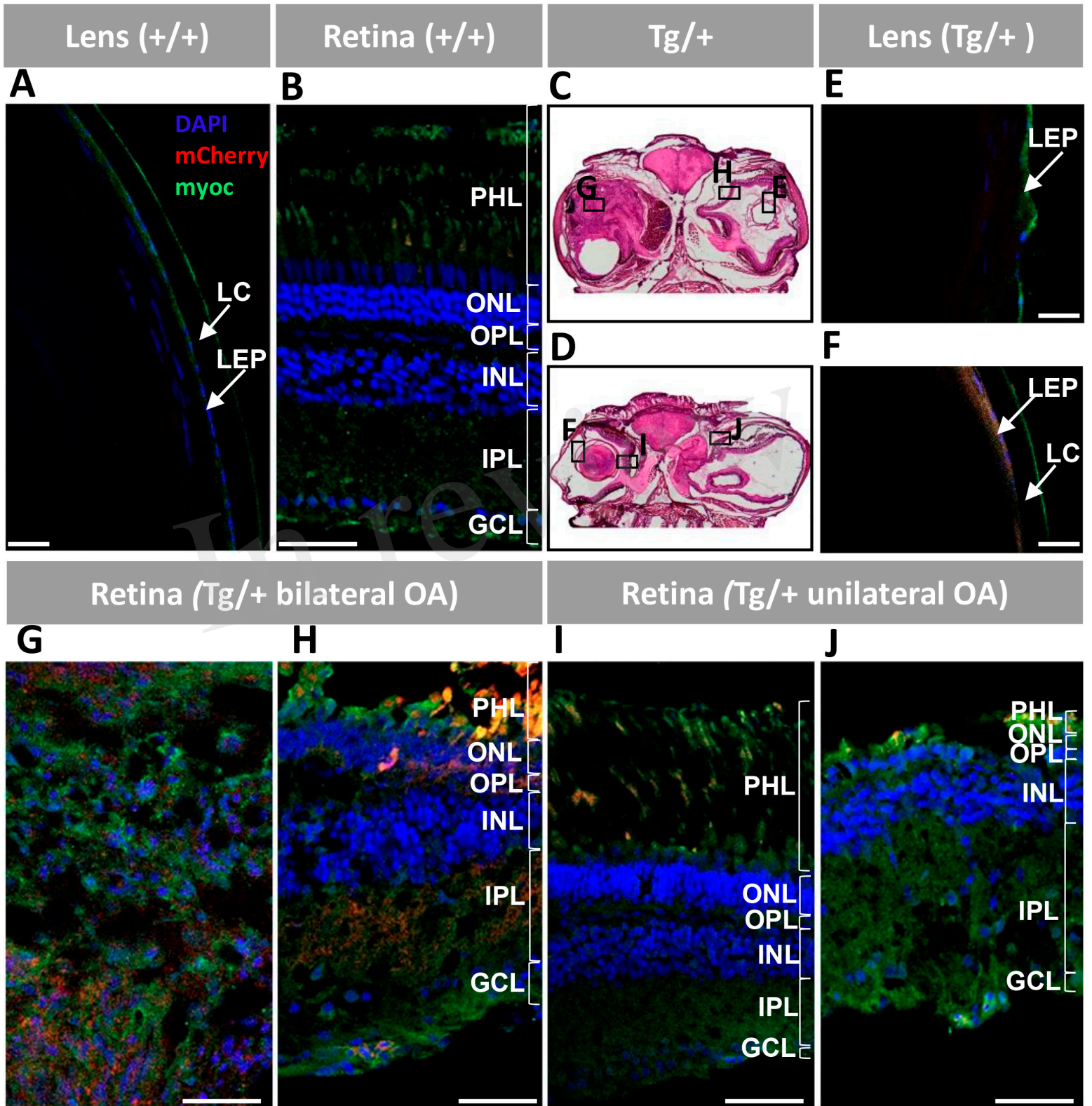
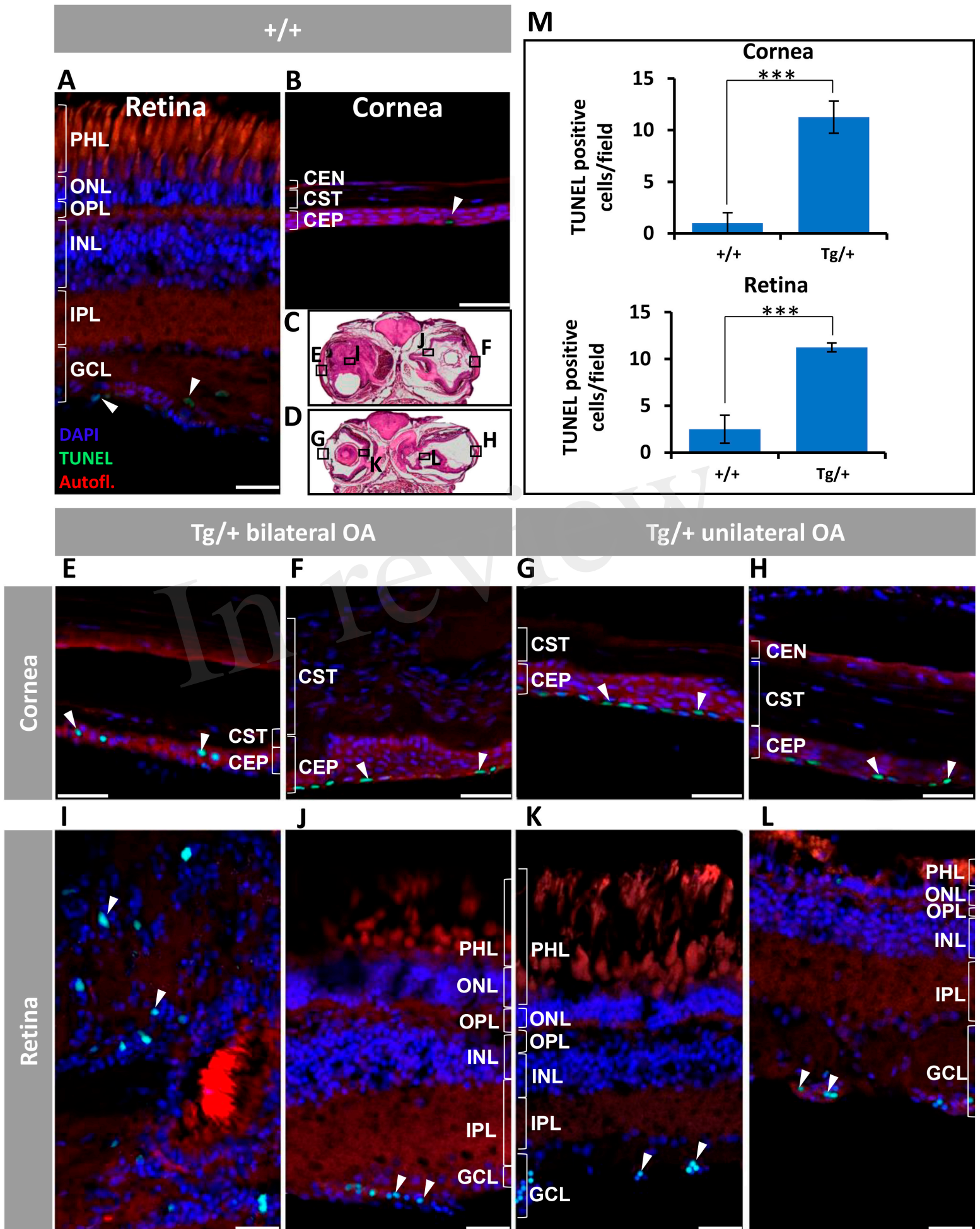


Figure 7.JPEG



+/+

Figure 8.JPEG

M

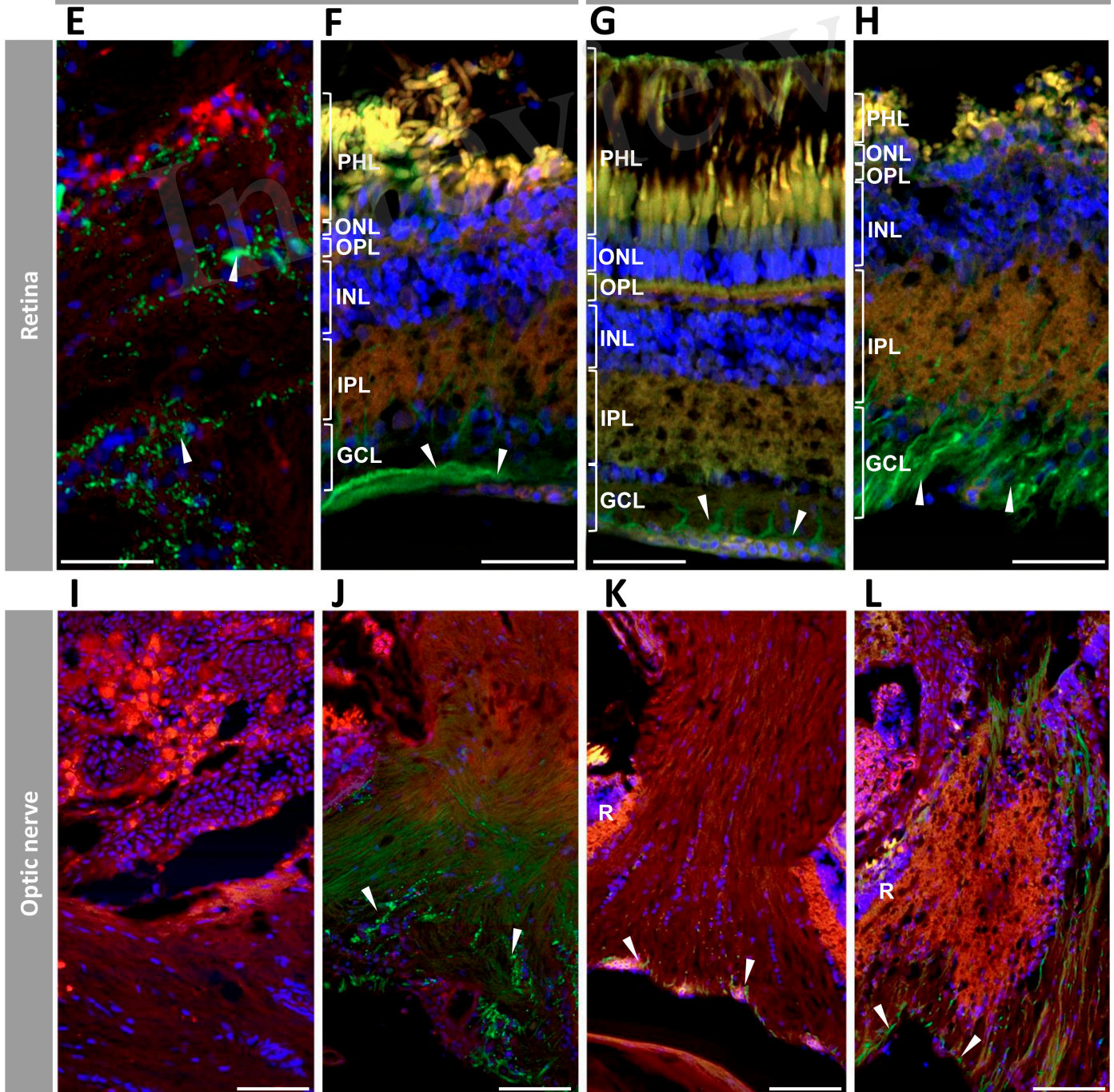
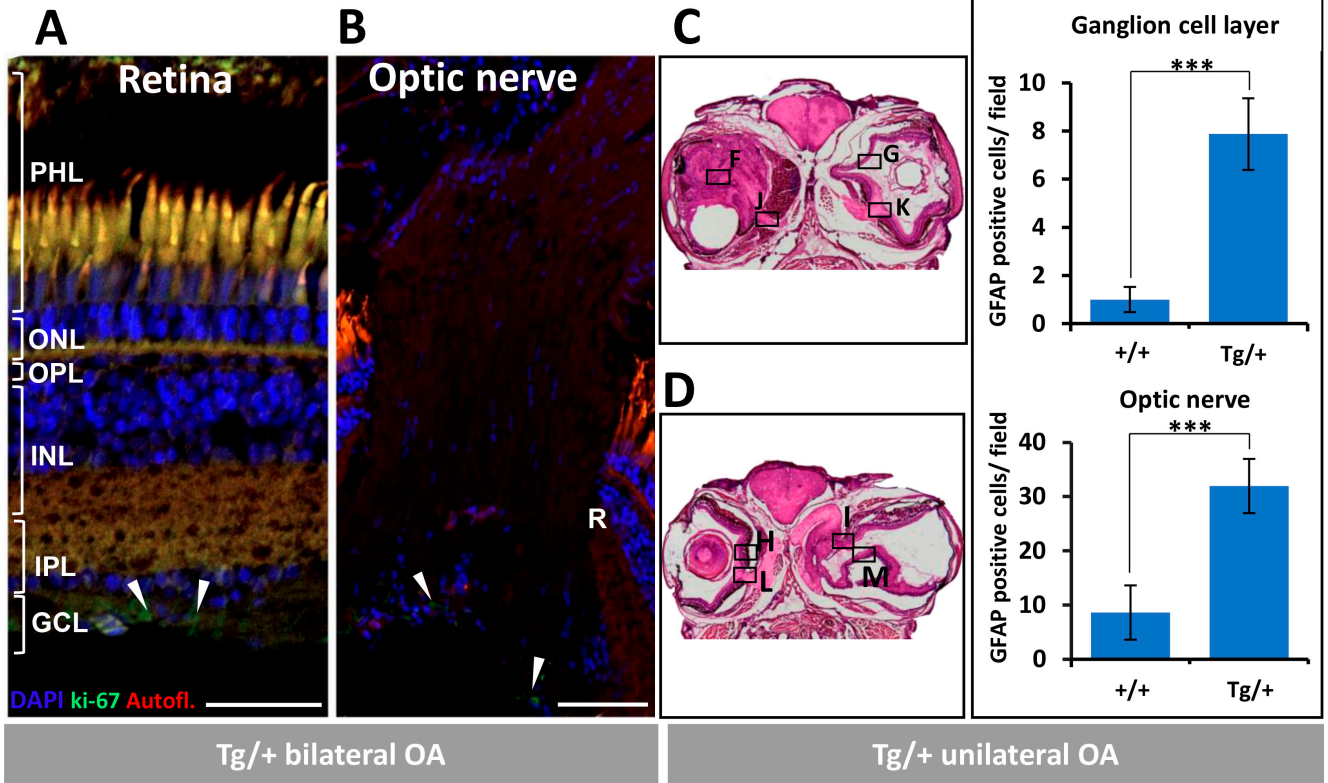


Figure 9.TIF

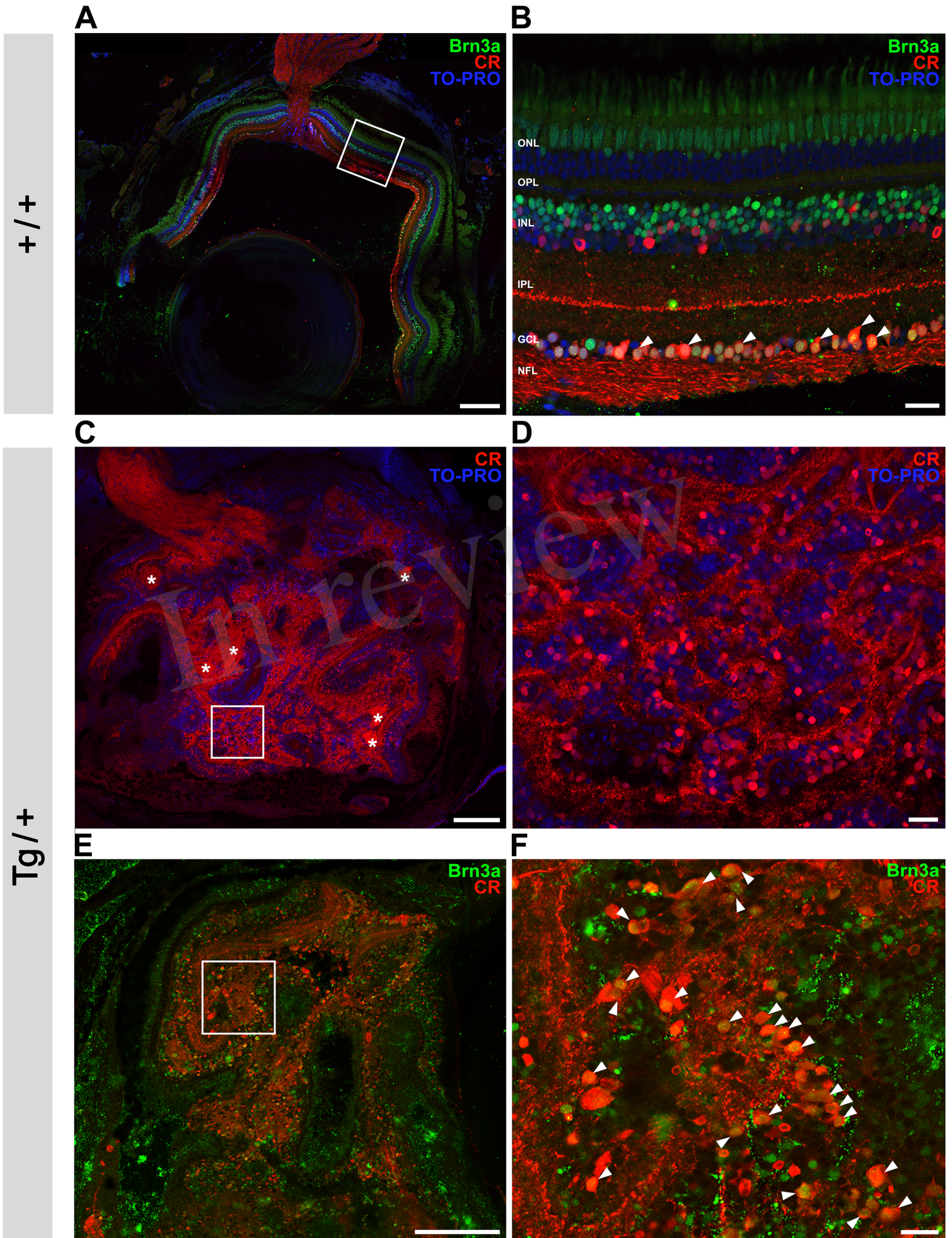


Figure 10.JPEG

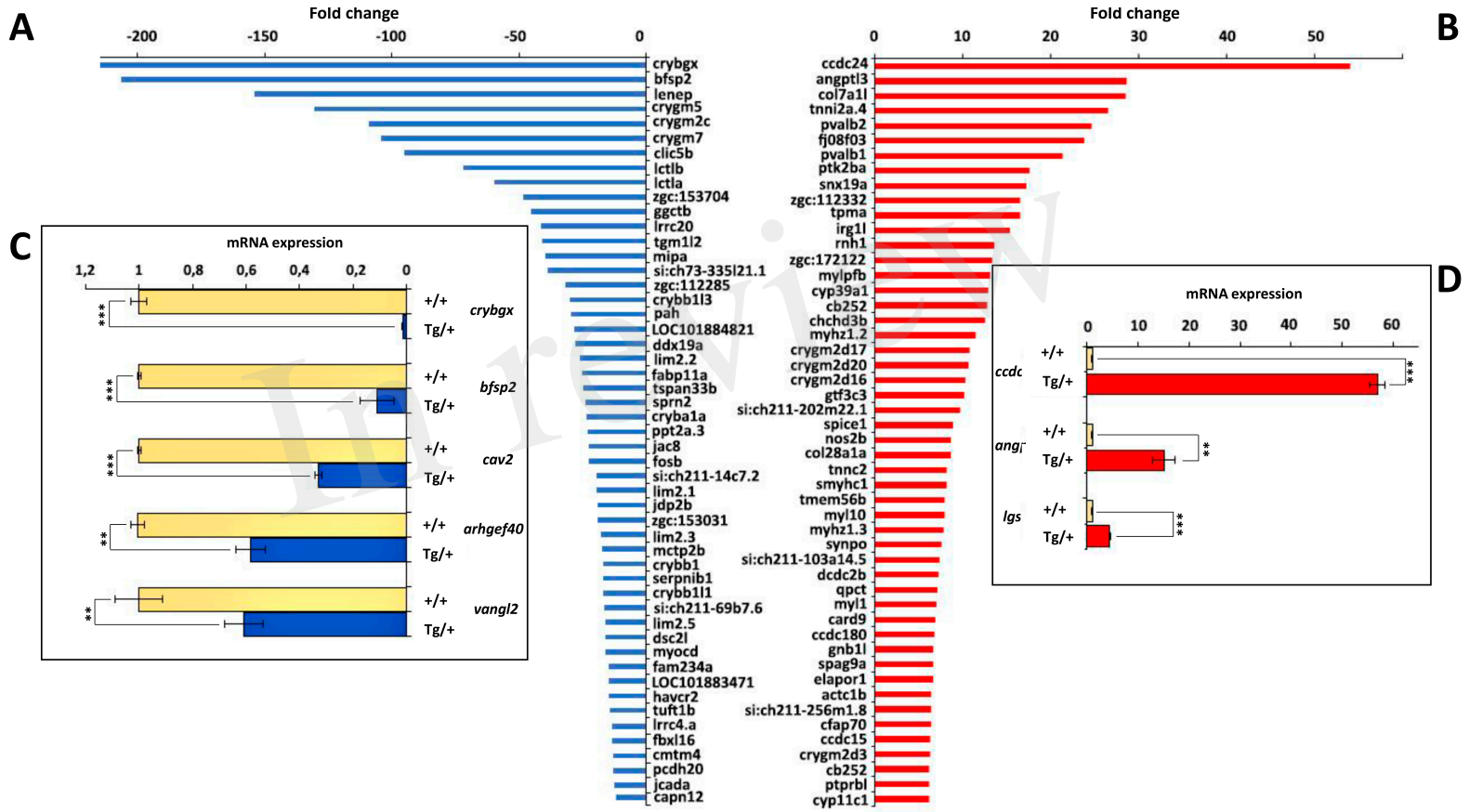


Figure 11.JPEG

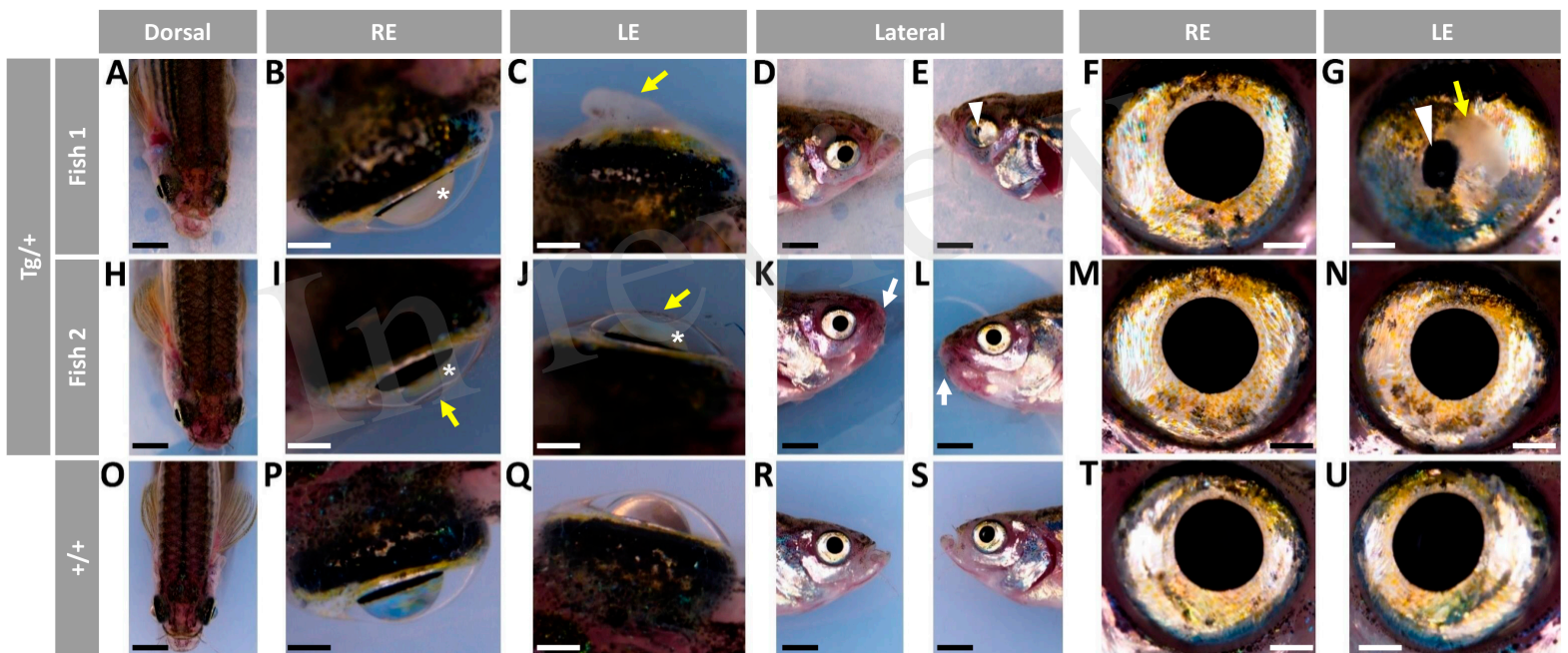
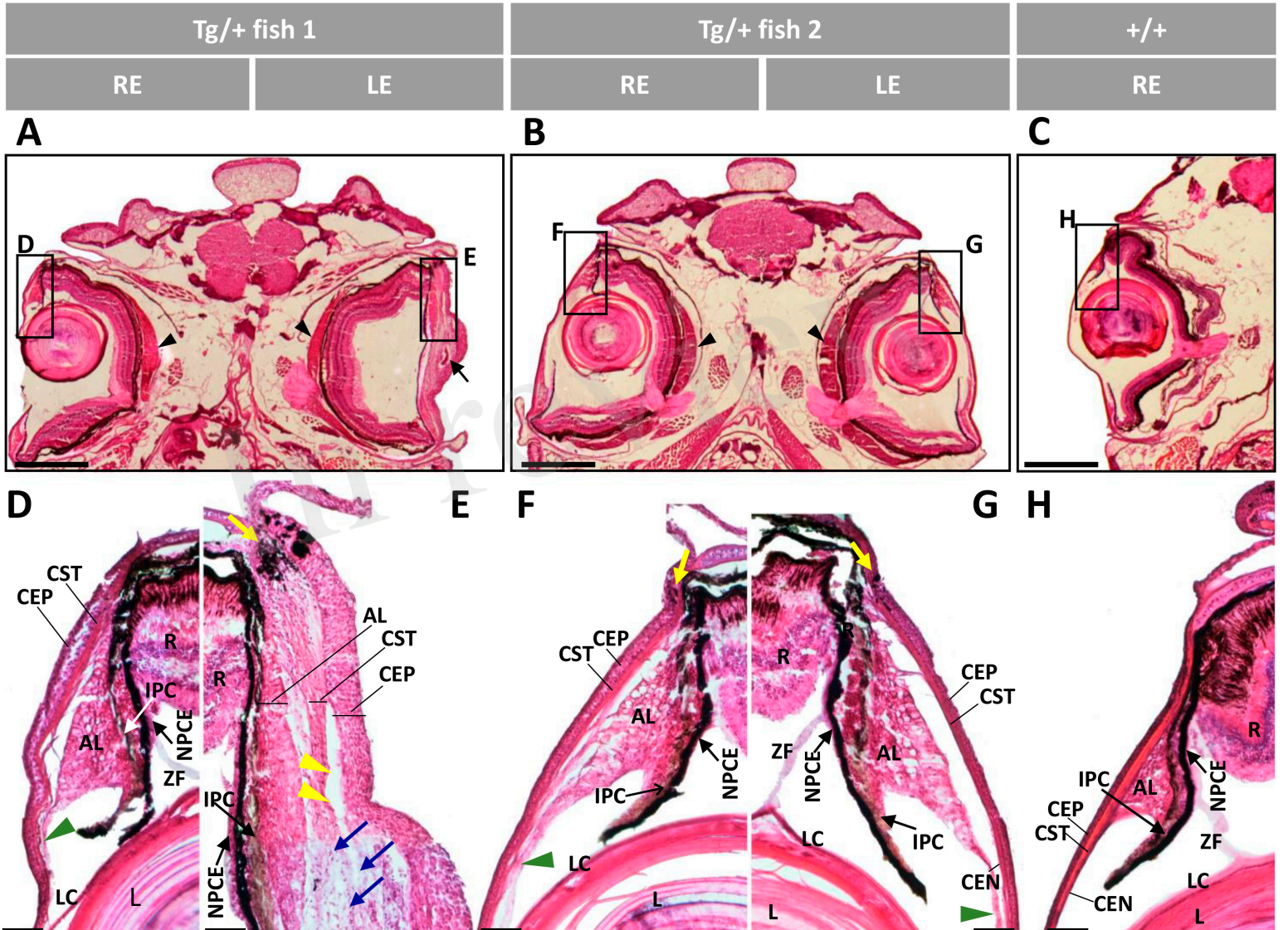


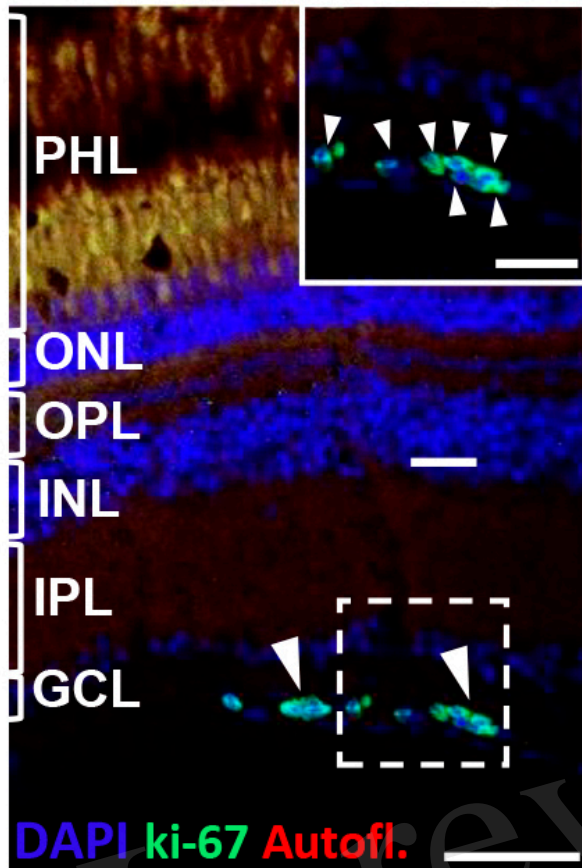
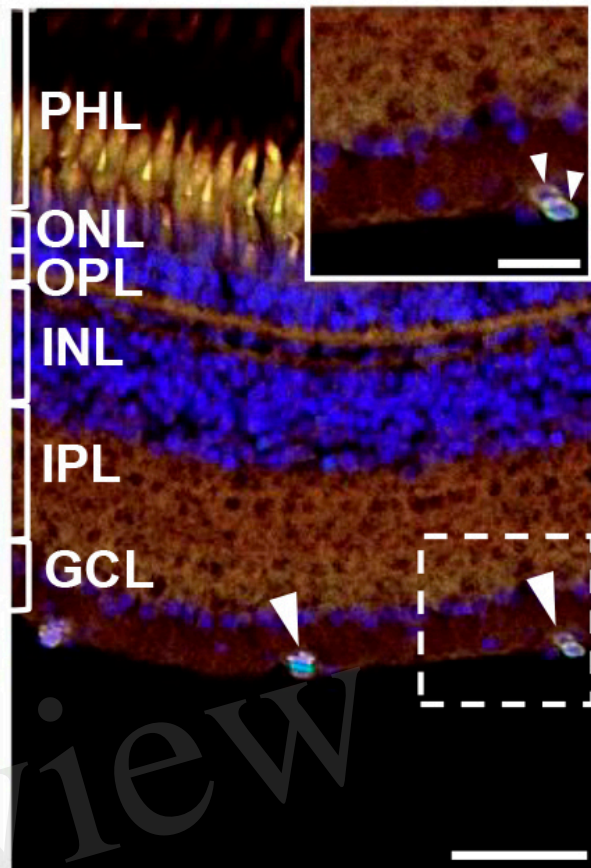
Figure 12.JPEG



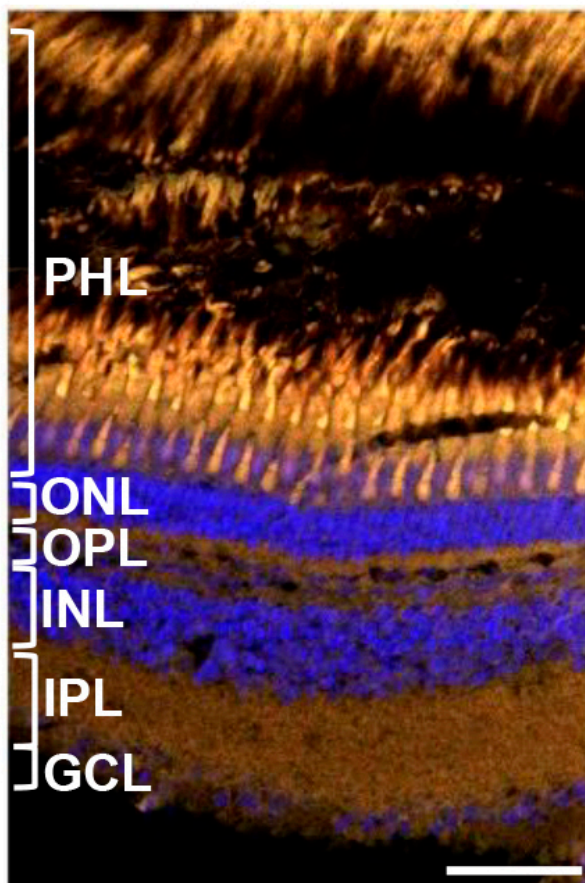
Tg/+

Figure 13.JPEG

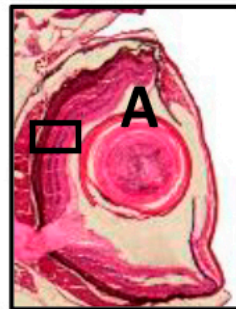
+/+

A**B**

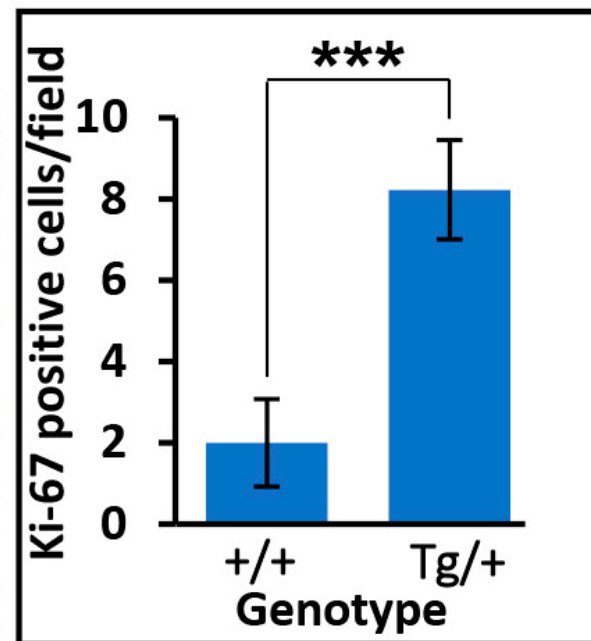
Neg. control

C**D**

Tg/+






**E**

+/+

**F**

Article

Role of *GUCA1C* in Primary Congenital Glaucoma and in the Retina: Functional Evaluation in Zebrafish

Samuel Morales-Cámara ¹, Susana Alexandre-Moreno ^{1,2}, Juan-Manuel Bonet-Fernández ^{1,2}, Raquel Atienzar-Aroca ^{1,2}, José-Daniel Aroca-Aguilar ^{1,2} , Jesús-José Ferre-Fernández ^{1,2} , Carmen-Dora Méndez ^{2,3,4}, Laura Morales ^{2,3,4}, Laura Fernández-Sánchez ⁵ , Nicolas Cuenca ^{2,6} , Miguel Coca-Prados ⁷, José-María Martínez-de-la-Casa ^{2,3,4}, Julián García-Feijoo ^{2,3,4} and Julio Escribano ^{1,2,*} 

- ¹ Área de Genética, Facultad de Medicina de Albacete/Instituto de Investigación en Discapacidades Neurológicas (IDINE), Universidad de Castilla-La Mancha, 02006 Albacete, Spain; samuelmoralescamara@gmail.com (S.M.-C.); Susana.Alexandre@uclm.es (S.A.-M.); JuanM.Bonet@uclm.es (J.-M.B.-F.); Raquel.Atienzar@uclm.es (R.A.-A.); josedaniel.aroca@uclm.es (J.-D.A.-A.); ferrejesus@hotmail.com (J.-J.F.-F.)
- ² Cooperative Research Network on Age-Related Ocular Pathology, Visual and Life Quality (OFTARED), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain; cmendez@iies.es (C.-D.M.); lauramoralesfernandez@gmail.com (L.M.); cuenca@ua.es (N.C.); jmmartinezcasa@gmail.com (J.-M.M.-d.-l.-C.); jgarciafeijoo@hotmail.com (J.G.-F.)
- ³ Servicio de Oftalmología, Hospital San Carlos, 28040 Madrid, Spain
- ⁴ Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, 28040 Madrid, Spain
- ⁵ Department of Optics, Pharmacology and Anatomy, University of Alicante, 03690 Alicante, Spain; laura.fs@gcloud.ua.es
- ⁶ Department of Physiology, Genetics and Microbiology, University of Alicante, 03690 Alicante, Spain
- ⁷ Department of Ophthalmology and Visual Science, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA; miguel.coca-prados@yale.edu
- * Correspondence: julio.escribano@uclm.es

Received: 27 March 2020; Accepted: 12 May 2020; Published: 14 May 2020



Abstract: Primary congenital glaucoma (PCG) is a heterogeneous, inherited, and severe optical neuropathy caused by apoptotic degeneration of the retinal ganglion cell layer. Whole-exome sequencing analysis of one PCG family identified two affected siblings who carried a low-frequency homozygous nonsense *GUCA1C* variant (c.52G > T/p.Glu18Ter/rs143174402). This gene encodes GCAP3, a member of the guanylate cyclase activating protein family, involved in phototransduction and with a potential role in intraocular pressure regulation. Segregation analysis supported the notion that the variant was coinherited with the disease in an autosomal recessive fashion. GCAP3 was detected immunohistochemically in the adult human ocular ciliary epithelium and retina. To evaluate the ocular effect of *GUCA1C* loss-of-function, a *guca1c* knockout zebrafish line was generated by CRISPR/Cas9 genome editing. Immunohistochemistry demonstrated the presence of GCAP3 in the non-pigmented ciliary epithelium and retina of adult wild-type fishes. Knockout animals presented up-regulation of the glial fibrillary acidic protein in Müller cells and evidence of retinal ganglion cell apoptosis, indicating the existence of gliosis and glaucoma-like retinal damage. In summary, our data provide evidence for the role of *GUCA1C* as a candidate gene in PCG and offer new insights into the function of this gene in the ocular anterior segment and the retina.

Keywords: primary congenital glaucoma; exome sequencing; *GUCA1C*; GCAP3; zebrafish; CRISPR/Cas9



CPAMD8 loss-of-function underlies non-dominant congenital glaucoma with variable anterior segment dysgenesis and abnormal extracellular matrix

Juan-Manuel Bonet-Fernández^{1,2,3} · José-Daniel Aroca-Aguilar^{1,2,3} · Marta Corton^{4,5} · Ana-Isabel Ramírez^{3,6} · Susana Alexandre-Moreno^{1,2,3} · María-Teresa García-Antón⁶ · Juan-José Salazar^{3,6} · Jesús-José Ferre-Fernández^{1,2,3} · Raquel Atienzar-Aroca^{1,2,3} · Cristina Villaverde^{4,5} · Ionut Iancu^{4,5} · Alejandra Tamayo⁴ · Carmen-Dora Méndez-Hernández^{3,7,8} · Laura Morales-Fernández^{3,7,8} · Blanca Rojas^{3,6,9} · Carmen Ayuso^{4,5} · Miguel Coca-Prados¹⁰ · José-Maria Martínez-de-la-Casa^{3,7,8} · Julián García-Feijoo^{3,7,8} · Julio Escribano^{1,2,3}

Received: 27 January 2020 / Accepted: 3 April 2020 / Published online: 9 April 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Abnormal development of the ocular anterior segment may lead to a spectrum of clinical phenotypes ranging from primary congenital glaucoma (PCG) to variable anterior segment dysgenesis (ASD). The main objective of this study was to identify the genetic alterations underlying recessive congenital glaucoma with ASD (CG-ASD). Next-generation DNA sequencing identified rare biallelic *CPAMD8* variants in four patients with CG-ASD and in one case with PCG. *CPAMD8* is a gene of unknown function and recently associated with ASD. Bioinformatic and in vitro functional evaluation of the variants using quantitative reverse transcription PCR and minigene analysis supported a loss-of-function pathogenic mechanism. Optical and electron microscopy of the trabeculectomy specimen from one of the CG-ASD cases revealed an abnormal anterior chamber angle, with altered extracellular matrix, and apoptotic trabecular meshwork cells. The *CPAMD8* protein was immunodetected in adult human ocular fluids and anterior segment tissues involved in glaucoma and ASD (i.e., aqueous humor, non-pigmented ciliary epithelium, and iris muscles), as well as in periocular mesenchyme-like cells of zebrafish embryos. CRISPR/Cas9 disruption of this gene in F0 zebrafish embryos (96 hpf) resulted in varying degrees of gross developmental abnormalities, including microphthalmia, pharyngeal maldevelopment, and pericardial and periocular edemas. Optical and electron microscopy examination of these embryos showed iridocorneal angle hypoplasia (characterized by altered iris stroma cells, reduced anterior chamber, and collagen disorganized corneal stroma extracellular matrix), recapitulating some patients' features. Our data support the notion that *CPAMD8* loss-of-function underlies a spectrum of recessive CG-ASD phenotypes associated with extracellular matrix disorganization and provide new insights into the normal and disease roles of this gene.

Introduction

Primary congenital glaucoma (PCG) and anterior segment dysgenesis (ASD) are related and heterogeneous diseases that may severely impair visual function. They result from

diverse developmental abnormalities of the ocular anterior segment structures, which include the Schlemm's canal (SC), trabecular meshwork (TM), ciliary body (CB), iris, and cornea (Kupfer and Kaiser-Kupfer 1978, 1979). PCG is caused by a malformation restricted to the TM and/or SC, i.e., trabeculodysgenesis or gonyodysgenesis (Gould and John 2002), which results in elevated intraocular pressure (IOP), and in the classical triad of epiphora, blepharospasm, and photophobia (Papadopoulos et al. 2013). Ocular enlargement and curvilinear breaks in the Descemet's membrane (Haab striae) may also be present in some patients. Typical PCG is usually diagnosed in the neonatal or infantile period. On the other hand, ASD malformation and its associated clinical features are highly variable and may include underdevelopment of the iris (iris hypoplasia), altered corneal

Juan-Manuel Bonet-Fernández and José-Daniel Aroca-Aguilar contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00439-020-02164-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Julio Escribano
julio.escribano@uclm.es

Extended author information available on the last page of the article



Article

Null *cyp1b1* Activity in Zebrafish Leads to Variable Craniofacial Defects Associated with Altered Expression of Extracellular Matrix and Lipid Metabolism Genes

Susana Alexandre-Moreno ^{1,2} , Juan-Manuel Bonet-Fernández ^{1,2} , Raquel Atienzar-Aroca ^{1,2},
José-Daniel Aroca-Aguilar ^{1,2,*} and Julio Escribano ^{1,2,*}

- ¹ Área de Genética, Facultad de Medicina de Albacete, Instituto de Investigación en Discapacidades Neurológicas (IDINE), Universidad de Castilla-La Mancha, 02006 Albacete, Spain; Susana.Alexandre@uclm.es (S.A.-M.); juanm.bonet@uclm.es (J.-M.B.-F.); raquel.atienzar@uclm.es (R.A.-A.)
- ² Cooperative Research Network on Age-Related Ocular Pathology, Visual and Life Quality (OFTARED), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: josedaniel.aroca@uclm.es (J.-D.A.-A.); julio.escribano@uclm.es (J.E.)



Citation: Alexandre-Moreno, S.; Bonet-Fernández, J.-M.; Atienzar-Aroca, R.; Aroca-Aguilar, J.-D.; Escribano, J. Null *cyp1b1* Activity in Zebrafish Leads to Variable Craniofacial Defects Associated with Altered Expression of Extracellular Matrix and Lipid Metabolism Genes. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6430. <https://doi.org/10.3390/ijms22126430>

Academic Editors: Seong-kyu Choe and Cheol-Hee Kim

Received: 19 May 2021
Accepted: 12 June 2021
Published: 16 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: CYP1B1 is a cytochrome P450 monooxygenase involved in oxidative metabolism of different endogenous lipids and drugs. The loss of function (LoF) of this gene underlies many cases of recessive primary congenital glaucoma (PCG), an infrequent disease and a common cause of infantile loss of vision in children. To the best of our knowledge, this is the first study to generate a *cyp1b1* knockout zebrafish model. The zebrafish line did not exhibit glaucoma-related phenotypes; however, adult mutant zebrafish presented variable craniofacial alterations, including uni- or bilateral craniofacial alterations with incomplete penetrance and variable expressivity. Transcriptomic analyses of seven-dpf *cyp1b1*-KO zebrafish revealed differentially expressed genes related to extracellular matrix and cell adhesion, cell growth and proliferation, lipid metabolism and inflammation. Overall, this study provides evidence for the complexity of the phenotypes and molecular pathways associated with *cyp1b1* LoF, as well as for the dysregulation of extracellular matrix gene expression as one of the mechanisms underlying *cyp1b1* disruption-associated pathogenicity.

Abstract: CYP1B1 loss of function (LoF) is the main known genetic alteration present in recessive primary congenital glaucoma (PCG), an infrequent disease characterized by delayed embryonic development of the ocular iridocorneal angle; however, the underlying molecular mechanisms are poorly understood. To model CYP1B1 LoF underlying PCG, we developed a *cyp1b1* knockout (KO) zebrafish line using CRISPR/Cas9 genome editing. This line carries the c.535_667del frameshift mutation that results in the 72% mRNA reduction with the residual mRNA predicted to produce an inactive truncated protein (p.(His179Glyfs*6)). Microphthalmia and jaw maldevelopment were observed in 23% of F0 somatic mosaic mutant larvae (144 hpf). These early phenotypes were not detected in *cyp1b1*-KO F3 larvae (144 hpf), but 27% of adult (four months) zebrafish exhibited uni- or bilateral craniofacial alterations, indicating the existence of incomplete penetrance and variable expressivity. These phenotypes increased to 86% in the adult offspring of inbred progenitors with craniofacial defects. No glaucoma-related phenotypes were observed in *cyp1b1* mutants. Transcriptomic analyses of the offspring (seven dpf) of *cyp1b1*-KO progenitors with adult-onset craniofacial defects revealed functionally enriched differentially expressed genes related to extracellular matrix and cell adhesion, cell growth and proliferation, lipid metabolism (retinoids, steroids and fatty acids and oxidation–reduction processes that include several cytochrome P450 genes) and inflammation. In summary, this study shows the complexity of the phenotypes and molecular pathways associated with *cyp1b1* LoF, with species dependency, and provides evidence for the dysregulation of extracellular matrix gene expression as one of the mechanisms underlying the pathogenicity associated with *cyp1b1* disruption.