

**Die Bedeutung von Atf6 für die Entwicklung  
der Zebrafischretina:  
Generierung und Charakterisierung eines  
*atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
und  
der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

**JULIA FELDEN**

geb. Stolz

aus Homberg (Efze), Deutschland

Tübingen,  
Juni 2019

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Oktober 2019

Dekan der Math.-Nat. Fakultät: Prof. Dr. W. Rosenstiel

Dekan der Medizinischen Fakultät: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Wissinger

2. Berichterstatter: Dr. Thorsten Schmidt

Prüfungskommission: Prof. Dr. Bernd Wissinger

Dr. Thorsten Schmidt

Prof. Dr. Alfred Nordheim

Prof. Dr. Marius Ueffing

**Erklärung / Declaration:**

Ich erkläre, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Die Bedeutung von Atf6 für die Entwicklung der Zebrafischretina: Generierung und Charakterisierung eines *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells“

selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

*I hereby declare that I have produced the work entitled “Die Bedeutung von Atf6 für die Entwicklung der Zebrafischretina: Generierung und Charakterisierung eines *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells”, submitted for the award of a doctorate, on my own (without external help), have used only the sources and aids indicated and have marked passages included from other works, whether verbatim or in content, as such. I swear upon oath that these statements are true and that I have not concealed anything. I am aware that making a false declaration under oath is punishable by a term of imprisonment of up to three years or by a fine.*

Tübingen, den .....

Datum / Date

.....

Unterschrift /Signature



**Meinen Großeltern**

**in Liebe**

**gewidmet**



*“There is a theory which states that if ever anybody discovers exactly what the universe is for and why it is here, it will instantly disappear and be replaced by something even more bizarre and inexplicable. There is another theory which states that this has already happened.”*

Douglas Adams, English humorist & science fiction novelist (1952 - 2001)



# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Die <i>Unfolded Protein Response</i> als Reaktion der Zelle auf ER-Stress.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Der aktivierende Transkriptionsfaktor 6.....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Der Aufbau und der Signalweg von ATF6 .....	3
1.2.2. Die unterschiedlichen Funktionen von ATF6 als UPR-Komponente.....	6
1.2.3. Unterschiedlichste zelluläre Stimuli führen zu einer ER-Stress-verbundenen Aktivierung von <i>ATF6</i> .....	8
1.2.4. Pharmakologische Induktion der UPR.....	9
<b>1.3. <i>ATF6</i> und Achromatopsie .....</b>	<b>10</b>
1.3.1. <i>ATF6</i> als sechstes Gen bei Achromatopsie .....	10
1.3.2. <i>ATF6</i> -Tiermodelle.....	14
<b>1.4. Der Zebrafisch als Tiermodell erblicher retinaler Erkrankungen.....</b>	<b>15</b>
1.4.1. Der Aufbau der Retina: Die Zebrafischretina im Vergleich zur humanen Retina .....	15
1.4.2. Die Entwicklung der Zebrafischretina .....	19
<b>1.5. Wissenschaftliche Zielsetzungen .....</b>	<b>22</b>
<b>2. MATERIAL .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Geräte .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Chemikalien .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3. Kommerzielle Reagenzien und Medien.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4. Kits.....</b>	<b>32</b>
<b>2.5. Enzyme .....</b>	<b>33</b>
<b>2.6. Längen- und Größenstandards .....</b>	<b>34</b>
<b>2.7. Plasmide und Vektoren.....</b>	<b>35</b>
<b>2.8. Verwendete Erst- und Zweitantikörper .....</b>	<b>35</b>
<b>2.9. Bakterienstämme.....</b>	<b>36</b>
<b>2.10. Primer.....</b>	<b>36</b>
<b>2.11. Zebrafischstämme .....</b>	<b>40</b>
<b>2.12. Zell-Linien.....</b>	<b>41</b>
<b>2.13. Lösungen und Puffer.....</b>	<b>41</b>
<b>2.14. Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>45</b>
<b>2.15. Software.....</b>	<b>45</b>

<b>3. METHODEN .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1. Mikrobiologische Techniken .....</b>	<b>46</b>
3.1.1. Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Bakterienstämmen .....	46
<b>3.2. Isolierung, Aufreinigung, Aufkonzentration und Vermessung von Nukleinsäureproben.....</b>	<b>46</b>
3.2.1. Aufreinigung von Plasmiden aus Bakterienkulturen .....	46
3.2.2. Isolierung von DNA aus Zebrafischlarven und Schwanzflossenbiopsien.....	47
3.2.3. Isolation und Aufreinigung von RNA.....	47
3.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	48
3.2.5. Aufreinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen .....	48
3.2.6. Phenol-/Chloroform-Extraktion.....	48
3.2.7. Ethanol-Fällung.....	48
3.2.8. Lithiumchlorid-Präzipitation.....	49
3.2.9. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäureproben .....	49
<b>3.3. Molekularbiologische Techniken .....</b>	<b>49</b>
3.3.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion .....	49
3.3.2. Kolonie-PCR.....	51
3.3.3. Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese .....	52
3.3.4. Restriktionsverdau .....	53
3.3.5. Ligation .....	53
3.3.6. Sequenzierung von DNA-Fragmenten und Plasmiden nach Sanger .....	54
3.3.7. cDNA-Synthese mittels reverser Transkription.....	55
3.3.8. <i>In vitro</i> RNA-Synthese und Poly-Adenylierung.....	56
3.3.9. Generierung von TALEN-Konstrukten gegen <i>atf6</i> .....	58
3.3.9.1. Identifizierung geeigneter TALEN-Zielsequenzen in <i>atf6</i> .....	59
3.3.9.2. Klonierung von TALEN-Konstrukten .....	59
3.3.9.3. Detektion der TALEN-Aktivität sowie TALEN-vermittelter Mutationen mittels RFLP .....	64
3.3.9.4. Toxizitäts- und Effizienzbestimmung der unterschiedlichen TALEN-Paare .	66
3.3.10. Generierung von Konstrukten zur heterologen Expression von ATF6/Atf6 in HEK293T-Zellen .....	67
3.3.10.1. Zielgerichtete Mutagenese des murinen und Zebrafisch-Atf6-Expressionskonstruktes .....	68
3.3.11. Relative Quantifizierung von Expressionsunterschieden mittels quantitativer <i>Real Time</i> PCR.....	70

3.3.11.1. Bestimmung der Amplifikationseffizienz der Primerpaare .....	71
3.3.11.2. Durchführung und Ablauf der qRT-PCR .....	72
3.3.11.3. Auswertung in der qRT-PCR generierter Daten .....	72
<b>3.4. Zellbiologische Techniken .....</b>	<b>73</b>
3.4.1. Auftauen von HEK293T-Zellen und Fibroblasten .....	73
3.4.2. Kultivierung und Splitten von HEK293T-Zellen .....	73
3.4.3. Kultivierung und Splitten von Fibroblasten.....	74
3.4.4. Transfektion von HEK293T-Zellen .....	74
<b>3.5. SDS-Page und Western Blot.....</b>	<b>75</b>
3.5.1. Isolierung von Proteinen aus HEK293T-Zellen und Fibroblasten .....	75
3.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	75
3.5.3. Durchführung der SDS-Page und des Western Blots .....	76
<b>3.6. Tierexperimentelle Methoden .....</b>	<b>78</b>
3.6.1. Haltung von Zebrafischen.....	78
3.6.2. Zucht und Aufzucht von Zebrafischen .....	78
3.6.3. Anästhesie und Euthanasie von Zebrafischen.....	79
3.6.4. Entnahme von Schwanzflossenbiopsien .....	80
3.6.5. Injektion von Zebrafischoozyten .....	80
3.6.6. Generierung und Aufbau der <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafischlinie .....	81
3.6.7. Durchführung des ERGs bei Zebrafischlarven .....	82
3.6.8. Behandlung von Zebrafischlarven mit Tunicamycin.....	84
3.6.9. Aufarbeitung und Fixierung von Zebrafischlarven für ISH und histologische Untersuchungen .....	84
3.6.10. Bleichen von Zebrafischlarven .....	84
3.6.11. Präparation von Zebrafischaugen für immunhistologische Untersuchungen ....	85
<b>3.7. Whole mount ISH.....</b>	<b>85</b>
3.7.1. Generierung von ISH-Konstrukten .....	85
3.7.2. <i>In vitro</i> -Synthese DIG-markierter Ribosonden.....	86
3.7.3. Durchführung und Ablauf der <i>whole mount</i> ISH an Zebrafischlarven.....	87
3.7.4. Durchführung und Ablauf der ISH an Gefrierschnitten adulter Zebrafischretinae .....	89
<b>3.8. Immunhistologische Techniken .....</b>	<b>91</b>
3.8.1. Verarbeitung von Zebrafischlarven und adulten Zebrafischaugen zur Anfertigung von Gefrierschnitten.....	91
3.8.2. Anfertigung von Gefrierschnitten .....	91

3.8.3. Immunhistologische Färbungen an Gefrierschnitten adulter Maus– sowie Zebrafischretinae und Zebrafischlarven.....	92
3.8.4. Immunologische <i>whole-mount</i> -Färbungen an Zebrafischlarven .....	93
3.8.5. Detektion apoptotischer Zellen mittels des TUNEL-Assays .....	94
3.8.6. DAB-Färbung .....	94
3.8.7. Fixierung und Einbettung von Zebrafischlarven zur Herstellung von Semidünnschnitten .....	95
<b>3.9. Bildgebende Techniken.....</b>	<b>96</b>
3.9.1. Dokumentation von immunhistologischen Färbungen und <i>in-situ</i> -Hybridisierungs-färbungen an Gewebeschnitten .....	96
3.9.2. Durchlichtaufnahmen der in der <i>whole-mount</i> ISH angefärbten Zebrafischlarven .....	97
3.9.3. Auszählung unterschiedlicher retinaler Zelltypen in Zebrafischlarven und adulten Tieren .....	97
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>99</b>
<b>4.1. Identifizierung von <i>atf6</i> im Zebrafisch.....</b>	<b>99</b>
4.1.1. <i>atf6</i> als einziges Ortholog im Zebrafischgenom .....	99
4.1.2. Lokalisation und Expression von <i>atf6</i> in der Zebrafischretina .....	101
4.1.3. Evaluation von Antikörpern zur Detektion des humanen, murinen und Zebrafisch-Atf6-Proteins .....	102
<b>4.2. Generierung einer <i>atf6</i><sup>-/-</sup>-Zebrafischlinie .....</b>	<b>103</b>
4.2.1. Identifikation von TALEN gegen <i>atf6</i> .....	103
4.2.2. Evaluation der TALEN gegen <i>atf6</i> .....	105
4.2.3. Generierung der <i>atf6-knockout</i> -Zebrafischlinie .....	106
4.2.4. Expression von <i>atf6</i> in <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafischen .....	109
<b>4.3. Charakterisierung des <i>atf6</i><sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells.....</b>	<b>111</b>
4.3.1. Histologische Charakterisierung der <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafischretina .....	111
4.3.1.1. Messung des retinalen Umfangs .....	111
4.3.1.2. Untersuchung der Rot-und Grünzapfen während der Entwicklung .....	112
4.3.1.3. Morphologie von Rot-und Grünzapfen und Lokalisation des Rhodopsins in den Stäbchen während der Entwicklung der Zebrafischretina.....	116
4.3.1.4. Untersuchung der Bipolar- und Ganglienzellen während der Entwicklung .	119
4.3.1.5. Untersuchung der Rot- und Grünzapfen in der adulten Zebrafischretina .....	122
4.3.1.6. Untersuchung der Bipolar- und Ganglienzellen in der adulten Zebrafischretina .....	123

4.3.1.7. Untersuchung der Proliferation und des Zelltods in der <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafischretina .....	124
4.3.2. Funktionelle Charakterisierung des <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafisches mittels ERG-Messungen .....	128
4.3.3. Expressionsanalyse von UPR-Komponenten in der WT- und <i>atf6</i> -defizienten Zebrafischretina .....	130
4.3.3.1. Lokalisation der Expression von <i>hspa5</i> , <i>hsp90b1</i> und <i>atf6β</i> in der WT-Retina .....	130
4.3.3.2. Die Expression weiterer UPR-Komponenten in der <i>atf6</i> -defizienten Zebrafischretina.....	134
4.3.4. Charakterisierung des <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafischmodells nach pharmakologischer Induktion von ER-Stress .....	136
4.3.4.1. Die Expression verschiedener ER-Stressgene nach pharmakologischer Induktion der UPR mit Tunicamycin .....	136
4.3.4.2. Der Effekt von Tunicamycin auf die Zellen der äußeren Zebrafischretina...	137
4.3.4.3. Der Effekt von Tunicamycin auf die Zellen der inneren Zebrafischretina ...	139
4.3.4.4. Der Effekt von Tunicamycin auf Proliferation und Zelltod in der Zebrafischretina.....	142
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>145</b>
<b>5.1. <i>atf6</i> als einziges Ortholog im Zebrafischgenom.....</b>	<b>145</b>
<b>5.2. Expression von <i>atf6</i> und <i>atf6</i>-assoziierter UPR-Komponenten in der Retina .....</b>	<b>147</b>
5.2.1. Während der Entwicklung entsteht ER-Stress .....	150
<b>5.3. Evaluierung der unterschiedlichen Antikörper gegen humanes, murines und Zebrafisch-Atf6.....</b>	<b>152</b>
<b>5.4. Generierung und Evaluierung der verschiedenen TALEN-Paare .....</b>	<b>154</b>
<b>5.5. Charakterisierung des <i>atf6</i><sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells.....</b>	<b>157</b>
5.5.1. <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafische zeigen eine Verzögerung in der retinalen Entwicklung .....	157
5.5.2. Expression unterschiedlicher UPR-Signalwegskomponenten in der <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafischretina .....	160
5.5.3. Die Rolle von <i>atf6β</i> .....	161
5.5.4. Der Einfluss von pharmakologisch induziertem ER-Stress auf den retinalen Phänotyp in der <i>atf6</i> -defizienten Zebrafischlarve.....	164
<b>5.6. Die Eignung des Zebrafisches als Tiermodell der <i>ATF6</i>-assozierten ACHM ....</b>	<b>168</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>172</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>174</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>176</b>
<b>9. GELEISTETER EIGENBEITRAG.....</b>	<b>196</b>

<b>10. DANKSAGUNG.....</b>	<b>197</b>
<b>11. ANHANG .....</b>	<b>199</b>
<b>11.1. Absolute Quantifizierung der untersuchten retinalen Zelltypen.....</b>	<b>199</b>
<b>11.2. Aminosäure-Vergleich von ATF6 in unterschiedlichen Spezies.....</b>	<b>199</b>
<b>11.3. Übersicht der evaluierten anti-ATF6/Atf6-Antikörper .....</b>	<b>201</b>
<b>11.4. NCBI-Referenzsequenzen.....</b>	<b>206</b>
<b>11.5. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>207</b>
<b>11.6. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>210</b>
<b>11.7. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>213</b>

# 1. Einleitung

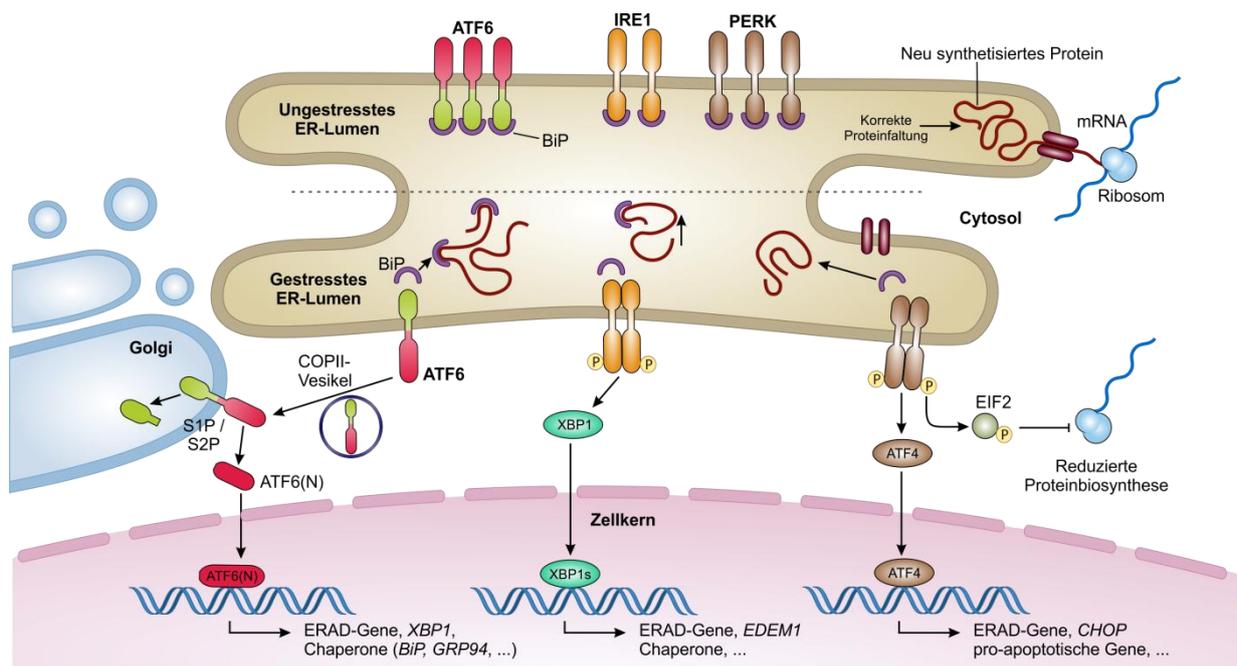
## 1.1. Die *Unfolded Protein Response* als Reaktion der Zelle auf ER-Stress

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein tubuläres und dynamisches Netzwerk, welches von Membranen umschlossen ist und, mit Ausnahme von ausgereiften Erythrozyten, in jeder Zelle des Körpers vorliegt. Zu seinen Aufgaben gehören die Proteinbiosynthese (Translation), -faltung und -prozessierung. Das ER kann daher auch als Regulator der Proteinhomöostase in der Zelle betrachtet werden. Außerdem dient das ER als Kalziumreservoir und Ort der Lipidsynthese (Rutkowski und Hedge, 2010; Walter und Ron, 2011). Die Funktion des ERs kann durch unterschiedlichste Faktoren, wie einem Mangel an Glukose, Veränderungen des Redoxpotentials, einer viralen Infektion oder auch durch eine Einschränkung in der kalzium-gesteuerten Signalübertragung, gestört werden. Infolgedessen akkumulieren fehlgefaltete oder ungefaltete Protein im ER-Lumen (Xu et al., 2005) – ein Prozess, der unter dem Begriff *ER-Stress*, zusammengefasst wird. Liegt eine solche Stress-Situation im ER vor, wird von der Zelle eine hochkonservierte Signalkaskade, die *Unfolded Protein Response* (UPR), ausgelöst (Zhang und Kaufman, 2004; Walter und Ron, 2011). Die Hauptaufgabe der UPR besteht darin kompensatorische Mechanismen anzuschalten, damit die Zelle die erhöhte Proteinhäufung im ER ausgleichen und überleben kann.

Die UPR besteht aus drei Signalkaskaden: der ATF6 (aktivierender Transkriptionsfaktor 6)-, der IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*) (IRE1)- und der PERK (*Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*)-Signalkaskade. Der ATF6- und der IRE1-Signalweg führen als *pro-survival*-Signalwege zu einer erhöhten Expression von Chaperonen sowie verschiedener ERAD-Gene. Durch diese wird der Abbau von Proteinen im Cytosol stimuliert und eine Überladung des ERs wird verhindert. Wird ATF6 durch entstehenden ER-Stress und die damit verbundene Dissoziation des *glucose-regulated protein 78kDa* (GRP78/BiP) aktiviert, migriert es in den Golgi-Apparat. Dort wird ATF6 proteolytisch gespalten. Der cytosolische Abschnitt transloziert anschließend in den Zellkern und agiert dort als Transkriptionsfaktor (Abb. 1). Eine detaillierte Beschreibung der Aktivierung und Wirkungsweise von ATF6 ist in den folgenden Kapiteln dargestellt.

Der IRE1-Signalweg wurde im Rahmen der UPR das erste Mal in den frühen 1990er Jahren beschrieben (Mori et al., 1992; Mori et al., 1993; Cox et al., 1993). Liegt ER-Stress vor, dissoziiert BiP, ähnlich wie im ATF6-Signalweg, von dem in der ER-Membran residierenden IRE1, wodurch IRE1 durch Dimerisierung und Autophosphorylierung aktiviert wird. Die ak-

tivierte Form von IRE1 induziert einen speziellen Spleißprozess, auch unkonventionelles Spleißen genannt (Yoshida et al., 2001; Uemura et al., 2009). Hierbei wird ein 26 Nukleotid langes Stück aus der Boten-RNA (mRNA) des X-Box-bindenden-Proteins (XBP1) herausgeschnitten, wodurch funktionelles XBP1 (XBP1s) translatiert werden kann. XBP1s migriert als Transkriptionsfaktor in den Zellkern und induziert dort die Expression verschiedener ERAD-Gene, wie beispielsweise EDEM1 (*Endoplasmic Reticulum Degradation-enhancing Alpha - Mannosidase-like Protein 1*) und anderer Chaperone (Abb. 1).



**Abbildung 1: Die verschiedenen UPR-Signalwege der Zelle.** Der ATF6-, der IRE1- und der PERK-Signalweg (Modifiziert nach Todd et al., 2008).

Der PERK-Signalweg wird auch als pro-apoptischer Signalweg bezeichnet, da er die Proteintranslation reduziert und bei Bedarf den programmierten Zelltod (Apoptose) einleitet (Marciniak und Ron, 2006, Walter und Ron, 2011). PERK ist ebenfalls ein membranständiger ER-Stress-Sensor. Unter ER-Stress-Bedingungen wird PERK genau wie ATF6 und IRE1 durch die Dissoziation von BiP aktiviert, oligomerisiert und phosphoryliert sich und den Translationsfaktor eIF2α (*Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha*; Walter und Ron, 2011). Durch die Phosphorylierung wird eIF2α inaktiv und inhibiert die Translation jeglicher Proteine (Harding et al., 1999; Wek et al., 2007). Die Translation des Transkriptionsfaktors ATF4 gilt hier jedoch als Ausnahme – diese wird durch phosphoryliertes eIF2α induziert. ATF4 reguliert anschließend neben ERAD-Genen (Harding et al., 2000; Vattam und Wek, 2004) die Expression

des C/EBP-homologen-Proteins (CHOP, Abb. 1). CHOP seinerseits reguliert die Induktion pro-apoptotischer Gene (Ma et al., 2002; Marciniak et al., 2004).

Im Fall von ER-Stress reagieren Zellen von Vertebraten nicht mit der gleichzeitigen Aktivierung aller drei UPR-Signalwege, sondern schalten diese gezielt in Abhängigkeit von der Art und Dauer der jeweiligen ER-Stress-Situation an. Als sofortige Reaktion der Zelle auf auftretenden ER-Stress aktiviert diese den PERK-Signalweg, wodurch jegliche weitere Proteinbiosynthese inhibiert wird (Harding et al., 2000; Hetz, 2012). Zusätzlich wird die mRNA verschiedener ER-Proteine gezielt abgebaut (Hollien et al., 2009). Erst danach wird die Genexpression der verschiedenen UPR-Gene über die Aktivierung der drei Stress-Sensoren PERK, IRE1 und ATF6 initiiert (Ron und Walter, 2007). Die zeitliche Abfolge, in der die drei Stress-Sensoren aktiviert werden, hat jedoch Einfluss darauf, ob die Apoptose eingeleitet wird oder ob die Zelle überlebt (DuRose et al., 2006). Verändert sich beispielsweise die Kalzium-Homöostase des ERs durch Blockade der ER-gebundenen Kalziumpumpen, erfolgt eine sofortige simultane Aktivierung des PERK- und des IRE1-Signalweges. Im Gegensatz hierzu wird der ATF6-Signalweg verstärkt infolge von verminderter Proteinglykosylierung sowie Veränderungen in der Redox-Homöostase der Zelle aktiviert (Du Rose et al., 2006). Obwohl jeder der drei Signalwege einen spezifischen Mechanismus besitzt, um auf erhöhten ER-Stress zu reagieren, können sie nicht als eigenständige und voneinander unabhängige Arme der UPR betrachtet werden. Verschiedene Studien zeigen, dass die unterschiedlichen Stress-Sensoren miteinander agieren und sich gegenseitig regulieren. Wird ER-Stress beispielsweise pharmakologisch in Neuroblastomzellen induziert, nimmt ATF6 Einfluss auf die Expression von IRE1 (Walter et al., 2018). Untersuchungen in Mäusen sowie zusätzliche Experimente in Fibroblasten aus Mäuseembryonen (MEFs) lieferten Hinweise auf eine regulatorische Verbindung zwischen PERK und ATF6, bei der PERK die Synthese und den Transport von ATF6 vom ER zum Golgi-Apparat erleichtert (Teske et al., 2011). Diese Erkenntnisse zeigen, dass die drei Arme der UPR nicht als parallele und voneinander unabhängige Signalwege angesehen werden können, sondern dass es sich bei der UPR um ein in sich verschaltetes und dynamisches Netzwerk handelt.

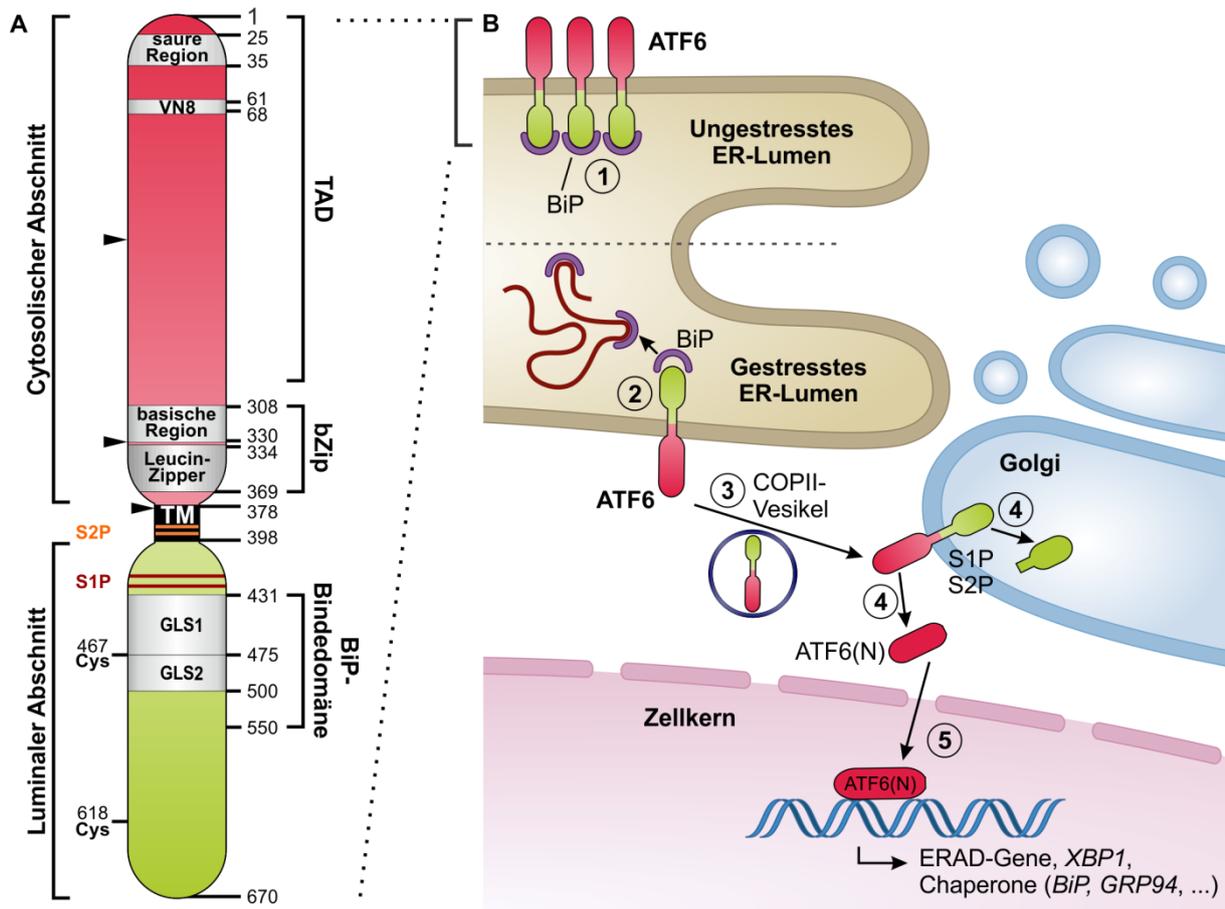
## **1.2. Der aktivierende Transkriptionsfaktor 6**

### **1.2.1. Der Aufbau und der Signalweg von ATF6**

ATF6 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, welches durch das *ATF6*-Gen (#MIM605537) kodiert wird. Es ist ein Schlüsselprotein und wichtiger Regulator der UPR und hält neben der

zellulären Homöostase auch die Funktion des ERs und damit die Überwachung der Proteinbiosynthese und –faltung aufrecht (Yoshida et al., 1998; Haze et al., 1999; Walter und Ron, 2011).

ATF6 ist ein 670 Aminosäuren langes und 90 kDa großes Typ-II-Transmembranprotein und gehört zu den Transkriptionsfaktoren der ATF/CREB (*cAMP-response element-binding protein*)-Familie. ATF6 liegt im inaktiven Zustand als Monomer, Dimer oder Oligomer in der ER-Membran vor. Der N-Terminus von ATF6 ist im Cytosol und der C-Terminus im ER-Lumen lokalisiert (Abb. 2B(1)). Aktiviert wird ATF6 durch die Dissoziation BiPs, einem Chaperon und Sensor fehlgefalteter Proteine im ER-Lumen, den ATF6 in seiner inaktiven Form im luminalen Abschnitt bindet (Shen et al., 2002). Kommt es zu einer Akkumulation un- oder fehlgefalteter Proteine im ER, dissoziiert BiP von ATF6, um die akkumulierten Proteine zu binden (Abb. 2B(2)). ATF6 besitzt zwei Golgi-Lokalisations-Sequenzen (GLS). Die erste (GLS1) ist im Bereich der Aminosäuren 431 bis 475 und die zweite (GLS2) ist im Bereich der Aminosäuren 476 bis 500 lokalisiert (Shen et al., 2002, Abb. 2A). Durch die Dissoziation BiPs von ATF6 werden dessen bisher verdeckte Golgi-Lokalisations-Sequenzen demaskiert (Abb. 2A), wodurch ATF6 in den Golgi-Apparat migrieren kann (Shen et al., 2002). Parallel hierzu werden inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken an zwei hoch konservierten Cysteinresten an den Aminosäure-Positionen 467 und 618 im luminalen Abschnitt des Proteins reduziert. Hierdurch wird eine weitere Dimer- oder Oligomerbildung verhindert und ATF6 liegt im aktiven Zustand als Monomer vor (Nadanaka et al., 2006; Nadanaka et al., 2007). Der Transport von ATF6 in den Golgi-Apparat erfolgt mittels *coat protein complex II* (COPII)-Vesikeln (Schindler und Schekman, 2009, Abb. 2B(3)). Im Golgi-Apparat wird es anschließend mithilfe zweier Serinproteasen gespalten (Abb. 2B(4)). Hierbei spaltet die Serinprotease 1 (S1P) ATF6 zunächst zwischen Aminosäure 419 und 420, wodurch der 50 kDa große cytosolische Abschnitt (ATF6(N)) des Proteins, der die Transaktivierungsdomäne sowie den basischen Leucin-Zipper enthält, vom luminalen Abschnitt abgespalten wird (Abb. 2A). Das Leucin an Position 419 stellt hierbei die letzte Aminosäure des vier Aminosäuren langen Erkennungsmotives (RxxL) der Serinprotease S1P dar. Die Serinprotease 2 (S2P) spaltet anschließend basierend auf den als Erkennungssignal dienenden Aminosäuren Asparagin an Position 391 und Prolin an Position 394 die Transmembrandomäne (TM) ab. Die TM ist eine 21 Aminosäuren lange Domäne (Haze et al., 1999), mit der ATF6 in der ER-Membran verankert ist (Ye et al., 2000, Abb. 2A). ATF6(N) transloziert daraufhin in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor agiert (Abb. 2B(5)). Die Translokation in den Kern erfolgt mithilfe der Kernlokalisationsignale (Li et al., 2000; Abb. 2A).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des ATF6-Proteins und dessen Aktivierung. (A)** Dargestellt ist das humane ATF6-Protein inklusive aller wichtigen funktionellen Domänen. bZiP: basische Leucin-Zipper-Domäne; GLS1/2: Golgi-Lokalisations-Sequenz 1/2; TM: Transmembrandomäne; S1P/S2P: Serinproteasen 1 und 2; Cys: Cysteinreste; TAD: Transaktivierungsdomäne; VN8: VN8-like Domäne; Dreiecke: mutmaßliche Kernlokalisationssequenzen. **(B)** Der ATF6 Signalweg: Akkumulieren un- oder fehlgefaltete Proteine im ER, dissoziiert BiP von ATF6 (2), wodurch ATF6 aktiviert wird. Das aktivierte ATF6-Protein wird mittels COPII-Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert (3), wo es durch zwei Serin-Proteasen proteolytisch gespalten wird (4). Die cytosolische Domäne von ATF6 transloziert anschließend in den Zellkern (5) und agiert dort als Transkriptionsfaktor (*Modifiziert nach Todd et al., 2008*).

Für die optimale transkriptionelle Aktivität von ATF6(N), sowie für dessen proteosomalen Abbau, sind die VN8-Domäne, eine acht Aminosäuren lange Domäne (Aminosäurepositionen 61-68) innerhalb der Transaktivierungsdomäne, die zu 75 % homolog zu einer Region des VP16-Proteins des *Herpes simplex* Virus ist, sowie eine potentielle zwischen Aminosäure 25 und 35 von ATF6 liegende Region, erforderlich (Thuerauf et al., 2002, Abb. 2A)).

Um als Transkriptionsfaktor agieren zu können, dimerisiert ATF6 mittels der basischen Leucin-Zipper-Domäne (bZiP, Aminosäuren 334-369, Haze et al., 1999). Die Bindung an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) erfolgt mithilfe der basischen Domäne (Aminosäuren 308 bis 330, Haze et al., 1999, Abb. 2(A)). Nach Bindung an die DNA bildet ATF6 mit weiteren Kofaktoren wie dem *nuclear transcription factor Y* (NF-Y) und YY1 einen Transkriptionsfaktorkomplex aus (Li et al., 2000; Yoshida et al., 2001(a)). Anstatt der Bil-

dung reiner Homodimere kann ATF6 auch mit dem aktivierenden Transkriptionsfaktor 6 $\beta$  (ATF6 $\beta$ ), der aus der gleichen Transkriptionsfaktorfamilie wie ATF6 stammt, dimerisieren. ATF6 und ATF6 $\beta$  können ebenfalls zusammen mit den genannten Kofaktoren an die DNA binden (Yoshida et al., 2001(a)), wobei ATF6 $\beta$  jedoch einen schwächeren Transkriptionsaktivator als ATF6 darstellt (Thuerauf et al., 2007). Die Erkennung und Anlagerung an die DNA erfolgt durch *ER-stress response elements* (ERSE), einer speziellen Basenabfolge (CCAAT-N<sub>9</sub>-CCACG), die in der Promotorregion fast aller ER-Stressgene in Säugetieren zu finden ist (Yoshida et al., 1998; Roy und Lee, 1999; Haze et al., 1999). Frühe Studien konnten zeigen, dass NF-Y an den CCAAT-Sequenzabschnitt des ERSE bindet und für dessen optimale Induktion unter physiologischen Bedingungen verantwortlich ist (Roy and Lee, 1995; Roy et al., 1996; Li et al., 2000). YY1 hingegen hat keinen direkten Einfluss auf die basale Aktivität von Stressgenpromotoren, wie beispielsweise des BiP-Promotors, kann seine Aktivität nach pharmakologisch induziertem ER-Stress aber stimulieren (Li et al., 2000).

Zu den von ATF6(N) aktivierten Genen gehören unter anderem die Protein-Disulfid-Isomerase, das X-Box-bindende Protein 1 (*XBPI*) und die Chaperone *GRP78/BiP*, *GRP94* und *GRP58* (Adachi et al., 2008). Durch die verstärkte Transkription von Chaperonen, *ER associated degradation* (ERAD)-Genen sowie weiterer „*pro survival*“-Gene wird die Kapazität des ERs gesteigert (Maiuolo et al., 2011), und das Überleben der Zelle unterstützt.

### 1.2.2. Die unterschiedlichen Funktionen von ATF6 als UPR-Komponente

ATF6 gehört wie oben beschrieben zu den Komponenten der UPR, die die Transkription verschiedener Chaperone und „*pro survival*“-Gene induzieren und somit die Proteinfaltungskapazität des ERs erhöhen. Eine Besonderheit des ATF6-Signalwegs liegt jedoch in der Regulation des Stress-Sensors BiP (Yoshida et al., 1998; Yoshida et al., 2001): ATF6(N) induziert wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben die Transkription seines eigenen Repressors. Es bildet folglich einen *Feedback loop* mit BiP aus, indem es dessen Expression reguliert und in der eigenen Aktivierungsphase durch BiP gesteuert wird.

Die Aktivierung des ATF6-Signalwegs steuert zusätzlich die Expansion des ERs als Reaktion auf die Akkumulation membranständiger Proteine. Mittels *in vitro* Experimenten in unterschiedlichen Säugerzell-Linien (CHO, NIH-3T3, HeLa, HEK293) konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von transkriptionell aktivem ATF6 zu einer Ausdehnung des rauen ERs durch eine Steigerung der Lipidbiosynthese führt. Der Mechanismus hierfür liegt in einer erhöhten Cholin-Kinase-Aktivität, wodurch die Menge an gebildetem Phosphocholin ansteigt

(Bommiasamy et al., 2009). Phosphocholin bildet die Vorstufe des Phosphatidylcholins, welches einen wichtigen Bestandteil der zellulären Membranen darstellt. Ähnlich führt auch eine Überexpression von gespleißten XBP1, einer *Downstream*-Komponente des IRE1-Signalweges, zu einer erhöhten Lipidbiosynthese (Bommiasamy et al., 2009). Nachstehende Experimente in HeLa-Zellen konnten jedoch zeigen, dass schon eine moderate Expression membranständiger Proteine im ER zur selektiven Aktivierung des ATF6-Signalweges und der damit verbundenen Expansion bzw. Proliferation des ERs durch eine erhöhte Phosphatidylcholin-Synthese ausreicht (Maiuolo et al., 2011). Diese Beispiele zeigen, dass ATF6 neben seiner Funktion als Chaperon-Induktor, zusätzlich eine essentielle Rolle in der ER-Expansion spielt.

Neueste Untersuchungen an humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) untermauern frühere Ergebnisse. Sie konnten zeigen, dass ATF6 auch in hESCs zur Expansion des ERs während deren Differenzierungsprozesses führt (Kroeger et al., 2018). hESCs, die mittels Adenoviren mit transkriptionell aktiven ATF6(N) transduziert wurden, exprimierten eine erhöhte Menge an ER-Chaperonen und weiteren an der Proteinfaltung beteiligten Proteinen im Vergleich zu Zellen, die mit einem Kontrollkonstrukt transduziert wurden. Weitere Experimente an diesen Zellen ließen auf eine weitere neue Rolle von ATF6 in der frühen Differenzierung humaner Stammzellen schließen. Sie zeigten, dass die artifizielle Aktivierung von ATF6 durch den Aktivator AA147 sowohl die Pluripotenz von hESCs unterdrückt als auch deren mesodermale Differenzierung fördert. Umgekehrt zeigten induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs), die aus Patientenfibroblasten mit einer Missense-Mutation in ATF6 (p.(R324C)) generiert worden waren, eine verminderte mesodermale Differenzierung und eine erhöhte Bereitschaft zur Pluripotenz (Kroeger et al., 2018).

Insgesamt lassen diese Studien erkennen, dass ATF6 nicht nur einen Aktivator von „*pro-survival*“-Genen während der UPR darstellt, sondern Einfluss auf ein breites Spektrum zellulärer Funktionen hat. Neben seiner bisher bekannten Rolle als ER-Stress-Sensor und Schlüsselkomponente der UPR, ist ATF6 ebenso für andere zelluläre Prozesse, wie die Expansion des ERs und die damit verbundene Lipidbiosynthese, als auch für die frühe Differenzierung humaner Stammzellen von essentieller Bedeutung.

### 1.2.3. Unterschiedlichste zelluläre Stimuli führen zu einer ER-Stress-verbundenen Aktivierung von ATF6

Im Rahmen seiner Funktion als Zellstress-Sensor, ist ATF6 für die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Proteinfaltungskapazität des ERs verantwortlich. Unterschiedlichste Stimuli wie die Akkumulation un- oder fehlgefalteter Proteine im ER verschieben das sensible Gleichgewicht zwischen der Synthese neuer Proteine und deren Modifikation. Das entstehende Ungleichgewicht führt zu einer Überladung der ERs und damit zu ER-Stress. Ein Beispiel hierfür stellt die Rhodopsin-Mutante P23H dar. Im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Rhodopsin, welches nach korrekter Faltung in den Disc-Membranen der Stäbchen-Außensegmenten lokalisiert ist, verbleibt P23H-Rhodopsin im ER (Sung et al., 1991). Auch *in vivo* Studien an Ratten, die P23H-Rhodopsin exprimieren, zeigten, dass P23H-Rhodopsin im ER verbleibt und dort zu einer erhöhten Expression unterschiedlicher ER-Stress-Marker führt (Gorbatyuk et al., 2010).

Auch die Entstehung von oxidativem Stress und dem damit verbundenen Anstieg von Stickstoffmonoxid (NO) und anderen reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), führen zu einer Aktivierung des ATF6-Signalweges in den betroffenen Zellen. Durch die Ansammlung von NO und ROS verändert sich das Redoxpotential der Zelle. Ein verändertes Redoxpotential wirkt sich negativ auf die Bildung von Disulfidbrücken aus und kann somit zu einer Fehlfaltung von Proteinen führen (Gotoh und Mori, 2006). In Studien an murinen Herzmuskelzellen konnte dieses Phänomen modelliert werden. Infolge von oxidativem Stress, aktivierten die Zellen den ATF6-Signalweg und wirkten so dem aufkommenden ER-Stress entgegen. Wurden jedoch *Atf6*-defiziente Herzmuskelzellen generiert und diese oxidativem Stress ausgesetzt, kam es infolgedessen zu erhöhtem ER-Stress und einer erhöhten Zelltodrate (Jin et al., 2017; Blackwood et al., 2019).

Auch in Neuronen zeigte die Aktivierung der UPR, speziell die Aktivierung von *ATF6*, eine protektive Wirkung. ER-Stress kann in dopaminergen Neuronen der *Substantia Nigra* durch die Injektion des Neurotoxins MPTP induziert werden. Es handelt sich hierbei um einen Vorläufer eines Inhibitors der mitochondrialen Atmungskette, welcher zu Symptomen ähnlich denen einer frühen Parkinsonerkrankung führen kann. Im Mausmodell induziert die MPTP-Applikation bei dopaminergen Neuronen die Aktivierung zweier unterschiedlicher Arme der UPR, den ATF6- und den PERK-Signalweg, wodurch der Verlust dieser Neuronen verhindert wurde. In dopaminergen Neuronen *Atf6*-defizienter Mäuse wurde nach Applikation des Neurotoxins stattdessen eine erhöhte Degenerationsrate detektiert (Hashida et al., 2012). Diese Experimente zeigen, dass Veränderungen im Redoxpotential, ausgelöst durch die Exposition

toxischer Substanzen, die UPR aktivieren können. Insbesondere in Neuronen stellt die Aktivierung von ATF6 und die damit verbundene Induktion von *pro-survival*-Signalwegen einen relevanten protektiven Mechanismus dar.

Auch metabolische Ungleichgewichte gehören zu den Stimuli, die eine Aktivierung des ATF6-Signalweges zur Folge haben können. In Leberzellen (Hepatozyten) des Zebrafischs kann, durch Exposition mit Alkohol ER-Stress induziert werden. Die daraus resultierende Aktivierung von Atf6 erhöht die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung einer Alkohol-induzierten Fettleber (Steatose) durch Ansammlung von Fetttropfchen in den Leberzellen. Wurde die Atf6-Aktivierung durch Überexpression von aktivem Atf6 simuliert, konnte eine erhöhte Lipogenese-Rate beobachtet werden (Howarth et al., 2014). Vacaru und Kollegen konnten diese Erkenntnisse bestätigen und postulierten, dass eine „akut gestresste“ UPR eine Steatose induzieren kann, während eine bereits an ER-Stress adaptierte UPR die Entstehung einer Steatose unter ER-Stress-Bedingungen verhindern kann (Vacaru et al., 2014).

In seiner Rolle als Schlüsselkomponente der UPR, kann *ATF6* durch unterschiedlichste Stimuli, die die zelluläre Homöostase aus dem Gleichgewicht bringen und ER-Stress induzieren, aktiviert werden oder durch gezielte Überexpression zu einer Verbesserung des metabolischen Gleichgewichts in bestimmten Zellen beitragen. Da *ATF6* ubiquitär exprimiert wird, ist das Spektrum möglicher Aktivierungsstimuli breit gefächert und neben dem Zelltyp auch abhängig von äußeren Einflüssen.

#### 1.2.4. Pharmakologische Induktion der UPR

Neben dem Auftreten von physiologischem ER-Stress, der beispielsweise während der Entwicklung auftritt, kann dieser auch pharmakologisch induziert werden. Zu den meist genutzten Substanzen, die ER-Stress induzieren und die UPR aktivieren, gehören das Nukleosid-Antibiotikum Tunicamycin, das Sesquiterpenlacton Thapsigargin und das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT). Tunicamycin inhibiert Enzyme der für die Protein-Glykosylierung wichtigen UDP-HexNAc: polyprenol-P HexNAc-1-P-Familie. Hierdurch wird die N-Glykosylierung von Proteinen verhindert (Heifetz et al., 1979) und der Ausbildung der Tertiärstruktur entgegengewirkt. Thapsigargin ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor der Sarco/Endoplasmatischen Retikulum- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA). Durch das Binden von Thapsigargin an SERCA kann kein Kalzium mehr in das ER einströmen (Lytton et al., 1991). Dadurch sinkt die luminale Kalziumkonzentration, wodurch Kalzium-abhängige ER-Chaperone (Wada et al., 1991), wie Calnexin, in ihrer Funktion gestört werden und un- oder

fehlgefaltete Proteine im ER akkumulieren. DTT interferiert direkt mit der Faltung von Proteinen, indem es als Reduktionsmittel wirkt und die intramolekularen Disulfidbrücken reduziert (Cleland, 1964). Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Experimente demonstrierten, dass jede der genannten Substanzen die UPR aktivieren kann. Immunoblots mit den Lysaten von mit Tunicamycin- bzw. Thapsigargin-behandelten HeLa-Zellen zeigten erhöhte ATF6- und BiP- Proteinengen sowie eine vermehrte Menge an geschnittenem ATF6 im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Yoshida et al., 1998; Haze et al., 1999). Auch in MEFs und humanen Fibroblasten führt die Behandlung mit Tunicamycin oder Thapsigargin bzw. aller drei Substanzen zu einer Aktivierung der UPR (Wu et al., 2007; Yamamoto et al., 2007; Kohl et al., 2015; Chiang et al., 2017). Obwohl in Zellkulturexperimenten erfolgreich gezeigt werden konnte, dass sowohl Tunicamycin als auch Thapsigargin und DTT zu einer Induktion der UPR führen, gilt dies nicht gleichermaßen für *in vivo* Experimente. Ishikawa und Kollegen berichten beispielsweise, dass eine 24-stündige Inkubation in Thapsigargin in keinem auffälligen Phänotyp in Medaka-Larven resultiert (Ishikawa et al., 2013). Diese Daten zeigen, dass abhängig von der Fragestellung und des Modells darauf geachtet werden muss, welcher ER-Stress-Induktor gewählt wird.

### **1.3. ATF6 und Achromatopsie**

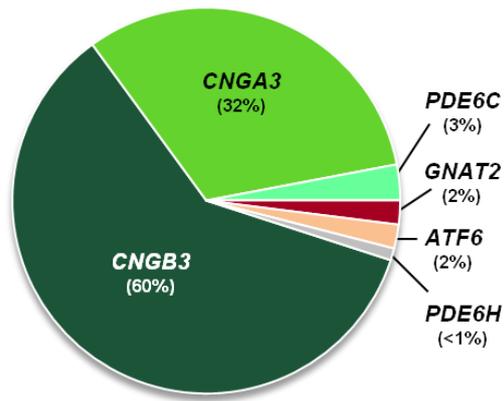
#### **1.3.1. ATF6 als sechstes Gen bei Achromatopsie**

Achromatopsie (ACHM), oder komplette Farbenblindheit, gehört zu den seltenen erblich bedingten, autosomal rezessiven, kongenitalen Netzhauterkrankungen, mit einer Prävalenz von 1:30.000 bis 1:50.000 (Sharpe et al., 1990; Sharpe et al., 1999). ACHM ist auf die Funktionsbeeinträchtigung oder den kompletten (Funktions-)Verlust von Zapfen-Photorezeptoren zurückzuführen. Dementsprechend zeigen Patienten charakteristische Symptome, wie ein fehlendes Farbunterscheidungsvermögen, eine sehr geringe Sehschärfe von  $<0,1$  oder 20/200, eine hohe Blendempfindlichkeit und eine anhaltende Pendelbewegung der Augen, den sogenannten Nystagmus. Die Erkrankung verläuft in Bezug auf ihre Symptome stationär, d.h. die Symptome verschlechtern sich nicht mit zunehmendem Alter der Patienten.

Nichtsdestotrotz konnte mithilfe nicht-invasiver bildgebender Verfahren gezeigt werden, dass im Verlauf der Erkrankung eine fortschreitende Degeneration der zentralen Netzhaut stattfindet (Aboshiha et al., 2014; Genead et al., 2011; Thiadens et al., 2010, Thomas et al., 2011, Thomas et al., 2012). Elektrophysiologische Untersuchungen mittels Elektroretinographie bei ACHM-Patienten zeigen einen kompletten Funktionsverlust der Zapfen-Photorezeptoren.

Lediglich die elektrischen Ströme der Stäbchen-Photorezeptoren sind messbar und meist unverändert (Andreasson und Tornqvist, 1991; Kohl und Hamel, 2013). Anhand der symptomatischen Ausprägung wird zwischen der kompletten und der inkompletten ACHM unterschieden. Patienten mit einer kompletten Farbenblindheit leiden unter den oben genannten und für eine Farbenblindheit charakteristischen Symptomen. Im Vergleich hierzu zeigen Patienten mit einer inkompletten Form der ACHM einen milderen Phänotyp. Sie sind noch in der Lage Farbtöne teilweise zu unterscheiden und weisen teilweise eine bessere Sehschärfe auf (AAPOS, 2015). Auch im Elektroretinogramm (ERG) können bei diesen Patienten zum Teil noch Restantworten der Zapfen-Photorezeptoren gemessen werden.

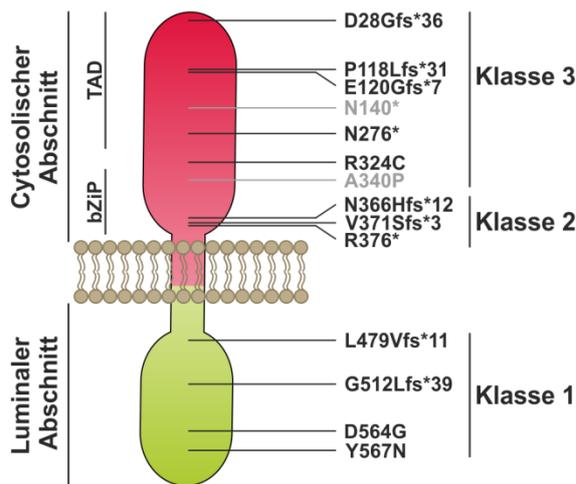
Momentan sind sechs verschiedene Gene bekannt, die mit der Erkrankung der ACHM assoziiert sind (Abb. 3). Die häufigsten Mutationen, die für ca. 60-90 % der Erkrankungsfälle verantwortlich sind, finden sich entweder in *CNGA3* (MIM# 600053, Kohl et al., 1998; Wissinger et al., 2001) oder in *CNGB3* (MIM# 605080, Sundin et al.; 2000; Kohl et al., 2000, Mayer et al., 2017). Beide Gene kodieren für die Untereinheiten des zyklisch Nukleotid-gesteuerten (CNG)-Kanals, der im Zapfen-Außensegment lokalisiert ist. *CNGA3* kodiert hierbei die kanalbildende *CNGA3*-Untereinheit und *CNGB3* kodiert die modulatorische *CNGB3*-Untereinheit des tetrameren Kanals. Weitere Gene, die mit ACHM assoziiert sind, sind *GNAT2* (MIM# 139340, Kohl et al., 2002; Aligianis et al., 2002), welches für die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins Transducin im Zapfen-Außensegment kodiert, sowie *PDE6C* (MIM# 600827, Thiadens et al., 2009; Chang et al., 2009) und *PDE6H* (MIM# 601190, Kohl et al., 2012), die jeweils die katalytische  $\alpha$ - bzw. die inhibitorische  $\gamma$ -Untereinheit der zapfenspezifischen Phosphodiesterase kodieren. All diese Gene bzw. Genprodukte stellen wichtige Komponenten der zapfenspezifischen Phototransduktionskaskade. Dieser auch Sehkaskade genannte Mechanismus wandelt ein Lichtsignal in ein elektrisches Signal um, welches im Anschluss an das Gehirn weitergeleitet wird.



**Abbildung 3: Spektrum der ACHM-assozierten Gene.** Fünf der bislang sechs bekannten ACHM-assozierten Krankheitsgene kodieren für Komponenten der Phototransduktionskaskade.

Am häufigsten sind Mutationen in *CNGB3* und *CNGA3* (60 % bzw. 32 %), gefolgt von Mutationen in *PDE6C*, *GNAT2* und *ATF6* (3 % bzw. 2 %). Mit einer Häufigkeit von unter 1 % gehören Mutationen in *PDE6H* zur Minderheit.

Im Gegensatz hierzu steht *ATF6* als einer der ER-Stress-Sensoren der UPR. Verschiedene unabhängige Studien konnten zeigen, dass Mutationen in *ATF6* zu retinalen Erkrankungen wie Achromatopsie oder einer Zapfen-Stäbchen-Dystrophie führen (Ansar et al., 2015; Kohl et al., 2015; Skorczyk-Werner et al., 2017). Ähnlich wie bei *PDE6C* und *GNAT2* gehören Mutationen in *ATF6* mit einer Häufigkeit von 2-3 % zu den selteneren ACHM-verursachenden Mutationen. Diese sind jedoch nicht so selten wie Mutationen im *PDE6H*-Gen, in welchem bisher nur eine bestimmte *nonsense*-Mutation in drei unabhängigen Familien beschrieben wurde (Kohl et al., 2012; Pedurupillary et al. 2016). Das Spektrum der bislang bekannten und mit retinalen Erkrankungen in Zusammenhang gebrachten 14 *ATF6*-Mutationen umfasst Punktmutationen, *nonsense*- und *missense*- Mutationen aber auch Spleißmutationen. Chiang und Kollegen schlugen vor, 12 der bislang in *ATF6* publizierten und mit retinalen Erkrankungen assoziierten Mutationen anhand ihrer Funktion im heterologen *in vitro* Expressionssystem in drei Klassen einzuteilen (Chiang et al., 2017; Abb. 4). Klasse 1 bilden die Mutationen, bei denen eine intakte luminale Domäne gebildet werden kann, der Transport von *ATF6* in den Golgi-Apparat und folglich die transkriptionelle Aktivität von *ATF6* aber beeinträchtigt wird. Mutationen der Klasse 2 resultieren in einer konstitutiven transkriptionellen Aktivität von *ATF6* und induzieren so die Transkription von UPR-Genen auch ohne vorliegenden ER-Stress. Mutationen der Klasse 3 führen zu einem kompletten Verlust der transkriptionellen Aktivität von *ATF6*, da sie die Transaktivierungs- und bZip-Domäne zerstören (Chiang et al., 2017).



**Abbildung 4: Funktionelle Klassifikation der ACHM-assoziierten ATF6-Mutationen.** Schwarz: Von Chiang und Kollegen klassifizierte Mutationen. Grau: Weitere Mutationen, die anhand der Kriterien von Chiang und Kollegen klassifiziert wurden. TAD: Transaktivierungsdomäne, bZIP: basische Leucin-Zipper-Domäne (verändert nach Chiang et al., 2017).

In einem Großteil der Patienten mit Mutationen in *ATF6* wurde Achromatopsie diagnostiziert. Es sind jedoch einzelne Fälle mit frühkindlicher Zapfen-(Stäbchen-)Dystrophie sowie früher, klinisch nicht weiter spezifizierter Photorezeptordegeneration beschrieben (Kohl et al., 2015; Xu et al., 2015; Skorczyk-Werner et al., 2017). Patienten mit einer *ATF6*-assoziierten ACHM zeigen neben den für eine ACHM charakteristischen Merkmalen, wie Nystagmus, geringer Visus und Photophobie, sowie einer reduzierten bzw. fehlenden photopischen ERG-Antwort (Ansar et al., 2015; Kohl et al., 2015) zusätzliche morphologische Auffälligkeiten in der Netzhautstruktur. Genau wie bei Patienten mit ACHM, welche durch Mutationen in den Phototransduktion-Proteinen verursacht werden, zeigen sie funduskopisch kleine, definierte ovale RPE-Defekte. In der Fundusautofluoreszenz sind Defekte als parafoveale hyperfluoreszierende Bereiche in den jungen Patienten zu sehen, und in älteren Patienten hypofluoreszierende Punkte, welche von einem Ring mit erhöhter Autofluoreszenz umgeben sind. Mittels spektraler optischer Kohärenz-Spektroskopie (SD-OCT) zeigte sich ein Verlust der inneren und äußeren Segmente des Zapfens mit einer Unterbrechung der Zilienschicht und einer Zerstörung der RPE-Schicht im Bereich der Fovea. Alle Patienten wiesen eine fast fehlende Fovea-Grube (foveale Hypoplasie) auf, was für die durch *ATF6*-Mutationen verursachte Netzhauterkrankung als charakteristisch angesehen werden kann. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass dies auch bei den anderen ACHM-Formen beobachtet werden kann (Kohl et al., 2015; Xu et al., 2015; Skorczyk-Werner et al., 2017). Neuste Untersuchungen mittels *adaptive optics split detection* deuten darauf hin, dass bei den *ATF6*-Achromaten keinerlei Zapfen-Photorezeptoren in der Fovea und der Parafovea vorhanden sind (Mastey et al., Arvo Abstract Nr. 669-C0227, 2018).

### 1.3.2. ATF6-Tiermodelle

Bislang sind drei unterschiedliche Tiermodelle mit Mutationen in *ATF6* beschrieben worden: zwei Mauslinien mit verschiedenen Deletionen in *Atf6* (Wu et al., 2007; Yamamoto et al., 2007) sowie ein *atf6*<sup>-/-</sup>-Medaka-Fischmodell (Ishikawa et al., 2013).

Der *atf6*-knockout im Medaka-Modell ist durch eine Stop-Mutation in *atf6* bedingt, wodurch kein funktionelles Atf6-Protein gebildet wird. *atf6*<sup>-/-</sup>-Medakas zeigen keinen auffälligen Phänotyp unter physiologischen Bedingungen. Untersuchungen an *atf6*<sup>-/-</sup>-, *atf6β*<sup>-/-</sup>- und *atf6*<sup>-/-</sup>; *atf6β*<sup>-/-</sup>-Doppel-knockout-Medakas, die alle EGFP unter dem *bip*-Promotor exprimieren, zeigten eine konstitutive EGFP-Expression während der Entwicklung, was auf intrinsischen Zellstress zu diesem Zeitraum hindeutet. Ferner konnte auch gezeigt werden, dass bei *atf6*<sup>-/-</sup>-Medakas eine Störung der Induktion der *bip*-Transkription vorliegt. Zusammen mit der weiteren Erkenntnis, dass die *bip*-Transkription in *atf6*<sup>-/-</sup>-Medakas während der Entwicklung anteilig auch von *atf6β* induziert werden kann, zeigt diese Studie, dass *atf6* den Hauptaktivator der *bip*-Transkription darstellt, *atf6β* die Rolle von *atf6* unter physiologischem ER-Stress aber anteilig kompensieren kann. Dies gilt jedoch nur für physiologischen nicht für pharmakologisch induzierten ER-Stress. *atf6*<sup>-/-</sup>; *atf6β*<sup>+/-</sup>-Medakas zeigten nach der Behandlung mit Tunicamycin keine erhöhte EGFP-Expression. Weitere Untersuchungen zeigen, dass eine Inaktivierung von *bip* zu einem embryonal letalen Phänotyp führt, und gleichzeitig dass *bip* an der frühen Embryonalentwicklung beteiligt ist. Diese Tatsache erklärt auch, warum ein Doppel-knockout von *atf6* und *atf6β* sowohl in Mäusen, als auch im Medaka bereits in frühen Entwicklungsstadien letal ist (Wu et al., 2007; Yamamoto et al., 2007; Ishikawa et al., 2013). Dass *bip* eine wichtige Komponente zur Kompensation von intrinsischem Zell-Stress darstellt, zeigen weitere Analysen zur Entwicklung des Notochords in *atf6*<sup>-/-</sup>; *atf6β*<sup>-/-</sup>-Doppel-knockout-Medakas. Während der Entwicklung des Notochords werden extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen und Laminin sekretiert, wodurch das intrinsische ER-Stress-Niveau ansteigt (Lamandé und Bateman, 1999). Die fehlende *bip*-Induktion resultiert in *atf6*<sup>-/-</sup>; *atf6β*<sup>-/-</sup>-Doppel-knockout-Medakas daher in einer Fehlentwicklung bzw. Verkürzung des Notochords. Experimente, in denen *bip* mRNA in Oozyten der *atf6*<sup>-/-</sup>; *atf6β*<sup>-/-</sup>-Doppel-knockout-Medakas injiziert wurde, führen zu einem *Rescue* dieses Phänotyps, d.h. Verlängerung des Notochords (Ishikawa et al., 2013). Insgesamt veranschaulichen die Untersuchungen in den verschiedenen *knockout*-Medaka den Zusammenhang zwischen *atf6*, *atf6β* und *bip*, und verdeutlichen, dass nicht das Fehlen von *atf6* oder *atf6β* selbst, sondern der Verlust des Zielgens *bip* zu pathologischen Veränderungen führt. Visuelle Untersuchungen wurden an diesem Tiermodell nicht durchgeführt.

Die Generierung des Mausmodells von Wu und Kollegen erfolgte über die Deletion von Exon 4, wodurch ein *frameshift* mit vorzeitigem Stop-Codon induziert wurde und wichtige funktionelle Proteindomänen in ATF6 wie die bZIP-Domäne, die Transmembrandomäne, die BiP-Bindedomäne sowie beide GLS fehlen (Wu et al., 2007). Die Generierung des zweiten beschriebenen Mausmodells erfolgte über die Deletion der Exons 8 und 9, wodurch ATF6 hier ebenfalls durch den Verlust des Leucin-Zippers und der Transmembrandomäne jegliche Funktionalität verliert (Yamamoto et al., 2007). Beide Mausmodelle zeigten in ihrer Entwicklung keinerlei Auffälligkeiten. Im Vergleich zum Medaka wurden hier jedoch Experimente zur visuellen Funktion durchgeführt. Elektrophysiologische und histologische Untersuchungen der Retina zeigten eine spät beginnende altersabhängige Degeneration der Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren für das von Wu und Kollegen generierte Mausmodell (Kohl et al., 2015). Im Gegensatz hierzu zeigte das von Yamamoto und Kollegen generierte Modell lediglich altersabhängige epi- und subretinale Ablagerungen. Die Funktion der Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren war auch im fortgeschrittenen Alter von 15 Monaten nicht beeinträchtigt (unpublizierte Daten). Vergleicht man diese Ergebnisse mit dem humanen Phänotyp, ist keine Korrelation zu erkennen. Der Funktionsverlust der Photorezeptoren ist bei den Patienten auf die Zapfen beschränkt und schon in jungen Patienten nachweisbar. Ebenso sind morphologische Veränderungen in der Photorezeptorschicht im OCT bei Patienten im Kindesalter (9 Jahre) zu erkennen. Patienten zeigen demzufolge einen kongenitalen, reinen Zapfen-Phänotyp, während das Mausmodell einen altersabhängigen Phänotyp zeigt, bei dem Zapfen und Stäbchen gleichermaßen betroffen sind.

## **1.4. Der Zebrafisch als Tiermodell erblicher retinaler Erkrankungen**

### **1.4.1. Der Aufbau der Retina: Die Zebrafischretina im Vergleich zur humanen Retina**

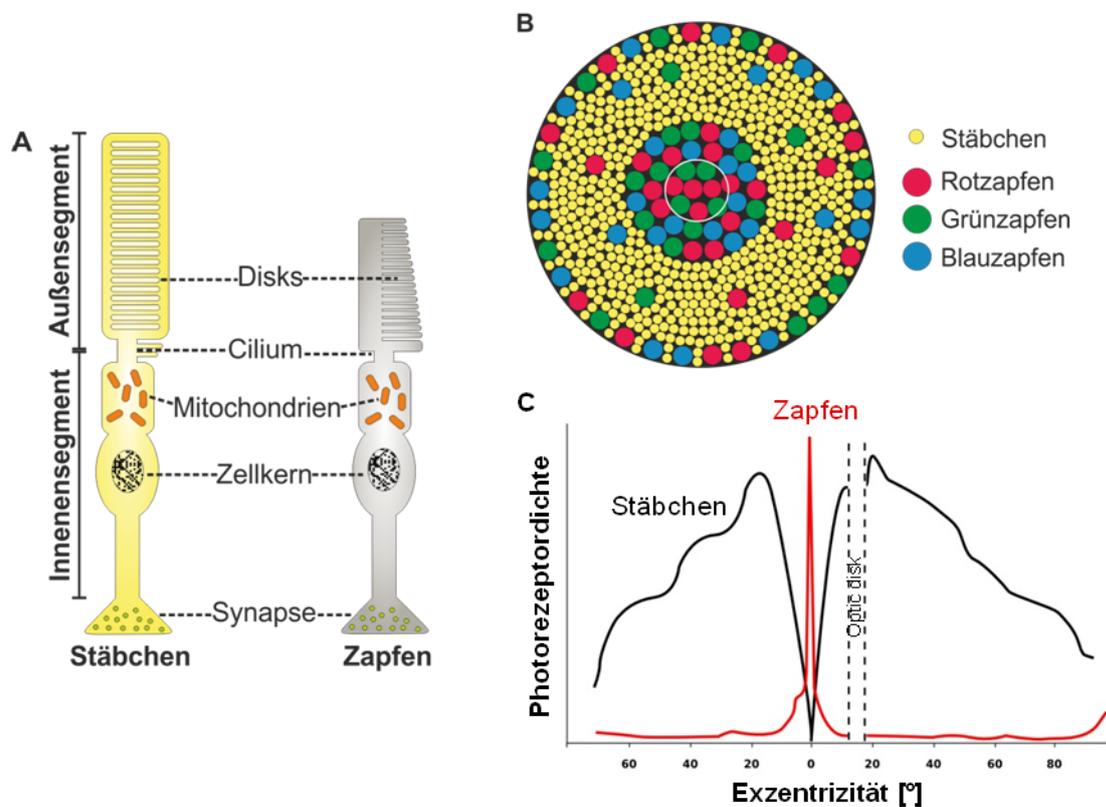
Die Retina von Vertebraten weist nach vollständiger Entwicklung eine gleichmäßige, schichtenartige Organisation der unterschiedlichen Zell- und Neuronenpopulationen auf (Wässle und Riemann, 1978). Sie besteht hauptsächlich aus sieben unterschiedlichen Zellarten. Die äußerste, lichtabgewandte – in Richtung der Sklera liegende – Schicht wird von den Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren gebildet, die für die Detektion der einfallenden Photonen und deren Umwandlung in ein elektrisches Signal zuständig sind. Ihre Außensegmente stehen mit dem retinalen Pigmentepithel (RPE) in Kontakt. Die Kerne der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht (*outer nuclear layer*, ONL). Die innerste, in Richtung des Vitreus

gelegene Schicht, die retinale Ganglienzellschicht (*retinal ganglion cell layer, GCL*), wird von den Ganglienzellen gebildet. Ihre Axone bilden gebündelt den optischen Nerv und sind daher der einzige Zelltyp der mit dem Gehirn, bei Säugetieren mit dem *Superior colliculus* und bei Fischen und Amphibien hauptsächlich mit dem optischen *Tectum*, verbunden sind (Livesey und Cepko, 2001; Burrill und Easter, 1994). Die Photorezeptoren und die Ganglienzellen sind mittels Bipolarzellen miteinander verbunden. Die mittlere Schicht, die innere Körnerschicht (*inner nuclear layer, INL*) wird von den Kernen der Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen gebildet. Diese Schicht wird nach oben hin durch die äußere Synapsenschicht (*outer plexiform layer, OPL*), in der Horizontal- und Bipolarzellen synaptische Kontakte mit den Photorezeptoren ausbilden, begrenzt. Zwischen der mittleren Körnerschicht und dem GCL befindet sich die innere Synapsenschicht (*inner plexiform layer, IPL*), in der Bipolar-, und Amakrinzellen Synapsen mit den Ganglienzellen ausbilden.

Den siebten Zelltyp bilden die retinalen Gliazellen, auch Müller-Gliazellen genannt. Ihre Zellkörper befinden sich im INL, sie reichen durch ihre langgestreckte Form vom GCL bis in den ONL. Da sie das gesamte retinale Epithel durchspannen, sind sie wichtige Nährstofflieferanten für die angrenzenden Zellen und halten die Zellhomöostase aufrecht (Bringmann et al., 2006; Reichenbach und Bringmann, 2013). Zudem werden Müller-Gliazellen von der Retina auch als optische Fasern genutzt, indem sie einfallende Photonen zu den Photorezeptoren leiten (Franze et al., 2007). Eine weitere wichtige Eigenschaft der Müller-Gliazellen ist ihre Reaktion auf Verletzungen. Liegen retinale Läsionen vor, reagieren Müller-Gliazellen indem sie sich vergrößern und die Expression des *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), welches den Hauptbestandteil der Intermediärfilamente von Gliazellen darstellt, erhöhen (Thomas et al., 2016). Zeitgleich erfolgt eine zelluläre Reprogrammierung der Müller-Gliazellen, wodurch diese die Eigenschaften von retinalen Stammzellen annehmen und zur Regeneration retinaler Zellen beitragen können (Ramachandran et al., 2010; Powell et al., 2013).

Obwohl die retinalen Zelltypen und der Aufbau der Retina vergleichbar zwischen unterschiedlichen Vertebraten ist, zeigen sich dennoch deutliche Unterschiede in Bezug auf die Anordnung und Verteilung der Photorezeptortypen bei unterschiedlichen Spezies. Der Mensch besitzt als Trichromat drei unterschiedliche Zapfentypen, welche sich in der Expression ihres lichtsensitiven Opsins unterscheiden (S-Opsin: blau, kurzwellig, ~430 nm; M-Opsin: grün, mittelwellig, ~530 nm; L-Opsin: gelbgrün, langwellig, ~560 nm; Müller und Knaupp, 1998; Solomon und Lennie, 2007). Sie sind für das Sehen bei Tageslicht zuständig. Die Stäbchen-Photorezeptoren sind für das Sehen im Dämmerlicht oder bei Nacht verantwortlich. Das Photopigment der Stäbchen ist Rhodopsin, welches ein Absorptionsmaximum von

~500 nm aufweist (Müller und Kaupp, 1998). Die humane Retina enthält etwa 110-120 Millionen Stäbchen und ca. 6,4 Millionen Zapfen (Osterberg, 1935).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Photorezeptor-Typen und deren Anordnung in der humanen Retina. (A)** Aufbau der Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren. **(B)** Anordnung der Photorezeptoren in der humanen Retina. Größenverhältnisse in der Abbildung sind nicht realitätsgetreu. Der weiße Ring markiert die Foveola. **(C)** Verteilung der Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren in der Retina (verändert nach Osterberg, 1935; Viets et al., 2016).

Die Verteilung der Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren ist nicht gleichmäßig in der humanen Retina. In der Fovea centralis, der Stelle des schärfsten Sehens sind nur Zapfen-Photorezeptoren lokalisiert. Die Mitte der Fovea, die Foveola, wird nur durch Rot- und Grünzapfen bestimmt. Außerhalb der Fovea, d.h. in der Peripherie der Retina sind hauptsächlich Stäbchen-Photorezeptoren lokalisiert; im Vergleich zur Fovea ist die Anzahl an Rot-, Grün- und Blauzapfen hier deutlich reduziert (Williams, 1991; Hendrickson, 1992; Hofer et al., 2005, Abb. 5).

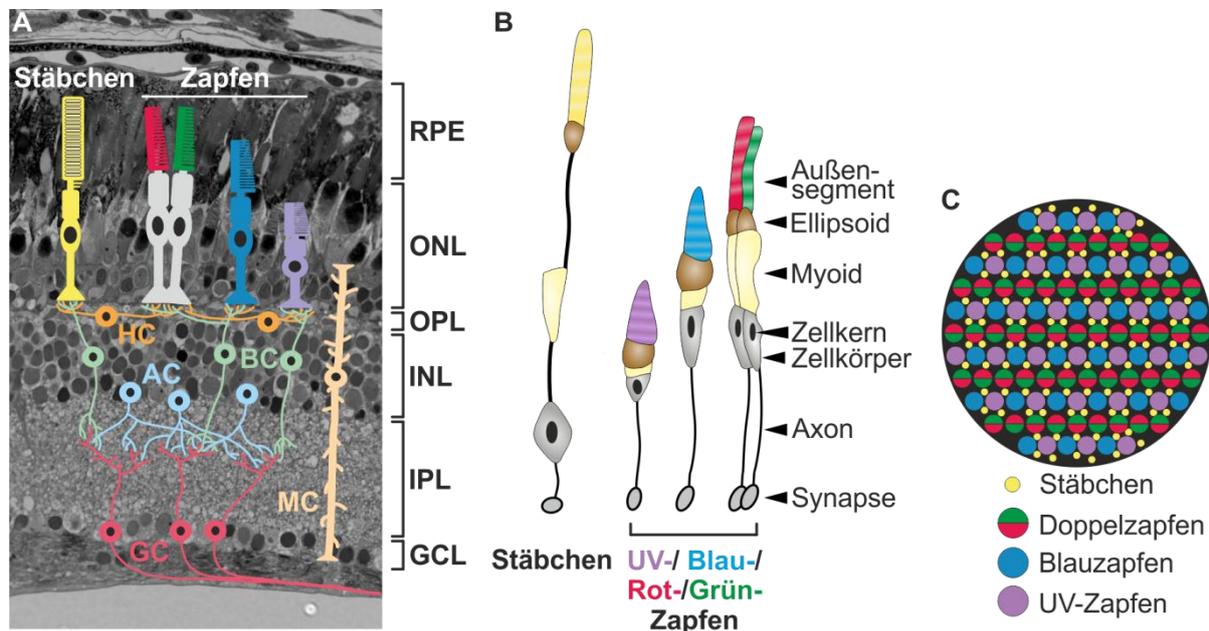
Dementsprechend resultiert der Verlust von Zapfen-Photorezeptoren bzw. deren Funktion beim Menschen in Farbfehlsichtigkeit oder Blindheit, Blendempfindlichkeit, einer geringen Sehschärfe und einem Nystagmus. Letzteres basiert auf dem Fehlen der Zapfen-Photorezeptoren in der zentralen Retina wodurch das Fokussieren beeinträchtigt ist.

Die Retina des Zebrafischs ist eine zapfenreiche Retina. Die Zapfen sind hier relativ groß und mosaikförmig angeordnet, weshalb sich der Zebrafisch als sehr geeignetes Tiermodell für zapfenbasierte retinale Erkrankungen darstellt. Das Mosaik der Fischretina wird aus vier unterschiedlichen Zapfen-Subtypen gebildet, die präzise zueinander angeordnet sind (Brancheck und Bremiller, 1984). Im Mosaik alternieren jeweils eine Reihe bestehend aus Blau- und UV-Zapfen mit einer Reihe in ihrer Orientierung abwechselnden Doppelzapfen, welche aus Rot- und Grünzapfen bestehen. Somit besitzt die adulte Zebrafischretina doppelt so viele Rot- und Grünzapfen, wie Blau- und UV-Zapfen (Raymond und Barthel., 2004; Allison et al., 2010). Die Stäbchen-Photorezeptoren sind dabei gleichmäßig und regelmäßig über die gesamte Zebrafischretina zwischen den Zapfen verteilt. Vier Stäbchen-Photorezeptoren umgeben hierbei immer einen UV-Zapfen (Larison und Bremiller, 1990; Raymond et al., 1995; Schmitt und Dowling, 1996; Fadool, 2003, Abb. 6). Frühere Studien konnten zeigen, dass die Verschaltung der sich entwickelnden Photorezeptoren untereinander eine bedeutende Rolle bei der Formierung des spezifischen Musters in der Zebrafischretina spielt (Raymond et al., 1995; Schmitt und Dowling, 1996).

Der Fisch ist im Gegensatz zum Menschen ein Tetrachromat. Neben den Stäbchen-Photorezeptoren, die für bewegungsabhängiges Sehen verantwortlich sind, existieren die vier unterschiedlichen Zapfensubtypen, die jeweils verschiedene Opsin-Typen mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima exprimieren. Das Zebrafischgenom weist aufgrund der Genomduplikation während der Entwicklung der Teleostei sowie weiterer Genduplikationen insgesamt neun Gene auf, die für die Expression der unterschiedlichen Opsine mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima verantwortlich sind. Zwei Gene kodieren für die Rot-Opsine (*LWS-1* und *LWS-2*;  $\lambda_{\max}$  558 nm bzw.  $\lambda_{\max}$  548 nm) und vier Gene kodieren die unterschiedlichen Grün-Opsine (*RH2-1*, *RH2-2*; *RH2-3* und *RH2-4*;  $\lambda_{\max}$  467 nm,  $\lambda_{\max}$  476 nm,  $\lambda_{\max}$  488 nm bzw.  $\lambda_{\max}$  505 nm). Das Blau-Opsin (*SWS2*;  $\lambda_{\max}$  416 nm) und das UV-Opsin (*SWS1*;  $\lambda_{\max}$  355 nm) werden jeweils nur von einem einzigen Gen kodiert (Chinen et al., 2003). Das neunte Opsin kodiert für das Stäbchenopsin Rhodopsin, dass ebenfalls nur von einem einzigen Gen (*RH1*;  $\lambda_{\max}$  501 nm) kodiert wird (Hamaoka et al., 2002; Chinen et al., 2003).

Die Expression der unterschiedlichen Rot- und Grün-Opsin-Subtypen folgt bei der Entwicklung einem räumlichen und zeitlichen Muster. Während der Entwicklung geht die Expression der jeweiligen kurzwelligen Subtypen des Rot- und Grün-Opsins der Expression der langwelligeren Subtypen voran. In der adulten Zebrafischretina befinden sich die langwelligen Zap-

fen-Subtypen im ventralen und peripheren Bereich, während die kurzwelligeren Subtypen im dorsalen und zentralen Bereich angesiedelt sind (Takechi und Kawamura, 2005).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Photorezeptortypen in der Zebrafischretina.** (A) Schema der Interaktionen der einzelnen retinalen Zellen miteinander und Lokalisation in den verschiedenen retinalen Schichten. Hintergrund bildet ein Semidünnschnitt einer 5 days post fertilization (dpf) alten Zebrafischretina. (B) Aufbau der unterschiedlichen Photorezeptoren. (C) Anordnung der unterschiedlichen Photorezeptortypen in der Zebrafischretina im gleichmäßig geordneten Mosaik. Größenverhältnisse in der Abbildung sind nicht realitätsgetreu (Modifiziert nach Lagman et al., 2015; Viets et al., 2016).

Ferner ist die zentripetale Position der Photorezeptor-Subtypen präzise definiert. Während sich die Außensegmente und Ellipsoide der Stäbchen ganz außen in der zur Sklera gewandten Region befinden, folgen in Richtung des Vitreus zunächst die Außensegmente und Ellipsoide der Doppelzapfen, daran angeschlossen die der Blau- und als letztes die der UV-Zapfen (Branchek und Bremiller, 1984, Abb. 6). So können die einzelnen Photorezeptortypen in der Zebrafischretina nicht nur anhand ihrer Morphologie, sondern auch anhand ihrer Position in der Retina bestimmt werden.

#### 1.4.2. Die Entwicklung der Zebrafischretina

Die ersten Teile des Auges entwickeln sich bei den Larven schon nach ca. 11,5 hours post fertilization (hpf) und bereits mit 24 hpf hat sich der Augenbecher vollständig ausgebildet. In den nächsten 12 h durchläuft die Retina eine Phase der schnellen Proliferation. Zwischen 32 hpf und 34 hpf bilden sich die ersten Axone der retinalen Ganglienzellen aus (Schmitt und Dowling, 1999).

Die Entwicklung der Zebrafischretina erfolgt in charakteristischen Wellen und ist kein gleichmäßig ablaufender Prozess (Raymond et al., 1995; Schmitt und Dowling, 1999). Die ersten Photorezeptoren entwickeln und differenzieren sich bereits im Alter von 50 hpf in einer bestimmten Region der ventralen Retina, auch *ventral patch* genannt. In diesem Bereich können im Alter von 50-55 hpf ebenfalls die ersten Außensegmente sowohl von Stäbchen als auch Rot- und Blauzapfen detektiert werden (Kljavin, 1987; Raymond et al., 1995; Schmitt und Dowling, 1999, Easter und Malicki, 2002).

Die Entwicklung der Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren breitet sich dann bis zum Alter von 84 hpf gleichmäßig von ventral zu dorsal und von nasal zu temporal über die gesamte Retina aus (Raymond et al., 1995; Schmitt und Dowling, 1999). Das Entwicklungsmuster der Zapfen lässt sich bildlich mit dem Öffnen eines Fächers vergleichen und wird daher auch als Fächergradient bezeichnet (Easter und Malicki, 2002). Hierbei entwickeln sich zuerst die UV-Zapfen, gefolgt von den Blau- und den Rot-/Grün-Doppelzapfen (Raymond et al., 1995; Robinson et al., 1993; Schmitt und Dowling 1999). Interessanterweise folgt die Expression der unterschiedlichen Opsine dem umgekehrten Muster, sodass die Expression des Rot-Opsins der des Blau-Opsins vorausgeht (Raymond et al., 2004). Die Stäbchen entwickeln sich unabhängig und in einem eher ungeordneten Muster über die gesamte Retina (Raymond, 1985; Raymond et al., 1995). Sie differenzieren sich aus proliferierenden Vorläuferzellen im INL, die anschließend entlang der Fasern der Müller-Gliazellen bis zum ONL migrieren (Raymond et al., 1986). Im Alter von 60 hpf bilden sich erste synaptische Kontakte zwischen den Photorezeptoren und den Zellen des INLs aus. Außerdem ist zu diesem Zeitpunkt ein Großteil der für die Retina typischen Schichtung aus GCL, IPL, INL, OPL und ONL bereits vorhanden (Kljavin, 1987; Schmitt und Dowling, 1999). Mit 72 hpf sind alle synaptischen Signalwege der Zebrafischretina vollständig ausgebildet und auch die Laminierung der einzelnen retinalen Schichten ist abgeschlossen (Schmitt und Dowling, 1999). Die Differenzierung und Entwicklung der Retina in diesen frühen Stadien erfolgt in drei aufeinanderfolgenden Wellen, die sich geordnet durch die drei retinalen Schichten, beginnend bei den Ganglienzellen über den INL bis zur Photorezeptorschicht ziehen und hier die jeweiligen Zelltypen bilden (Schmitt und Dowling, 1996; Hu und Easter, 1999; Schmitt und Dowling, 1999; Easter und Malicki, 2002). Sie folgt dabei einem Gradienten, der sich von der inneren zur äußeren Retina und vom Zentrum in die Peripherie bewegt (Easter et al., 2000).

Im Alter von 12 dpf können zum ersten Mal alle vier Photorezeptor-Typen morphologisch voneinander unterschieden werden (Branchek und Bremiller, 1984). Zapfen-Photorezeptoren sind ab einem Alter von 15 dpf und Stäbchen-Photorezeptoren mit etwa 20 dpf vollständig

ausgereift. (Branchek und Bremiller, 1984; Raymond et al., 1995; Saszik et al., 1999; Bilotta et al., 2001; Hitchcock und Raymond, 2004). Im Alter von 24 dpf wird die Retina als adult angesehen (Branchek und Bremiller, 1984). Der optokinetische Reflex kann das erste Mal nach 73 hpf detektiert werden und stabilisiert sich mit zunehmendem Alter (Brockhoff et al., 1995; Easter und Nicola, 1996). Bereits nach 5 dpf können erste elektrophysiologische Antworten der Zapfen-Photorezeptoren in der Retina detektiert werden (Neuhauss, 2010).

Im Alter von 5 dpf liegen alle vier Zapfen-Typen über die gesamte Retina in heterogenen Mosaiken verteilt vor, jedoch noch ohne die in adulten Tieren ausgeprägte reihenförmige Anordnung. Außerdem variieren sie in ihrer Dichte in den unterschiedlichen retinalen Regionen (Allison et al., 2010; Zimmermann et al., 2018). Während die Grün- und Blauzapfen eine recht homogene Verteilung über die gesamte Fläche der Retina zeigen, treten Rotzapfen verstärkt im nasal-dorsalen sowie im temporo-dorsalen Bereich auf. Dies ermöglicht den Larven das chromatische Sehen im unteren Sichtfeld bzw. unterhalb der Wasseroberfläche (Zimmermann et al., 2018). Die UV-Zapfen liegen besonders dicht gepackt im temporo-ventralen Bereich der Larvenretina vor. Im Vergleich zu den Zapfen sind die Stäbchen-Photorezeptoren hauptsächlich in den dorsalen und ventralen Bereichen der Larvenretina lokalisiert. Nach Abschluss der Entwicklung spiegelt die adulte Retina in der Anordnung der Photorezeptoren das in Abschnitt 1.4.1 beschriebene Mosaik wieder, wobei die Dichte der Photorezeptoren im zentralen Bereich jedoch erhöht ist (Fu et al., 2018).

Die Retina des Zebrafisches wächst ein Leben lang. Die retinale Neurogenese in der Vertebratenretina findet hauptsächlich in der *ciliary marginal zone* (CMZ) statt, die sich an den peripheren Enden der Retina befindet. Von hier aus werden der Retina immer neue Zellen hinzugefügt (Johns, 1977; Straznicky und Gaze, 1971). Die CMZ besteht aus zwei unterschiedlichen proliferierenden Zelltypen: der erste Zelltyp, die retinalen Stammzellen (*retinal stem cells*, RSCs), verbleiben im Kontakt mit der CMZ während sich der zweite Zelltyp, die retinalen Vorläuferzellen (*retinal progenitor cells*, RPCs) differenzieren und den Kontakt mit der CMZ verliert (Wetts et al., 1989). Auch die Expressionsprofile verschiedener Transkriptionsfaktoren oder Signalmoleküle unterscheiden sich zwischen den Zonen der CMZ. Die Expression der Gene, die in frühen Stadien der Retinogenese exprimiert werden, erfolgt in den peripheren Regionen der CMZ, während die Expression von Genen, die zu späteren Zeitpunkten in der Retinogenese exprimiert werden, in den zentralen Bereichen der CMZ stattfindet (Harris und Perron, 1998; Raymond et al., 2006). Damit spiegelt die CMZ in ihrer räumlichen Anordnung die zeitliche Embryonalentwicklung der Retina wieder (Harris und Perron, 1998).

## 1.5. Wissenschaftliche Zielsetzungen

*ATF6* wurde als sechstes Gen für ACHM identifiziert. Im Gegensatz zu allen anderen bisher bekannten mit ACHM assoziierten Genen, kodiert *ATF6* nicht für eine Komponente der Zapfen-Phototransduktionskaskade sondern stellt ein Schlüsselprotein der UPR dar. Da es daher zu den ubiquitär exprimierten Genen gehört, ist es verwunderlich, dass Patienten, die Mutationen in *ATF6* tragen einen reinen und ausschließlichen Zapfen-Photorezeptor-Phänotyp zeigen. Funktionelle und histologische Untersuchungen an *Atf6-knockout*-Mausmodellen hatten gezeigt, dass die Maus kein geeignetes Model für die Untersuchung des Pathomechanismus der *ATF6*-assoziierten ACHM darstellt. Diese Dissertation soll zur Aufklärung des Pathomechanismus der *ATF6*-assoziierten ACHM anhand der Untersuchung eines *atf6-knockout*-Zebrafischmodells beitragen.

### 1. Zielsetzung: Lokalisation von *atf6* in der Zebrafischretina

Da bislang nicht bekannt ist, welche retinalen Zellen *atf6* exprimieren, sollte die Lokalisation und Expression von *atf6* in der WT-Zebrafischretina bestimmt werden. Aufgrund der Tatsache, dass kein spezifischer Antikörper gegen *Atf6* verfügbar war bzw. erworben werden konnte, wurde die Lokalisation auf Transkript-Ebene mittels *In-situ*-Hybridisierungen (ISH) an Zebrafischlarven sowie an adulten Zebrafischretinae durchgeführt.

### 2. Zielsetzung: Generierung eines TALEN-vermittelten *atf6-knockout*-Zebrafischmodells

Da die vorherige Charakterisierung zwei unterschiedlicher *Atf6-knockout*-Mausmodelle keine Anhaltspunkte auf den Pathomechanismus der *ATF6*-assoziierten ACHM ergab, sollte ein *atf6-knockout*-Zebrafischmodell mithilfe der *Transcription Activator-like Effector Nuclease* (TALEN)-Technologie generiert werden. Der Zebrafisch gilt aufgrund seiner zapfendominierten Retina als ideales Modell zur Untersuchung zapfenbasierter Erkrankungen.

### 3. Zielsetzung: Die Auswirkung des Fehlens von *Atf6* auf die Entwicklung, Morphologie und Funktionalität der Zebrafischretina

Um zu überprüfen welche Auswirkungen das Fehlen von *Atf6* auf die Entwicklung und Morphologie der Retina und der einzelnen Zelltypen der Zebrafischretina hat, sollten histologische Schnitte in unterschiedlichen Larvenstadien und adulten Zebrafischretinae von WT- und *atf6-knockout*-Tieren angefertigt und mittels immunhistologischer Färbungen untersucht wer-

den. Die Funktion der Retina sollte mithilfe von ERG-Messungen an 5 dpf WT- und *atf6*-*knockout*-Larven ermittelt werden.

#### **4. Zielsetzung: Die Auswirkung des Fehlens von *atf6* auf die Expression anderer UPR-Komponenten**

Es sollten qRT-PCR-Experimente durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob das Fehlen von *atf6* einen Einfluss auf die Expression anderer UPR-Komponenten hat. Hierzu sollten nicht nur die Zielgene von *atf6* untersucht werden, sondern ebenfalls die Expression der anderen ER-Stress-Antwort-Komponenten der beiden anderen UPR-Signalwege (IRE1 und PERK) analysiert werden. Die Untersuchungen sollten sowohl im Larvalstadium im Alter von 5 dpf als auch im adulten Alter durchgeführt werden.

#### **5. Zielsetzung: Die Auswirkung von pharmakologisch induziertem ER-Stress mittels Tunicamycin auf die retinale Entwicklung**

Um zu überprüfen, ob erhöhter ER-Stress zu einer Änderung des retinalen Phänotyps bzw. ob insbesondere bei *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven eine pharmakologische Induktion von ER-Stress den retinalen Phänotyp verstärkt, sollten sowohl WT- als auch *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven mit dem ER-Stress-Induktor Tunicamycin behandelt und anschließend histologisch untersucht werden. Ob die Behandlung mit Tunicamycin zur erfolgreichen Aktivierung der verschiedenen UPR-Signalwege führt, sollte zudem mittels qRT-PCR-Experimenten überprüft werden.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
ApoTome.2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Axio Imager.Z2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Blockthermostat	Gebr. Liebisch GmbH & Co.KG Labortechnik, Bielefeld, Deutschland
CMOS Farbkamera SC100	Olympus Europa SE & Co.KG, Hamburg, Deutschland
Drucker für Gelbilder (Model P95)	Mitsubishi Electric Corporation, Tokyo, Japan
Eisbereiter MF36 mit Eisspeicher B393	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA
FemtoJet Mikroinjektor	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filmentwicklungsmaschine Curix 60	AGFA Health Care GmbH, Rottenburg, Deutschland
Gelkammern	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Heraeus Pico 21 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Heraeus Mini-Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Heraeus Multifuge 1L-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
HXP 120V Lichtquelle	Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland

---

Inkubationsschüttler Infors HT Ecotron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Inkubationsschüttler Infors HAT Minitron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
CCD-Kamera (Model B-139-3U7N)	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Kryostat CM3050S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland
Mehrkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Membranpumpe LVS 300	ILMVAC GmbH, Ilmenau, Deutschland
Mikromanipulator	Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co.KG, Wetzlar, Deutschland
Mikroladerpipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle R941STW	Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland
MilliQ-Wasseranlage GenePure Pro	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Mini Trans-Blot <sup>®</sup> Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mini Protean <sup>®</sup> 3-Gelelektrophorese-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	peqLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Netzgerät Consort E231	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
PCR-Cycler Veriti 96 Well	Applied Biosystems Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Photospektrometer (Ultraspec 2000)	Pharmacia Biosystems, Freiburg, Deutschland
Pipettensatz (2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipettierhelfer	VWR, Wien, Österreich
pH-Meter SevenMulti Ion S80-KS	Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland

## MATERIAL

---

Präzisionswaage (Model 423I-1S)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Puller PC-10 (für Injektionsnadeln)	Narishige Scientific Instrument Lab, Tokyo, Japan
Pumpe KNF Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Ringlicht-LED-System	Olympus Europa SE & Co.KG, Hamburg, Deutschland
Rollschüttler (Model RS-TR05)	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Sigma 4-16K Zentrifuge	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Stereomikroskop SZX7	Olympus Europa SE & Co.KG, Hamburg, Deutschland
Stereomikroskop SZH10	Olympus Europa SE & Co.KG, Hamburg, Deutschland
SterilWerkbank BDk-S 1500	Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Thermoschüttler (MB-102)	Hangzhou Bioer Co. Ltd., Hangzhou, China
Transelektronenmikroskop 900	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Ultramikrotom Ultracut S	C. Reichert AG, Wien, Österreich
Umwälzthermostat Julabo F30-HC	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
UV Transilluminator	Bachofer GmbH, Reutlingen Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage PJ 400	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert GmbH & CO.KG, Schwabach, Deutschland
Wippschüttler Rocky	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland

## 2.2. Chemikalien

2-β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Hydrat (DAB)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
4',6-Diamino-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
Acrylamid	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Agar <i>bacteriological grade</i>	MP Biomedicals Inc., Ohio, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Amphotericin B (100x)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
ATP	Epicentre, Madison, WI, USA
Azur-II	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Bacto-Trypton	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DEPC	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulphoxid)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

## MATERIAL

---

EDTA, Di-Natriumsalz-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Epon	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Esmeron	Organon Technika, Eppelheim, Deutschland
Ethanol (100 %)	Honeywell, Morristown, NJ, USA
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethyl 3-Aminobenzoat, Methansulfonsäuresalz 98 % (Tricain)	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Ficoll	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Formamid (> 99,5 %)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Gelatine	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Halocarbonöl 27	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Heparin-Natriumsalz aus der Schweinedarm-Schleimhaut	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Honeywell, Morristown, NJ, USA
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kaliumhydroxid	Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

Kalziumchlorid-Dihydrat	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Levamisol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
LE-Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Lithiumchlorid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Maleinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol (100 %)	Honeywell, Morristown, NJ, USA
Methylenblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat-Trihydrat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcacodylat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdexoycholat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

## MATERIAL

---

Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid (10M)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland
Natriumhydroxid-Tabletten	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Natriumtetraborat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Nonidet <sup>®</sup> -P 40	Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Osmiumtetroxid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd-Lösung 4 % in PBS	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Periodsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland
Phenolrot (0,5 %)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland
Polyvenylalkohol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Propylenoxid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ponceau-S	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Roti-Phenol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose / Sucrose	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (32 %)	MERCK, Darmstadt, Deutschland

Ribonucleic acid from torula yeast	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TritonX-100	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trizma-Base	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trizma-HCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tween20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tunicamycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid-Lösung (30 %)	Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Xylen-Cyanol	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Zitronensäure	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

### 2.3. Kommerzielle Reagenzien und Medien

<i>Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i> (Bradford-Lösung)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
DAKO <i>Fluorescent Mounting Medium</i> DIG-Labeling Mix	Agilent, Santa Clara, CA, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
dNTP-Mix (je 5mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	peqLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
<i>Dulbeccos` s Modified Eagle Medium</i> (DMEM) mit Natriumpyruvat (1 mM) und Glukose (25 mM)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
<i>Dulbeccos` s Phosphat-gepufferte Saline</i> (DPBS)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
HI-DI Formamide	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA

LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamin 2000	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
NBT/BCIP Stocklösung (18,75 mg/ml Nitroblau- Tetrazoliumchlorid, 9,4 mg/ml 5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat Toluidinsalz)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
OPTIMEM	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Peanut agglutinin Alexa Fluor 568-Konjugat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin (100x)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Protease Inhibitor Cocktail Set III</i>	Calbiochem, MERCK KGaA; Darmstadt, Deutschland
Riboguard™ RNase Inhibitor	Epicentre (Illumina), Madison, Wisconsin, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
RNAlater RNA Stabilisierungsreagenz	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compund	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Trypsin-EDTA	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Ziegenserumalbumin (NGS)	Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt a. M., Deutschland

## 2.4. Kits

A-Plus Poly(A) Polymerase Tailing Kit	Cellscript, Madison, WI, USA
Big Dye® Terminator v.1. Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA

Click-iT™ Plus TUNEL Assay for in situ apoptosis detection, Alexa-Fluor™ 488 dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Message Max™ T7 ARCA-Capped Message Trascription Kit	Cellscript, Madison, WI, USA
MinElute Reaction Cleanup Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
MinElute Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Western-Lightning® Plus ECL Kit	PerkinElmer, Waltham, MA, USA

## 2.5. Enzyme

### DNA-Polymerasen

Herculase II Fusion Polymerase	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
<i>PfuUltra II</i> Fusion HS DNA Polymerase	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Taq DNA-Polymerase (5 U/μl)	ATG Biosynthetics, Merzhausen, Deutschland

### RNA-Polymerasen

Sp6-RNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
T7-RNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

### Restriktionsenzyme

<i>AatII, ApaI, BccI, BsaI-HF, BstNI, DpnI, EcoRV, KpnI, NdeI, NotI, NsiI, PmeI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M. Deutschland
<i>BsmBI, BseII</i>	Fermentas, Waltham, MA, USA

### Ligasen

T4 DNA-Ligase (40 U/μl)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M. Deutschland
-------------------------	--

T7 DNA-Ligase (3000 U/μl)

McLab Headquarters, South San Francisco, CA, USA

### **Nukleasen**

Desoxyribonuklease I rekombinant (RNase-frei) für ISH

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Desoxyribonuklease I (DNase I für cDNA-Synthese)

Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

ExoSAP-IT

Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA

Plasmid Safe™ ATP-Dependent DNase

Epicentre, Madison, WI, USA

### **Sonstige Enzyme**

Proteinase K

peqLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

## **2.6. Längen- und Größenstandards**

### **DNA-Längenstandards**

Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA

pcDNA3.1 Zeo / TaqI-verdaut

= KEB, Eigenherstellung

### **RNA-Längenstandard**

RiboRuler™, high range RNA Ladder

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA

### **Protein-Größenstandard**

*Novex Sharp Prestained Protein Standards*  
(Proteingrößenstandard)

Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA

## 2.7. Plasmide und Vektoren

**Tabelle 1: Verwendete Standardvektoren**

Vektor	Beschreibung	Resistenz	Ursprung
pGEM <sup>®</sup> -5zf(+)	Standardklonierungsvektor	Ampicillin	Promega Corporation, Madison, WI, USA
pcDNA3.1/myc-His A	Standardklonierungsvektor	Ampicillin	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
pcDNA3.1/Zeo(+)	Standardklonierungsvektor	Ampicillin, Zeocin	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA

**Tabelle 2: Vektoren der TALEN-Toolbox.** Die Plasmide werden von Addgene vertrieben und von Feng Zhang zur Verfügung gestellt.

Vektor	Beschreibung	Resistenz	Anmerkung
pNI_v2	TALE Monomer Template Plasmid	Kanamycin	(Addgene Plasmid #32180)
pNG_v2	TALE Monomer Template Plasmid	Kanamycin	(Addgene Plasmid #32181)
pNN_v2	TALE Monomer Template Plasmid	Kanamycin	(Addgene Plasmid #32182)
pHD_v2	TALE Monomer Template Plasmid	Kanamycin	(Addgene Plasmid #32183)
pTALEN_v2 (NI)	TALE Nuklease (TALEN) Backbone-Plasmid	Ampicillin	(Addgene Plasmid #32189)
pTALEN_v2 (NG)	TALE Nuklease (TALEN) Backbone-Plasmid	Ampicillin	(Addgene Plasmid #32190)
pTALEN_v2 (NN)	TALE Nuklease (TALEN) Backbone-Plasmid	Ampicillin	(Addgene Plasmid #32191)
pTALEN_v2 (HG)	TALE Nuklease (TALEN) Backbone-Plasmid	Ampicillin	(Addgene Plasmid #32192)

## 2.8. Verwendete Erst- und Zweitantikörper

**Tabelle 3: Verwendete Erstantikörper für immunhistologische Färbungen und ISH**

Ursprung und Antigen	Hersteller
Anti-ATF6 (Human, Maus, Zebrafisch)	s. Tabelle S1
Kaninchen, DANRE anti-Opn1mw2 (Zf-Grün-Opnin)	Abgent, San Diego, CA, USA
Maus, anti-Zpr1 (Zebrafisch-Arrestin 3a)	Zebrafish International Resource Center (ZIRC), Eugene, OR, USA
Maus, anti-Zpr3 (Zf-Rhodopsin)	Zebrafish International Resource Center (ZIRC), Eugene, OR, USA
Kaninchen, anti-aktive Caspase 3 (C92-605)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Maus <i>anti-proliferating-cell-nucleus-antigen</i> (PCNA; PC-10)	NSJ Bioreagents, San Diego, CA, USA
Kaninchen, anti-Protein Kinase Calpha (PKC $\alpha$ , C20)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

**Fortsetzung Tabelle 3: Verwendete Erstantikörper für immunhistologische Färbungen und ISH**

Maus, anti-Zn8 (Zf-Neurolin)	Zebrafish International Resource Center (ZIRC), Eugene, OR, USA
Schaf, anti-Dioxigenin, alkalische Phosphatase konjugiert	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Kaninchen, anti-myc	Abeomics Inc., San Diego, CA, USA
Maus, anti-FLAG (M2)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Maus, anti-GAPDH (6c5)	Merck Millipore, Burlington, MA; USA

**Tabelle 4: Verwendete Zweitantikörper für immunhistologische Färbungen**

Ursprung und Fluophor	Hersteller
Ziege anti-Maus Alexa 660	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Ziege anti-Kaninchen Alexa 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Ziege anti-Maus Alexa 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Ziege anti-Maus Cy3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Ziege anti-Maus HRP-konjugiert	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Ziege anti-Kaninchen HRP-konjugiert	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Ziege anti-Ratte HRP-konjugiert	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland

## 2.9. Bakterienstämme

**NEB<sup>®</sup> 5-alpha Competent E.coli (high efficiency):** DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> Weiterentwicklung, (Genotyp: huA2a(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 a80a(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17) von New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland

**NEB<sup>®</sup> 5-alpha F'I<sup>q</sup> Competent E.coli (high efficiency):** DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> Weiterentwicklung, (Genotyp: F' proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>  $\Delta$ (lacZ)M15 zff::Tn10(Tet<sup>R</sup>)/fhuA2 $\Delta$ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 $\Phi$ 80 $\Delta$ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17) von New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland

**NEB<sup>®</sup> 10-beta Competent E.coli (high efficiency):** DH10 $\beta$ <sup>TM</sup> Weiterentwicklung, (Genotyp: araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 fhuA lacX74 galK ( $\Phi$ 80  $\Delta$ (lacZ)M15) mcrA galU recA1 endA1 nupG rpsL (Str<sup>R</sup>) D(mrr-hsdRMS-mcrBC) von New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland

## 2.10. Primer

Die entsprechend den Spezifikationen des Herstellers über das „Standard-Desalting-Verfahren“ aufgereinigten Primer wurden bei der Firma Integrated DNA Technologies, Inc. (Skokie, IL, USA) bestellt. Die lyophilisierten Primer wurden in entsprechenden Volumina ¼

TE-Puffer aufgenommen, um Stocklösungen von 100 pmol/μl herzustellen. Für PCR- oder Sequenzierreaktionen wurden *working*-Stocks mit einer Konzentration von 5 pmol/μl angefertigt.

**Tabelle 5: Standardprimer**

Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3' Richtung)	Anmerkung
M13forward	GTAAAACGACGGCCAGT	
M13reverse	AAACAGCTATGACCATGA	
Sp6	TTCTATAGTGTACCTAAAT	Sp6 Promotorprimer
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	T7 Promotorprimer
BGH_rev	TAGAAGGCACAGTCGAGGC	
CMV_for	CACCAAAATCAACGGGACTT	CMV Promotorprimer

**Tabelle 6: TALEN Toolbox-Primer**

Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3' Richtung)	Anmerkung
Ex-F1	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTC TCCTGACCCCAGAGCAGGTCGTG	
Ex-F2	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTC TCGACTTACACCCGAACAAGTCGTGGCAATTGCGAGC	
Ex-F3	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTC TCGCGGCCTCACCCAGAGCAGGTCG	
Ex-F4	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTC TCGTGGGCTCACCCAGAGCAGGTCG	
Ex-R1	GCTGACCGTCTCCGTTTCAGTCTGTCTTTCCCCTTTCCGGTC TCTAAGTCCGTGCGCTTGGCAC	
Ex-R2	GCTGACCGTCTCCGTTTCAGTCTGTCTTTCCCCTTTCCGGTC TCAGCCGTGCGCTTGGCACAG	
Ex-R3	GCTGACCGTCTCCGTTTCAGTCTGTCTTTCCCCTTTCCGGTC TCTCCCATGGGCCTGACATAACACAGGCAGCAACCTCTG	
Ex-R4	GCTGACCGTCTCCGTTTCAGTCTGTCTTTCCCCTTTCCGGTC TCTGAGTCCGTGCGCTTGGCAC	
In-F2	CTTGTTATGGACGAGTTGCCCGTCTCGTACGCCAGAGCAGG TCGTGGC	Monomer-Amplifikation
In-F3	CCAAAGATTCAACCGTCTCGTCTCGAACCCAGAGCAGG TCGTG	
In-F4	TATTCATGCTTGGACGGACTCGTCTCGGTTGACCCAGAGC AGGTTCGTG	
In-F5	GTCCTAGTGAGGAATACCGGCGTCTCGCCTGACCCAGAGC AGGTTCGTG	
In-F6	TTCCTTGATACCGTAGCTCGCGTCTCGGACACCAGAGCAGG TCGTGGC	
In-R1	TCTTATCGGTGCTTCGTTCTCGTCTCCCGTAAGTCCGTGCG CTTGGCAC	
In-R2	CGTTTCTTTCCGGTCGTTAGCGTCTCTGGTTAGTCCGTGCG CTTGGCAC	
In-R3	TGAGCCTTATGATTTCCCGTCTCTCAACCCGTGCGCTT GGCACAG	
In-R4	AGTCTGTCTTTCCCCTTTCCCGTCTCTCAGGCCGTGCGCTT GGCACAG	
In-R5	CCGAAGAATCGCAGATCCTACGTCTCTTGTGTCAGTCCGTGCG CTTGGCAC	

**Fortsetzung Tabelle 6: TALEN Toolbox-Primer**

Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3' Richtung)	Anmerkung
Hex-F Hex-R	CTTAAACCGGCCAACATACC AGTCTGTCTTTCCCCTTCC	Hexamer- Amplifikation
TALE-Seq-F1	CCAGTTGCTGAAGATCGCGAAGC	Sequenzierprimer; Kolonie-PCR-Primer
TALE-Seq-F2	ACTTACACCCGAACAAGTCG	Sequenzierprimer
TALE-Seq-R1	TGCCACTCGATGTGATGTCCTC	Sequenzierprimer; Kolonie-PCR-Primer
TALE-Seq-R2	CCCATGGGCCTGACATAA	Sequenzierprimer

**Tabelle 7: TALEN Screening-Primer**

Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3' Richtung)
atf6_TALEN1_F atf6_TALEN1_R	GTCAGCTTTTTGCAGTGTCCA GGCTTCTTCTCATTAGGTGCCT
atf6_TALEN2_F atf6_TALEN2_R	AGCCAAACCTCTCCAACCAG AGCCTGAAATCCAATTGTTTTACCT
atf6_TALEN3_F atf6_TALEN3_R	AATGAGAAGAAGCCATCTAAGAGGA TATTACCTGTAGGGGGCGCT

**Tabelle 8: Primer zur Klonierung der ISH-Sonden unterschiedlicher Zebrafisch-Gene.** Markiert sind die Schnittstellen der jeweilig verwendeten Restriktionsenzyme zur Klonierung in pGEM<sup>®</sup>-5zf(+)

Primerbezeichnung	Gen	Sequenz (5'-3' Richtung)
atf6_fl_Sonde_AatII_F	<i>atf6</i>	TATATATATATAT <u>GACGTC</u> ATGTCGTCGAATTTAATGTT AGATT
atf6_fl_Sonde_NsiI_R		TATATATATATATAT <u>ATGCAT</u> CTAAGAAGAGCCCACGAGGA C
hspa5_fl_ApaI_F hspa5_fl_NsiI_R	<i>bip</i> ( <i>hspa5</i> )	TATATATATATATAT <u>GGGCC</u> ATGCGGTTGCTTTGCCTGTT TATATATATATATAT <u>ATGCAT</u> CTACAGCTCGTCTTCTCTT CG
hsp90b1_5'UTR_EcoRV_F hsp90b1_3'UTR_NsiI_R	<i>hsp90b1</i>	TATATATATATATAT <u>GATATC</u> AAGCCGACTTCTCTCCCT TATATATATATATAT <u>ATGCAT</u> CCACCCGCACAGAGAAAAGA
atf6b_AatII_F atf6b_fl_NsiI_R	<i>atf6β</i>	TATATATATATATAT <u>GACGTC</u> GTCAGAGAATCCTCCGACGC TATATATATATATAT <u>ATGCAT</u> CTAGTCTCCGCTCTGGCTGA

**Tabelle 9: Klonierungsprimer und *in vitro*-Mutagenese-Primer zur Generierung der unterschiedlichen *Atf6/atf6*-Expressionskonstrukte.** Markiert sind die Schnittstellen der jeweils verwendeten Restriktionsenzyme zur Klonierung in pcDNA3.1/myc-His A

Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3' Richtung)
mATF6_ <i>KpnI</i> _for	TATATATATATATAGGTACCTTAACCATGGAGTCGCCTTTTAGTCCG
mATF6_ <i>NotI</i> _rev	TATATATATATAGCGGCCGCTGCAACGACTCAGGGATGG
mATF6_IVM_F	GCTCGAGTCAGAGGGCCCTTCGAAC
mATF6_IVM_R	GTTCTGAAGGGCCCTCTGACTCGAGC
drATF6_ <i>KpnI</i> _for	TATATATATATATAGGTACCTTAACCATGTCGTCGAATTTAATGTTAGA
drATF6_ <i>NotI</i> _rev	TATATATATATAGCGGCCGCTAAGAAGAGCCCACGAGGAC
dr_atf6_IVM F	CTCGTGGGCTCTTCTCGGCCGCTCGAGTCTA
dr_atf6_IVM R	TAGACTCGAGCGGCCGAGAAGAGCCCACGAG

**Tabelle 10: Sequenzierprimer der unterschiedlichen *ATF6*-Sequenzen (human, murin, Zebrafisch).**

Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3' Richtung)
mATF6_Seq1	AGCACGTTCCCTGAGGAGTTG
mATF6_Seq2	AGCCCGGTGAATGGAAACT
mATF6_Seq3	CAGCTATGATCACTCTGTGTC
mATF6_Seq4	TGACTGTCAGGTGATGGACA
dr_atf6_Seq1	TCAGTGTTCATCACCAGCGTC
dr_atf6_Seq2	GCACAGGACAGACCCATCTC
dr_atf6_Seq3	GTTGGAGGAGGGGTTTCAG
dr_atf6_Seq4	CGACTGTGAGGTCATGGACA

**Tabelle 11: qRT-PCR Primer Für Referenzgene im Zebrafisch**

Primerbezeichnung	Gen	Lage	Sequenz (5'-3' Richtung)
g6pd_F_Ex8	<i>g6pd</i>	Exon 8	AAGAGCCGTTTGGTACCCAG
g6pd_R_Ex9		Exon 9	CTTCTCCATCGCCACCAGAC
hprt1_F_Ex7	<i>hprt1</i>	Exon 7	GTGAAGAGGACACCGAGGAG
hprt1_R_Ex8		Exon 8	ACTCGTTGTAGTCAAGTGCA
sdha_F_Ex8	<i>sdha</i>	Exon 8	AGGGATGTGGTTTCAAGATCCA
sdha_R_Ex9		Exon 9	TCATGGCGGTCTCAGAGATG

**Tabelle 12: qRT-PCR Primer der unterschiedlichen Zebrafisch-UPR Gene**

Primerbezeichnung	Gen	Lage	Sequenz (5'-3' Richtung)
atf6_F_Ex6_short	<i>atf6</i>	Exon 6	TGTGCCCAAGGTTTCCATT
atf6_R_Ex7_short		Exon7	GAGAACCTGAGTGGGCTGAG
atf6b_F_Ex4	<i>atf6<math>\beta</math></i>	Exon 4	GGAGTACCTGCAGAACCTGG
atf6b_R_Ex5		Exon 5	CATCACACACACGGCTCTCT
hspa5_F_Ex7_short	<i>bip (hspa5)</i>	Exon 7	CCGTCCAGAGGAATCAACCC
hspa5_R_Ex8_short		Exon 8	GAGTTTGGTCATCACTCCTCCA
ddit3_F_Ex1	<i>chop (ddit3)</i>	Exon 1	ACACTCGGTGACTTCAGCTG
ddit3_R_Ex2		Exon 2	TGTTGGCGATATTTTGTCCCAAT

**Fortsetzung Tabelle 12: qRT-PCR Primer der unterschiedlichen Zebrafisch-UPR Gene**

Primerbezeichnung	Gen	Lage	Sequenz (5'-3' Richtung)
edem1_F_Ex5 edem1_R_Ex6	<i>edem1</i>	Exon 5 Exon 6	TGCTCGTGGAGTTTGGTATTCT CCCCTGGCCAGTCTGAATA
ero1b_F_Ex6 ero1b_R_Ex7	<i>ero1b</i>	Exon 6 Exon 7	AATCAGAGTAAAGAAGCGTTTGCAG AGCAGTTTTCTCATAAATGCTGTT
hsp90b1_F_Ex10 hsp90b1_R_Ex11	<i>hsp90b1</i>	Exon 10 Exon 11	TGTTTCGTGCGTAGAGTCTTCA CACGTTTCAGAGGCAGATCGT
ern1_F_Ex14 ern1_R_Ex15	<i>ire1 (ern1)</i>	Exon 14 Exon 15	GACATGGTGCTGAAGGAACTA CCTCACGGTCAGCAAAGCTA
pdia3_F_Ex11 pdia3_R_Ex12	<i>pdia3</i>	Exon 11 Exon 12	TCCGAAGATCCAAATATCGTCA ATATTTCTTTGGATTCTGTTTACGG CC
eif2ak3_F_Ex10 eif2ak3_R_Ex11	<i>perk (eif2ak3)</i>	Exon 10 Exon 11	TCACAGATATGCGTCCCTGC CCTTGTTGCGAGCCTCAAAC

## 2.11. Zebrafischstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Zebrafischstämme sind in Tabelle 13 aufgeführt.

**Tabelle 13: Verwendete Zebrafischlinien (*Danio rerio*)**

Zebrafischlinie	Beschreibung	Herkunft
TUE (Tübingen)	Wildtyp-Linie	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Brigitte Walderich, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen, Deutschland
<i>atf6</i> <sup>-/-</sup>	1 bp Deletion (c.519delG;p.V174C*fs42) in <i>atf6</i>	Generierung in dieser Arbeit durch TALEN-Injektion in Wildtyp-Oozyten

## 2.12. Zell-Linien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zell-Linien sind in Tabelle 14 aufgeführt.

**Tabelle 14: Verwendete humane Zell-Linien**

Zell-Linie	Mutation	Herkunft
HEK293T	-	ATCC, Manassas, VA, USA
Fibroblasten	Missense Mutation in <i>ATF6</i> (c.970C>T;p.(R324C))	Von Dr. York Kamenisch aus Patienten-Hautstanzen generiert
Fibroblasten	Spleiß- Mutation in <i>ATF6</i> (c.82+5G>T;p.(D28Gfs*36))	Von Dr. York Kamenisch aus Patienten-Hautstanzen generiert
Fibroblasten	WT	Von Britta Baumann aus Hautstanzen von Kontroll-Probanden generiert
WT-MEFs	-	Aus C57BL/6-Embryonen isoliert
<i>Atf6</i> <sup>-/-</sup> -MEFs	Deletion von Exon 4 des <i>Atf6</i> -Gens	Aus <i>Atf6</i> <sup>-/-</sup> -Embryonen isoliert

## 2.13. Lösungen und Puffer

### DNA Puffer

#### **Tris-EDTA-Puffer (1xTE)**

10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
1 mM EDTA

#### **¼ TE**

2,5 mM Tris-HCl, pH 8,0  
0,25 mM EDTA

### PCR

#### **10x Amplitaq II-Puffer (ATII)**

100 mM Tris Base, pH 8,6  
500 mM KCl  
15 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,01 % Gelantine

#### **10x BOM18**

100 mM Tris Base, pH 8,9  
500 mM KCl  
30 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **10x BOM17**

100 mM Tris Base, pH 8,9  
500 mM KCL  
20 mM MgCl<sub>2</sub>

### Agarose-Gelelektrophorese

#### **Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)**

40 mM Tris-Base, pH 8,0  
0,11 % Essigsäure  
1 mM EDTA

#### **Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)**

89 mM Tris-Base, pH 8,0  
89 mM Borsäure  
2,5 mM EDTA

**10x Ladepuffer**

20 % Ficoll 400  
100 mM EDTA  
0,2 % Bromphenolblau  
0,2 % Xylene Cyanol

**Ethidiumbromid-Lösung**

100 µg/ml in TE

**Bakterienkultur**

**LB-Medium**

1 % (w/v) Bacto-Trypton  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
170 mM NaCl  
pH 7,5

**Ladepuffer**

3 ml 10x Ladepuffer  
29 ml 50 % Glycerol

**DNA-Längenstandards (Fertiglösung)**

20 µg Standard-DNA  
120 µl 10x Ladepuffer  
860 µl TE

**LB-Agar**

1,5 % Agar in LB-Medium

**Medienzusätze**

0,15 mg/ml Ampicillin  
0,05 mg/ml Kanamycin

**Zellkultur**

**Kulturmedium HEK293T**

10 % (v/v) FCS  
1 % (v/v) Amphotericin B  
1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin  
in DMEM

**Kulturmedium Fibroblasten**

10 % (v/v) FCS  
1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin  
in DMEM

**Transfektionsmedium**

10 % (v/v) FCS  
in DMEM

**SDS-Page und Western Blot**

**RIPA-Basis-Puffer**

50 mM Tris-Base  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA

**RIPA-Membran-Puffer**

1 % (v/v) Nonidet P-40  
0,25 % (w/v) Natriumdeoxycholat  
1 mM DTT (frisch angesetzt)  
1 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail Set III

**Trenngel-Puffer**

1,5 M Tris-Base pH 8,8

**Sammelgel-Puffer**

1,5 M Tris-Base pH 6,8

**Laemmli-Puffer**

60 mM Tris-HCl pH 6,8  
2 % SDS  
10 % Glycerol  
5 % β-Mercaptoethanol  
0,01 % Bromphenolblau

**Towbin-Puffer**

25 mM Tris-Base  
192 mM Glycin  
0,05 % (w/v) SDS  
20 % (v/v) MeOH

**SDS-Laufpuffer (10x)**

2 M Glycin  
250 mM Tris-Base  
1 % (w/v) SDS

**SDS-Laufpuffer (1x)**

10 % (v/v) SDS-Laufpuffer (1x) in ddH<sub>2</sub>O

**5 % MMP-TBST**

5 % (w/v) Magermilchpulver in 1xTBST

**TBST (1x)**

10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
150 mM NaCl  
0,1 % (v/v) Tween20

**TBS (1x)**

10 mM Tris-HCl pH 8,0  
150 mM NaCl

**Zebrafische****E3-Medium (1x)**

5 mM NaCl  
0,17 mM KCl  
0,33 mM CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O  
0,33 mM MgSO<sub>4</sub>  
0,00001 % (w/v) Methylenblau

**Lysepuffer**

10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
50 mM KCl  
0,3 % (v/v) Tween20  
0,3 % (v/v) Nonidet P40  
1 mM / 4 mM EDTA

**Immunhistochemie / -zytochemie****Phosphatpuffer Saline (1x PBS)**

130 mM NaCl  
7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O  
3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O

**10 %, 20 %, 30 % Saccharose-Lösung**

10 % (w/v) bzw.  
20 % (w/v) bzw.  
30 % (w/v) Saccharose in 1xPBS

**Blockierlösung**

1xPBS  
10 % (v/v) NGS  
1 % (v/v) BSA  
0,1 % (v/v) TritonX-100  
oder  
0,05 % (v/v) TritonX-100  
oder  
0,8 % (v/v) TritonX-100; 0,1 % (v/v)  
Tween20

**DAPI-Stocklösung**

10 mg/ml in 1xPBS

**Lösung C**

10 % (v/v) FCS in 1xPBS

**Lösung CT**

0,1 % (v/v) TritonX-100 in Lösung C

**DAB-Stocklösung**

0,1 g DAB in 5 ml ddH<sub>2</sub>O

**1xPBS-TS**

1xPBS  
10 % (v/v) BSA  
1 % (v/v) TritonX-100

**1xPBS-T**

1xPBS  
1 % (v/v) TritonX-100

## **ISH**

### **3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 0,5 % KOH-Bleichlösung**

10 % (v/v) 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
5 % (v/v) 10 % KOH  
in DEPC-H<sub>2</sub>O

### **DEPC-H<sub>2</sub>O**

0,001 % (v/v) aktives DEPC

### **0,1 M PBS**

8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O  
2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O  
in DEPC-H<sub>2</sub>O  
154 mM NaCl

### **AP-complete-Puffer**

1 mM Levamisol  
0,1 % (v/v) Tween20  
in AP-Puffer

### **Hybridisierungswaschpuffer (Hyb<sup>-</sup>)**

25 % (v/v) 20x SSC  
50 % (v/v) Formamid  
0,1 % (v/v) Tween20  
in DEPC-H<sub>2</sub>O  
pH 6,0 mit 1M Zitronensäure einstellen

### **Hybridisierungslösung (Hyb<sup>+</sup>)**

1 % (v/v) Heparin (Stock: 50µg/ml)  
2 % (v/v) torula RNA (tRNA, Stock: 1 mg/ml)  
5 % (w/v) Dextran  
in Hybridisierungswaschpuffer

### **20x SSC Puffer**

3 M NaCl  
300 mM Natrium-Citrat  
in DEPC-H<sub>2</sub>O  
pH 7,0

## **Semidünnschnitte**

### **Cacodylat-Puffer**

0,1 M Natriumcacodylat in H<sub>2</sub>O  
pH 7,4

### **Blockierpuffer**

2 % (v/v) NGS  
2 mg/ml BSA  
0,1 % (v/v) Tween20  
in MAP-Puffer

### **2x Alkaline-Phosphatase -Puffer (AP-Puffer)**

200 mM Tris-Base  
200 mM NaCl  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
in DEPC-H<sub>2</sub>O  
pH 9,8

### **NBIT/BCIP Färbelösung**

2 % (v/v) NBIT/BCIP  
Stocklösung in AP-complete Puffer

### **Stoplösung**

10 % (v/v) 10xPBS  
0,4 % (v/v) 0,25 M EDTA  
0,1 % (v/v) Tween20  
in DEPC-H<sub>2</sub>O  
pH 5,5

### **MAP-Puffer**

100 mM Maleinsäure  
150 mM NaCl  
in DEPC-H<sub>2</sub>O  
pH 7,5

### **Richardson-Färbelösung**

1 % (w/v) Periodsäure  
1 % (w/v) Azur-II  
1 % (w/v) Methylenblau  
4 % (w/v) Natriumtetraborat

## 2.14. Verbrauchsmaterialien

Handelsübliche Laborverbrauchsmaterialien wie Plastikwaren, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc. wurden von wechselnden Laborbedarfsanbietern bezogen.

## 2.15. Software

**Tabelle 15: Verwendete Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
E.A.S.Y Win32 A+B N5	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Sequencing Analysis 5.2	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
DNASTAR® Lasergene Package 5.08 ( <i>EditSeq</i> und <i>Seqman</i> )	DNASTAR Inc., Madison WI, USA
cellSense Entry 1.15	Olympus Europa SE & Co.KG, Hamburg, Deutschland
Image J 1.50I	Entwickelt von: Wayne Rasband, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA
ZEN lite 2.3 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Zeiss ZEN 2.3 Imaging Software (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Corel Draw Graphics Suite 2017	Corel GmbH, München, Deutschland
Microsoft Office 2007	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
REST 2009 (Relative Expression Software Tool) V2.0.13	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
SigmaPlot13	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland

## 3. Methoden

### 3.1. Mikrobiologische Techniken

#### 3.1.1. Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Bakterienstämmen

Um Plasmide inklusive Ligationsprodukte in Bakterienstämme einzubringen, wurden Transformationen durchgeführt. Je nach Art und Toxizität des im Ligationsprodukt enthaltenen Inserts wurden die chemisch kompetenten Bakterienstämme *E.coli* NEB10 $\beta$ , NEB5 $\alpha$  oder NEB5 $\alpha$  F' $I^q$  verwendet. Die unterschiedlichen Bakterienstämme wurden nach dem vorgegebenen Herstellerprotokoll transformiert. Die Bakterien wurden zunächst 10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von  $\frac{1}{10}$  eines Ligationsansatzes erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, gefolgt von einem Hitzeschock für 30 sek bei 42 °C im Wasserbad. Anschließend wurde 300  $\mu$ l SOC-Medium auf die Bakterien gegeben und diese dann für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurden 50  $\mu$ l und 25  $\mu$ l der Bakteriensuspension auf Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten mit Impfösen ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 3.1.2. Anlegen von Glycerolstocks zur Langzeitlagerung

Für die Langzeitlagerung transformierter Bakterien sowie als Basis zur erneuten Kultivierung wurden Glycerolstocks angelegt. Hierzu wurden 500  $\mu$ l 50%iges Glycerol und 500  $\mu$ l über-Nacht-Bakterienkultur gut gemischt und bei -80 °C eingefroren und aufbewahrt.

### 3.2. Isolierung, Aufreinigung, Aufkonzentration und Vermessung von Nukleinsäureproben

#### 3.2.1. Aufreinigung von Plasmiden aus Bakterienkulturen

Um Plasmide zu vermehren, können diese in Bakterien eingebracht werden. Hier werden sie durch die bakterielle Replikationsmaschinerie autonom repliziert und anschließend durch die Aufreinigung aus den Bakterien gewonnen. Die Kultivierung der transformierten Bakterien erfolgte in Antibiotika-haltigem LB-Medium (Ampicillin 0,15 mg/ml; Kanamycin 0,05mg/ml) bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 200 rpm über Nacht für 16 h. Zur Aufreinigung wurden 5 ml der Bakteriensuspension 10 min bei 5000xg zentrifugiert, um die Bakterien zu pelletieren. Die Plasmidaufreinigung erfolgte unter Zuhilfenahme des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kits I*. Das Aufreinigungsprotokoll basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien

gefolgt von der Aufreinigung der Plasmid-DNA über Silica-Membran-Säulchen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 50 µl Kit-zugehörigem Elutionspuffer eluiert.

### **3.2.2. Isolierung von DNA aus Zebrafischlarven und Schwanzflossenbiopsien**

Für die Isolierung von genomischer DNA aus Zebrafischlarven wurden einzelne euthanasierte Zebrafischlarven in ein Reaktionsgefäß mit 50 µl Lysepuffer und 4 mM EDTA überführt. Wurde DNA aus Zebrafischlarven im Alter von 2 dpf isoliert, wurde die Eihülle zunächst mithilfe von zwei Pinzetten entfernt, bevor die Larven in das Reaktionsgefäß überführt wurden.

Schwanzflossen-Biopsien wurden in ein Reaktionsgefäß mit 50 µl Lysepuffer mit 1 mM EDTA überführt. Anschließend wurde das in Lysepuffer befindliche Gewebe auf 98 °C erhitzt. Nach 10 min wurde 1 µl Proteinase K (20 mg/ml Stocklösung) zugegeben und die Proben über Nacht bei 55 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Proteinase K durch erneutes Erhitzen der Probe auf 98 °C für 10 min inaktiviert. Die DNA, die nun für weitere Analysen, wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), verwendet wurde, befand sich im Lysepuffer.

### **3.2.3. Isolation und Aufreinigung von RNA**

Um Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) aus Zebrafischlarven oder adulten Retinae zu isolieren sowie *in vitro* synthetisierte RNA aufzureinigen, wurde das *RNeasy Mini Kit* von Qiagen verwendet. Die Isolierung bzw. Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von 2-β-Mercaptoethanol. Die RNA wurde nach der Aufreinigung mit 30 µl 65 °C warmem RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Für spätere cDNA (komplementäre DNA)-Synthesen wurde die Gesamt-RNA sowohl aus 3 dpf und 5 dpf alten Zebrafischlarven als auch aus Retinae adulter Zebrafische isoliert. Hierzu wurden die Köpfe von 12 bis 15 Larven bzw. sechs Retinae von drei unterschiedlichen Fischen, die vom Zeitpunkt der Präparation bis zur Verarbeitung in *RNA later* aufbewahrt wurden, vereinigt.

### **3.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Restriktionsverdau oder PCR-Reaktionen wurden über Gelextraktion aufgereinigt, um unspezifische Nebenprodukte zu entfernen. Die Proben wurden in einem 0,5%igem bis 2%igem TAE-Agarosegel in 1xTAE-Puffer elektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.3.3). Anschließend wurde ein Gelstück, welches das gewünschte Fragment enthielt, mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Aufreinigung des DNA-Fragments erfolgte mithilfe des *MinElute Gel Extraction Kits* nach Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde je nach späterer Verwendung in 10 µl Elutionspuffer oder 10 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert.

### **3.2.5. Aufreinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen**

PCR-Produkte, die im nachfolgenden Schritt für einen Restriktionsverdau verwendet wurden, oder Plasmid-DNA, die mittels eines Restriktionsverdau linearisiert wurde, wurden mithilfe des *MinElute Reaction Cleanup Kits* von Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Dadurch wird die DNA von Pufferzusätzen, Nukleotiden und Enzymen befreit. Eluiert wurde mit 10 µl Elutionspuffer oder 10 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O.

### **3.2.6. Phenol-/Chloroform-Extraktion**

Die Phenol-/Chloroform-Extraktion wurde genutzt, um linearisierte Plasmide, die später als Vorlage zur Synthese von komplementärer RNA (cRNA) dienen, RNase-frei aufzureinigen. Der Restriktionsverdau wurde mit dem gleichen Volumen eines 1:1-Phenol-Chloroform-Gemisches versetzt und der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur bei >10.000xg zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase, die das gewünschte linearisierte Plasmid enthielt, vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mithilfe einer Ethanol-Präzipitation (siehe Abschnitt 3.2.7) aufkonzentriert.

### **3.2.7. Ethanol-Fällung**

DNA-Proben können durch eine Ethanol-Fällung aufkonzentriert werden. Zur Probe wurde das 0,1-fache Volumen (RNase-freies) an 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und das 2-fache Volumen an eiskaltem 100 % EtOH gegeben und diese für 15 min bei Raumtemperatur mit >10.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet mit

80%igem EtOH gewaschen. Der Alkohol wurde dann vorsichtig abpipettiert, das Pellet an der Luft angetrocknet und anschließend in 5 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **3.2.8. Lithiumchlorid-Präzipitation**

RNA-Proben können über eine Lithiumchlorid-Fällung präzipitiert werden. Hierzu wurde die Probe mit 15 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O und 15 µl 7,5 M Lithiumchlorid versetzt und bei -20 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte eine Zentrifugation mit  $\geq 10.000 \times g$  bei 4 °C, um die RNA zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet mit 80 % EtOH gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 76,5 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **3.2.9. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäureproben**

Die Konzentrationsbestimmung von RNA- und DNA-Proben erfolgte spektrophotometrisch mit dem NanoDrop ND1000 nach Angaben des Herstellers. Als Referenz für die Messung diente das jeweilige Lösungsmittel der Nukleinsäureprobe. Da Nukleinsäuren kurzwelliges Licht mit einem Maximum von  $\lambda=260$  nm absorbieren, erfolgte die Vermessung bei dieser Wellenlänge.

## **3.3. Molekularbiologische Techniken**

### **3.3.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion**

Um spezifische DNA-Abschnitte aus genomischer DNA, von Plasmiden oder aus komplementärer DNA (cDNA) *in vitro* zu vervielfältigen, wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewandt (Saiki et al., 1985, Mullis und Faloona, 1987). Das Prinzip der PCR beruht auf der Enzym-basierten Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnitts, der mittels zweier sequenzspezifischer kurzer DNA-Oligos, den sogenannten Primern, die diesen flankieren, definiert wird. Für Standard-PCRs wurde die Taq-DNA-Polymerase ohne Korrekturlesefunktion verwendet. Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Als Template für die PCR wurden 1 µl cDNA, 2 µl Zebrafisch-DNA (siehe Abschnitt 3.2.2) oder 100 ng Plasmid verwendet. Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle mit Wasser anstatt DNA/Plasmid mitgeführt. Ein Standard-PCR-Protokoll für eine 30 µl-Reaktion inklusive des benötigten Cycling-Protokolls ist im Folgenden dargestellt:

**Reaktionsansatz:**

- 3 µl BOM 17 Puffer (10x)
- 1,2 µl dNTP-Mix (je dNTP 5 mM)
- 1,2 µl *Forward* Primer (5 µM)
- 1,2 µl *Reverse* Primer
- 0,4 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
- x µl Template
- Ad 30 µl ddH<sub>2</sub>O

**Tabelle 16: Cycling-Protokoll einer Standard-PCR**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	96	5 min	1
Denaturierung	96	30 sek	35
Annealing	58	30 sek	
Elongation	72	30 sek	
Finale Elongation	72	4 min	1

Um sehr lange DNA-Fragmente bzw. um DNA-Fragmente mit möglichst geringer Fehlerrate, die zum Beispiel als Matrize für die Synthese von ISH-Sonden verwendet wurden, zu amplifizieren, wurde die *PfuUltra II Fusion HS*-Polymerase, eine „*Proof-reading*“-Polymerase, verwendet. Diese Art der Polymerasen erkennt und repariert mithilfe ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität Amplifikationsfehler und ersetzt die fehlerhafte durch die korrekte, komplementäre Base, ohne einen weiteren Reaktionsschritt. Das Protokoll für einen solchen 50 µl Reaktionsansatz inklusive des benötigten Cycling-Protokolls ist im Folgenden dargestellt:

**Reaktionsansatz:**

- 5 µl *PfuUltra II* Puffer (10x)
- 5 µl dNTP-Mix (je dNTP 5 mM)
- 1 µl *Forward* Primer (5 µM)
- 1 µl *Reverse* Primer (5 µM)
- 1 µl *PfuUltra II Fusion HS* Polymerase
- x µl cDNA (50 ng) oder 100 ng Plasmid
- Ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O

**Tabelle 17: Cycling-Protokoll einer Proofreading-PCR**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	1 min	1
Denaturierung	95	20 sek	40
Annealing	59	20 sek	
Elongation	72	1 min/kb	
Finale Elongation	72	3 min	1

### 3.3.2. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient zum schnellen Nachweis von bestimmten DNA-Sequenzen in einzelnen Bakterienklonen, bzw. zur Selektion bestimmter Klone. Hierzu wurden Klone, die nach der Transformation auf Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten angewachsen sind, gepickt und in PCR-Reaktionsgefäße mit ddH<sub>2</sub>O überführt, und anschließend der entsprechende PCR-Mix hinzupipettiert. Hierdurch kann das gewünschte Plasmid bzw. die gewünschte Zielsequenz untersucht werden. Das in den Platten verwendete Antibiotikum entspricht dem Resistenzgen des für die Transformation verwendeten Vektors. Als *Template* für die PCR-Reaktion dient hier also das Plasmid, das von den Bakterien aufgenommen wurde. Um die *Template*-DNA für die Polymerase zugänglich zu machen, erfolgt vor der eigentlichen PCR-Reaktion zur Lyse der Bakterien ein initialer Hitzeschritt. Die Primer für die PCR-Reaktion wurden so gewählt, dass ein Primer im Vektor und der andere im Insert bindet. Somit kann bereits die Orientierung der gewünschten Zielsequenz untersucht werden. Auch hier wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle mit nicht-angeimpftem Wasser mitgeführt. Der Reaktionsansatz für eine solche Reaktion sowie das *Cycling*-Protokoll wurden wie folgt angesetzt.

<b>Reaktionsansatz:</b>	40 µl	Angeimpftes H <sub>2</sub> O
	5 µl	BOM18 (10x)
	2 µl	dNTP-Mix (je dNTP 5 mM)
	1 µl	<i>Forward</i> Primer (5 µM)
	1 µl	<i>Reverse</i> Primer (5 µM)
	0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
	0,8 µl	ddH <sub>2</sub> O

**Tabelle 18: *Cycling*-Protokoll einer Kolonie-PCR für Kolonie-PCR-Produkte ≤ 1 kb**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklenzahl
Initialer Hitzeschritt	60	20 min	1
Initiale Denaturierung	94	4 min	1
Denaturierung	94	30 sek	25
Annealing	58	30 sek	
Elongation	72	3 min	
Finale Elongation	72	5 min	1

Um Klone zu untersuchen, bei denen das zu amplifizierende Fragment in der Kolonie-PCR länger als 1 kb ist, wurde ein modifiziertes Protokoll angewendet. Hierfür wurde für den Reaktionsansatz 10x AT-II-Puffer als PCR-Puffer verwendet und ein *Cycling*-Programm ohne initialen Hitzeschritt und mit an die Größe angepasster Elongationszeit, d.h. mit 1 min Elongationszeit pro kb Zielsequenz, eingesetzt.

**Tabelle 19: Cycling-Protokoll für Kolonie-PCR-Produkte >1kb**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94	4 min	1
Denaturierung	94	30 sek	25
Annealing	60	30 sek	
Elongation	68	1 min/kb	
Finale Elongation	68	5 min	1

### 3.3.3. Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Um die Größe einer amplifizierten oder synthetisierten Nukleinsäureprobe zu bestimmen bzw. um zu überprüfen, ob die Amplifikation erfolgreich und spezifisch war, wurden sowohl DNA- als auch RNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese analysiert. Das Verfahren beruht auf der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit von Nukleinsäureproben mit unterschiedlichen Längen durch ein Polymergel mit bestimmter Maschengröße in einem elektrischen Feld. Je kleiner das Fragment, desto schneller dessen Laufgeschwindigkeit und umgekehrt (Hayward and Smith, 1972, Aaji und Borst, 1972). Für die Auftrennung großer Fragmente wurden geringer konzentrierte Gele mit einer höheren Maschengröße als bei kleineren Fragmenten verwendet. Die hier verwendeten Gele enthielten zwischen 0,5 % und 3 % Agarose. Um die Proben im Gel mittels UV-Licht sichtbar zu machen, wurden die Gele mit Ethidiumbromid (100 µg/ml Agarosegel), einem in die DNA interkalierenden Farbstoff, versetzt.

Die Auftrennung der Proben im Gel erfolgte in einer Laufkammer, die mit einem ionischen Puffer (1xTris-Borat-EDTA-Puffer, 1xTBE-Puffer oder 1xTris-Acetat-EDTA-Puffer, 1xTAE-Puffer), gefüllt war. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 8-10 V/cm. Im Fall der Auftrennung von DNA-Fragmenten, wurden 5 µl der PCR-Reaktion oder das gesamte Volumen eines Restriktionsverdauens mit 4 µl bzw. 10 µl Ladepuffer gemischt. Um Plasmide gelelektrophoretisch aufzutrennen wurde ein entsprechendes Volumen, das 200 ng Plamid-DNA enthielt, mit ddH<sub>2</sub>O auf 5 µl aufgefüllt und mit 4 µl Ladepuffer versetzt. Für DNA-Fragmente bis 1 kb wurde als Längenstandard der KEB-Marker (Eigenherstellung) und für DNA-Fragmente >1 kb wurde die *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder* verwendet. RNA-Fragmente wurden vor der Gelelektrophorese mit einem kommerziell erhältlichen Ladepuffer (Kit: Ribo Ruler High Range RNA, Thermo Scientific) versetzt und bei 70 °C für 10 min denaturiert. Als Längenstandard bei der Auftrennung von RNA-Proben wurden 120 ng der *RiboRuler High Range RNA ladder* verwendet. Die Dokumentation erfolgte mit dem Setup der Firma Herolab (Herolab GmbH, Wiesloch, Deutschland) und Software E.A.S.Y Win32 A+B N5.

### 3.3.4. Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau dient zum Schneiden von DNA an bestimmten DNA-Sequenzen. Die Enzyme, die die DNA aufschneiden, werden Restriktionsenzyme genannt. Jedes Restriktionsenzym schneidet die DNA an einer bestimmten, meist vier bis acht Basenpaaren langen, Erkennungsstelle, der sogenannten Restriktionsenzymsschnittstelle. Jeder Restriktionsverdau wurde nach Herstellerangaben in dem für das Enzym geeigneten Puffer angesetzt. So konnte eine optimale Effizienz des Restriktionsenzym erreicht werden. Die Reaktionsansätze der Restriktionsverdau von PCR-Produkten sowie zur Linearisierung von Plasmiden sind im Folgenden dargestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind in Abschnitt 2.5 aufgeführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei enzymespezifischer Temperatur (37 °C bis 65 °C).

<b>Reaktionsansatz (PCR-Produkte):</b>	6 µl	PCR-Produkt
	2 µl	Enzymspezifischer Puffer (10x)
	(2 µl)	(BSA 10x)
	0,4 µl	Restriktionsenzym (10 U/µl)
	Ad 20 µl	ddH <sub>2</sub> O

<b>Reaktionsansatz (Plasmid-Linearisierung):</b>	x µl	Plasmid-DNA (2 µg)
	3 µl	Enzymspezifischer Puffer (10x)
	(3 µl)	(BSA 10x)
	1 µl	Restriktionsenzym (10-50 U/µl)
	Ad 30 µl	ddH <sub>2</sub> O

Um den Erfolg des Restriktionsverdau zu überprüfen, wurde die verdaute DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.3.3) und anschließend mithilfe des *MinElute Reaction Cleanup Kits* oder des *Min Elute Gel Extraction Kits* von Qiagen, wie in Abschnitt 3.2.5 und 3.2.4 beschrieben, aufgereinigt.

### 3.3.5. Ligation

Die Ligation ist eine Methode, bei der eine DNA-Ligase unter ATP-Verbrauch durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwei DNA-Fragmente miteinander verbindet. Für die Standard-Ligationen in dieser Arbeit wurde die T4-Ligase verwendet. Bei der Ligation eines spezifischen DNA-Fragmentes, dem *Insert*, in die *multiple cloning site* (MCS) eines Zielvektors betrug das Mengenverhältnis von Insert zu Vektor 3:1. Das Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes betrug 10 µl und ist im Folgenden dargestellt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C.

<b>Reaktionsansatz:</b>	x $\mu$ l	Insert (z.B. 30 ng/ $\mu$ )
	x $\mu$ l	Zielvektor (z.B. 10 ng/ $\mu$ )
	1 $\mu$ l	T4-DNA-Ligasepuffer (10x)
	1 $\mu$ l	T4-Ligase (400 U/ $\mu$ l)
	Ad 10 $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O

Die Ligationsprodukte wurden, wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, in kompetente *E.coli* Bakterien transformiert.

### 3.3.6. Sequenzierung von DNA-Fragmenten und Plasmiden nach Sanger

Die Sequenzierung wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die Basenabfolge von DNA-Fragmenten, die beispielsweise amplifiziert oder in ein Plasmid kloniert wurden, zu überprüfen. Die Sequenzierung erfolgt ähnlich einer PCR (*cycle sequencing*), beruht aber auf dem Verfahren des zufälligen Einbaus von mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Didesoxynukleotiden (ddNTPs), nach deren Einbau durch die Polymerase keine weitere Verlängerung des DNA-Stranges erfolgen kann. Daher spricht man hier auch von der Kettenabbruchsynthese nach *Sanger* (Sanger et al., 1977). Die Kettenabbruchprodukte werden anschließend mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die Fluoreszenzfarbstoffe durch einen Laser angeregt. Die unterschiedlichen Farbstoffe emittieren in unterschiedlichen Wellenlängen und können von einem Detektor erkannt und unterschieden werden. Das Elektropherogramm, d.h. die Abfolge der Farbsignale, die vom Detektor erkannt wurden, gibt die Basenabfolge des sequenzierten DNA-Fragments wieder.

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden bei dieser Methode ca. 100 ng und für Plasmide ca. 500 ng eingesetzt. Um überschüssige, aus der PCR-Reaktion verbliebene, dNTPs und Primer zu hydrolysieren, wurde vor der Sequenzierung ein Verdau mit ExoSAP-IT, einem Reagenz, welches eine Kombination aus Exonuklease I und alkalischer Phosphatase (SAP) enthält, durchgeführt. Hierfür wurden je nach Größe und Stärke des PCR-Produkts 0,8 bis 2  $\mu$ l des PCR-Produktes mit 5  $\mu$ l ExoSAP-IT (1:50 in H<sub>2</sub>O) gemischt und 15 min bei 37 °C verdaut. Um die Enzymreaktion zu stoppen, wurde der Reaktionsansatz anschließend bei 80 °C für 15 min inkubiert. Die Sequenzierungsreaktion für PCR-Produkte und Plasmide wurde wie im Folgenden dargestellt durchgeführt:

	PCR-Produkt	Plasmid
<b>Matrize</b>	(ExoSAP-IT verdaut) $\leq 7 \mu\text{l}$	500 ng
<b>5x Big Dye Sequenzierpuffer</b>	2 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$
<b>Primer (5 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	1 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$
<b>Big Dye v3.1</b>	1 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Ad 11 $\mu\text{l}$	Ad 20 $\mu\text{l}$

**Tabelle 20: Cycling-Protokoll einer Sequenzier-PCR**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	96	2 min	1
Denaturierung	96	15 sek	25
Annealing	53/55	15 sek	
Elongation	60	4 min	

Vor der kapillarelektrophoretischen Auftrennung wurden die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente über eine Alkohol-Fällung aufgereinigt. Sequenzier-Reaktionen basierend auf PCR-Produkten wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, mit 5  $\mu\text{l}$  125 mM EDTA und 75  $\mu\text{l}$  100 % EtOH versetzt und für 30 min bei 2580xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 60  $\mu\text{l}$  80% EtOH gewaschen. Sequenzier-Reaktionen basierend auf Plasmiden wurden mit dem 4-fachen Volumen an 75% Isopropanol versetzt, bei 2580xg für 30 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde durch Zentrifugation für 1 min bei 440xg getrocknet und anschließend in 50  $\mu\text{l}$  HI-DI-Formamid gelöst. Für die Sequenzierung wurden 17  $\mu\text{l}$  dieses Gemisches verwendet. Die Sequenzierung erfolgte mit dem 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA).

### 3.3.7. cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Als cDNA bezeichnet man einen DNA-Strang, der mithilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“ aus RNA synthetisiert wird. Die cDNA enthält im Vergleich zu genomischer DNA keine Introns mehr. Die RNA wurde wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben aufgereinigt. Mögliche Verunreinigungen der isolierten RNA mit genomischer DNA, wurden mittels eines Desoxyribonuklease I (DNaseI)-Verdau, entfernt. Dafür wurde 1  $\mu\text{g}$  RNA mit 1 U DNaseI 15 min bei Raumtemperatur verdaut und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Stopp-Puffer (50 mM EDTA) und Inkubation bei 70 °C für 10 min gestoppt. Nach dem DNaseI-Verdau wurde die Konzentration der RNA spektrophotometrisch mit dem NanoDrop

bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.9). Die darauffolgende Reverse Transkription erfolgte in zwei Schritten mithilfe des „*Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis*“ Kits von Roche. Zunächst wurde wie im Folgenden dargestellt ein Reaktionsansatz angesetzt, der neben der DNaseI-verdauten RNA noch *random* Nukleotidhexamere enthält. Diese dienen als zufällige Primer für die später verwendete reverse Transkriptase, die den zur RNA komplementären cDNA-Strang synthetisiert.

**Reaktionsansatz I:**

400 ng	DNaseI-verdaute RNA
2 µl	Random Hexamere (600 µM)
Ad 11,4 µl	ddH <sub>2</sub> O

Reaktionsansatz I wurde für 10 min bei 65 °C erhitzt und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Im zweiten Schritt wurden die restlichen Komponenten die zur cDNA-Synthese benötigt wurden, zu Reaktionsansatz I gegeben. Die Reaktion zur finalen Herstellung der cDNA setzt sich wie folgt zusammen:

**Reaktionsansatz II:**

11,4 µl	Reaktionsansatz I
4 µl	5x Reaktionspuffer
0,5 µl	Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)
2 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
1 µl	DTT (0,1 M)
1,1 µl	Transkriptase (9 U/µl)

Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 50 °C inkubiert und die Synthese anschließend durch Erhitzen auf 85 °C für 5 min gestoppt.

### 3.3.8. *In vitro* RNA-Synthese und Poly-Adenylierung

Bei der *in vitro* Synthese von cRNA wird der komplementäre RNA-Strang zu einer DNA-Matrize synthetisiert. Die so synthetisierte cRNA wurde zur Injektion von Zebrafisch-Oozyten genutzt (siehe Abschnitt 3.6.5). Bei den hier durchgeführten Versuchen dienten linearisierte Plasmide (siehe Abschnitt 3.3.4), welche über eine Phenol/Chloroform-Extraktion RNase-frei aufgereinigt wurden (siehe Abschnitt 3.2.6), als DNA-Matrize. Im Fall der cRNA-Generierung der unterschiedlichen TALEN-Paare (siehe Abschnitt 3.3.9), wurden pro TALEN 2,5 µg des Plasmids, welches die gewünschte Matrizensequenz für einen TALEN enthält, mit dem Restriktionsenzym *PmeI* über Nacht bei 37 °C verdaut (siehe Abschnitt 3.3.4). Anschließend wurde mittels Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.3.3) überprüft, ob die komplette Plasmidmenge verdaut wurde. Die Aufreinigung des linearisierten Plasmids erfolgte wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben über eine Phenol/Chloroform-Aufreinigung. An-

schließlich wurde das aufgereinigte Plasmid über eine modifizierte Ethanol-Fällung präzipitiert (siehe Abschnitt 3.2.7) und in 5 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Für die cRNA-Synthese wurde das „*MessageMAX T7 ARCA-Capped Message Transcription*“-Kit von Cellscript verwendet. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur angesetzt.

<b>Reaktionsansatz:</b>	Ad 10 µl	ddH <sub>2</sub> O
	500 ng	linearisiertes Plasmid
	1 µl	10x MessageMAX T7 Transcription buffer
	4 µl	MessageMAX ARCA Cap/NTP Pre-Mix (22.5 mM ATP, CTP,UTP; 4.5 mM GTP, 18 mM ARCA)
	1 µl	DTT (100 mM)
	0,25 µl	ScripGuard™ RNase Inhibitor
	1 µl	MessageMAX T7 Enzymlösung

Zur Synthese wurde dieser Ansatz bei 37 °C 30 min inkubiert. Um die Plasmid-DNA, die als Matrize für die cRNA-Synthese gedient hat, zu entfernen, wurden anschließend 0,5 µl DNaseI (1 U/µl) zum Reaktionsansatz zugegeben und der Ansatz 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Aufreinigung wurde die synthetisierte cRNA über eine Lithiumchlorid-Fällung präzipitiert (siehe Abschnitt 3.2.8). Um den Erfolg der Synthesereaktion zu prüfen, wurde anschließend 1 µl des Reaktionsansatzes entnommen und gelelektrophoretischen aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.3.3).

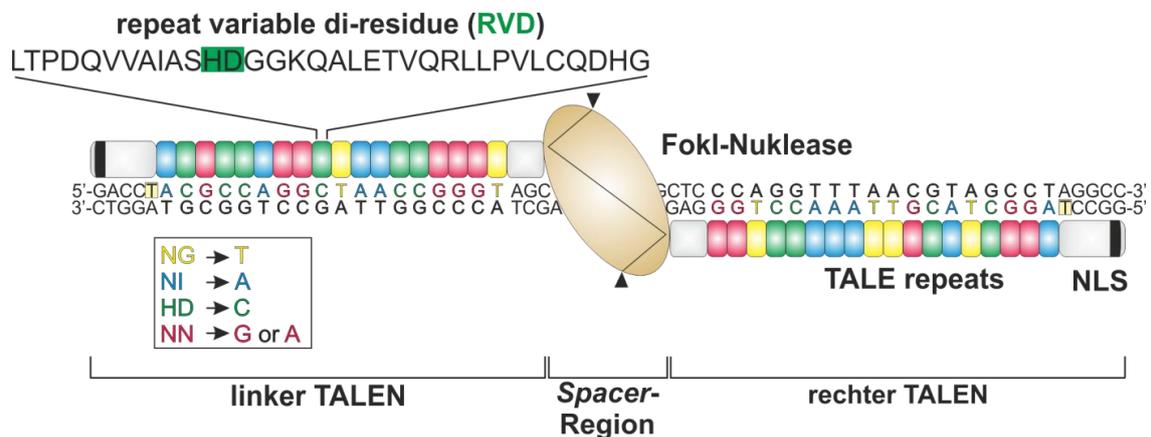
Um die Stabilität der synthetisierten cRNA zu erhöhen wurden mittels des „*A-Plus Poly(A) Polymerase Tailing*“-Kits von Cellscript zusätzliche Adenin-Nukleotide an das 3'-Ende angehängt. Hierzu wurden 75,5 µl der resuspendierten cRNA bei 65 °C für 10 min erhitzt. Zudem wurde folgender Reaktionsmix angesetzt:

<b>Reaktionsmix:</b>	10 µl	10x A-Plus™ Poly(A) Tailing Puffer
	10 µl	ATP (10 mM)
	2,5 µl	RiboGuard RNase Inhibitor (40 U/µl)
	2 µl	Polymerase (4 U/µl)

Der Reaktionsmix wurde zur denaturierten cRNA gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der polyadenylierten cRNA erfolgte über das *RNeasy Mini Kit* von Qiagen (siehe Abschnitt 3.2.3). Es wurde in 30 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Der Erfolg der Polyadenylierung wurde durch Auftrennung von 1 µl aufgereinigten cRNA auf einem Agarosegel (siehe Abschnitt 3.3.3) überprüft.

### 3.3.9. Generierung von TALEN-Konstrukten gegen *atf6*

TALEN sind Fusionsproteine aus einer DNA-Bindedomäne (TALE-Domäne) und der DNA-Doppelstrangbruch-induzierenden FokI-Nuklease. Die TALE-Domäne vermittelt die Erkennung und Bindung einer spezifischen DNA-Sequenz. Sie enthält hierzu eine repetitive Abfolge kurzer Aminosäuresequenzen, die sogenannten *Repeats*. Diese *Repeats* (oder TALE-Monomere) besitzen eine Länge von 34 Aminosäuren und unterscheiden sich nur an den zwei variablen Positionen 12 und 13, auch *repeat variable di-residues* (RVDs) genannt (Abb. 7). Die Identität der Aminosäurereste an diesen beiden Positionen bestimmt das Nukleotid, welches das *Repeat* erkennt und bindet. Basierend auf der zu bindenden DNA-Sequenz, werden die einzelnen TALE-Monomere aneinander gehängt, um spezifisch an die gewünschte DNA-Sequenz von 16 – 18 bp binden zu können (Abb. 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der an die DNA gebundenen TALEN-Fusionsproteine.** RVD: *repeat variable di-residues*; NLS: *nuclear localization signal*, Kern-Lokalisations-Sequenz (verändert nach Auer et al., 2014).

Dieses Prinzip ermöglicht es TALEN zur spezifischen Genomeditierung einzusetzen, da für nahezu jede Position im Genom ein entsprechendes TALEN-Fusionsprotein artifizial hergestellt werden kann (Reyon et al., 2012; Schmid-Burgk et al., 2013). Die Auswahl der möglichen TALEN-Bindedomänen im Genom wird nur minimal eingeschränkt. Basierend auf den in Pflanzen natürlich-vorkommenden TALEs und deren Bindedomänen im Pflanzengenom (Boch et al., 2009; Moscou und Bagdanove, 2009), müssen auch die Zielsequenzen der artifizial hergestellten TALENs mit einer Thymin-Base beginnen (Sanjana et al., 2012).

Der unspezifische DNA-Doppelstrangbruch wird bei dieser Technologie mittels der Endonuklease FokI eingeführt. Da die FokI nur als Dimer aktiv ist (Bitinaite et al., 1998), müssen TALEN immer als Paare, die in unmittelbarer Nähe zueinander an die DNA binden,

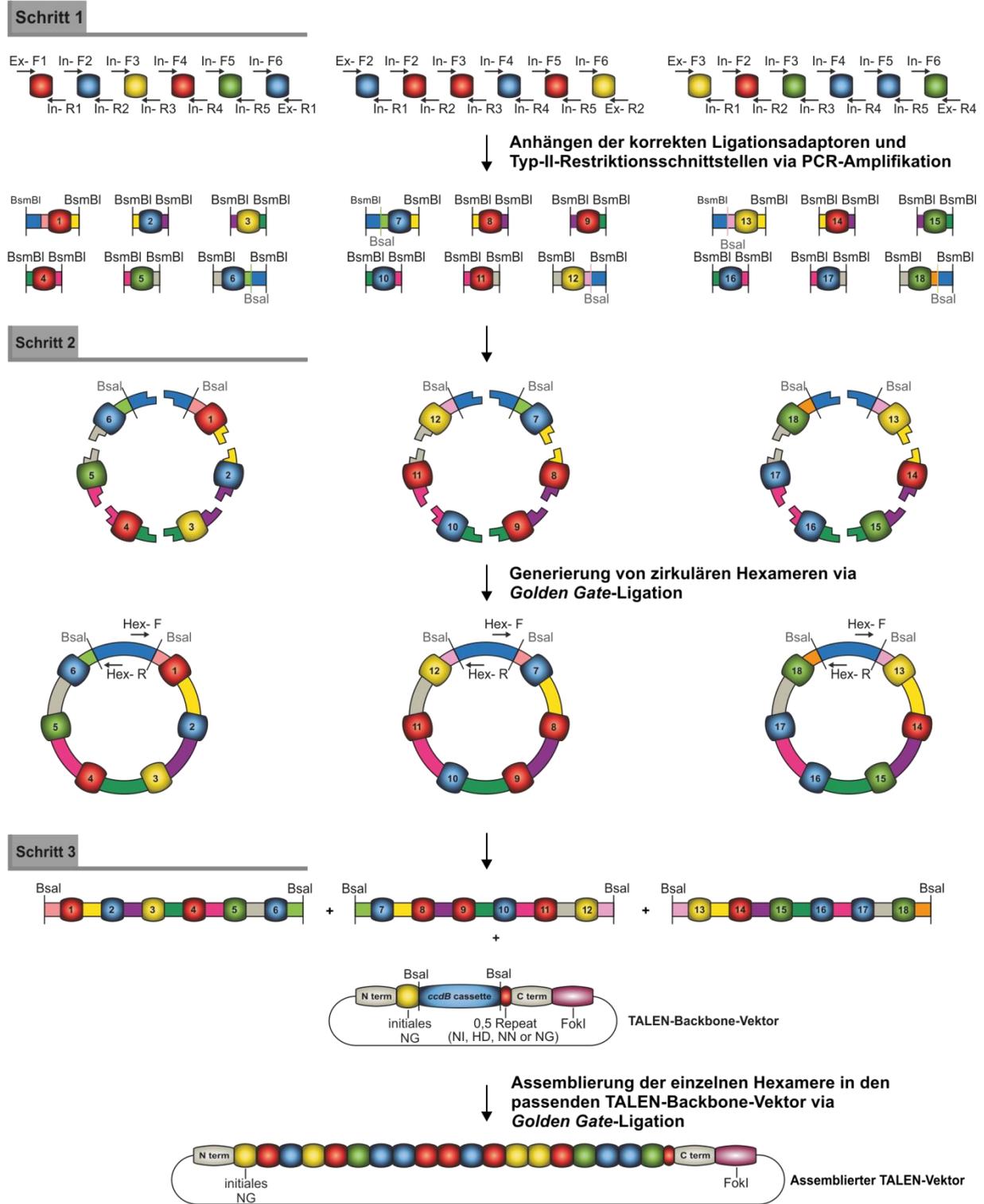
konstruiert werden. Der DNA-Doppelstrangbruch wird dann in der sogenannten *Spacer*-Region eingeführt, einer 14-20 bp großen Region, zwischen den beiden TALEN-Bindedomänen (Abb. 7). Zusätzlich besitzen TALEN-Dimere eine Kern-Lokalisations-Sequenz (NLS) mittels der sie an ihren Wirkungsort, den Zellkern, transportiert werden.

#### 3.3.9.1. Identifizierung geeigneter TALEN-Zielsequenzen in *atf6*

Mithilfe des Prädiktionsprogrammes TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 wurden zwei TALEN-Zielsequenzen in Exon 5 und Exon 6 des Zebrafisch-*atf6*-Gens identifiziert. Die Lage der TALEN-Bindestellen wurde so gewählt, dass im Fall von Leserastermutationen funktionell und strukturell essentielle Abschnitte des Atf6-Proteins nicht translatiert werden. Die Prädiktions-Einstellungen wurden so gewählt, dass jede TALEN-Zielsequenz sowie die *Spacer*-Region minimal 15 und maximal 18 Basen lang ist. Außerdem sollte die vorgelagerte Base ein Thymin darstellen. Für die finale Wahl der TALEN-Zielsequenz wurde zudem überprüft, ob die *Spacer*-Region eine Restriktionsenzymchnittstelle enthält, um später mithilfe eines Restriktionsenzym-Längenpolymorphismus‘ (RFLP) (siehe Abschnitt 3.3.9.3) die erfolgreiche TALEN-Aktivität nachweisen zu können. Als drittes TALEN-Paar wurde eine von Sander und Kollegen bereits publizierte TALEN-Zielsequenz gegen *atf6* ausgewählt (Sander et al., 2011, Addgene: TAL3406 und TAL3704).

#### 3.3.9.2. Klonierung von TALEN-Konstrukten

Die Generierung der unterschiedlichen TALEN-Konstrukte erfolgte mithilfe der TALEN-Toolbox nach dem Protokoll von Sanjana et al., 2012. Sie erfolgte in mehreren einzelnen Schritten, die im Folgenden dargestellt sind. Eine Übersicht des kompletten Generierungsvorgangs eines Beispiel-TALEN-Konstrukts mit 18 Monomeren ist in Abb. 8 schematisch dargestellt.



**Abbildung 8: Übersicht über die Klonierung eines TALEN-Konstruktes.** Das Schema basiert auf dem Beispiel eines 19,5-mer-Konstruktes. Die Klonierung eines TALEN-Konstrukts erfolgt in mehreren Schritten. **Schritt 1** (Monomer-Generierung): Die einzelnen Monomere werden mittels PCR amplifiziert, um spezifische Ligationsadaptoren anzuhängen. **Schritt 2** (Ligation der Monomere zu Hexameren): Die einzelnen Monomere werden über eine *Golden-Gate*-Ligation zu Hexameren ligiert. Die 5'-Enden der Monomere 1, 7 und 13 sowie die 3'-Enden der Monomere 6, 12 und 18 sind so konzipiert, dass jedes Hexamer eine zirkuläre Struktur bildet. **Schritt 3** (Assemblierung der Hexamere und Einbau in den Zielvektor): Die drei konstruierten Hexamere werden mittels PCR-Amplifikation linearisiert und in den entsprechenden TALEN-Backbone-Vektor integriert (*verändert nach Sanjana et al., 2012*).

Schritt 1: Monomer-Generierung

Um die einzelnen spezifischen TALEN-Konstrukte herzustellen, wurden im ersten Schritt die einzelnen TALE-Monomere generiert. Die Monomere wurden basierend auf Plasmiden (siehe Tabelle 2) über eine PCR amplifiziert, wobei über die verwendeten Primer (siehe Tabelle 6) Adaptoren und Restriktionsenzymststellen für die spätere Generierung und Assemblierung der Oligomere angehängt wurden. Für jedes Monomer wurde eine 100 µl PCR-Reaktion wie folgt angesetzt und anschließend auf einem Agarosegel 5 µl des PCR-Produktes überprüft.

<b>Reaktionsansatz:</b>	1 µl	Plasmid (5 ng/µl)
	1 µl	100 mM dNTP-Mix (5 mM je dNTP)
	20 µl	5x Herculase II Puffer
	2 µl	20 µM Primermix (10 µM je Primer)
	1 µl	Herculase II Fusion Polymerase
	(Ad 100 µl)	75 µl ddH <sub>2</sub> O

**Tabelle 21: Cycling-Protokoll der Monomergenerierung**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	20 sek	30
Annealing	60	20 sek	
Elongation	72	10 sek	
Finale Elongation	72	3 min	1

Nach erfolgreicher Generierung der einzelnen Monomere wurden diese mithilfe des *MinElute Reaction Cleanup Kits* aufgereinigt. Im Oligomer außen liegende Monomere wurden danach auf 18 ng/µl und innen liegende Monomere auf 15 ng/µl verdünnt.

Schritt 2: Ligation der Monomere zu Oligomeren

Die einzelnen Monomere wurden anschließend abhängig von der finalen TALEN-Länge zu Oligomeren (hier Tetra-, Penta- und Hexamere) ligiert. Die Anordnung der einzelnen Monomere im Oligomer wird hierbei an die zu bindende DNA-Sequenz angepasst, d.h. die Position und Abfolge der einzelnen Monomere ist spezifisch festgelegt. Die Oligomer-Generierung war in zwei separaten Schritten durchzuführen, d.h. aus den Monomeren wurden erst Tetra-, Penta- und Hexamere generiert, um anschließend aus zwei Hexameren und einem Pentamer bzw. zwei Hexameren und einem Tetramer die 16- bzw. 17-mere zu generieren. Dieses Vorgehen bietet den Vorteil, dass man nicht für jedes der Monomere einzigartige Adaptoren generieren muss. Das erste Monomer, das die initiale Thymin-Base der Zielsequenz bindet,

sowie das letzte halbe Monomer sind im Backbone-Vektor enthalten und werden daher bei der Oligomer-Generierung nicht berücksichtigt. Die jeweiligen Oligomere wurden via *Golden-Gate*-Ligation assembliert. Das Besondere an dieser Klonierungsart besteht darin, dass Restriktionsverdau sowie Ligation mehrerer DNA-Fragmente simultan und gerichtet durchgeführt werden können. Hierfür werden sogenannte TypII-Restriktionsenzyme verwendet, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden und nicht-palindromische Überhänge bilden. Die *Golden-Gate*-Ligation wurde wie folgt angesetzt:

**Reaktionsansatz:**

- 0,75 µl *Esp3I* (*BsmBI*, 10 U/µl)
- 1,5 µl Tango Puffer (10x)
- 1,5 µl DTT (10 mM)
- 0,25 µl T7 Ligase (3000 U/µl)
- 1,5 µl ATP (10 mM)
- X µl Monomere (1 µl je Monomer)
- Ad 15 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Reaktion wurde wie nachfolgend beschrieben inkubiert.

Inkubationstemperatur	Dauer	Zyklen
37 °C	5 min	30
20 °C	5 min	

Um nicht-zirkuläre Ligationsprodukte aus der Reaktion zu entfernen wurde ein Verdau mit der PlasmidSafe DNase durchgeführt.

**Reaktionsansatz:**

- 7 µl *Golden-Gate*-Reaktion
- 1 µl PlasmidSafe DNase (10 U/µl)
- 1 µl PlasmidSafe Reaktion Puffer (10x)
- 1 µl ATP (10 mM)

Um die Tetra-, Penta- und Hexamere später in den entsprechenden TALEN-*Backbone*-Vektor einbauen zu können, wurde jedes Oligomer mittels einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die PCR-Reaktion hierzu ist im Folgenden dargestellt:

**Reaktionsansatz:**

- 2 µl PlasmidSafe behandeltes Oligomer
- 3 µl 100 mM dNTP-Mix (5 mM je dNTP)
- 10 µl 5x Herculase II PCR Puffer
- 1,25 µl 20 µM Hex-F / Hex-R Primermix (10 µM je Primer)
- 0,5 µl Herculase II Fusion Polymerase
- (Ad 50 µl) 33,25 µl ddH<sub>2</sub>O

**Tabelle 22: Cycling-Protokoll zur Hexamer-Amplifizierung**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	20 sek	35
Annealing	60	20 sek	
Elongation	72	30 sek	
Finale Elongation	72	3 min	1

Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf einem präparativen 2 % Agarosegel aufgetrennt. Mittels Gelextraktion (siehe Abschnitt 3.2.4) wurde das gewünschte PCR-Fragment mit einer Länge von ca. 650-700 bp isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration jedes Oligomers auf 20 ng/µl eingestellt.

### Schritt 3: Assemblierung der Oligomere und Einbau in den Zielvektor

Die aufgereinigten Oligomere wurden über eine *Golden-Gate*-Ligation in den entsprechenden TALEN-*Backbone*-Vektor kloniert, um die einzelnen spezifischen TALEN-Konstrukte zu erhalten.

#### **Reaktionsansatz:**

1 µl	TALEN- <i>Backbone</i> Vektor (100 ng/µl)
0,75 µl	<i>Bsa</i> I-HF (20 U/µl)
1,5 µl	NEB4-Puffer (10x)
1,5 µl	BSA (10x)
1,5 µl	ATP (10 mM)
0,4 µl	T7 Ligase (3000 U/µl)
x µl	Aufgereinigte Hexamere (je 20 ng)
Ad 15 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die Reaktion wurde wie nachfolgend beschrieben inkubiert.

Inkubationstemperatur	Dauer	Zyklen
37 °C	5 min	30
20 °C	5 min	
80 °C	20 min	1

Um auch in diesem Schritt inkomplette, nicht-zirkuläre Ligationsprodukte zu entfernen, wurde der Ligationsansatz erneut wie oben beschrieben mit PlasmidSafeDNase verdaut. Die assemblierten TALEN-Konstrukte wurden danach wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben in chemisch kompetente *E.coli* Bakterien transformiert und positive Klone mittels Kolonie-PCR (siehe Abschnitt 3.3.2) unter Verwendung der Primer TALE\_seq\_F1 und TALE\_seq\_R1 ausgewählt. Aus Klonen, die ein *Insert* mit der korrekten Länge trugen, wurden anschließend Bakterienkulturen angesetzt und die Plasmid-DNA wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, iso-

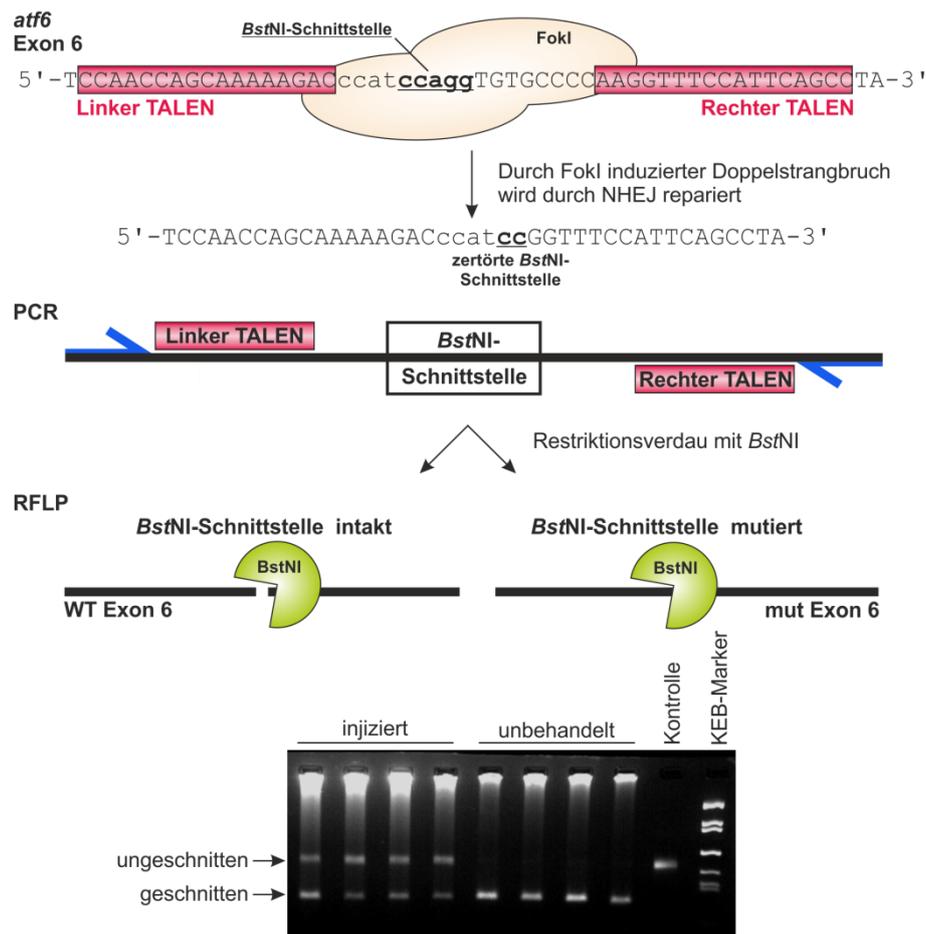
liert. Die erhaltenen Plasmide wurden anschließend auf ihre Richtigkeit und Vollständigkeit hin sequenziert (siehe Abschnitt 3.3.6). Hierzu wurden die Primer TALE\_seq\_F1, TALE\_seq\_F2 und TALE\_seq\_R1 verwendet. Die Referenzsequenzen wurden mithilfe des *TALE reference sequence generators* (<http://taletoolbox.genome-engineering.org/>) generiert.

### 3.3.9.3. Detektion der TALEN-Aktivität sowie TALEN-vermittelter Mutationen mittels RFLP

Der RFLP wird in der Molekularbiologie zum Beispiel dazu verwendet, um mit Hilfe eines Restriktionsverdau Mutationen in einem bestimmten DNA-Abschnitt, welcher über eine PCR amplifiziert wurde, zu detektieren. Das Verfahren beruht darauf, dass ein Restriktionsenzym den DNA-Doppelstrang nur schneiden kann, wenn seine individuelle Erkennungssequenz in dem zu untersuchenden DNA-Fragment vorhanden ist. Ist diese aufgrund einer Mutation verändert oder deletiert, kann kein Doppelstrangbruch mehr induziert werden. Die dadurch entstandenen in ihrer Größe unterschiedlichen PCR-Fragmente können anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert werden. Schematisch ist dies in Abb. 9 anhand von TALEN-Paar 3 dargestellt.

In dieser Arbeit wurde der RFLP mehrfach eingesetzt. Mittels dieser Methode wurde untersucht, ob die eingesetzten TALEN einen DNA-Doppelstrangbruch an der gewünschten Stelle im Genom induzieren. Außerdem wurde der RFLP bei der Analyse der somatischen Mutationsrate von potentiellen *Founder*-Fischen sowie der Genotypisierung von Zebrafischen angewandt.

Nach Einführung eines Doppelstrangbruches durch die TALE-gekoppelte Endonuklease FokI repariert die Zelle den Bruch mittels *non-homologous end-joining* (NHEJ), um beide DNA-Enden wieder miteinander zu verbinden. Während dieses Vorgangs entfernt und/oder inseriert die Zelle einige Basenpaare an jedem Strangende. Liegt die spezifische Restriktionsschnittstelle in unmittelbarer Nähe, wird diese im Zuge des NHEJ mit hoher Wahrscheinlichkeit zerstört (Abb. 9).



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der RFLP-Analyse.** Durch den Einsatz von Genomeditierungsmaßnahmen wie beispielsweise TALEN, wird ein DNA-Doppelstrangbruch nahe einer spezifischen Restriktionsenzymchnittstelle erzeugt. Die Zelle repariert den Strangbruch mittels NHEJ, wobei an beiden Strangenden Basenpaare deletiert und/oder inseriert werden. Liegt der Strangbruch in unmittelbarer Nähe zu der Restriktionsenzymchnittstelle, wird diese ebenfalls verändert bzw. zerstört. Das ausgewählte Restriktionsenzym (hier BstNI) kann somit den DNA-Doppelstrang nicht schneiden (mut Exon 6).

Für jedes getestete TALEN-Paar wurden Primer konzipiert (siehe Tabelle 23), die die Amplifikation des DNA-Abschnitts ermöglichen, der die *Spacerregion* und somit auch die spezifische Restriktionsschnittstelle enthält. Die Amplifikation dieses Abschnitts erfolgte mittels PCR (siehe Abschnitt 3.3.1) basierend auf genomischer DNA von Zebrafischlarven oder aus Schwanzflossenbiopsien (siehe Abschnitt 3.2.2). Die Amplikons wurden auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.3.3).

**Tabelle 23: Primer und Restriktionsenzyme für die PCR/RFLP-Analysen**

<b>TALEN</b>	<b>Primer</b>	<b>Restriktionsenzym (Inkubationstemperatur)</b>
atf6-TALEN1	atf6_TALEN1_F atf6_TALEN1_R	<i>BccI</i> (37 °C)
atf6-TALEN2	atf6_TALEN2_F atf6_TALEN2_R	<i>BseJI</i> (65 °C)
atf6-TALEN3	atf6_TALEN3_F atf6_TALEN3_R	<i>BstNI</i> (60 °C)

Die Restriktionsverdau wurden wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben und mit den in Tabelle 23 angegebenen Restriktionsenzymen angesetzt. Der Verdau erfolgte über Nacht. Anschließend wurde der komplette Verdauansatz via Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.3.3). Sollten Genomeditierungseffizienzen analysiert werden, erfolgte eine weitere Analyse mittels ImageJ (Schneider et al., 2012). Für jede Probe wurden sowohl die Intensitäten des unverdauten als auch des verdauten DNA-Fragments gemessen. Die weitere Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Es wurde der Anteil der unverdauten DNA im Verhältnis zur Gesamt-DNA gebildet und das Ergebnis in Prozent angegeben.

#### *3.3.9.4. Toxizitäts- und Effizienzbestimmung der unterschiedlichen TALEN-Paare*

Um die generierten TALEN-Paare hinsichtlich ihrer (I) Effizienz Genommutationen zu induzieren und (II) toxischer Nebeneffekte zu evaluieren, wurden unterschiedliche TALEN-cRNA-Mengen von 52 pg bis 298 pg pro Larve getestet, wobei das cRNA-Verhältnis aus linkem und rechtem TALEN 1:1 betrug. Die Injektionen in Oozyten im Einzell-Stadium erfolgten wie in Abschnitt 3.6.5 beschrieben. Jede Bedingung, d.h. jede getestete Konzentration pro TALEN-Paar wurde in mindestens drei unterschiedlichen Gelegen an zwei unabhängigen Versuchstagen getestet. Es wurden jeweils  $\frac{2}{3}$  eines Geleges injiziert, der Rest wurde als unbehandelte Kontrollen aufbewahrt. Zur Bestimmung der Toxizität wurde mithilfe der Entwicklungstabelle von Kimmel (Kimmel et al., 1995) der prozentuale Anteil morphologisch unauffälliger Larven und abgestorbener Eier/Larven bis zum Alter von 2 dpf ermittelt. Überstieg die Anzahl an deformierten und toten Larven in den unbehandelten Eiern bzw. Geschwister-Larven eine Grenze von 5 %, wurden die jeweiligen dazugehörigen injizierten Gelege nicht in die Toxizitätsberechnung und Effizienzbestimmung mit einbezogen.

Die Effizienz der einzelnen TALEN-Paare wurde mithilfe der PCR/RFLP-Analyse (siehe Abschnitt 3.3.9.3) bestimmt (Abb. 9). Die hierzu benötigte DNA aus 2 dpf alten Larven wur-

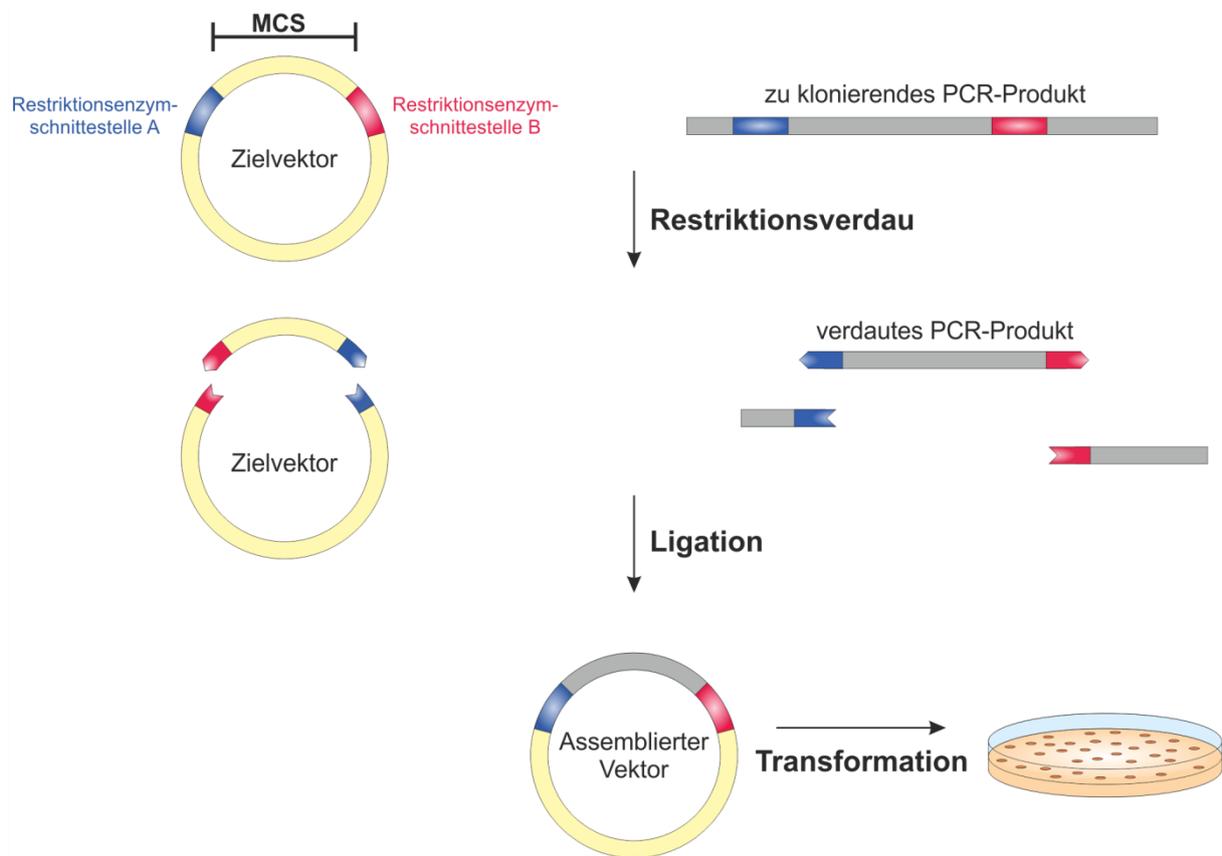
de wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, gewonnen. Die DNA von jeweils drei mit der gleichen Bedingung behandelte Larven wurde für die PCR-Amplifikation vereinigt. Der prozentuale Anteil der ungeschnittenen DNA im Verhältnis zur Gesamt-DNA entsprach der Effizienz des jeweiligen TALEN-Paares bei gegebener Injektionsmenge.

### **3.3.10. Generierung von Konstrukten zur heterologen Expression von ATF6/Atf6 in HEK293T-Zellen**

Um kommerzielle wie auch speziell für diese Arbeit generierte Antikörper gegen das humane, das murine oder das Zebrafisch-Atf6 auf ihre Spezifität hin zu testen, wurden Konstrukte zur heterologen Expression der unterschiedlichen ATF6-Proteine in HEK293T-Zellen generiert. Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen ATF6-Proteine in den Zellen exprimiert wurden, wenn unter Verwendung der zu testenden anti-ATF6-Antikörper keine Expression zu detekieren ist, wurden das murine und das Zebrafisch-Atf6 mit einem C-terminalen *myc*-His-Tag (*myc*-Epitop: 5'-EEKLISEEDL-3'; His-Epitop: 5'-HHHHHH-3') versehen. Das verwendete humane ATF6-Konstrukt enthielt bereits einen N-terminalen FLAG-Tag (von Ron Prywes zur Verfügung gestellt und von Addgene vertrieben: Plasmid # 11975; Chen et al., 2002; FLAG-Epitop: 5'-FDYKDDDDK-3'). Für das murine und das Zebrafisch-Atf6 wurde pcDNA3.1/*myc*-His A als Expressionsvektor verwendet. Die *ATF6*-Sequenz des humanen ATF6-Expressionkonstruktes wurde mittels Sequenzierung (siehe Abschnitt 3.3.6) mit den in Tabelle 10 aufgelisteten Primer verifiziert.

Die Generierung der unterschiedlichen Expressionskonstrukte erfolgte über die gerichtete Klonierung eines entsprechenden cDNA-Fragments in einen Zielvektor (Expressionsvektor). Die gerichtete Klonierung besteht aus mehreren Schritten, angefangen bei der Amplifikation des gewünschten DNA-Fragmentes mittels Proofreading-Polymerasen aus cDNA (siehe Abschnitt 3.3.1), über den Restriktionsverdau des Zielvektors und der amplifizierten Target-DNA-Sequenz (siehe Abschnitt 3.3.4) bis hin zur Ligation des Target-DNA-Inserts in den Zielvektor (siehe Abschnitt 3.3.5) und der Transformation kompetenter Zellen (siehe Abschnitt 3.1.1). Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Abb. 10 dargestellt.

Welcher Abschnitt der murinen *Atf6*- bzw. Zebrafisch-*atf6*-Sequenz in welchen Expressionsvektor kloniert wurde, sowie die verwendeten Restriktionsenzyme, sind in Tabelle 24 dargestellt. Als Ausgangsmaterial für die Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments wurde murine cDNA aus der Leber und cDNA aus 5 dpf alten Zebrafischlarven verwendet. Die zur Amplifikation verwendeten Primer sind in Tabelle 9 aufgeführt.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung einer gerichteten Klonierung:** Im ersten Schritt wird der Zielvektor und das entsprechende zu klonierende PCR-Produkt mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut, um ein gerichtetes Einschleusen der DNA in den Vektor zu ermöglichen. Die komplementären Überhänge am Vektor und am PCR-Produkt werden mithilfe einer DNA-Ligase enzymkatalysiert miteinander verbunden. Zur Vervielfältigung des assemblierten Vektors wird dieser in kompetente *E.coli* Bakterien transformiert und kultiviert.

**Tabelle 24: Verwendete Expressionsvektoren und Restriktionsenzyme zur Generierung der unterschiedlichen ATF6-Expressionskonstrukte**

	Klonierter Bereich	Expressionsvektor	Restriktionsenzyme
Murines ATF6	Gesamter ORF ohne das Stopp-Codon (c.1-1968)	pcDNA3.1/ <i>myc</i> -His A	<i>KpnI</i> , <i>NotI</i>
Zebrafisch-Atf6	Gesamter ORF ohne das Stopp-Codon (c.1-1959)	pcDNA3.1/ <i>myc</i> -His A	<i>KpnI</i> , <i>NotI</i>

### 3.3.10.1. Zielgerichtete Mutagenese des murinen und Zebrafisch-Atf6-Expressionskonstruktes

Durch die Klonierung der ausgewählten Sequenzen des murinen und Zebrafisch-*atf6* in Kombination mit der gewählten *NotI*-Schnittstelle kam es im Folgenden zu einer Leseraster-Verschiebung in der MCS des Expressionsvektors. Im Fall des murinen ATF6-Expressionskonstruktes entstand dadurch ein frühzeitiges Stopp-Codon, sodass der *myc*-His-

Tag nicht abgelesen werden konnte. Im Fall des Zebrafisch-Atf6-Expressionskonstruktes kam es ebenfalls zu einer Verschiebung des Leserasters in der MCS sowie im *myc*-His-Tag des Expressionsvektors. Um die korrekte Translation eines *myc*-His-Tags in beiden Expressionskonstrukten zu gewährleisten, wurden diese über eine zielgerichtete Mutagenese (*in vitro* Mutagenese (IVM)) verändert. Im Fall des murinen Expressionskonstruktes wurde die dritte Base der XbaI-Schnittstelle (Thymin) in der MCS deletiert, im Falle des Zebrafisch-Expressionskonstruktes wurde die erste Base (Guanin) der NotI-Schnittstelle in der MCS deletiert. Die Mutagenese erfolgt mittels einer PCR unter Verwendung von Primern, die die ausgewählte Stelle, an der die Mutation eingeführt werden soll, überlagern und so die Mutation über Fehlpaarungen (*mismatches*) in das entstehende PCR-Produkt inserieren. Die hierfür verwendeten Primer sind in Tabelle 9 aufgeführt. Der Reaktionsansatz sowie das *Cycling*-Protokoll sind im Folgenden dargestellt:

<b>Reaktionsansatz:</b>	5 µl	10x PfuUltra II Puffer
	2 µl	dNTP-Mix (je dNTP 5 mM)
	125 ng	<i>Forward</i> Primer
	125 ng	<i>Reverse</i> Primer
	20 ng	<i>Template</i> -Plasmid
	1 µl	PfuUltra II Fusion HS Polymerase (5 U/µl)
	Ad 50 µl	ddH <sub>2</sub> O

**Tabelle 25: *Cycling*-Protokoll einer IVM-PCR**

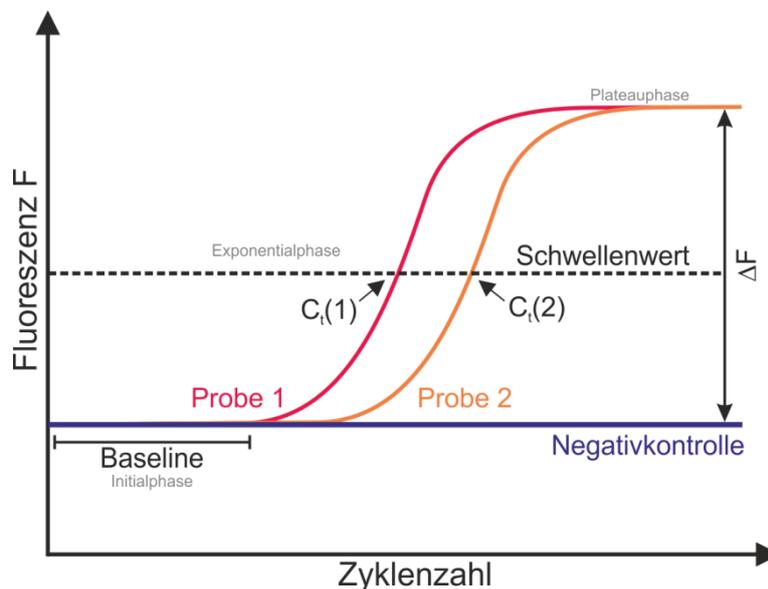
Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	92	1 min	1
Denaturierung	92	30 sek	16
Annealing	55	1 min	
Elongation	68	15-30 sec/kb	
Finale Elongation	68	10 min	1

Nach der PCR wurde ein DpnI-Verdau durchgeführt, um das in der Reaktion enthaltene WT-Plasmid (*Template*-Plasmid) zu entfernen. Da DpnI nur methylierte DNA verdaut, wie sie beispielsweise nach Isolation aus Bakterien vorliegt, ist es mit dieser Methode möglich, nur das WT-Plasmid aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, ohne dabei das neu synthetisierte, nicht-methylierte, mutierte Plasmid zu beschädigen. Zu 40 µl des obigen Reaktionsansatzes wurde nach der PCR-Reaktion 1 µl DpnI gegeben und der Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert. Der Erfolg des Verdau wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung überprüft. Anschließend wurden die DpnI-aufgereinigten, neu synthetisierten Plasmide in kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert (siehe Abschnitt 3.1.1). Ob mittels der IVM die gewünschten Basen in den Plasmiden deletiert wurden, wurde durch die anschließende Sequenzierung (siehe Ab-

schnitt 3.3.6) einzelner Klone unter Verwendung Vektor-spezifischer (CMV\_for, BGH\_rev, Tabelle 5) sowie Insert-spezifischer Primer (Tabelle 10) überprüft.

### 3.3.11. Relative Quantifizierung von Expressionsunterschieden mittels quantitativer *Real Time* PCR

Bei der relativen Quantifizierung handelt es sich um ein Verfahren, in dem die Quantität, also die Menge der mRNA eines Zielgens relativ zur Menge an mRNA eines stabil exprimierten Referenz-Gens bestimmt wird (Livak und Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2004). Für die quantitative *Real Time* PCR (qRT-PCR) wurde das *QuantiTect*<sup>®</sup> *SYBR*<sup>®</sup> *Green PCR Kit* verwendet. Der enthaltene SYBR-Green-Fluoreszenz-Farbstoff interkaliert in die DNA, wodurch die Zunahme des PCR-Produktes in Echtzeit verfolgt werden kann. Die Fluoreszenzintensität nimmt proportional zur Menge der PCR-Produkte in der Probe zu. Mithilfe der gemessenen Fluoreszenzsignale kann die Quantifizierung in der exponentiellen Phase vorgenommen werden. Hierbei wird der  $C_t$ -Wert, d.h. die Zyklenzahl bei der die Fluoreszenzintensität einen bestimmten Schwellenwert überstiegen hat, ermittelt. (Abb. 11).



**Abbildung 11: Exemplarische Amplifikationskurve einer qRT-PCR.** Die Amplifikationskurve des Referenz-Gens (Probe1) ist in rot, die Amplifikationskurve eines Zielgens (Probe 2) ist in orange dargestellt. Die  $C_t$ -Werte der beiden Proben ( $C_t(1)$  und  $C_t(2)$ ) sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

In dieser Arbeit wurde die qRT-PCR genutzt, um quantitativ zu untersuchen, ob sich die Genexpressionen bzw. die Transkript-Mengen von *atf6* sowie anderer UPR-Gene durch den Ver-

lust von *atf6* ändern. Als Referenz-Gene wurden Gene gewählt, die unter den experimentellen Bedingungen stabil exprimiert werden. Die Stabilität der Expression der drei verwendeten Referenz-Gene *hprt1*, *g6pd* und *sdha* sowie die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse wurde mithilfe der „BestKeeper“-Software (Pfaffl et al., 2004) überprüft. Für die Quantifizierung wurden die zu untersuchenden Zielgene zunächst auf die Referenz-Gene normalisiert und anschließend die relativen Expressionsunterschiede zwischen den zu vergleichenden Proben ermittelt.

#### 3.3.11.1. Bestimmung der Amplifikationseffizienz der Primerpaare

Für alle Primerpaare, die zur Amplifikation der Referenzgene und Zielgene verwendet wurden, wurde vor der Verwendung in der qRT-PCR die jeweilige Amplifikationseffizienz bestimmt. Die Primerpaare wurden Exon-übergreifend entworfen, wobei die *Annealing*-Temperatur zwischen 58 °C und 62 °C lag und die Länge der Amplikons 89 bp bis 190 bp betrug. Die Effizienz *E* jedes einzelnen Primerpaars wurde anhand der Steigung der Standardkurve bestimmt, die durch unterschiedliche cDNA-Ausgangsmengen erstellt wurde. Hierzu wurde eine cDNA-Verdünnungsreihe mit mindestens 6 Messpunkten (1:5 – 1:200) in der qRT-PCR verwendet. Pro Primerpaar und cDNA-Verdünnung wurden Triplikate und von den Negativkontrollen Duplikate gemessen. Der Reaktionsansatz sowie das Cycling-Programm sind in Abschnitt 3.3.11.2 dargestellt. Die PCR erfolgte auf einem 7500 *Real Time* PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA).

Die Amplifikationskurven und die Ct-Werte wurden mithilfe der 7500 System SDS Software (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) ermittelt. Nach Beendigung der Amplifikation wurden die Proben denaturiert und die Schmelzkurven ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von Microsoft Excel (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Um die Effizienz *E* zu bestimmen, wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Ct-Wert-Triplikate berechnet und gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge aufgetragen. Die Steigung *m* einer durch diese Kurve gelegten Regressionsgeraden wurde anschließend verwendet, um mittels der folgenden Formel die Effizienz *E* zu bestimmen (Pfaffl, 2001; Pfaffl, 2004):

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

Eine Effizienz von 1 bzw. 100 % bedeutet in diesem Fall eine Verdopplung aller Amplikons in einem Amplifikationszyklus. Generell wurden für die qRT-PCR-Analyse nur Primer verwendet, die eine Effizienz von 0,9 bis 1,12 besaßen.

3.3.11.2. Durchführung und Ablauf der qRT-PCR

Eine Analyse der Transkript-Menge mittels qRT-PCR wurde für die UPR-assoziierten Gene *atf6*, *atf6β*, *hspa5*, *hsp90b1*, *ddit3*, *edem1*, *pdia3*, *ern1*, *eif2ak3* und *ero1β* in 3 dpf und 5 dpf alten Larven sowie in Retinae adulter Zebrafische durchgeführt (Gewinnung der Proben mittels RNA-Isolation und zur cDNA-Synthese gemäß Abschnitt 3.2.3 und Abschnitt 3.3.7). Um die Expression der einzelnen Gene zu normalisieren und experimentell bedingte Schwankungen in den C<sub>t</sub>-Werten auszugleichen, wurden drei unterschiedliche Haushaltsgene, *g6pd*, *hprt1* und *sdha*, ausgewählt. Die verwendeten Primer-Paare sind in Tabellen 11 und 12 aufgeführt. Für alle WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Proben wurden pro Primerpaar Triplikate und für die Negativkontrollen jeweils Duplikate angefertigt. Als Ausgangsmaterial wurde 10 ng an cDNA genutzt. Für die Negativkontrollen wurde anstatt cDNA Wasser verwendet. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzeugen, wurden drei unabhängige PCR-Läufe mit cDNA aus drei unabhängigen RNA-Isolationen durchgeführt. Die Reaktion, sowie das Cycling-Programm sind im Folgenden dargestellt:

**Reaktionsansatz:**                    10 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix  
     2 µl Forward Primer (5 µM)  
     2 µl Reverse Primer (5 µM)  
     5 µl cDNA (1:10-Verdünnung)  
     1 µl ddH<sub>2</sub>O

**Tabelle 26: qRT-PCR-Cycling-Protokoll**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	15 min	1
Denaturierung	94	15 sek	40
Annealing	58	30 sek	
Elongation	72	40 sek	
Finale	95	15 sek	1
Denaturierung	60	1 min	1
	95	15 sek	1

Die jeweiligen Schmelzkurven, Amplifikationskurven und Ct-Werte wurden mithilfe der 7500 System SDS Software (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) ermittelt.

3.3.11.3. Auswertung in der qRT-PCR generierter Daten

Die in der qRT-PCR generierten Daten bezüglich der relativen Expression der unterschiedlichen UPR-Gene zwischen WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischen wurden mithilfe des *Relative Expres-*

sion Software Tools 2009 (REST<sup>®</sup>, 2009; Qiagen, Hilden, Deutschland; Pfaffl et al., 2002) ausgewertet. Das Programm ermöglicht es unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen die relativen Expressionsunterschiede zu ermitteln. Die statistische Auswertung erfolgt mittels des *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation*-Tests (<https://www.gene-quantification.de/rest.html>).

### **3.4. Zellbiologische Techniken**

Die Kultivierung der HEK293T-Zellen sowie der Fibroblasten erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte im Brutschrank.

#### **3.4.1. Auftauen von HEK293T-Zellen und Fibroblasten**

Die Langzeitlagerung der HEK293T-Zellen sowie der Fibroblasten erfolgte in Kryo-Röhrchen in der Gasphase von Flüssigstickstoff. Nachdem ein Kryo-Röhrchen aus dem Gasktank entnommen wurde, wurde dieses vorsichtig bei Raumtemperatur in der Hand aufgewärmt. Dabei wurde der Deckel des Röhrchens vorsichtig um wenige Millimeter aufgedreht, damit beim Auftauvorgang möglicherweise entstehender Überdruck entweichen konnte. Die aufgetauten Zellen wurden anschließend in 10 ml Kulturmedium überführt und bei 200xg 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 ml Kulturmedium resuspendiert in eine Kulturflasche mit 15 ml Kulturmedium überführt. Die Kultivierung von HEK293T-Zellen erfolgte in T75-, die Kultivierung von Fibroblasten in T125-Kulturflaschen.

#### **3.4.2. Kultivierung und Splitten von HEK293T-Zellen**

HEK293T-Zellen wurden wie oben beschrieben im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden gesplittet, wenn eine Konfluenz von 80-90 % erreicht war. Hierfür wurden die HEK293T-Zellen zunächst mit Magnesium- und Kalzium-freiem DPBS gewaschen. Nach dem Absaugen des DPBS erfolgte das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche unter Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA und anschließender Inkubation für 2-3 min bei 37 °C. Die Zellen wurden durch leichtes Klopfen gegen die Flasche vom Boden abgelöst. Die Trypsin-Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 13 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei Raumtempera-

tur für 5 min bei 200xg pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 4 ml Kulturmedium resuspendiert. Wurden Zellen für eine am nächsten Tag folgende Transfektion benötigt, wurde das Zellpellet in 4 ml Transfektionsmedium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung, d.h. zum Anlegen einer Erhaltungskultur wurden montags 150 µl und freitags 200 µl der Zellsuspension in frisches, in einer T75-Kulturflasche vorgelegtes Kulturmedium ausgesät.

### 3.4.3. Kultivierung und Splitten von Fibroblasten

Fibroblasten (humane Fibroblasten sowie MEFs) wurden wie oben beschrieben im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden gesplittet, wenn eine Konfluenz von 80-90 % erreicht war. Hierfür wurden die Fibroblasten zunächst mit Magnesium- und Kalzium-freiem DPBS gewaschen. Nach dem Absaugen des DPBS erfolgte das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche unter Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA und anschließender Inkubation für 5-10 min bei 37 °C im Brutschrank. Die Zellen wurden durch Klopfen gegen die Flasche vom Boden abgelöst. Die Trypsin-Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 6 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Zur weiteren Kultivierung, d.h. zum Anlegen einer Erhaltungskultur wurden 3 ml der Zellsuspension in 17 ml frisches, in einer T125-Kulturflasche vorgelegtes Kulturmedium ausgesät. Die übrigen 3 ml der Zellsuspension wurden entweder verworfen oder für eine folgende Protein-Isolation in 6 cm-Schalen überführt, mit 2 ml Kulturmedium aufgefüllt und für weitere 48 h kultiviert.

### 3.4.4. Transfektion von HEK293T-Zellen

Die HEK293T-Zell-Linie wurde als heterologes Expressionssystem für ATF6 von *H. sapiens*, *D. rerio* und *M. musculus* verwendet. Die Transfektion der HEK293T-Zellen mit aufgereinigten Expressionskonstrukten erfolgte mittels Lipofektion unter Verwendung von Lipofectamin 2000. Einen Tag vor der Transfektion, d.h. im Zuge des Split-Prozesses der Erhaltungskultur wurden 200 µl der dabei generierten 4 ml Zellsuspension in 2 ml Transfektionsmedium pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Am Tag der Transfektion besaßen die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 %. Für die Transfektion selbst wurden pro zu transfizierendem Well zwei Reaktionsgemische angesetzt. Die hier angegebenen Mengen beziehen sich jeweils auf ein Well einer 6-Well-Platte. Hierfür wurden zunächst 20 µl Lipofectamin 2000 und 230 µl OPTIMEM-Medium gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Plasmid-OPTIMEM-Gemisch hergestellt. Hierzu wurde

ein entsprechendes Volumen Plasmidlösung, das 10 µg Plasmid-DNA enthielt mit OPTIMEM-Medium auf 250 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die beiden Reaktionsgemische vereinigt, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf die ausgesäten Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 5-6 h im Brutschrank wurden die Zellen für immunocytochemische DAB-Färbungen in eine 24-Well Platte oder für spätere Protein-Isolationen in 6 cm-Schalen umgesetzt. Hierfür wurden die Zellen pro Well zunächst mit 3 ml DPBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 500 µl Trypsin/EDTA und einer Inkubation von 2-3 min bei 37 °C vom Boden des Well abgelöst. Die Trypsin-Reaktion wurde durch die Zugabe von 6 ml Kulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen bei 200xg für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Wurden die Zellen für eine Protein-Isolation benötigt, wurde die gesamte Zellsuspension in eine 6 cm-Schale überführt, diese mit Kulturmedium auf 5 ml aufgefüllt und die Zellen weitere 48 h im Brutschrank kultiviert. Wurden die transfizierten Zellen für immunocytochemische Färbungen verwendet, wurden je 50 µl der Zellsuspension pro Well in eine 24-Well-Platte ausgesät und die Zellen weitere 24 h im Brutschrank kultiviert.

### **3.5. SDS-Page und Western Blot**

#### **3.5.1. Isolierung von Proteinen aus HEK293T-Zellen und Fibroblasten**

Die Zellen wurden unter Verwendung von 1 ml Trypsin/EDTA und 10 ml Kulturmedium wie in Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3 beschrieben geerntet. Das Zellpellet wurde anschließend dreimal in DPBS gewaschen bevor es in 300 µl RIPA-Membran-Puffer resuspendiert wurde. Um die Zellen aufzuschließen wurde das resuspendierte Zellpellet in Flüssigstickstoff eingefroren und durch Erwärmen in der Hand wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Zellnuklei sowie größere Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (470xg, 4 °C, 20 min) abgetrennt. Der Überstand enthielt die Proteine und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

#### **3.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung der Konzentration der isolierten Proteine wurde der Bradford-Assay (Bradford 1976; Compton und Jones, 1985) verwendet. Mittels einer BSA-Verdünnungsreihe aus

BSA-Stocklösung mit Konzentrationen von 1000 µg/µl bis 10 µg/µl wurde eine Standardkurve (Tabelle 27) erstellt.

**Tabelle 27: Pipettierschema zur Erstellung einer BSA-Standardkurve für den Bradford-Assay**

Sollkonzentration [µg/µl]	BSA-Menge [µl]	ddH <sub>2</sub> O [µl]
1000	10 µl der 10 mg/ml Lösung	90
500	50 µl der 1000 µg/ml Lösung	50
250	50 µl der 500 µg/ml Lösung	50
100	10 µl der 1000 µg/ml Lösung	90
50	10 µl der 500 µg/ml Lösung	90
20	20 µl der 100 µg/ml Lösung	80
10	10 µl der 100 µg/ml Lösung	90

Die Proteinproben wurden für die Messung 1:10 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die Bradford-Lösung wurde 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und je 1 ml in Küvetten vorgelegt. Zu der vorgelegten Bradford-Lösung wurden entweder 10 µl ddH<sub>2</sub>O als Referenzprobe, 10 µl der BSA-Verdünnungen zur Erstellung der Standardkurve oder 10 µl der verdünnten Proteinprobe gegeben. Die Küvetten wurden mit Parafilm verschlossen, die Proben durch Invertieren der Küvette gemischt und 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Vermessung erfolgte anschließend am Photospektrometer bei 595 nm. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen. Mittels der gemessenen optischen Dichte der Proteinproben aus der BSA-Standardreihe konnte die Konzentration der einzelnen Proteinproben abgeleitet werden.

### 3.5.3. Durchführung der SDS-Page und des Western Blots

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden denaturierende Polyacrylamid-Gele (Zusammensetzung siehe Tabelle 28) verwendet. Für die Gelelektrophorese wurde das Mini-Protean@3-System der Firma Bio-Rad Laboratories verwendet.

**Tabelle 28: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele.** Die Volumina sind jeweils für die Herstellung eines Gels angegeben.

	Trenngel (8 %)	Sammelgel
ddH <sub>2</sub> O	4,6 ml	3,4 ml
30 % Acrylamid	2,7 ml	830 µl
Trenngel- / Sammelgel-Puffer	2,5 ml	830 µl
10 % SDS	100 µl	50 µl
10 % APS	100 µl	50 µl
TEMED	6 µl	5 µl

Zur Auftrennung wurden 20 µg bis 100 µg Protein verwendet. Zur Vorbereitung der Proben wurde die benötigte Proteinmenge in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit ddH<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt und mit 4 µl Laemmli-Puffer versehen. Die gesamte Probenvorbereitung er-

folgte auf Eis. Zur Denaturierung wurden die Proteinproben für 5 min bei 99 °C im Thermo- schüttler erhitzt. Anschließend wurde sie auf das Gel geladen. Als Protein-Größenstandard wurde der *Novex Sharp Pre-Stained* Protein-Standard (10 µl pro Spur) verwendet. Der Gellauf erfolgte in einem Tris-haltigen SDS-Laufpuffer bei 20 mA pro Gel bei Raumtempera- tur. Die Auftrennung der Proben wurde anhand der Lauffront des im Laemmli-Puffer enthal- tenen Bromphenolblaus sowie der sichtbaren farbigen Markerbanden verfolgt und dauerte etwa 1,5 h. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte in einem Mini Trans Blot-System der Firma BioRad-Laboratories für 1 h bei 200 mA bei Raumtemperatur mit Towbin-Puffer. Zur Kühlung wurde ein in das System einbaubarer Eisakku verwendet. Der Erfolg des Proteintransfers auf die Nitrozellulose-Membran sowie die Qualität der Auf- trennung wurden mittels einer Ponceau-S-Färbung überprüft. Der Farbstoff wurde anschlie- ßend durch mehrmaliges Waschen mit entsalztem Wasser wieder von der Membran entfernt.

Für die anschließenden Wasch- und Inkubationsschritte zur Proteindetektion wurde die Membran in eine Kunststoffschale auf einem Wipptisch überführt. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min bei Raumtemperatur in 1xTBS gewaschen. Der Blockier-Schritt erfolgte dann ebenfalls bei Raumtemperatur für 1 h in 5 % MMP-TBST. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für 10 min bei Raumtemperatur in 1xTBS gewaschen, bevor sie mit dem Primär-Antikörper inkubiert wurde. Da unterschiedliche Primär-Antikörper verwen- det wurden, wurde die Membran vor der Primär-Antikörper-Inkubation mithilfe der Marker- banden entsprechend geschnitten. Die Primär-Antikörper wurden in 5 % MMP-TBST ver- dünnt (siehe Tabelle 29) und die Membran darin über Nacht bei 4 °C inkubiert.

**Tabelle 29: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für den Westernblot**

Antigen	Antikörper
Humanes ATF6 , murines ATF6, Zebrafisch-Atf6	<b>Primär:</b> Entsprechende zu testende anti-ATF6-Antikörper (1:500)
	<b>Sekundär:</b> Der Spezies entsprechende HRP-Antikörper (1:4000)
<i>myc</i> -Tag	<b>Primär:</b> Maus anti- <i>myc</i> (1:700)
	<b>Sekundär:</b> Ziege anti-Maus-HRP (1:10 000)
FLAG-Tag	<b>Primär:</b> Maus anti-FLAG (1:1000)
	<b>Sekundär:</b> Ziege anti-Maus-HRP (1:10 000)
GAPDH	<b>Primär:</b> Maus anti-GAPDH (1:500)
	<b>Sekundär:</b> Ziege anti-Maus-HRP (1:10 000)

Am folgenden Tag wurde die Membran erneut dreimal in 1xTBS für je 10 min bei Raumtem- peratur gewaschen, um nicht gebundene Primär-Antikörper-Moleküle zu entfernen. Anschlie- ßend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem in 5 % MMP-TBST verdünnt- en HRP-gekoppelten Zweitantikörper (siehe Tabelle 29) inkubiert. Zur Detektion wurde die

Membran 2 min mit dem *Western Lightning*<sup>®</sup> *ECL Plus Kit* behandelt. Die Proteinbanden wurden auf licht-sensitiven Filmen bei einer Belichtungszeit von bis zu 1 h unter Verwendung einer Filmentwicklungsmaschine detektiert.

### **3.6. Tierexperimentelle Methoden**

Die Haltung und Zucht der Zebrafische sowie alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden entsprechend den Auflagen der Universität Tübingen zur Haltung und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt und im Tierversuchsantrag mit der Nummer AK5/16 genehmigt.

#### **3.6.1. Haltung von Zebrafischen**

Die Haltung der Zebrafische erfolgte in einer Aquarienanlage der Firma AQUA SCHWARZ GmbH (Göttingen, Deutschland). Die adulten Tiere wurden in Gruppen von maximal 5 Tieren pro Liter bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14/10 h gehalten. Das Fischwasser hatte eine durchschnittliche Temperatur von 27 °C und bestand aus einem Leitungswasser/VE-Wassergemisch, sodass die Gesamtwasserhärte zwischen 9-10 °dH, die Leitfähigkeit zwischen 150-1000 µS und der pH-Wert zwischen 7-8 lag. Zweimal täglich wurden die adulten Zebrafische mit selbst angezogenen Artemien (Great Salt Lake Artemia, Sander, Mt. Green, UT, USA) gefüttert. Die Anzucht der Artemien erfolgte durch Kultivierung von Artemien-Eiern in 37 °C warmem Salzwasser für 24 h. Während dieser Zeitspanne schlüpfen die Artemien und können anschließend für die Fütterung aufbereitet werden.

#### **3.6.2. Zucht und Aufzucht von Zebrafischen**

Um die Zebrafische zu züchten wurden Verpaarungsboxen (Firma AQUA SCHWARZ) mit einem Volumen von 1 l verwendet. Die Verpaarung der Fische erfolgte am späten Nachmittag oder frühen Abend. Hierzu wurden ein weiblicher und ein männlicher Zebrafisch in eine Verpaarungsbox mit einem Einsatzsieb und einer Grasattrappe gesetzt. Das Einsatzsieb bewirkt eine räumliche Aufteilung der Verpaarungsbox, sodass die abgelaichten Eier durch den Siebboden des Einsatzes in das untere Drittel der Verpaarungsbox absinken und von den adulten Fischen nicht mehr gefressen werden können. Meist erfolgte die Eiablage am nächsten Morgen kurz nach Einsetzen der Lichtphase. Wurden Eier für die Injektion von TALENs oder für

zeitlich abgestimmte histologische Experimente benötigt, wurden die Zebrafischpaare räumlich getrennt in die Verpaarungsboxen gesetzt; das Männchen in das untere Drittel der Box unter den Siebeinsatz, das Weibchen in den oberen Bereich des Siebeinsatzes. Am nächsten Morgen wurden die Pärchen nach und nach in den Siebeinsatz zusammengesetzt, wodurch eine zeitlich abgestimmte Eiablage erzielt wurde und die Eier insbesondere zur Injektion im Einzell-Stadium vorlagen.

Die gelegten Eier wurden zum Sammeln vorsichtig durch ein Teesieb abgesehen und mit E3-Medium in eine Petrischale überführt. Anschließend wurden die Gelege sortiert. Hierbei wurden alle unbefruchteten Eier aussortiert und die Anzahl Eier pro Petrischale auf maximal 60 Stück begrenzt. Die Aufzucht der Larven erfolgte in einem Brutschrank (Inkubationsschüttler Infors HT Ecotron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 28 °C, sodass ihre Entwicklung mit in der Literatur beschriebenen Entwicklungsstadien abgeglichen werden konnte (Kimmel et al., 1995). Bis zum Alter von 5 dpf wurden die Gelege auf abgestorbene, morphologisch auffällige, entwicklungsverzögerte Larven und Larven, die bei 3dpf nicht selbstständig geschlüpft sind, überprüft. Im Alter von 6 dpf wurden die Larven in Aquaboxen in 1 l Fischwasser mit einer Besatzdichte von maximal 45 Larven pro Tank überführt. Bis 9 dpf wurde bei Bedarf ein Wasserwechsel von maximal 300 ml pro Tag durchgeführt, ansonsten fand keine Frischwasserzufuhr statt. Mit 10 dpf und 11 dpf wurde der Wasserstand im Tank jeweils um ca. 300 ml erhöht und mit 12 dpf wurden die Tanks an die Frischwasserzufuhr der Zebrafischanlage angeschlossen. Die Frischwasserzufuhr erfolgte zunächst nur tropfenweise und wurde mit steigendem Alter der Larven erhöht. Im Alter von 6 dpf bis 11 dpf wurden die Larven mit Paramecien und Staubfutter (ST-1, Firma AQUA SCHWARZ) gefüttert. Mit 12 dpf erfolgte eine Umstellung des Futters auf Artemien, wobei bis zum Alter von 2 mpf (*month post fertilization*) weiterhin parallel Trockenfutter (ST-1 und/oder ST-3, Firma AQUA SCHWARZ) gefüttert wurde.

### 3.6.3. Anästhesie und Euthanasie von Zebrafischen

Zebrafischlarven und adulte Zebrafische wurden vor Experimenten durch eine Überdosis Tricain (>200 µg/ml) betäubt. Adulte Tiere wurden durch eine anschließende Dekapitation und Larven durch einen anschließenden Kälteschock, d.h. eine Inkubation in E3-Medium auf Eis für 15 min, getötet.

### 3.6.4. Entnahme von Schwanzflossenbiopsien

Um DNA eines bestimmten adulten Zebrafisches beispielsweise zur Genotypisierung zu erhalten, wurde dieser zunächst in mit Tricain versetztem Fischwasser (200 µg/ml) anästhesiert und anschließend ein kleines Stück der Schwanzflosse mithilfe einer Skalpellklinge abgetrennt. Der Fisch wurde nach der Biopsie in ein Becken mit Fischwasser gesetzt und das Tricain so lange aus den Kiemen gespült, bis er wieder bei Bewusstsein war und selbstständig stabile Schwimmbewegungen ausführen konnte. Um die DNA aus der Schwanzflossenbiopsie zu isolieren, wurde diese wie in Abschnitt 3.2.2 weiterverarbeitet. Anschließend wurde jeder Fisch einzeln in einem separaten mit Fischwasser gefülltem 1 l Tank gesetzt, in dem er bis zur Beendigung des gesamten Genotypisierungsvorganges, maximal aber 48 h, gehalten wurde.

### 3.6.5. Injektion von Zebrafischoozyten

Für die Generierung von Zebrafischoozyten wurden WT-Fische der TUE-Linie wie in Abschnitt 2.4.2 zeitlich abgestimmt verpaart, um eine Injektion der Oozyten im Einzell-Stadium, d.h. innerhalb der ersten 20 min nach Ablage, gewährleisten zu können. Hierzu wurden immer drei Zebrafischpaare in ihren Siebeinsätzen zusammengesetzt und die Ei-Ablage abgewartet, bevor weitere Paare zusammengesetzt wurden. Die Zebrafischoozyten wurden im Einzell-Stadium mit *in vitro* synthetisierter cRNA injiziert. Die Injektion erfolgte unter einem Binokular (Stereomikroskop SZX7, Olympus Europa SE & Co.KG, Hamburg, Deutschland). Zusätzlich bestand der Injektionsplatz aus dem FemtoJet Microinjektor (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit Fußpedal und einem Mikromanipulator (Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co.KG, Wetzlar, Deutschland), in den die Injektionsnadel eingespannt wurde.

Die Injektionsnadeln wurden aus Borsilikat-Glaskapillaren (0,58x1,0x100 mm) mithilfe eines Pullers (PC-10, Narishige Scientific Instrument Lab, Tokyo, Japan) gezogen. Da diese nach dem Ziehen am vorderen Ende geschlossen sind, wurden sie unmittelbar vor der Injektion vorsichtig mit einer Pinzette aufgebrochen. Befüllt wurden die Injektionsnadeln rückseitig unter Zuhilfenahme einer Microloader-Pipettenspitze mit ungefähr 10 µl der Injektionslösung. Die Injektionslösung wurde zur visuellen Kontrolle der Injektion mit 0,1 % (v/v) Phenolrot versetzt.

Um die Injektionsnadel zu kalibrieren und auf ein Injektionsvolumen von 3 nl einzustellen, wurde zuerst in Halocarbonöl 27, das in einen Objektträger mit eingeschliffener Delle vorgelegt war, injiziert. Das Injektionsvolumen konnte über die Tropfengröße, welche anhand eines Okulars mit Strichplatte bestimmt wurde, ermittelt und durch Anpassen des Injektionsdruckes

und der Injektionszeit am FemtoJet angepasst werden. Anhand dieses Kalibrierungsschrittes konnte die injizierte cRNA-Menge pro Oozyte/Larve ermittelt werden.

Zur Injektion wurden  $\frac{2}{3}$  der Oozyten eines Geleges genutzt, die restlichen Oozyten dienten als unbehandelte Kontrollen. Zur Immobilisation der Oozyten während der Injektion, wurden diese in V-förmige Vertiefungen ausgehärteter 3%iger Agarose arrangiert. Die Eier wurden nach der Injektion bei 28 °C in E3-Medium im Inkubator aufgezogen. Vier bis fünf Stunden nach der Injektion wurden unbefruchtete Eier aus den Gelegen aussortiert. Die Aufzucht der injizierten Larven erfolgte anschließend wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben.

### 3.6.6. Generierung und Aufbau der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlinie

Um die Parentalgeneration der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlinie zu generieren, wurden Zebrafischoozyten wie in Abschnitt 3.6.5 beschrieben mit 298 pg TALEN3-cRNA injiziert. Die Aufzucht der injizierten Larven erfolgte wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben. Die Auswahl potentieller *Founder*-Kandidaten erfolgte im Alter von 3 Monaten anhand der somatischen Mutationseffizienz. Hierzu wurden, wie in Abschnitt 3.6.4 beschrieben, Schwanzflossenbiopsien aller Fische entnommen, die DNA isoliert und die somatische Mutationsrate via PCR/RFLP-Analyse (siehe Abschnitt 3.3.9.3) bestimmt. Fische, die eine somatische Mutationsrate von  $\geq 90$  % aufwiesen wurden als potentielle *Founder*-Fische zur Generierung der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlinie eingestuft und separat gehalten.

Die potentiellen *Founder*-Fische wurden anschließend mit WT-Tieren verpaart (siehe Abschnitt 3.6.2) und die Nachkommen im Alter von 3 dpf auf transmittierte Mutationen untersucht. Pro Fisch wurden 32 Nachkommen analysiert. Hierzu wurden die Larven-DNA wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, isoliert, das TALEN3-Targetfragment mittels PCR unter Verwendung der Primer *atf6*-TALEN3\_F und *atf6*-TALEN3\_R amplifiziert und die PCR-Produkte mithilfe des Primers *atf6*-TALEN3\_R sequenziert (siehe Abschnitt 3.3.6) Es wurde die Identität der transmittierten Mutationen und die Effizienz, mit welcher eine bestimmte Mutation an die Nachkommen weitergegeben wurde, ermittelt. Fische, die den gewünschten Genotyp, d.h. Mutationen bzw. Deletionen weitergaben, die eine Verschiebung des ORFs bewirkten, wurden weiterhin als potentielle *Founder*-Fische gehalten.

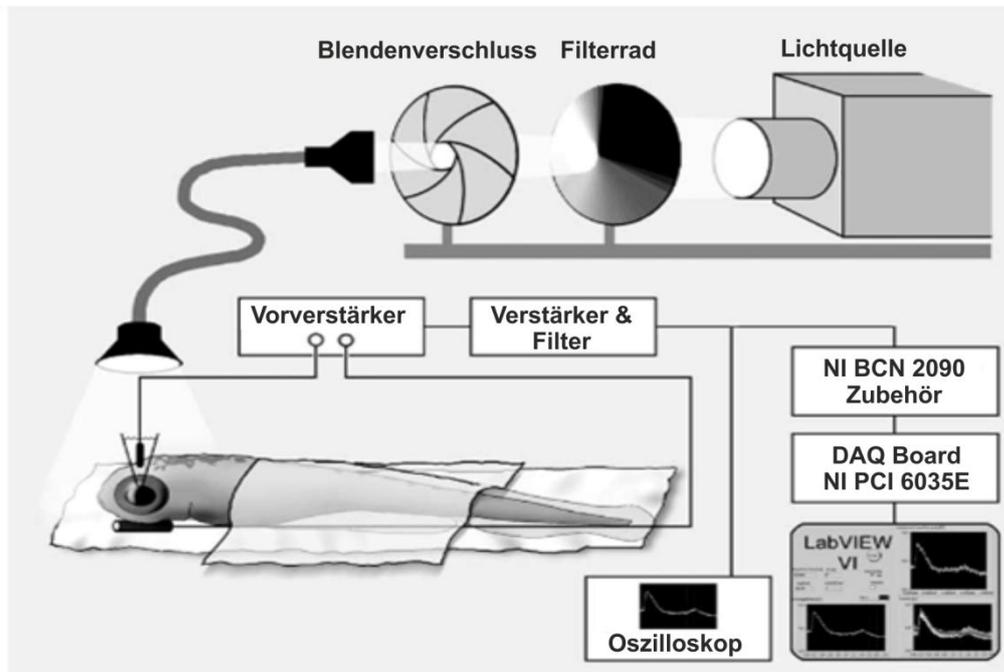
Zur Generierung der F<sub>1</sub>-Generation der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlinie wurden ein männlicher und ein weiblicher *Founder*-Fisch, die dieselbe Deletion (c.519delG;p.(V174Cfs\*42)) an ihre Nachkommen weitergaben, ausgewählt und miteinander verpaart (siehe Abschnitt 3.6.2). Die Nachkommen wurden aufgezogen und im Alter von 2,5-3 mpf via PCR/RFLP-Analyse

(3.3.9.3) auf diese Deletion hin untersucht. Da die transmittierte Deletion zur Entstehung einer neuen BsrI-spezifischen Schnittstelle führte, wurde als Restriktionsenzym für den RFLP das Restriktionsenzym BsrI verwendet. Das Vorliegen der gewünschten Deletion wurde bei homozygoten F1-Tieren über Sequenzieranalyse (siehe Abschnitt 3.3.6) bestätigt und aus diesen Tieren die *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlinie generiert.

### **3.6.7. Durchführung des ERGs bei Zebrafischlarven**

Die Elektroretinographie wird verwendet, um die Funktion der Photorezeptoren und deren Verschaltung mit Zellen in der inneren Retina zu untersuchen. Hierzu werden definierte Lichtstimuli präsentiert und die von der Retina generierten Gesamtpotentiale abgeleitet. Die ERG-Messung an dunkeladaptierten Zebrafischlarven erfolgt im Alter von 5 dpf. Sind keine funktionellen Zapfen mehr vorhanden, können im ERG keine oder nur stark verminderte elektrische Ströme aufgezeichnet werden (Brockhoff et al., 1995; Brockhoff et al., 2003). Die genaue Vorgehensweise wurde bereits von Makhankov und Kollegen (Makhankov et al., 2004) sowie von Sirisi und Kollegen (Sirisi et al., 2014) beschrieben und erfolgte in Kooperation mit Dr. Jingjing Zang und Prof. Stefan Neuhaus an der Universität Zürich.

Alle vorbereitenden Schritte vor der Messung wurden unter Rotlichtbeleuchtung durchgeführt, um ein Bleichen der Photopigmente zu verhindern. Die Messung selbst erfolgte in einem Faraday'schen Käfig unter visueller mikroskopischer Kontrolle. Eine Übersicht des Messstandes ist in Abb. 12 dargestellt.



**Abbildung 12: Aufbau des Messstandes zur ERG-Messung an Zebrafischlarven** (verändert nach Makhankov et al., 2004).

Die mit dem Muskelrelaxans Esmeron (0,8 mg/ml in E3) ruhig gestellten Zebrafischlarven wurden für die Messung seitlich, sodass das Auge nach oben blickt, auf einen nassen Schwamm in einer Petrischale gelegt und mit einem feuchten Filterpapier in dieser Position fixiert. Die mit E3-Medium gefüllte Messelektrode wurde zentral auf der Kornea positioniert. Die Referenzelektrode wurde unter dem Körper der Larve positioniert. Bevor der erste Lichtstimulus präsentiert wurde, wurde die zu messende Larve mindestens 2 min in kompletter Dunkelheit adaptiert. Die Stimulusintensität betrug 6000 Lux und wurde mithilfe von Neutralfiltern von 100 % bis zu 0,01 % gedämpft. Der Lichtstimulus wurde so ausgerichtet, dass er genau auf das Larvenauge traf. Die Stimuluslänge betrug 100 ms und wurde das erste Mal 50 ms nach Aufzeichnungsbeginn präsentiert. Die elektrischen Signale wurden von einem *Preamplifier* mit einem Bandpassfilter von 0,1 bis 100 Hz zunächst 1000-fach verstärkt, bevor sie digitalisiert und mithilfe eines von der AG Neuhaus an der Universität Zürich eigens entwickelten Programms unter Verwendung von NI LabVIEW 5.1 visualisiert wurden. Pro Genotyp wurden mindestens 38 Larven gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte in Microsoft Excel (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Hierzu wurden die gemessenen Gesamtpotentiale der einzelnen Larven pro eingestellte Lichtintensität und nach Genotyp getrennt gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

### **3.6.8. Behandlung von Zebrafischlarven mit Tunicamycin**

Tunicamycin (Tm) ist ein Gemisch homologer Nukleosidantibiotika und verhindert die Glykosylierung von Proteinen in der Proteinbiosynthese (Heifetz et al., 1979), weshalb es auch als ER-Stress-Induktor zum Einsatz kommt. Für die Behandlung der Zebrafischlarven, die den Wirkstoff über die Haut aufnehmen können, wurde eine Tunicamycin-Stocklösung von 10 mg/ml Tunicamycin in DMSO angesetzt. Um ER-Stress in Zebrafischlarven zu induzieren, wurden diese für 48 h in 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Hierzu wurden 3 µl der Tunicamycin-Stocklösung in 30 ml E3-Medium verdünnt und darin bis zu 30 Larven bei 28 °C inkubiert. Die Behandlung der Larven erfolgte entweder von 1 dpf bis 3 dpf oder von 3 dpf bis 5 dpf. Anschließend wurden die Larven in reinem E3-Medium gespült, euthanasiert und für histologische Färbungen weiterverarbeitet (siehe Abschnitt 3.6.9). Als Kontrolle dienten Larven, die in E3-Medium mit vergleichbaren Mengen (3 µl) DMSO inkubiert wurden.

### **3.6.9. Aufarbeitung und Fixierung von Zebrafischlarven für ISH und histologische Untersuchungen**

Für *whole mount* ISHs und die Anfertigung von Gefrierschnitten für immunhistologische Untersuchungen mussten 3 dpf und 5 dpf Larven zunächst fixiert werden. Die Fixierung der euthanasierten Larven erfolgte mit 4 % PFA. Wurden die Larven für die ISH fixiert, betrug die Fixierdauer 24 h und erfolgte bei 4 °C. Larven, die ihre Verwendung in der Immunfärbung fanden, wurden 2 h bei Raumtemperatur fixiert und anschließend bei 4 °C in 30 % Sucrose dehydriert.

### **3.6.10. Bleichen von Zebrafischlarven**

Larven, die für die ISH verwendet wurden, wurden nach der Fixierung zusätzlich gebleicht, um ihre Pigmentierung zu entfernen. Das Bleichen erfolgte in einer 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/0,5 % KOH-Bleichlösung bis unter visueller Kontrolle keine Pigmentierung mehr beobachtet werden konnte. Die gebleichten Larven wurden anschließend in 1xPBS gewaschen und in einer MeOH-Reihe (50 % MeOH in 1xPBS, 100 % MeOH) für jeweils 5 min inkubiert und dabei dehydriert. Die dehydrierten Larven wurden in 100 % MeOH bei -20 °C gelagert.

### **3.6.11. Präparation von Zebrafischaugen für immunhistologische Untersuchungen**

Für histologische Untersuchungen wurden die Augen von adulten Zebrafischen präpariert. Hierzu wurden die Fische wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben euthanasiert und anschließend dekapitiert. Anschließend wurde der Zebrafischkopf in eine Schale mit 1x PBS überführt, Die folgende Präparation erfolgt unter dem Binokular (Stereomikroskop SZX7, Olympus Europa SE & Co.KG, Hamburg, Deutschland). Zunächst wurde das um die Augen liegende Gewebe mit Präparierpinzetten entfernt. Der optische Nerv jedes Auges wurde anschließend mit einer feinen Präparierschere durchtrennt und die Augen entnommen. Anschließend wurde die Kornea mit einer Heparinnadel durchstoßen und das entstandene Loch kreuzförmig aufgeschnitten, um das Eindringen der Fixierlösung in das Auge zu gewährleisten. Die präparierten Zebrafischaugen wurden in 1 ml 4 % PFA überführt und auf einem Rollschüttler bei minimalster Rotation 45 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung wurde die Kornea ringförmig aufgeschnitten und die Linse, möglichst ohne die darunter liegende Retina zu verletzen, herauspräpariert. Die Augen wurden nun mithilfe einer Sucrose-Reihe dehydriert (siehe Abschnitt 3.8.1) und zur Herstellung von Gefrierschnitten (siehe Abschnitt 3.8.2) aufgearbeitet.

## **3.7. Whole mount ISH**

Die ISH ist eine qualitative Methode zum Nachweis der Expression unterschiedlicher Gene in Zellen oder Geweben, die auf dem Prinzip der Hybridisierung komplementärer Nukleinsäure-Stränge beruht. Hierzu wird ein künstlich erzeugtes spezifisches Nukleinsäure-Fragment, eine sogenannte Sonde, verwendet, die über komplementäre Basenpaare an die nachzuweisende Nukleinsäure bindet. Die Detektion erfolgt entweder über den Einbau fluoreszenzmarkierter Nukleotide in die Sonden oder über einen Antikörper-basierten Nachweis. In dieser Arbeit wurde die ISH verwendet, um die Expression verschiedener UPR-assoziiierter Gene in der Zebrafischlarve insbesondere spezifisch in der Zebrafischretina zu lokalisieren.

### **3.7.1. Generierung von ISH-Konstrukten**

Die Generierung der unterschiedlichen ISH-Sonden-Konstrukte erfolgte über die gerichtete Klonierung eines entsprechenden cDNA-Fragments in den pGEM5-zf(+)-Vektor (vgl. Abschnitt 3.3.10). Die MCS dieses Vektors ist von einem Sp6- und einem T7-Promotor flankiert, wodurch eine anschließende RNA-Sondensynthese mithilfe der DNA-abhängigen Sp6- bzw.

T7-RNA-Polymerase möglich war. Für die Generierung der ISH-Sonden-Konstrukte wurden mithilfe von spezifischen Primern (siehe Tabelle 8) die gewünschten Fragmenten, die als Vorlage der einzelnen Sonden dienen sollten, aus cDNA (siehe Abschnitt 3.3.7) 5 dpf alter Zebrafischlarven mittels einer *Proofreading*-Polymerase amplifiziert (siehe Abschnitt 3.3.1) und anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (siehe Abschnitt 3.3.4). Welche Teile der einzelnen Gene amplifiziert wurden und welche Restriktionsenzyme zur Klonierung verwendet wurden, ist in Tabelle 30 aufgelistet. Die verdauten PCR-Produkte wurden anschließend über das *MinElute Reaction Cleanup Kit* (siehe Abschnitt 3.2.5) bzw. der verdauten pGEM5zf(+)-Vektor über eine Gelextraktion (siehe Abschnitt 3.2.4) aufgereinigt und anschließend wie in Abschnitt 3.3.5 beschrieben mittels der T4-Ligase ligiert. Anschließend wurden chemisch kompetente *E.coli*-Bakterien mit dem Ligationsprodukt transformiert (siehe Abschnitt 3.1.1).

**Tabelle 30: Übersicht der klonierten cDNA-Fragmente und Restriktionsenzyme für die Generierung der ISH-Sonden-Konstrukte**

Gen	Kloniertes Fragment	Verwendete Restriktionsenzyme
<i>atf6</i>	Klonierung des gesamten ORFs	<i>AatII, NsiI</i>
<i>hspa5</i>	Klonierung des gesamten ORFs	<i>ApaI, NsiI</i>
<i>hsp90b1</i>	Klonierungsprimer liegen innerhalb der UTRs (5'-UTR: -126 bis -106; 3'-UTR: +76 bis +95)	<i>EcoRV, NsiI</i>
<i>atf6β</i>	Klonierung des ORFs ab c.385	<i>AatII, NsiI</i>

### 3.7.2. *In vitro*-Synthese DIG-markierter Ribosonden

Die ISH-Sonden wurden mithilfe der zuvor klonierten Konstrukte (s. Abschnitt 3.7.1) generiert. Hierfür wurde zunächst das Template für die entsprechende Sonde mittels PCR-Reaktion unter Verwendung des M13-Primerpaares mit einer *Proofreading*-Polymerase amplifiziert (siehe Abschnitt 3.3.1). Die Amplikons wurden auf einem 1 % Agarosegel überprüft und über eine Gelextraktion wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, aufgereinigt.

Die eigentliche Synthese der ISH-Sonden erfolgte unter der Verwendung eines dNTP-Mixes, welcher Digoxigenin-markierte dUTPs enthielt. Pro zu untersuchendem Gen wurden immer zwei Sonden synthetisiert: die *antisense*-Sonde (mittels Sp6-RNA-Polymerase), die komplementär zur mRNA ist und später zu einer Markierung führen soll und die *sense*-Sonde (mittels T7-RNA-Polymerase) zur Negativkontrolle. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur angesetzt, wobei die Reihenfolge der einzelnen Komponenten zu beachten war. Als Template wurde das zuvor erzeugte und aufgereinigte PCR Produkt verwendet

<b>Reaktionsansatz:</b>	Ad 20 µl	RNase-freies H <sub>2</sub> O
	4 µl	5x Reaktionspuffer (Sp6 oder T7)
	2 µl	DIG-Mix (10x)
	1 µl	Aufgereinigtes PCR Produkt (250 ng)
	0,5 µl	RiboGuard RNase Inhibitor (40 U/µl)
	1 µl	DNA-abhängige RNA-Polymerase (Sp6 oder T7, 20U/µl)

Dieser Ansatz wurde für 2,5 h 37 °C inkubiert, um die RNA-Sonden zu synthetisieren. Um das noch vorhandene DNA-Template zu entfernen, wurden anschließend 2 µl RNase-freie DNase I (10U/µl) hinzugegeben und der Ansatz erneut für 30 min bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Sonden über das *RNeasy Mini Kit* aufgereinigt und in 30 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Da zu lange Sonden schlecht in das Gewebe penetrieren können, wurden alle Sonden, die länger als 300 bp waren, hydrolysiert und somit fragmentiert. Die Hydrolyse erfolgt durch Zugabe von 18 µl 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 12 µl 200 mM NaHCO<sub>3</sub> bei 60 °C. Die Inkubationszeit wurde über folgende Formel für jede Sonde separat berechnet:

$$t = (L_0 - L_f) / (K * L_0 * L_f)$$

L<sub>0</sub>: Anfangslänge der RNA-Sonde in kb, L<sub>f</sub>: gewünschte RNA-Sondenlänge in kb,  
K: Konstante = 0,11 (kb\*min)<sup>-1</sup>, t = benötigte Zeit der Hydrolyse

Nach der Hydrolyse wurden die Sonden erneut über das *RNeasy Mini Kit* aufgereinigt und in 30 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Die Quantifizierung der Ribosonden erfolgte über spektrophotometrische Vermessung (siehe Abschnitt 3.2.9). Zusätzlich wurde die Qualität der Sonden und der Erfolg der Fragmentierung mittels Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.3.3) überprüft.

### 3.7.3. Durchführung und Ablauf der *whole mount* ISH an Zebrafischlarven

Für die ISH wurden wie zuvor in Abschnitt 3.6.9 beschrieben, 24 h fixierte und gebleichte Zebrafischlarven verwendet. Generell gilt, dass alle für die ISH verwendeten Chemikalien und Lösungen RNase-frei sein mussten und dass sauber und RNase-frei gearbeitet wurde. Die ISH wurde in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt und pro Reaktionsgefäß wurden jeweils 15 Larven und 200 µl der jeweiligen Lösungen verwendet. Die verwendeten Larven wurden zunächst in einer MeOH-Reihe (75 % MeOH in 1xPBS, 50 % MeOH in 1xPBS, 25 % MeOH in 1xPBS) für jeweils 5 min rehydriert bevor sie in 1xPBST erst dreimal gewaschen und dann für 1,5 h inkubiert und dabei permeabilisiert wurden. Es folgte eine Be-

handlung mit aktivem DEPC (0,1 % (v/v) in 1xPBS), wodurch einerseits RNAsen inaktiviert wurden und andererseits der Hintergrund durch späteres spezifischeres Binden der Ribosonden minimiert wurde (Braissant und Wahli, 1998). Im Anschluss wurden die Larven in Hyb<sup>+</sup>-Puffer überführt und bei 65 °C im Thermoschüttler für 4 h prähybridisiert. Kurz vor Beendigung der Prähybridisierung wurden die mit Digoxigenin markierten Hybridisierungssonden vorbereitet. Hierzu wurden 50 bis 200 ng der jeweiligen Sonde in 200 µl Hyb<sup>+</sup>-Puffer, der zusätzlich 5 % Dextran enthielt, verdünnt und 10 min bei 65 °C im Thermoschüttler denaturiert. Das Dextran verhindert die Diffusion der Sondenmoleküle während der Hybridisierung und führt somit zu einer intensiveren Färbung (Hauptmann et al., 2016). Nach der Denaturierung wurden die Sonden-Verdünnungen direkt auf Eis gestellt, um ein *Reannealing* zu verhindern. Anschließend wurde der Hyb<sup>+</sup>-Puffer aus der Prähybridisierung von den Larven entfernt, ohne dass die Larven mit der Raumluft in Berührung kamen, und die verdünnten Sonden zur Hybridisierung auf die jeweiligen Larven pipettiert. Die Hybridisierung erfolgt ebenfalls bei 65 °C im Wärmeschrank für 72 h. In dieser Zeit binden die Sonden, wenn sie, wie im Fall der Sp6-Sonde komplementär zu den intrinsischen mRNA-Transkripten sind.

Nach der Hybridisierung wurden die Larven nach einem stringenten Waschprotokoll gewaschen, um nicht gebundene Sonden-Moleküle zu entfernen. Die Waschzeiten betragen jeweils 15 min und sind im Folgenden der Reihe nach aufgeführt. Wurde der Waschschrift bei 65 °C durchgeführt, wurden die Waschpuffer zuvor auf diese Temperatur erwärmt.

- einmal in 100 % Hyb<sup>-</sup> bei 65 °C
- einmal in 75 % Hyb<sup>-</sup> / 25 % 2x SSCTw bei 65 °C
- einmal in 50 % Hyb<sup>-</sup> / 50 % 2x SSCTw bei 65 °C
- einmal in 25 % Hyb<sup>-</sup> / 75 % 2x SSCTw bei 65 °C
- einmal in 2xSSCTw bei 65 °C
- zweimal in 0,2x SSCTw bei 65 °C
- einmal in 75 % 0,2x SSCTw / 25 % PBST bei Raumtemperatur
- einmal in 50 % 0,2x SSCTw / 50 % PBST bei Raumtemperatur
- einmal in 25 % 0,2x SSCTw / 75 % PBST bei Raumtemperatur
- zweimal in PBST bei Raumtemperatur

Bei jedem Waschschritt musste darauf geachtet werden, dass die Larven noch mit etwas Flüssigkeit bedeckt waren und nicht komplett austrockneten. Danach wurden die Larven für die Antikörperbehandlung vorbereitet und mit Blockierungspuffer für 3-4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der an die alkaline Phosphatase (AP)-gekoppelte anti-DIG Antikörper wurde 1:5000 in Blockierungspuffer verdünnt und die Larven über Nacht bei 4 °C darin inkubiert. Am folgenden Tag wurden überschüssige nicht gebundene Antikörperreste durch sechsmaliges Waschen der Larven für jeweils 15 min in 1xPBST entfernt. Dann folgte die Vorbereitung zur Detektion. Hierzu wurden die Larven in AP-complete-Puffer inkubiert, der die Basis für die Färbelösung bildete. Die Detektion erfolgte mithilfe von NBT/BCIP, einem Substrat der alkalinen-Phosphatase, welches zu einer lilafarbenen Färbung des Gewebes mit gebundenen Sonden führt. Zur Färbung wurde AP-complete-Puffer mit NBT/BCIP gemischt und die Larven darin inkubiert. Wurden von den gefärbten Larven später Gefrierschnitten angefertigt, so wurde der Färbelösung final 5 % Polyvenylalkohol zugegeben (Pringle und Richardson, *In situ Hybridization Protocols*), um die Färbung zu intensivieren. Die Färbereaktion fand unter visueller Kontrolle unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur statt. Die Färbereaktion wurde, wenn die gewünschte Signalstärke erreicht war, durch die Inkubation in Stopplösung gestoppt. Um unspezifische Färbungen und Akkumulationen an Farbmolekülen aus dem Gewebe zu entfernen, wurden die Larven anschließend in 100 % EtOH gewaschen (Braissant und Wahli, 1998). Dabei schlug die lilafarbene Färbung in einen Blauton um. Um das Gewebe zu schonen, wurde eine EtOH-Reihe verwendet, in der die Larven zunächst für 5 min in 50 % EtOH in 1xPBS und schließlich unter Sichtkontrolle in 100 % EtOH bis zum gewünschten Entfärbungsgrad gewaschen wurden. Anschließend wurden Larven, von denen Bilder im Ganzen aufgenommen werden sollten, mit 100 % Glycerol infiltriert und darin bei 4 °C gelagert. Larven aus denen Kyroschnitte gefertigt werden sollten, wurden über eine entsprechende EtOH-Reihe wieder rehydriert, 20 min bei Raumtemperatur in 4 % PFA nachfixiert und über Nacht bei 4 °C in 30 % Sucrose dehydriert. Anschließend wurden sie wie in Abschnitt 3.8.1 beschrieben, eingebettet. Die Aufnahmen der Larven wurden wie in Abschnitt 3.9.2 beschrieben durchgeführt.

#### **3.7.4. Durchführung und Ablauf der ISH an Gefrierschnitten adulter Zebrafischretinae**

Die gefrorenen Gefrierschnitte wurden zunächst 30 min bei 37 °C aufgetaut. Um das Kryoeinbettmedium zu entfernen, wurden die Schnitte 5 min in 1xPBS bei Raumtemperatur gewaschen. Pro Objektträger wurden, wenn nicht anders angegeben, jeweils 150 µl der jeweiligen

Lösungen in den folgenden Arbeitsschritten verwendet. Zur Permeabilisierung wurden die Schnitte in eine Feuchtekkammer gelegt und mit 10 µg/ml Proteinase K bei 37 °C 5 min inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschrirte für jeweils 5 min mit 1xPBST. Um die Proteinase K zu inaktivieren, wurde eine Fixierung mit 4 % PFA für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Um das PFA zu entfernen, wurden die Objektträger danach dreimal für 5 min bei Raumtemperatur in 1xPBST gewaschen. Um eine mögliche Hintergrundfärbung zu verringern, wurden die Schnitte im nächsten Schritt einmal für 5 min bei Raumtemperatur mit aktiven DEPC in 1xPBS inkubiert und erneut dreimal für jeweils 5 min bei Raumtemperatur in 1xPBS gewaschen. Die Prähybridisierung erfolgte anschließend für 4 h bei 59 °C im Wärmeschrank. Hierzu wurde die Feuchtekkammer zusätzlich mit Formamid befüllt. Pro Objektträger wurden jeweils 700 µl Hyb<sup>+</sup>-Puffer aufgetragen und die Objektträger mit HybriSlips abgedeckt, um ein Verdunsten der Hybridisierungslösung zu vermeiden. Nach beendeter Prähybridisierung wurden die HybriSlips vorsichtig mit der Pinzette von den Objektträgern gehoben. Für die folgende Hybridisierung wurden jeweils 200 ng der entsprechenden Sonde in 700 µl Hyb<sup>+</sup>-Puffer, der zusätzlich 5 % Dextran enthielt, verdünnt und bei 65 °C für 10 min denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 59 °C, wobei die Objektträger mit HybriSlips abgedeckt waren. Diese wurden am folgenden Tag vorsichtig mit einer Pinzette entfernt und die Objektträger in einer SSC-Waschpufferreihe aus 2xSSC, 1xSSC und 0,5xSSC pro Puffer jeweils für 15 min bei 59 °C gewaschen, um ungebundene Sonden-Moleküle zu entfernen. Final wurden die Schnitte für 15 min bei Raumtemperatur in 1xPBST in einer Küvette gewaschen. Die Schnitte wurden danach wieder in eine Feuchtekkammer transferiert und vor dem anschließenden Antikörper-Blockierungsschritt 5 min bei Raumtemperatur in MAP-Puffer inkubiert. Geblockt wurde danach in Blockierungslösung für 3-4 h bei Raumtemperatur. Der AP-gekoppelte anti-DIG-Antikörper wurde 1:2500 in Blockierungslösung verdünnt und die Schnitte damit über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal für je 5 min mit 1xPBST bei Raumtemperatur gewaschen, um überschüssige Antikörpermoleküle zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte dreimal 5 min in AP-complete-Puffer inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels NBT/BCIP-Lösung unter Verwendung von 5% Polyvenylalkohol. Darin wurden die Schnitte unter Sichtkontrolle solange inkubiert, bis die gewünschte Signalstärke erreicht war. Um die gefärbten Schnitte später unter dem Mikroskop anschauen zu können, wurden die Schnitte vor dem Eindeckeln kurz mit entsalztem Wasser gespült und anschließend mit DAKO *Fluorescent Mounting Medium* eingedeckelt. Die Aufnahmen wurden wie in Abschnitt 3.9.1 beschrieben durchgeführt.

## 3.8. Immunhistologische Techniken

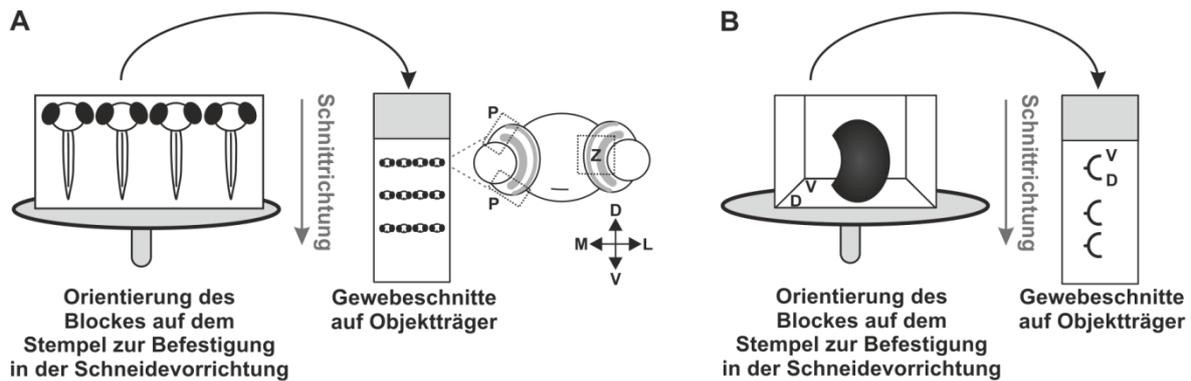
### 3.8.1. Verarbeitung von Zebrafischlarven und adulten Zebrafischaugen zur Anfertigung von Gefrierschnitten

Die bereits fixierten adulten Zebrafischaugen sowie die Zebrafischlarven (siehe Abschnitte 3.6.11 und 3.6.9) wurden nach der Fixierung erneut 5 min in 1xPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Dehydrierung des Gewebes durch die Verwendung einer aufsteigenden Sucrose-Reihe (10 % Sucrose in 1xPBS, 20 % Sucrose in 1xPBS, 30 % Sucrose in 1xPBS). Die Zebrafischaugen sowie die Larven wurden jeweils für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Rollschüttler mit minimalster Rotation erst in 10 % und anschließend in 20 % Sucrose-Lösung inkubiert. Die Inkubation in 30 % Sucrose-Lösung erfolgte auf einem Rollschüttler bei minimalster Rotation über Nacht bei 4 °C.

Am Folgetage wurden die Zebrafischlarven in purem Tissue-Tek® O.C.T. Compound für Gefrierschnitte eingebettet. Die adulten Augen wurden für 30 min mit einem Gemisch, das aus zwei Teilen Tissue-Tek® O.C.T. Compound und einem Teil 30 % Sucrose (3:1 Tissue-Tek® O.C.T. Compound : 30 % Sucrose) bestand, bei Raumtemperatur auf dem Rollschüttler infiltriert. Die Einbettung der Augen erfolgte ebenfalls in diesem Gemisch. Für die Einbettung wurden die Augen so ausgerichtet, dass dorsal-ventrale Gefrierschnitte angefertigt werden konnten. Die Einbettung der Larven erfolgte so, dass Frontalschnitte angefertigt werden konnten. Das Einfrieren eines adulten Auges bzw. von vier bis fünf Larven erfolgte in einem kleinen Aluminiumförmchen mit entsprechendem Einbettmedium. Die Förmchen wurden hierzu auf einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Metallblock gestellt. Das eingebettete Gewebe wurde bis zum Schneidevorgang bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.8.2. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden an einem Kryostat (Kryostat CM3050S, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) hergestellt. Hierzu wurden die eingefrorenen Gewebelöckchen mithilfe von Einbettmedium auf die Schneidevorrichtung des Kryostats geklebt, sodass von den Larven Frontalschnitte und von den adulten Augen Schnitte, die sowohl die ventrale als auch die dorsale Seite enthielten, hergestellt werden konnten (Abb. 13).



**Abbildung 13: Vorgehensweise zur Ausrichtung der Gewebeblöckchen zur Anfertigung von Gefrierschnitten. (A)** Ausrichtung von Gewebeblöckchen, die Zebrafischlarven beinhalten. Pro Block werden vier bis fünf Larven eingebettet. **(B)** Ausrichtung von Gewebeblöckchen, die ein adultes Zebrafisch-Auge beinhalten. Pro Block wird ein Auge eingebettet. D: dorsal, V: ventral; M: medial; L: lateral; P: periphere retinale Bereiche; Z: zentrale Retina.

Die Schnittdicke betrug 12  $\mu\text{m}$ . Die adulten Augen wurden bis zum optische Nerv seriell geschnitten. Larven wurden in Reihe, d.h. nicht seriell geschnitten. Pro Objektträger wurden drei Schnitte aufgenommen und anschließend 1 h bei 37 °C auf der Wärmeplatte getrocknet. Die fertigen Gefrierschnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.8.3. Immunhistologische Färbungen an Gefrierschnitten adulter Maus- sowie Zebrafischretinae und Zebrafischlarven

Die Gefrierschnitte der adulten Zebrafischaugen sowie der Zebrafischlarven wurden wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben eigenständig angefertigt. Die Gefrierschnitte der adulten WT- und *Atf6*<sup>-/-</sup>-Mausretinae wurden von Dr. Irene Gonzalez-Menendez zur Verfügung gestellt. Bevor die Gefrierschnitte für die Färbungen verwendet werden konnten, wurden diese für 30 min bei 37 °C auf der Wärmeplatte getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger in Küvetten für 10 min bei Raumtemperatur in 1xPBS gewaschen, um das Einbettmedium, das die Schnitte umgibt, zu entfernen. Je nach Antigen wurden die Schnitte anschließend in einer 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/0,5 % KOH-Bleichlösung inkubiert, um die Pigmentierung des RPEs zu eliminieren. Hierbei wurden Larvenschnitte für ca. 10 min bzw. adulte Retinae für ca. 20 min bei Raumtemperatur unter visueller Kontrolle gebleicht. Schnitte von 5 dpf und 15 dpf alten Larven sowie von adulten Retinae wurden anschließend in Färbegestelle (Eigenbau) mithilfe von Coverplates eingespannt, während Schnitte von 3 dpf alten Larven liegend in Feuchtekammern gefärbt wurden. Pro Objektträger wurden jeweils 150  $\mu\text{l}$  der benötigten Lösungen für die folgenden Arbeitsschritte verwendet. Vor der Erstantikörper-Inkubation wurden die Schnitte 1 h bei Raumtemperatur in Blockierlösung inkubiert. Die Zusammensetzung der

Blockierlösung richtete sich nach Antigen und Alter des verarbeiteten Tieres (siehe Tabelle 31). Nach dem Blockierungsvorgang wurden die Erstantikörper in der jeweiligen Blockierlösung verdünnt (siehe Tabelle 31) und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

**Tabelle 31: Übersicht der verwendeten Antikörper und Blockierlösungen**

Markierung	Primärantikörper (Verdünnung)	Blockierlösung	Sekundärantikörper (Verdünnung)
Doppelzapfen	Zpr1 (1:100)	1xPBS+10 %NGS+ 1 %BSA+ 0,1 % Tx*	Anti-Maus (1:100)
Ganglienzellen	Zn8 (1:100)		Anti-Maus (1:200)
Grün-Opisin	Opn1mw2 (1:500)		Anti-Kaninchen (1:200)
Bipolarzellen	PKC $\alpha$ (1:100)		Anti-Kaninchen (1:400)
Stäbchen	Zpr3 (1:100)		Anti-Maus (1:100)
?	Zebrafisch-Atf6 (1:100)		Anti-Maus (1:200)
?	Murines ATF6 (1:500)		Anti-Maus (1:200)
Apoptotische Zellen	Aktive Caspase-3 (1:500)	PBS + 0,8 % Tx + 0,1 % Tw*	Anti-Kaninchen (1:200)
Proliferierende Zellen	PCNA (1:200)		Anti-Maus (1:200)

\* für jegliche Färbungen 3 dpf alter Larven wurde 1xPBS + 10 %NGS + 1 BSA + 0,05 % Tx verwendet

Tx: TritonX-100, Tw: Tween20

Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal für 10 min bei Raumtemperatur in 1xPBS gewaschen und anschließend mit den entsprechenden fluoreszierenden Zweitantikörpern, die zuvor in 1xPBS verdünnt worden waren (siehe Tabelle 31), für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation mit den Zweitantikörpern wurden die Schnitte erneut dreimal für 10 min bei Raumtemperatur mit 1xPBS gewaschen. Zur Färbung der Rotzapfen-Außensegmente in der Zebrafischretina wurden die Schnitte nach dem Blockierschritt mit Lektin-PNA-568 (1:200) inkubiert. Um die Zellkerne anzufärben wurden die Schnitte mit DAPI-Lösung (1  $\mu$ g/ml) für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschritte mit 1xPBS für 10 min bei Raumtemperatur. Um die Schnitte unter dem Mikroskop anschauen zu können, wurden sie abschließend mit DAKO *Fluorescent Mounting Medium* eingedeckelt. Die Fluoreszenzaufnahmen der gefärbten Schnitte wurden wie in Abschnitt 3.9.1 beschrieben durchgeführt.

### 3.8.4. Immunologische *whole-mount*-Färbungen an Zebrafischlarven

Für immunhistologische *whole-mount*-Färbungen wurden zuvor gebleichte und in 100 % MeOH gelagerte Zebrafischlarven (3 dpf und 5 dpf) in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und über eine MeOH-Reihe (75 % MeOH, 50 % MeOH, 25 % MeOH für jeweils 5 min bei RT)

rehydriert. Die rehydrierten Larven wurden anschließend durch dreimalige Inkubation für 10 min in 1xPBSTw permeabilisiert. Um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu vermeiden folgte eine dreistündige Inkubation in Blockierpuffer bei RT. Die verschiedenen anti-Atf6- sowie der als Kontrolle dienende zpr-1-Primärantikörper wurden 1:100 in Antikörperpuffer verdünnt und die Larven in der verdünnten Antikörperlösung bei 4 °C für zwei Nächte inkubiert. Nach der Erstantikörperinkubation wurden die Larven 1x für 3 h in PBS-TS, anschließend 2x für 10 min in PBS-T und erneut 1x für 3 h in PBS-TS gewaschen. Der verwendete Zweitantikörper wurde ebenfalls zunächst ebenfalls 1:200 in Antikörperpuffer verdünnt und die gewaschenen Larven erneut für 2 Nächte bei 4 °C darin inkubiert. Überschüssige und ungebundene Zweitantikörpermoleküle wurden nach der Inkubation durch zweimaliges Waschen in 1xPBST für jeweils 1 h bei RT und durch zweimaliges Waschen mit PBSTw für jeweils 1 h bei RT entfernt.

### 3.8.5. Detektion apoptotischer Zellen mittels des TUNEL-Assays

Die Detektion apoptotischer Zellen *in situ* erfolgte neben der aktiven Caspase-3-Immunfärbung zusätzlich mittels des *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL)-Assays. Der TUNEL-Assay beruht auf dem Verfahren der Endmarkierung fragmentierter DNA-Moleküle mit einem fluoreszierenden dUTP. Der TUNEL-Assay wurde mit dem *Click-iT™ Plus TUNEL Assay Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte mit DAPI-Lösung (1 µg/ml) für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in 1xPBS für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Um die Schnitte unter dem Mikroskop anschauen zu können, wurden sie abschließend mit DAKO *Fluorescent Mounting Medium* eingedeckelt. Die Fluoreszenzaufnahmen der gefärbten Schnitte wurden wie in Abschnitt 3.9.1 beschrieben durchgeführt.

### 3.8.6. DAB-Färbung

Die 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung wurde genutzt, um die unterschiedlichen kommerziellen und eigens für diese Arbeit generierten Antikörper gegen die unterschiedlichen ATF6-Proteine zu testen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten in der 24-Well-Platte auf dem Wipptisch bei Raumtemperatur. Pro Well wurden, wenn nicht anders angegeben, jeweils 200 µl der unterschiedlichen Reagenzien verwendet. Die entweder mit dem humanen, dem murinen oder dem Zebrafisch-Atf6 transfizierten HEK293T-Zellen bzw. die untransfizierten

WT- und Patientenfibroblasten sowie WT- und *Atf6*<sup>-/-</sup>-MEFs wurden vor der Färbung dreimal für 10 min mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % PFA für 15 min fixiert. Nach der Fixierung erfolgten erneut drei Waschschrte in 1xPBS für jeweils 10 min. Um die Zellen zu permeabilisieren und gleichzeitig unspezifische Antikörper-Bindestellen zu blockieren wurden die Zellen danach 30 min in CT-Lösung inkubiert. Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde dieser in CT-Lösung verdünnt (siehe Tabelle 32) und die Zellen nach dem Blockier-Schritt darin für 1 h inkubiert.

**Tabelle 32: Übersicht der für die DAB-Färbung verwendeten Antikörper.**

Antigen	Antikörper
Humanes ATF6 , murines ATF6, Zebrafisch-Atf6	Entsprechende zu testende ATF6-Primärantikörper (1:50 – 1:1000)
<i>myc</i> -Tag	Maus anti- <i>myc</i> (1:500)
FLAG-TAG	Maus anti-FLAG (1:1000)

Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal für jeweils 10 min in 1xPBS gewaschen, um nicht gebundene Primär-Antikörper-Moleküle zu entfernen. Als Sekundär-Antikörper wurden HRP-gekoppelte Antikörper entsprechend der Spezies des Primär-Antikörpers verwendet. Diese wurden 1:250 in C-Lösung verdünnt und die Zellen darin für 45 min inkubiert. Um nicht-gebundene Sekundär-Antikörper-Moleküle zu entfernen, wurden die Zellen anschließend erneut dreimal in 1xPBS gewaschen. Die für die Detektion benötigte DAB-Lösung wurde kurz vor Gebrauch frisch angesetzt. Pro Well wurden hiervon jeweils 600 µl benötigt. Hierzu wurde 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:250 und die DAB-Stocklösung 1:40 in 1xPBS verdünnt und das Gemisch auf die Zellen gegeben. Die Entwicklung erfolgte unter visueller Kontrolle unter dem Binokular. Um die Färbereaktion zu stoppen, wurde die Färbelösung von den Zellen entfernt und diese mit 1xPBS gewaschen.

### 3.8.7. Fixierung und Einbettung von Zebrafischlarven zur Herstellung von Semidünnschnitten

Die Zebrafischlarven wurden für die Herstellung von Semidünnschnitten über Nacht bei 4 °C in 2,5 % Glutaraldehyd / 2 % PFA in 0,1 M Cacodylatpuffer fixiert, um jegliche Proteinstrukturen zu stabilisieren. Anschließend wurden sie dreimal für 10 min mit 0,1 M Cacodylatpuffer gespült bevor sie mit 1 % OsO<sub>4</sub> in 0,1 M Cacodylatpuffer für 80 min bei Raumtemperatur fixiert wurden. Anschließend wurden die Larven zweimal für 10 min unter leichtem Schütteln in 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen. Die Dehydrierung erfolgte mithilfe einer EtOH-Reihe von 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 95 % und 100 % EtOH für jeweils 15 min bei Raumtempera-

tur. Der Dehydrierungsschritt in 100 % EtOH erfolgte insgesamt dreimal. Zur Vorbereitung der Einbettung wurden die Larven anschließend zweimal für 15 min unter leichtem Schütteln in Propylenoxid inkubiert. Die Einbettung erfolgte in einer Einbettungsreihe, bei der die Eponkonzentration mit jedem Schritt zunahm. Zuerst wurden die Larven in ein Propylenoxid/Epon-(2:1)-Gemisch überführt und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten eine Inkubation für 30 min in einem 1:1-Propylenoxid/Epon-Gemisch und eine Inkubation für 30 min in einem Propylenoxid/Epon-1:2-Gemisch. Final wurden die Larven in purem Epon für 2 h inkubiert bevor jeweils drei Larven pro Kapsel in purem Epon eingebettet wurden. Zur Polymerisation wurden die Eponkapseln zuerst 12 h bei 45 °C und anschließend 48 h bei 60 °C inkubiert. Die Einbettung auf Kunstharzbasis ist notwendig, um die zellulären Strukturen in der Probe zu festigen.

Nach der Einbettung wurden die Larven mit einem Ultramikrotom (Ultramikrotom Ultracut S, C. Reichert AG, Wien, Österreich) mit einer Schnittdicke von 0,6 µm geschnitten. Zur Durchlichtmikroskopie wurden die Schnitte anschließend 3-5 min in Richardson-Lösung gefärbt. Nach dem Färbvorgang wurden die Schnitte solange in 1xPBS gewaschen, bis sich keine Farbreste mehr lösten. Die Einbettung der Larven sowie die Herstellung und Färbung der Schnitte wurden in Zusammenarbeit mit Sylvia Bolz und Christine Henes durchgeführt.

### **3.9. Bildgebende Techniken**

#### **3.9.1. Dokumentation von immunhistologischen Färbungen und *in-situ*-Hybridisierungsfärbungen an Gewebeschnitten**

Für die Dokumentation der Färbungen an Gewebeschnitten aus den Immunfärbungen und den ISHs wurde das Axio Imager.Z2 Mikroskop und die ZEISS ZEN Imaging Software (2.3 blue edition) der Firma Zeiss verwendet. Mithilfe der Tile-Funktion wurden Mosaikaufnahmen der gesamten adulten bzw. Larven-Retina unter Verwendung des „Plan-Apochromat 40x/1,4 Öl“-Objektiv aufgenommen. Die Durchlichtaufnahmen der in der ISH angefärbten adulten retinalen Schnitte, wurden mit der „AxioCam 502 Farbkamera“ aufgenommen. Fluoreszenzaufnahmen von immunhistologischen Färbungen wurden mit der „AxioCam 512 Mono-Kamera“ unter Verwendung der Apotomfunktion erstellt. Die Aufnahmen wurden als Z-Stapel mit einer Ebenen-Dicke von 1 µm bis 1,5 µm bei einer Ebenen-Zahl von 6 bis 11 Ebenen erstellt und als *maximum intensity projections* zusammengefügt und ausgewertet.

### **3.9.2. Durchlichtaufnahmen der in der *whole-mount* ISH angefärbten Zebrafischlarven**

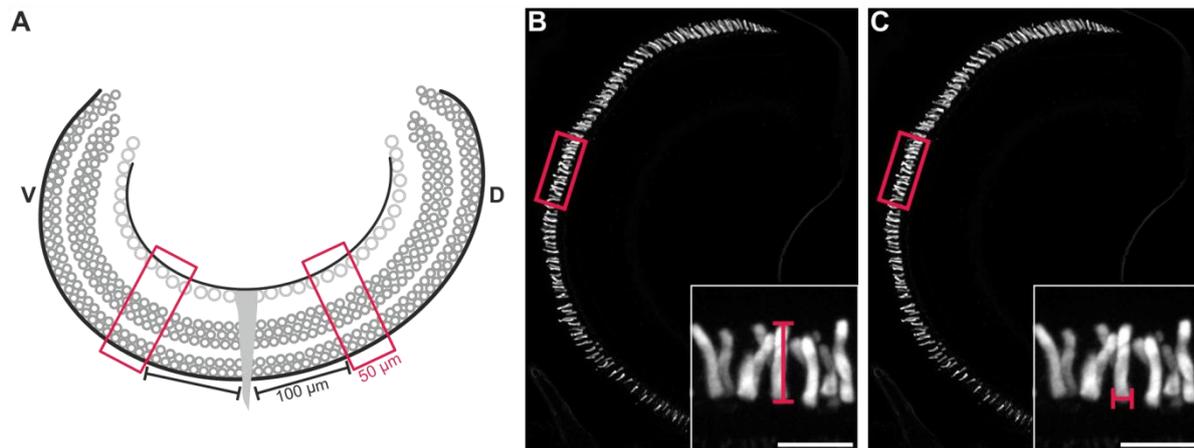
Die in der ISH zuvor angefärbten Zebrafischlarven wurden in 100% Glycerol, welches sich in einem Objektträger mit Vertiefung befand, für die Bildaufnahmen ausgerichtet. Die Aufnahmen wurden unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (Stereomikroskop SZX7, Olympus Europa SE & Co.KG, Hamburg, Deutschland) mit Farbkamera (CMOS Farbkamera SC100, Olympus Europa SE & Co.KG, Hamburg, Deutschland) bei 4-facher Vergrößerung unter Verwendung der cellSense Entry-Software (Version 1.15, Olympus Europa SE & Co.KG, Hamburg, Deutsch) aufgenommen.

### **3.9.3. Auszählung unterschiedlicher retinaler Zelltypen in Zebrafischlarven und adulten Tieren**

Die Auszählung der einzelnen unterschiedlichen retinalen Zelltypen sowie apoptotischen bzw. proliferierenden Zellen erfolgte mithilfe der ZEISS ZEN Imaging Software (2.3 blue edition) der Firma Zeiss. Die Auszählung der unterschiedlichen retinalen Zelltypen an adulten Zebrafischretinae erfolgte an Aufnahmen von Schnitten, die den optischen Nerv enthielten und somit den zentralen Bereich des Auges abbildeten. Ausgezählt wurde ein 50  $\mu\text{m}$  breites Fenster etwa 100  $\mu\text{m}$  dorsal und ventral neben dem optischen Nerv (Abb. 14A). Bei der Auszählung der apoptotischen bzw. proliferierenden Zellen wurde über die gesamte Retina ausgezählt. Bei den adulten Tieren wurden je drei individuelle Tiere ausgewertet.

Die Auszählung der einzelnen retinalen Zelltypen bei Zebrafischlarven im Alter von 3 dpf bis 15 dpf erfolgte über die gesamte Retina. Hierzu wurden Aufnahmen gewählt, die möglichst nahe am optischen Nerv geschnitten und aufgenommen wurden, um einen möglichst zentralen und umfassenden Bereich des Auges zu untersuchen. Die CMZ wurde bei den Auszählungen der proliferierenden Zellen in Zebrafischlarven ausgespart. Pro Zelltyp wurden zwischen sieben und zehn Larven analysiert.

Die Außensegment-Längen und -Breiten der Rotzapfen wurden jeweils in drei Larven im Alter von 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf untersucht. Hierzu wurde ein 50  $\mu\text{m}$  breites Fenster in den zentralen Bereich der Retina gelegt und jeweils fünf Außensegmente ausgemessen. Die Länge wurde von der basalen Seite des Außensegments bis zu dessen Spitze gemessen (Abb. 14B). Für die Außensegment-Breite wurde die Breite der basalen Seite des Außensegments gemessen (siehe Abb. 14C).



**Abbildung 14: Auszählungen und Messungen in der adulten bzw. Larven-Retina.** (A) Schematische Darstellung einer adulten Zebrafischretina. Die roten Kästen markieren den 50 µm breiten Bereich, der für die unterschiedlichen retinalen Zelltypen ausgezählt wurde. V: ventral, D: dorsal. (B) Die Außensegment-Länge wurde in einem 50 µm breiten Fenster in der zentralen Retina gemessen (roter Kasten). Die Höhe der einzelnen Außensegmente wurde von der Basis bis zu Spitze ausgemessen (Bildausschnitt). (C) Die Außensegment-Breite wurde in einem 50 µm breiten Fenster in der zentralen Retina gemessen (roter Kasten). Die Breite der einzelnen Außensegmente wurde entlang der Basis ausgemessen (Bildausschnitt). Maßstabsbalken: 10 µm.

Die Verarbeitung und Auswertung der Daten erfolgte anschließend in Excel und die statistische Auswertung mit der Software „SigmaPlot13“. Um zu entscheiden, welcher Test für den Vergleich zweier unterschiedlicher Gruppen (z.B. WT und *knockout*) verwendet werden muss, wurde zuerst getestet, ob die Daten in jeder Gruppe normalverteilt vorliegen und ob die gleiche Varianz vorliegt. Wurden beide Kriterien erfüllt, wurde der „*Students-T-Test*“ angewendet. Wurden die Kriterien nicht erfüllt, wurden die Gruppen mithilfe des „*Mann-Whitney-U-Tests*“ miteinander verglichen. Für die Signifikanz gilt:  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*). Für  $p > 0,05$  liegt keine Signifikanz (n.s.) vor.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Identifizierung von *atf6* im Zebrafisch

#### 4.1.1. *atf6* als einziges Ortholog im Zebrafischgenom

Anhand von *in silico* Analysen mittels unterschiedlicher Datenbanken (Santa Cruz Genome Browser, Ensembl Genome Browser) wurde im Zebrafischgenom *atf6* als Ortholog zum humanen *ATF6* identifiziert (siehe Tabelle 33).

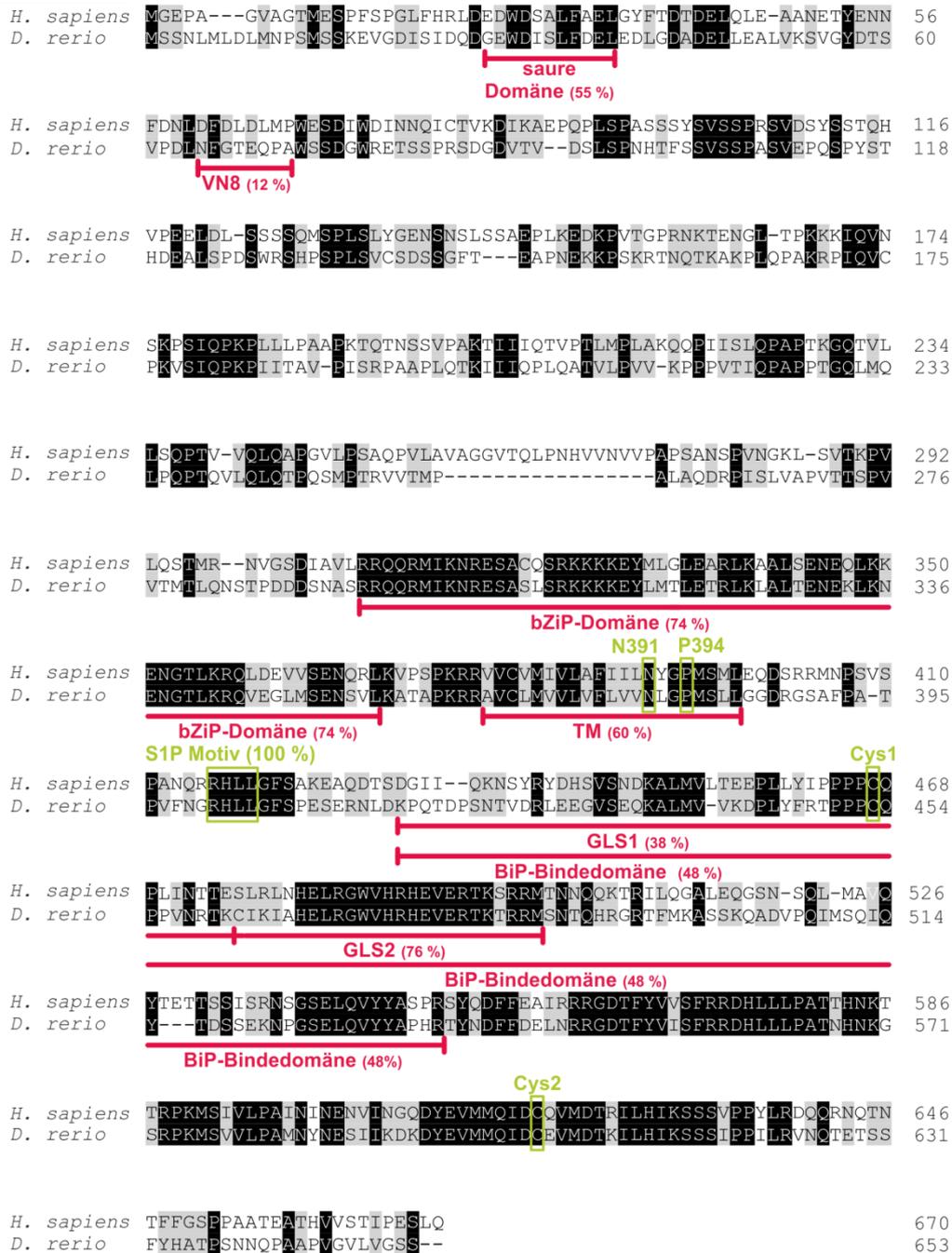
**Tabelle 33: Vergleich des Zebrafisch *atf6* mit dem humanen Ortholog *ATF6***

Spezies	Human	Zebrafisch
Genname	<i>ATF6</i>	<i>atf6</i>
Referenzsequenz	NM_007348.3	NM_001110519.1
Chromosom	1	20
Transkriptlänge	7496 bp	4192 bp
Strang	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
Gengröße	197,78 kb	55,37 kb
Exons	16	16
Kodierende Exons	16	16
Proteinlänge in aa	670	653

*atf6* ist im Zebrafisch auf Chromosom 20 lokalisiert und erstreckt sich genomisch über 55,37 kb mit 16 kodierenden Exons und kodiert für ein Transkript von 4192 bp. Im Vergleich hierzu umspannt das humane *ATF6* auf Chromosom 1 197,78 kb, kodiert für ein Transkript von 7496 bp und hat ebenfalls 16 kodierende Exons.

Die Proteinsequenzen der beiden ATF6-Orthologe wurden durch Erstellen eines *pairwise* Alignments mittels der Software „Clustal Omega“ miteinander verglichen. Mithilfe des Alignments konnte eine Sequenzidentität zwischen dem humanen und dem Zebrafisch-Atf6-Protein von 44,91 % bestimmt werden. Die Sequenzidentität der für die transkriptionelle Aktivität von ATF6 wichtigen VN8-ähnlichen Domäne und der sauren Domäne lag bei 12 % bzw. 55 % (Thuerlauf et al., 2002). Die Konservierung der bZip-Domäne betrug 74 %. Die Sequenzidentitäten der Transmembrandomäne und der im luminalen Abschnitt des Atf6-Proteins liegenden GLS1 und GLS2 sowie der BiP-Bindedomäne variierten zwischen 38 % und 76 % (Abb. 15). Das Erkennungsmotiv der S1P (RHLL, Ye et al., 2000) war zu 100 % identisch zwischen beiden Spezies. Ebenso waren die für das S2P-Motiv essentiellen Aminosäuren Asparagin (human p.N391, Zebrafisch p.N377) und Prolin (human p.Pro394, Zebrafisch p.Pro380) (Ye et al., 2000) konserviert (Abb. 15). Selbiges galt für die beiden Cysteinreste Cys 1 (human p.C467, Zebrafisch p.C453) und Cys2 (human p.C618, Zebrafisch p.C603), die für die Ausbildung von inter- oder intramolekularen Disulfidbrücken bei der

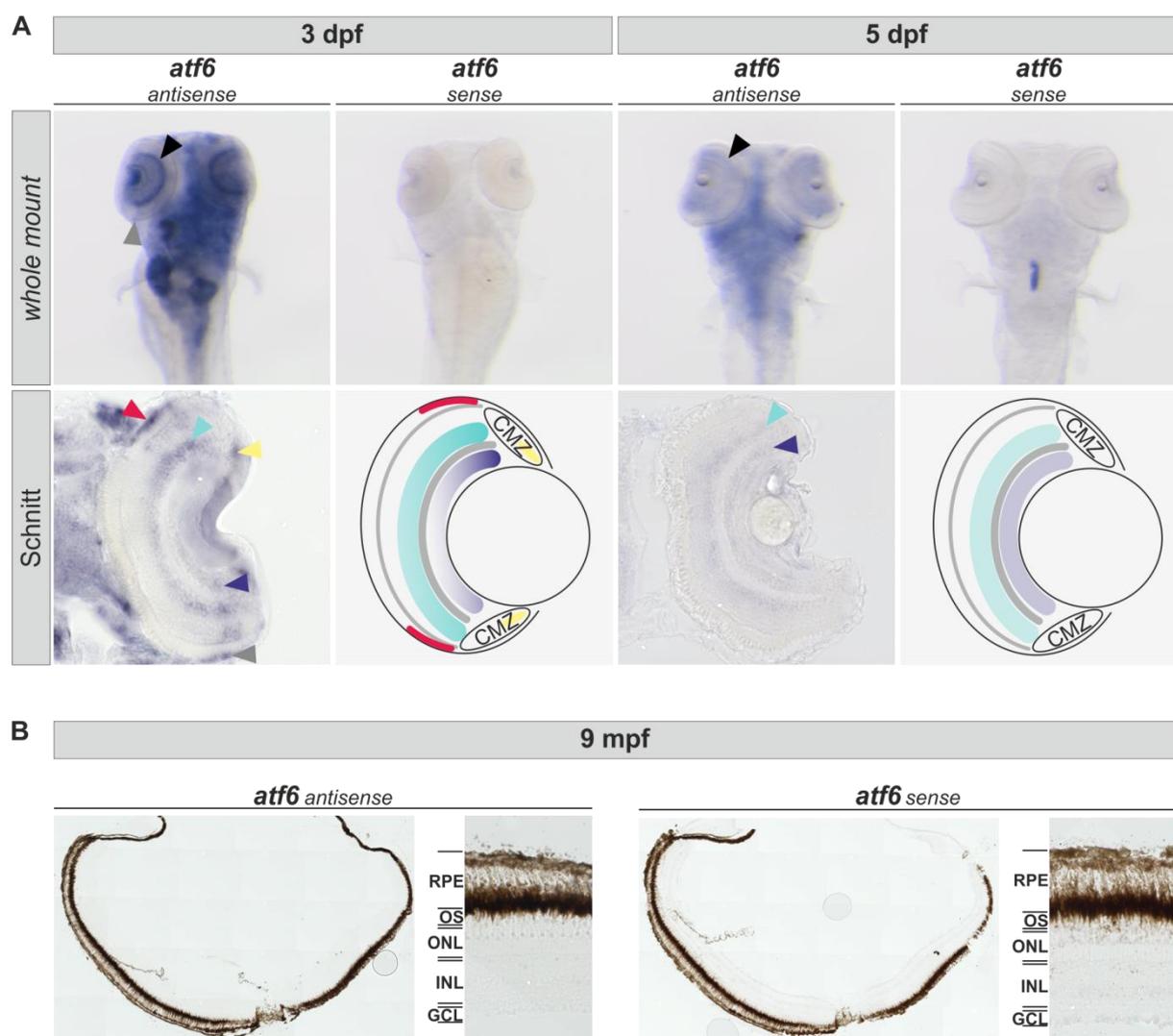
Dimerisierung und Oligomerisierung von ATF6 verantwortlich sind (Nadanaka et al., 2007, (Abb. 15)).



**Abbildung 15: Pairwise Alignment des humanen (*H. sapiens*) und des Zebrafisch (*D. rerio*) ATF6-Proteins.** Schwarz hinterlegte Aminosäuren sind identisch zwischen beiden Spezies. Grau hinterlegte Aminosäuren besitzen Seitenketten mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften. Die verschiedenen strukturellen und funktionellen Domänen sind in rot gekennzeichnet. Die Proteinsequenz-Identität jeder Domäne zwischen beiden Spezies ist in Klammern angegeben. Funktionell wichtige, konservierte Aminosäuren an bestimmten Stellen im Protein sind mit grünen Kästen markiert. TM: Transmembrandomäne; bZIP: basischer Leucin-Zipper; GLS1 / GLS2: Golgi-Lokalisationssequenz 1 bzw. 2; S1P/S2P: Serinprotease 1 bzw. 2; N391 und P394: Aminosäuren, die als Erkennungssignal für die S2P dienen; Cys1 bzw.2: konservierte Cysteinreste für inter- und intramolekulare Disulfidbrücke zur Dimerisierung und Oligomerisierung.

#### 4.1.2. Lokalisation und Expression von *atf6* in der Zebrafischretina

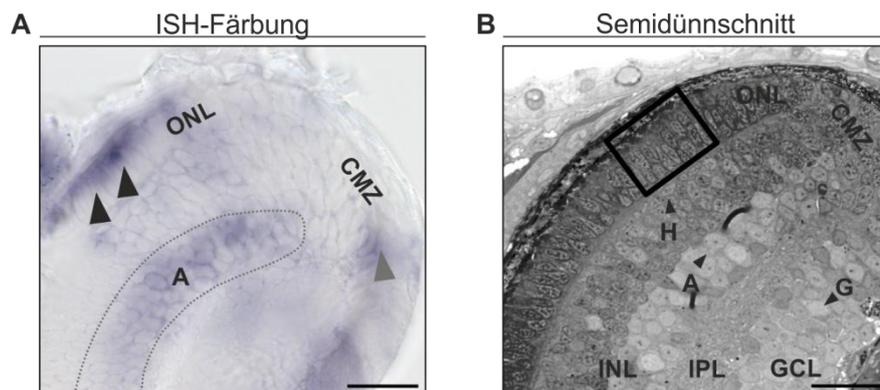
Da bislang nicht bekannt ist, in welchen retinalen Zellen *atf6* zu welchem Zeitpunkt in der Entwicklung exprimiert wird, sollte die Lokalisation und Expression mittels *whole mount* und Schnitt-ISH-Experimenten untersucht werden. Die Detektion der exprimierten *atf6*-mRNA erfolgte mittels einer spezifischen Ribosonde an 3 dpf und 5 dpf alten Zebrafischlarven sowie an adulten (9 mpf) retinalen Schnitten von WT-Tieren der TUE-Linie. Die verwendete Sonde für die *atf6*-Transkripte umfasste den kompletten offenen Leserahmen von *atf6* (Referenzsequenz: NM\_001110519). Sowohl in 3 dpf als auch in 5 dpf alten Zebrafischlarven konnte eine Expression von *atf6* in der Retina als auch in der Hirnregion detektiert werden (Abb. 16A).



**Abbildung 16: Übersicht der *atf6*-Expression in Zebrafischlarven- und der adulten Zebrafischretina. (A)** ISH zur Detektion der *atf6*-Expression in 3 dpf und 5 dpf alten Zebrafischlarven. Die retinale Expression von *atf6* ist mit farbigen Pfeilen markiert und zur Verdeutlichung zusätzlich schematisch dargestellt. Rot: Photorezeptoren, Türkis: Amakrinzellen im INL, Blau: Zellen im GCL, Gelb: Zellen der CMZ, Grau: OPL und IPL. **(B)** ISH von *atf6* in der adulten Zebrafischretina (9 mpf). Es konnte keine *atf6*-spezifische Färbung in 9 mpf alten Zebrafischretinae detektiert werden. Maßstabsbalken: Retina: 200 µm, Vergrößerung: 50 µm.

Schnitte der ISH-gefärbten Larven zeigten eine restriktive Expression von *atf6* in verschiedenen retinalen Regionen. Im ONL wurde eine Expression in den peripheren Bereichen, nahe der CMZ detektiert. In der CMZ selbst konnte ebenfalls eine Färbung beobachtet werden. Die *atf6*-Expression im INL sowie im GCL folgte einem Gradienten, der eine stärkere Expression in den dorsalen und ventralen Bereichen als im zentralen Bereich zeigte (Abb.16A). In der adulten Zebrafischretina konnte in ISH-Experimenten keine *atf6*-Expression detektiert werden (Abb. 16B). Vergleich man die *atf6*-Expression in den unterschiedlichen Altersstufen war eine Abnahme der Expression mit zunehmendem Alter zu beobachten (Abb. 16A und Abb. 16B).

Der Vergleich der retinalen Strukturen aus dem Semidünnschnitt mit den in der ISH angefärbten Strukturen zeigte, dass die Expression von *atf6* im INL mit Amakrinzellen und im ONL mit den Innensegmente der sich nahe zur CMZ befindenden Photorezeptoren kolokalisierte (Abb. 17). Die Unterscheidung der einzelnen Zellen im Semidünnschnitt erfolgte analog zu der bereits bestehenden Einteilung von Schmitt und Dowling (Schmitt und Dowling, 1999).



**Abbildung 17: Lokalisation von *atf6* in der larvalen Zebrafischretina.** (A) *atf6*-Expression in der Retina einer 3 dpf alten Zebrafischlarve. Die Expression von *atf6* konnte in den Innensegmenten der peripheren Photorezeptoren (schwarze Pfeile), den Amakrinzellen (Umriss) sowie der CMZ (grauer Pfeil) lokalisiert werden. (B) Derselbe retinale Ausschnitt einer 3 dpf alten Zebrafischlarve im Semidünnschnitt. Der schwarze Kasten im Semidünnschnitt markiert die Region, in der die ersten Außensegmente gebildet werden und die *atf6*-Expression mittels ISH in den Photorezeptoren detektiert werden konnte. H: Horizontalzellen, A: Amakrinzellen, G: Ganglienzellen. Maßstabsbalken: ISH und Semidünnschnitt: 20 µm.

#### 4.1.3. Evaluation von Antikörpern zur Detektion des humanen, murinen und Zebrafisch-Atf6-Proteins

Um Atf6 auch immunhistologisch in retinalen Schnitten detektieren zu können, wurden in dieser Arbeit verschiedene kommerzielle wie auch Kunden-spezifische Antikörper gegen die aus unterschiedlichen Spezies stammenden ATF6-Proteine getestet. Insgesamt wurden 54 Antikörper immunhistochemisch und immunzytochemisch sowie im Western Blot getestet:

sieben kommerziell erhältliche Antikörper gegen das humane und murine ATF6, 26 für dieses Projekt in Auftrag gegebene Antikörper gegen das humane ATF6, 12 für dieses Projekt in Auftrag gegebene Antikörper gegen das murine ATF6 und 9 für dieses Projekt in Auftrag gegebene Antikörper gegen das Zebrafisch-Atf6-Protein. Eine Übersicht der Evaluation aller getesteten Antikörper inklusive der zur Evaluation angewandten Techniken ist in Tabelle S1 dargestellt. Die Evaluation zeigte, dass keiner der getesteten Antikörper gegen das Zebrafisch-Atf6-Protein dieses im Western Blot oder in der Immunzyto- bzw. in der Immunhistochemie spezifisch erkennt. Sechs der 26 gegen humanes ATF6 getesteten Antikörper zeigten ein falsch-positives Ergebnis, d.h. in der Immunzytochemie war eine ATF6-spezifische Färbung in, mit humanem ATF6 transfizierten, HEK293T-Zellen zu detektieren, die in der Immunzytochemie an WT- und Patientenfibroblasten mit Mutationen in *ATF6* jedoch nicht zu verifizieren war. Unter Verwendung der restlichen 20 der 26 für dieses Projekt generierten Antikörper gegen humanes ATF6 konnte ATF6 mit keiner der angewandten Techniken detektiert werden. Alle 12 gegen das murine ATF6 generierten Antikörper wiesen ebenfalls falsch-positive oder unspezifische Ergebnisse auf. War eine spezifische Detektion von ATF6 in der Immunzytochemie in, mit murinem ATF6 transfizierten, HEK293T-Zellen möglich, war diese in der Immunzytochemie unter Verwendung von WT- und *Atf6*<sup>-/-</sup>-MEFs sowie in der Immunhistochemie an adulten retinalen Schnitten von WT- und *Atf6*-defizienten Mäusen nicht zu verifizieren. Ebenso war mit keinem der getesteten kommerziell erhältlichen Antikörper, weder in der Immunzyto- noch in der Immunhistochemie, eine spezifische Detektion des humanen oder des murinen ATF6-Proteins möglich.

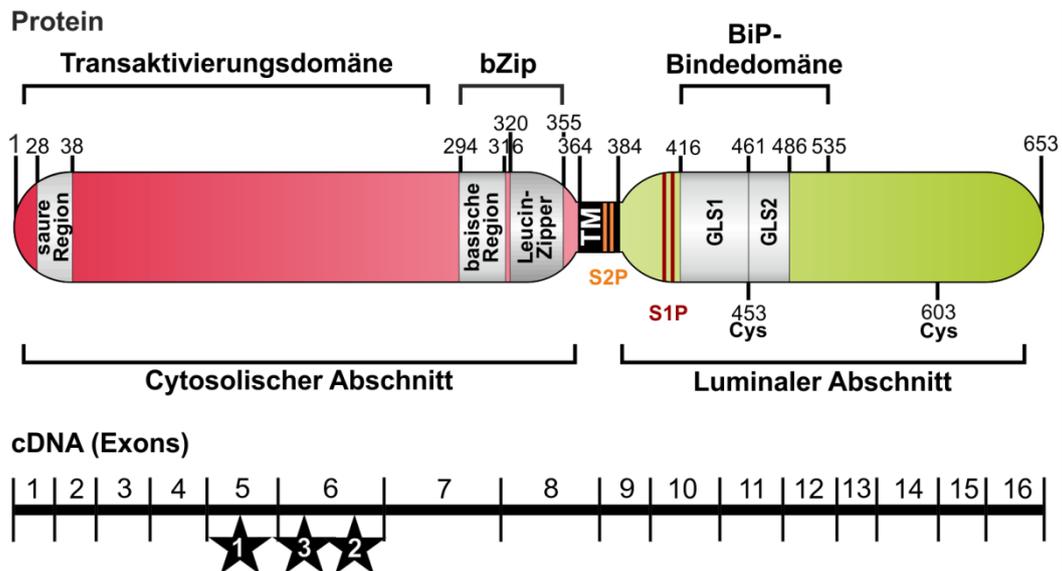
## 4.2. Generierung einer *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlinie

Die Erzeugung des *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells erfolgte durch den Einsatz von TALENs. Es wurden drei verschiedene TALEN-Paare identifiziert und kloniert, und hinsichtlich ihrer Toxizität und Editierungseffizienz validiert (siehe Abschnitt 3.3.9.4 im Methodenteil).

### 4.2.1. Identifikation von TALEN gegen *atf6*

Mithilfe des Prädiktionsprogrammes „TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0“ wurden zwei unterschiedliche TALEN-Paare, TALEN1 in Exon 5 und TALEN2 in Exon 6, identifiziert. Zusätzlich wurde ein bereits publiziertes TALEN-Paar gegen *atf6* ausgewählt (TALEN3; Sander et al., 2011). Eine graphische Übersicht der Lokalisation der ausgewählten TALEN-Paare im Vergleich zu der Lage der strukturellen und funktionellen Domänen im *Atf6*-Protein

ist in Abb. 18 dargestellt. Die Zielsequenzen der identifizierten TALEN-Paare sind in Tabelle 34 zusammengefasst.



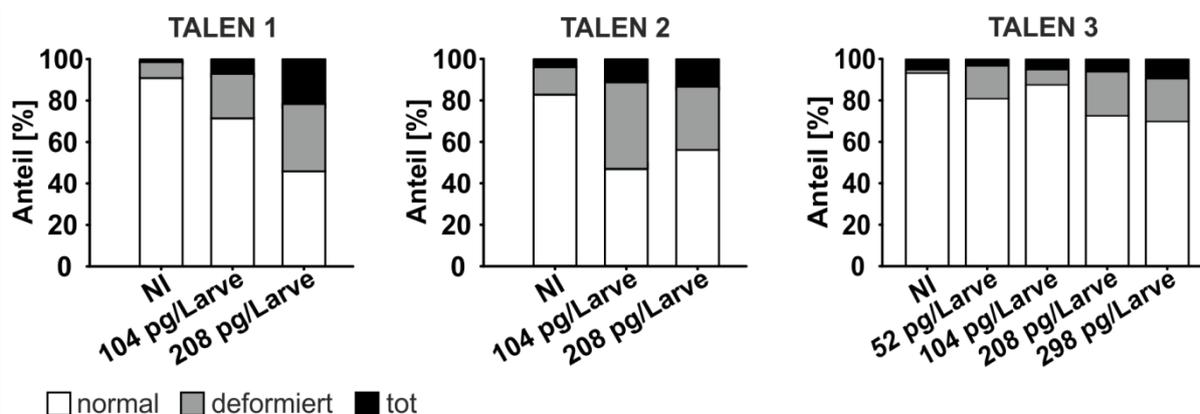
**Abbildung 18: Lage der ausgewählten TALEN-Paare in *atf6*.** Die Lage der einzelnen TALEN-Paare in Exon 5 und Exon 6 von *atf6* ist durch Sterne gekennzeichnet. Alle drei TALEN-Paare binden vor den Sequenzabschnitten, die die strukturellen und funktionellen Domänen von Atf6 kodieren. TM: Transmembrandomäne; GLS: Golgi-Lokalisationssequenz; S1P und S2P: Serinprotease-Schnittstellen 1 und 2; bZip: basische Leucin-Zipper-Domäne, Cys: Cysteinreste.

**Tabelle 34: Zielsequenzen der TALEN gegen Zebrafisch-*atf6*.** <sup>1</sup>Starke RVDs sind grau unterlegt. <sup>2</sup>Die Länge der Spacer-Sequenz ist in Klammern angegeben und die Erkennungssequenz der für die Genotypisierung verwendeten Restriktionsenzyme ist fett markiert und unterstrichen.

	<b>atf6_TALEN1L (Exon 5)</b>	<b>atf6_TALEN1R (Exon 5)</b>
<i>atf6</i> -Zielsequenz (5'-3')	TCTCCAGACTCGTGCGGTT	TGGAGTCAGAGCAGACGGA
TALE-Monomersequenz <sup>1</sup>	HD NG HD HD NI NN NI HD NG HD NN NG NN NN HD NN NG NG	NN NN NI NN NG HD NI NN NI NN HD NI NN NI HD NN NN NI
Spacer-Sequenz (5'-3') <sup>2</sup>	<u>CCCATC</u> CCCTCTCCGCTG (17 bp)	
	<b>atf6_TALEN2L (Exon 6)</b>	<b>atf6_TALEN2R (Exon 6)</b>
<i>atf6</i> -Zielsequenz (5'-3')	TCCGGCAGCCCCTCTTCAA	TGTGGCCTGAAGCGGCTG
TALE-Monomersequenz <sup>1</sup>	HD HD NN NN HD NI NN HD HD HD HD NG HD NG NG HD NI NI	NN NG NN NN HD HD NG NN NI NI NN HD NN NN HD NG ND
Spacer-Sequenz (5'-3') <sup>2</sup>	ACCAAG <u>GATCATCATC</u> (15 bp)	
	<b>atf6_TALEN3L (Exon 6)</b> (Sander et al., 2011)	<b>atf6_TALEN3R (Exon 6)</b> (Sander et al., 2011)
<i>atf6</i> -Zielsequenz (5'-3')	TCCAACCAGCAAAAAGAC	TAGGCTGAATGGAAACCT
TALE-Monomersequenz <sup>1</sup>	HD HD NI NI HD HD NI NN HD NI NI NI NI NI NN NI HD	NI NN NN HD NG NN NI NI NG NN NN NI NI NI HD HD NG
Spacer-Sequenz (5'-3') <sup>2</sup>	CCAT <u>CCAGG</u> TGTGCCCA (18 bp)	

#### 4.2.2. Evaluation der TALEN gegen *atf6*

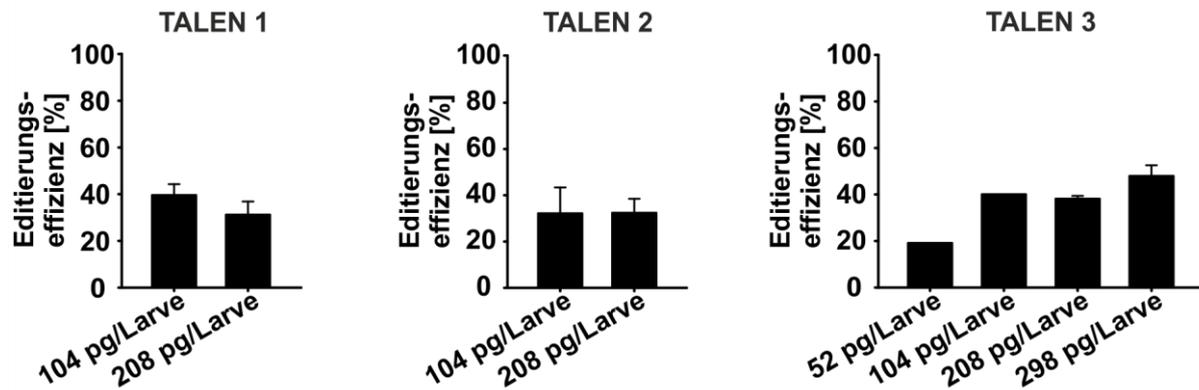
Die generierten TALEN-Paare gegen *atf6* sollten hinsichtlich ihrer Toxizität und ihrer Editierungseffizienz, d.h. der Effizienz mit der ein DNA-Doppelstrangbruch induziert wurde, evaluiert werden. Die injizierten Mengen reichten je nach TALEN-Paar von 52 pg/Larve bis 298 pg/Larve (Abb. 19). Die TALEN-Paare kodierenden cRNAs wurden in Oozyten im Einzell-Stadium von WT-Fischen injiziert und die Toxizität anhand des Anteils morphologisch unauffälliger und morphologisch auffälliger Larven sowie toter Larven bis 2 dpf bestimmt.



**Abbildung. 19: Toxizität der getesteten TALEN-Paare bei unterschiedlichen Injektionsmengen.** Pro TALEN-Paar wurde für jede getestete TALEN-cRNA-Menge sowie für unbehandelte, nicht injizierte Kontrolltiere (NI) der Anteil an normal entwickelten, deformierten und toten Larven bis zum Alter von 2 dpf anhand visueller Kontrolle bestimmt. Pro TALEN-Paar und Bedingung wurden mindestens 110 Larven untersucht.

Bei den TALEN-Paaren 1 und 2 konnten bei 104 pg/Larve bzw. 208 pg/Larve eine Toxizität von 30,0 % bzw. 55,5 % beobachtet werden. Von TALEN-Paar 3 wurden Mengen von 52 pg/Larve bis zu 298 pg/Larve getestet, wobei eine maximale Toxizität von 30,2 % bei einer Injektionsmenge von 298 pg beobachtet wurde.

Für jedes TALEN-Paar und dessen getesteten cRNA-Menge wurde die Editierungseffizienz bei Larven im Alter von 2 dpf semiquantitativ mittels PCR/RFLP-Analyse ermittelt (Abb. 20).

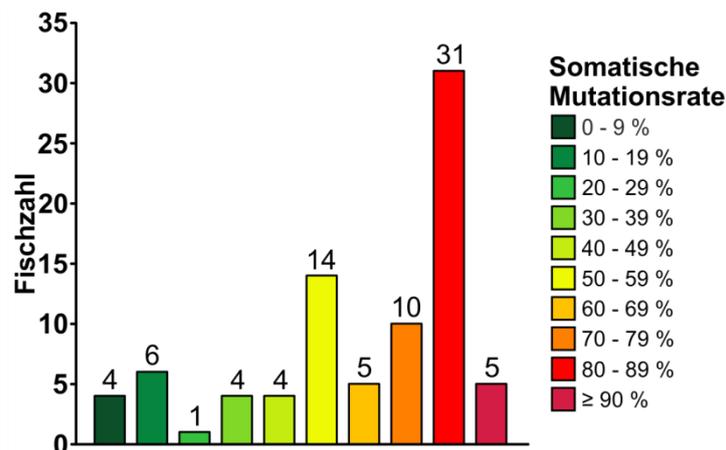


**Abbildung 20: Editierungseffizienz der getesteten TALEN-Paare.** Pro TALEN-Paar wurde für jede getestete cRNA-Menge die Genom-Editierungseffizienz an Larven im Alter von 2 dpf mittels PCR/RFLP-basierter Analyse bestimmt. Die TALEN-Paare 1 und 2 zeigten ähnliche Editierungseffizienzen für alle getesteten Injektionsmengen. Für TALEN-Paar 3 wurde ein Dosis-abhängiger Anstieg in der Editierungseffizienz mit zunehmender Injektionsmenge beobachtet. Pro TALEN-Paar und Bedingung wurde die Editierungseffizienz in mindestens 24 Larven untersucht

Im direkten Vergleich zeigten die TALEN-Paare 1 und 2 eine ähnliche Editierungseffizienz zwischen 32,2 % und 39,7 % für die jeweils getesteten cRNA-Mengen von 104 pg/Larve und 208 pg/Larve. Für das TALEN-Paar 3 zeigte sich ein Dosis-abhängiger Anstieg in der Editierungseffizienz mit steigender cRNA-Menge. Bei Injektion von 52 pg TALEN-cRNA pro Larve wurde eine Editierungseffizienz von 19,2 %, erzielt. Eine Verdopplung oder Vervierfachung der applizierten TALEN-Menge resultierte in einer Erhöhung der Genom-Editierungseffizienz auf 40,1 % bzw. 38,2 %. Erhöhte man die injizierte TALEN-Paar-Menge pro Larve auf 298 pg, konnte eine höchstmögliche Editierungseffizienz von 48,0 % erreicht werden. Basierend auf den Toxizitäts- und Editierungseffizienzdaten wurde das in Exon 6 von *atf6* bindende TALEN-Paar 3, das im Vergleich bei geringster Toxizität die höchste Editierungseffizienz aufwies, für die Generierung der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlinie ausgewählt.

#### 4.2.3. Generierung der *atf6*-knockout-Zebrafischlinie

Zur Generierung der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlinie wurden 122 Larven, welche mit TALEN-Paar 3 behandelt wurden, aufgezogen. Die Überlebensrate der injizierten Larven betrug 63,1 %, sodass im Alter von 2,5 mpf mittels Schwanzflossenbiopsien die somatische Mutationseffizienz von 77 F<sub>0</sub>-Tieren bestimmt werden konnte (Abb. 21). Von insgesamt 77 analysierten F<sub>0</sub>-Tieren trugen fünf eine somatische Mutationsrate von ≥90 % und wurden daher als potentielle *Founder*-Fische eingestuft (siehe Tabelle 34). Diese fünf Tiere wurden mit WT-Tieren verpaart, um zu testen, ob und welche *atf6*-Mutationen diese an ihre Nachkommen transmittieren.



**Abbildung. 21: Spektrum der somatischen Mutationsrate.** Von 77 Fischen, die mit TALEN3 behandelt wurden, wurde die somatische Mutationsrate bestimmt. Die einzelnen Fische wurden anhand ihrer somatischen Mutationsrate gruppiert. Die Anzahl der Fische pro Gruppe ist oberhalb der Balken angegeben.

Von den fünf potentiellen *Founder*-Fischen transmittierten nur vier Fische Mutationen an ihre Nachkommen (siehe Tabelle 35). Der *Founder*-Kandidat atf6-66 hatte zwar die höchste somatische Mutationsrate von allen getesteten Fischen, gab jedoch keine Mutationen an seine Nachkommen weiter. Die verbleibenden vier Kandidaten gaben alle ausschließlich Deletionen an ihre Nachkommen weiter. Die Deletionen variierten in ihrer Größe zwischen 1 bp (atf6-38; atf6-76) und 42 bp (atf6-57) und in ihrer Transmissionseffizienz von 3,2 % bis 56,3 %. Jeder *Founder*-Kandidat transmittierte mindestens zwei verschiedene Deletionen. Insgesamt wurden vier verschiedene *in-frame* und vier verschiedene *frame-shift*-Mutationen an die Nachkommen weitergegeben (Tabelle 35). Alle transmittierten Deletionen sind vergleichend grafisch in Abb. 22 dargestellt.

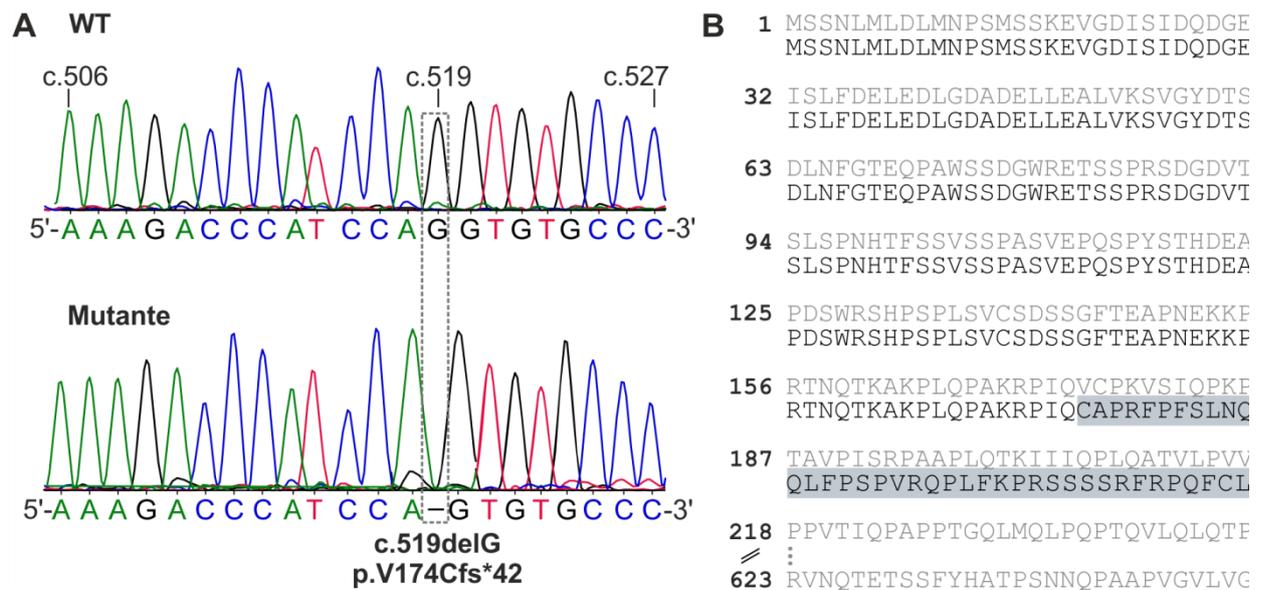
**Tabelle 35: Übersicht der potentiellen *Founder*-Fische:** Pro *Founder*-Kandidat wurde das Geschlecht, die somatische Mutationsrate, die transmittierten Mutationen inklusive ihrer Häufigkeit in den Nachkommen sowie die Transmissionseffizienz jedes einzelnen Fisches bestimmt.

<i>Founder</i> -Kandidat	Geschlecht	Somatische Mutationsrate [%]	Weitergegebene Mutationen (Häufigkeit [%])	Transmissionseffizienz des <i>Founders</i> [%]
atf6-3	♂	90,01	15 bp Deletion (54,8) 13 bp Deletion (3,2)	58,0
atf6-38	♀	95,72	34 bp Deletion (35,5) 1 bp Deletion (6,5)	42,0
atf6-57	♂	91,1	9 bp Deletion (25,0) 15 bp Deletion (43,8) 42 bp Deletion (31,2)	100,0
atf6-66	♂	97,43	-	0
atf6-76	♂	93,28	1 bp Deletion (56,2) 11 bp Deletion (43,8)	100,0

	linker TALEN	<u>BstNI</u>	rechter TALEN	
WT	CCTCTCCAACCAGCAAAAAGAC	ccatccagggtgtgcccc	AAGGTTTCATTTCAGCCTA	AAACCAAT
<b>Founder</b>				<b>Deletion</b>
atf6-3	CCTCTCCAACCAGCAAAA	gcccc	AAGGTTTCATTTCAGCCTA	15 bp
	CCTCTCCAACCAGCAAAA	gtgcccc	AAGGTTTCATTTCAGCCTA	13 bp
atf6-38	CCTCTCCAACCAGCAAAAAGAC	ccat		34 bp
	CCTCTCCAACCAGCAAAAAGAC	cca	gtgcccc	1 bp
atf6-57	CCTCTCCAACCAGCAAAAAGA	ccc	AAGGTTTCATTTCAGCCTA	15 bp
	CC		TTCCATTTCAGCCTA	42 bp
	CCTCTCCAACCAGCAAAAAGAC	ccatcca	AAGGTTTCATTTCAGCCTA	9 bp
atf6-76	CCTCTCCAACCAGCAAAAAGAC	cca	gtgcccc	1 bp
	CCTCTCCAACCAGCAAAAAGAC	cc	AAGGTTTCATTTCAGCCTA	11 bp

**Abbildung 22: Übersicht der transmittierten Deletionen der Founder-Kandidaten.** Dargestellt sind die unterschiedlichen Deletionen in *atf6*, die die einzelnen Founder-Kandidaten an ihre Nachkommen transmittierten (graue Boxen). Die schwarzen Boxen markieren die identische 1 bp-Deletion, die sowohl von Kandidat atf6-38 als auch von Kandidat atf6-76 transmittiert wurde.

Um eine Zebrafischlinie mit einem funktionellen *knockout* in *atf6* zu generieren, wurden die Founder-Kandidaten ausgewählt, die Deletionen weitergaben, die zu einer Verschiebung im Leseraster und einem vorzeitigem Stop in *atf6* führen. Da Kandidat atf6-57 nur Deletionen an seine Nachkommen transmittierte, die nicht zu einer Verschiebung des Leserasters führten, wurde dieser für die Generierung der *knockout*-Linie nicht länger in Betracht gezogen. Auffällig hingegen ist die identische 1 bp-Deletion, die sowohl von Founder atf6-38 als auch von Founder atf6-76 transmittiert wurde. Diese führt zu einer Verschiebung des Leserasters und zu einem vorzeitigem Stop-Codon und damit zu einem Abbruch der Translation des Atf6-Proteins an Position 216 (Abb. 23B). Aufgrund dieser Eigenschaft und der Tatsache, dass es sich bei Kandidat atf6-38 um ein Weibchen und bei Kandidat atf6-76 um ein Männchen handelte, wurden diese beiden Fische als finale Founder zur Generierung der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlinie ausgewählt. Die Verpaarung der beiden Founder-Fische ermöglichte schon in der F<sub>1</sub>-Generation die Generierung von *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischen, welche somit homozygot für die 1 bp-Deletion (c.519delC; p.(V174Cfs\*42)) waren (Abb. 23A).

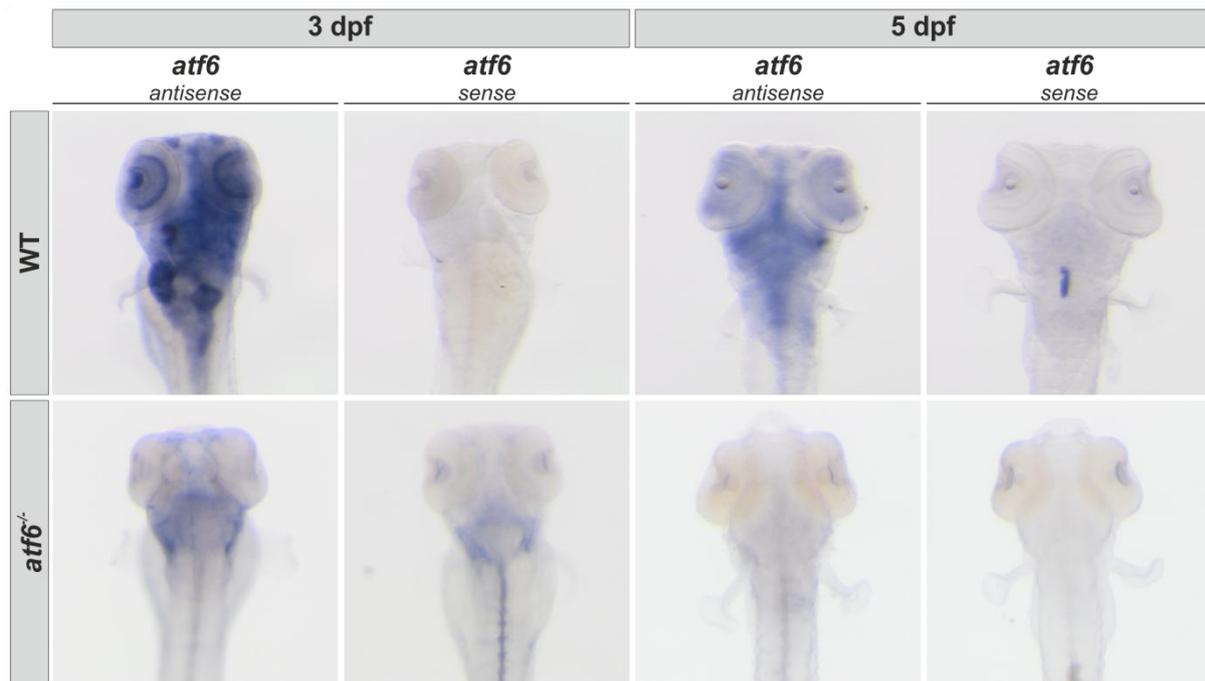


**Abbildung 23: Verifizierung der homozygot vorliegenden 1 bp-Deletion in der F1-Generation. (A)** Sequenzvergleich zwischen der WT- und der mutierten *atf6*-Sequenz. Die eingeführte 1 bp-Deletion (c.519delC) lag in der Mutante homozygot vor. **(B)** Vergleich der Proteinsequenzen des WT- und mutierten Atf6-Proteins. Die WT-Sequenz ist in hellgrau, die verkürzte Sequenz der Mutanten ist in schwarz dargestellt. Die Position, an der die Leserasterverschiebung beginnt, ist grau und das frühzeitige Stop-Codon ist rot hinterlegt.

#### 4.2.4. Expression von *atf6* in *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischen

Die Kontrolle des tatsächlichen *atf6*-knockouts erfolgte auf RNA-Level mittels ISH- und qRT-PCR-Experimenten. Eine Analyse auf Protein-Level mittels Western Blots war aufgrund des Fehlens eines spezifischen Antikörpers gegen Atf6 nicht möglich (siehe Abschnitt 4.1.3). Die Untersuchungen zur Expression von *atf6* in der *knockout*-Linie im Vergleich zu WT-Tieren erfolgten mittels ISH an 3 dpf und 5 dpf alten Zebrafischlarven.

Während in den WT-Tieren in beiden Altersstufen eine deutliche Expression von *atf6* in der Hirnregion sowie im Auge detektiert werden konnte, zeigten die *atf6*<sup>-/-</sup>-Tiere eine verringerte (3 dpf) oder keine (5 dpf) *atf6*-Expression (Abb. 24). Bei den mit der *atf6*-Sense-Sonde hybridisierten Kontroll-Larven wurden in keiner Altersstufe unspezifische Färbungen beobachtet.



**Abbildung 24: Detektion von *atf6* in WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven mittels ISH.** Sowohl im Alter von 3 dpf als auch im Alter von 5 dpf war bei den generierten *knockout*-Tieren eine verringerte (3 dpf) bzw. keine (5 dpf) *atf6*-Expression zu detektieren. WT-Tiere zeigten hingegen eine starke *atf6*-Expression im Bereich des Gehirns sowie in der Retina. Die mit der Kontrollsonde behandelten Tiere zeigten keine Färbung.

Um die Expression von *atf6* in den *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischen quantifizieren zu können, wurden qRT-PCR-Experimente mit RNA von 3 dpf und 5 dpf alten Larven und aus adulten Zebrafischretinae durchgeführt. Die Expression von *atf6* war im Vergleich zu WT-Tieren in jeder der analysierten Altersstufen signifikant reduziert (Tabelle 36). In beiden larvalen Altersstufen (3 dpf und 5 dpf) konnte eine 5,4-fach verringerte *atf6*-Expression in *atf6*<sup>-/-</sup>- im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Zebrafischlarven detektiert werden. In der adulten *atf6*-defizienten Retina war die *atf6*-Expression im Vergleich zu WT-Tieren um das 8,9-fache reduziert, und damit stärker als im Larvalstadium beobachtet werden konnte.

**Tabelle 36: Quantifizierung der relativen Expression von *atf6* in *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischen im Vergleich zu WT-Fischen zur Verifizierung des *atf6*-knockouts**

	Relativer Expressions- unterschied <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> ver- sus WT	<i>p</i> -Wert	Ergebnis
<i>atf6</i> (3 dpf)	0,19	<0,001	5,4-fach ↓
<i>atf6</i> (5 dpf)	0,19	<0,001	5,4-fach ↓
<i>atf6</i> (adult)	0,11	<0,001	8,9-fach ↓

↓: Reduzierte Expression

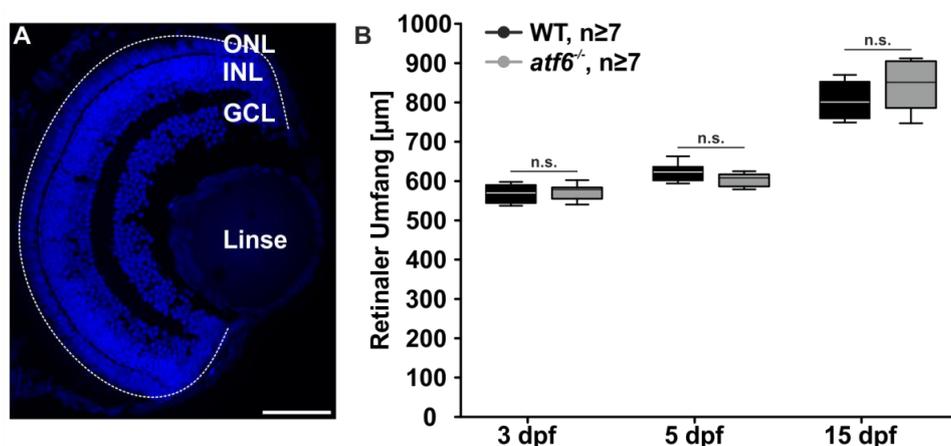
### 4.3. Charakterisierung des *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells

#### 4.3.1. Histologische Charakterisierung der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischretina

Mutationen in *atf6* resultieren im Menschen in einem kompletten Funktionsverlust (Ansar et al., 2015; Kohl et al., 2015, Xu et al., 2015; Skorczyk-Werner et al., 2017) bzw. dem Fehlen (Kohl et al., 2015; Mastey et al., ARVO Abstract Nr. 669-C0227, 2018) der Zapfen-Photorezeptoren. Da bislang nicht bekannt ist, welchen Einfluss *atf6* auf die Entwicklung und Funktion der Retina hat, wurde die Entwicklung, der Aufbau und die Integrität der Retina des generierten *atf6*-Zebrafischmodells histologisch untersucht. Hierbei sollten *atf6*-abhängige Unterschiede sowohl im zeitlichen Verlauf, in der Anzahl als auch in der Morphologie der Zellen des ONLs, des INLs und des GCLs in den Altersstufen 3 dpf, 5 dpf, 15 dpf und der adulten Retina (13 mpf bzw. 16 mpf) analysiert werden.

##### 4.3.1.1. Messung des retinalen Umfangs

Da in verschiedenen Zebrafischmodellen mit retinalem Phänotyp eine Verminderung in der Augengröße beobachtet werden konnte (Zhang et al., 2013; Cerveny et al., 2012), sollte zuerst gewährleistet werden dass jegliche detektierten Unterschiede in den retinalen Zellzahlen zwischen *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven nicht auf Unterschieden in der Augengröße der Tiere basieren. Hierzu wurde der Umfang der Retina vom dorsalen zum ventralen Linsenansatzpunkt anhand der DAPI-Färbung vermessen (Abb. 25A). Die Vermessung des retinalen Umfangs ergab, wie zu erwarten war, in beiden Zebrafischlinien eine Vergrößerung des Umfangs mit zunehmendem Alter. In keiner der untersuchten Altersstufen konnten signifikante Unterschiede in der Augengröße zwischen *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven detektiert werden.



**Abbildung 25: Vermessung des retinalen Umfangs in Zebrafischlarven.** (A) Schematische Darstellung des Prinzips zur Vermessung des retinalen Umfangs. (B) Ergebnisse der Vermessung des retinalen Umfangs in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven.  $p > 0,05$ . Maßstabsbalken: 50 µm.

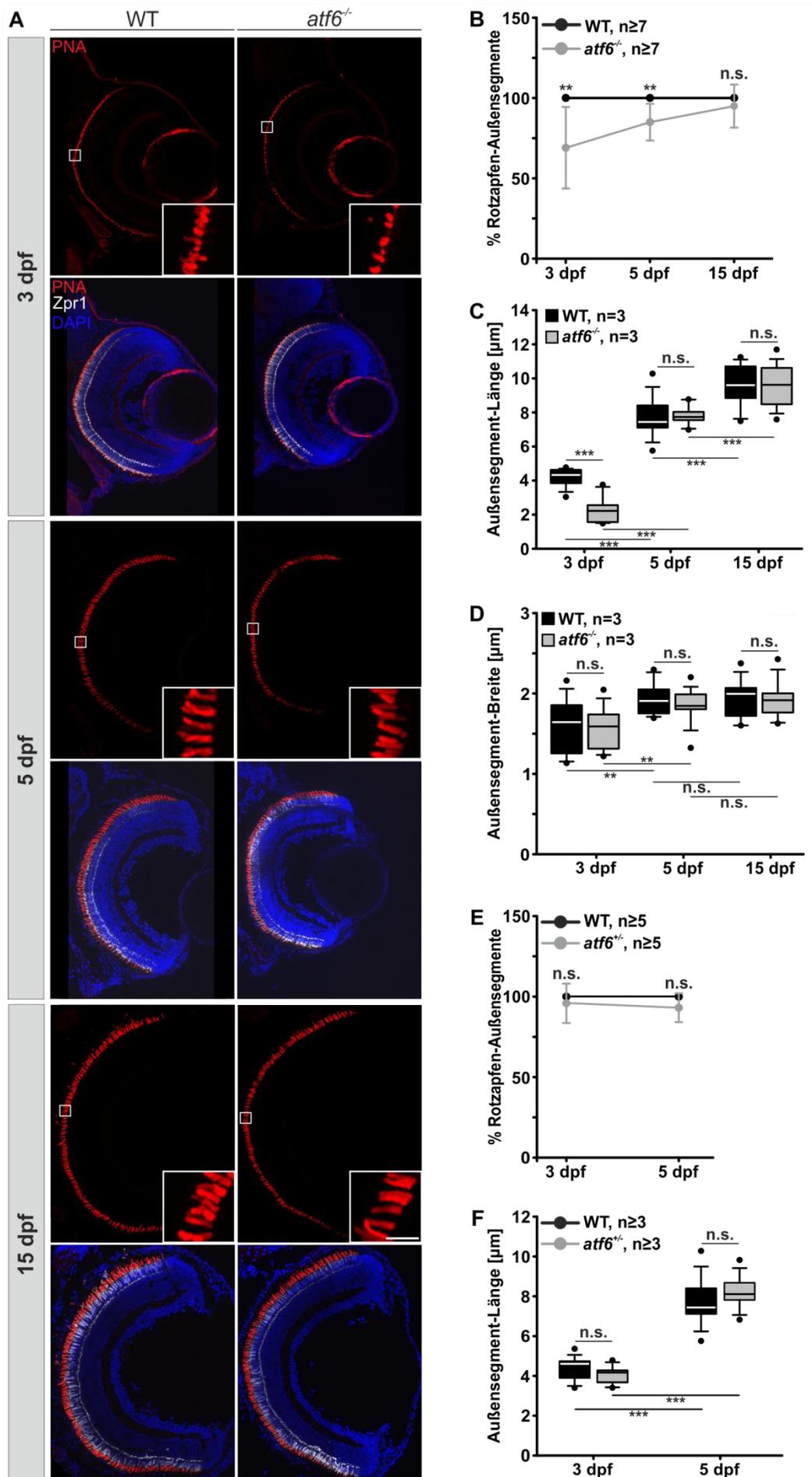
Der retinale Umfang von WT- bzw. *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven betrug im Alter von 3 dpf 566,9 µm (SD 23,2 µm) bzw. 572,5 µm (SD 19,8 µm) und im Alter von 5 dpf 623,1 µm (SD 24,4 µm) bzw. 604,0 µm (SD 16,3 µm). Bis zu einem Alter von 15 dpf stieg der retinale Umfang weiter auf 803,5 µm (SD 45,0 µm) bzw. 842,1 µm (SD 58,9 µm) an (Abb. 25B).

#### 4.3.1.2. Untersuchung der Rot- und Grünzapfen während der Entwicklung

Zur Untersuchung der Rot- und Grünzapfen in der Retina von Zebrafischlarven während der Entwicklung wurden immunhistologische Doppelfärbungen durchgeführt. Die Rot- und Grünzapfen wurden unter Verwendung eines Arrestin 3a-Primärantikörpers (Zpr1) angefärbt, die Rotzapfen-Außensegmente wurden mit PNA-Lektin und die Grünzapfen-Außensegmente mithilfe eines Grün-Opisin-Primärantikörpers (Opn1mw2) markiert.

Die Analyse der Rotzapfen ergab im Alter von 3 dpf eine um 31,6 % (SD 25,4 %) und im Alter von 5 dpf eine um 14,9 % (SD 10,9 %) reduzierte Zahl an Rotzapfen-Außensegmenten in der Retina von *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven im Vergleich zu WT-Larven (Abb. 26A und 26B). *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven besaßen damit durchschnittlich nur 88,6 (SD 33,0) bzw. 147,9 (SD 18,9) Rotzapfen pro retinalem Schnitt während in der WT-Retina 129,6 (SD 23,2) bzw. 173,9 (SD 11,7) Rotzapfen pro Schnitt detektiert werden konnten (Abb. S1). Im Alter von 15 dpf konnte kein Unterschied zwischen *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven beobachtet werden (Abb. 26A und 26B).

Da in der Maus bereits gezeigt werden konnte, dass der Verlust von *Atf6* zu verkürzten Blauzapfen-Außensegmenten führt (Kohl et al., 2015), wurde hier neben der Zahl der Rotzapfen zusätzlich noch die Länge und Breite ihrer Außensegmente untersucht. Die Messung der Außensegment-Länge zeigte, dass die Rotzapfen-Außensegmente in der Retina von *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven im Alter von 3 dpf im Vergleich zu WT-Larven verkürzt waren (Abb. 26C). Sie sind mit 2,3 µm (SD 0,8 µm) nur etwa halb so lang wie die Rotzapfen-Außensegmente der WT-Retina mit 4,2 µm (SD 0,5 µm, Abb. 26C). In späteren Altersstufen (5 dpf und 15 dpf) waren keine Unterschiede in der Rotzapfen-Außensegment-Länge zwischen *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven und WT-Larven mehr zu detektieren (Abb. 26C). Der Vergleich der einzelnen Altersstufen untereinander ergab eine zwischen beiden Linien vergleichbare, signifikante Verlängerung der Rotzapfen-Außensegmente in der WT- und *atf6*-defizienten Retina von 3 dpf auf 5 dpf um 3,5 µm bzw. 5,5 µm und von 5 dpf auf 15 dpf um 1,9 µm.

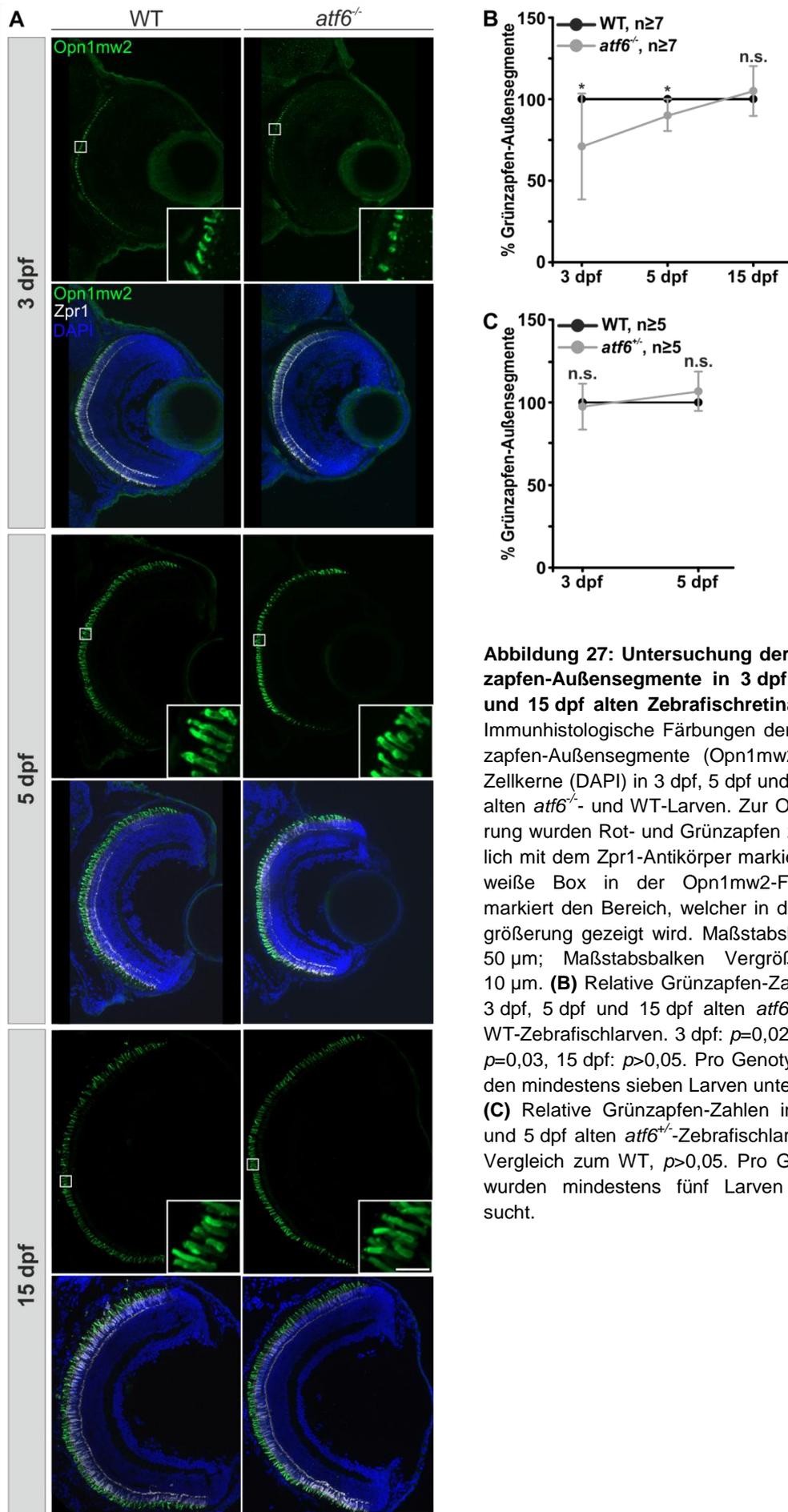


**Abbildung 26: Untersuchung der Rotzapfen-Außensegmente in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten Zebrafischretinae.** (A) Immunhistologische Färbungen der Rotzapfen-Außensegmente (PNA) und Zellkerne (DAPI) in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Larven. Zur Orientierung wurden Rot- und Grünzapfen zusätzlich mit dem Zpr1-Antikörper markiert. Die weiße Box in der PNA-Färbung markiert den Bereich, welcher in der Vergrößerung gezeigt wird. Maßstabsbalken: 50 µm; Maßstabsbalken Vergrößerung: 10 µm. (B) Relative Rotzapfen-Zahlen in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven im Vergleich zum WT. 3 dpf:  $p=0,002$ , 5 dpf:  $p=0,008$ , 15 dpf:  $p>0,05$ . Pro Genotyp wurden mindestens sieben Larven untersucht. (C) Länge der Rotzapfen-Außensegmente in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven. 3 dpf:  $p<0,001$ , 5 dpf und 15 dpf:  $p>0,05$ , 3 dpf auf 5 dpf:  $p<0,001$ , 5 dpf auf 15 dpf:  $p<0,001$ . (D) Breite der Rotzapfen-Außensegmente in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven.  $p>0,05$ . Veränderung der Außensegment-Breite von 3 dpf auf 5 dpf in WT-  $p=0,003$  bzw. in *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven  $p=0,002$ . (E) Relative Rotzapfen-Zahlen in 3 dpf und 5 dpf alten *atf6*<sup>+/-</sup>-Zebrafischlarven im Vergleich zum WT,  $p>0,05$ . Pro Genotyp wurden mindestens fünf Larven untersucht. (F) Länge der Rotzapfen-Außensegmente in 3 dpf und 5 dpf alten *atf6*<sup>+/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven. 3 dpf auf 5 dpf:  $p<0,001$ , innerhalb einer Altersstufe  $p>0,05$ . Pro Genotyp wurden bei mindestens drei Larven die Außensegmente vermessen.

Die Rotzapfen-Außensegment-Breite wurde entlang des basalen Endes gemessen. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Larven in keiner der untersuchten Altersstufen festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied in der Breite konnte nur im Vergleich zwischen 3 dpf und 5 dpf alten Larven beider Linien detektiert werden, wobei ältere Larven breitere Rotzapfen-Außensegmente besaßen als jüngere Larven. Während in 3 dpf alten Larven beider Linien die Rotzapfen-Außensegmente durchschnittlich 1,6 µm (SD 0,3 µm) breit waren, stieg deren Breite bis zu einem Alter von 5 dpf um 0,3 µm auf durchschnittliche 1,9 µm (SD 0,2 µm) an (Abb. 26D). Ein weiterer Anstieg bis zum Alter von 15 dpf war nicht zu beobachten.

Zur weiteren Validierung der Ergebnisse wurden zusätzlich zu *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven auch noch für die 1 bp-Deletion heterozygote Larven auf Veränderungen in der Zahl der Rotzapfen bzw. auf Unterschiede in der Länge der Rotzapfen-Außensegmente im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Larven untersucht. Sowohl im Alter von 3 dpf als auch von 5 dpf konnten keine Unterschiede zwischen WT- und *atf6*<sup>+/-</sup>-Zebrafischlarven in der Zahl der Rotzapfen beobachtet werden (Abb. 26E). Auch die Länge der Rotzapfen-Außensegmente unterschied sich nicht zwischen beiden Genotypen in den untersuchten Altersstufen (Abb. 26F). Betrachtete man die Außensegment-Länge zwischen den beiden Altersstufen, konnte, wie schon zuvor bei WT-Larven, ein signifikanter Zuwachs von 3,4 µm und im Falle von *atf6*<sup>+/-</sup>-Larven von 4,2 µm in der Außensegment-Länge von 3 dpf auf 5 dpf detektiert werden.

Die Untersuchungen der Grünzapfen ergaben im Alter von 3 dpf und 5 dpf ebenfalls eine signifikant reduzierte Zahl der Grünzapfen-Außensegmenten in der Retina von *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven im Vergleich zu WT-Larven (Abb. 27A und 27B).



**Abbildung 27: Untersuchung der Grünzapfen-Außensegmente in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten Zebrafischretinae. (A)** Immunhistologische Färbungen der Grünzapfen-Außensegmente (Opn1mw2) und Zellkerne (DAPI) in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Larven. Zur Orientierung wurden Rot- und Grünzapfen zusätzlich mit dem Zpr1-Antikörper markiert. Die weiße Box in der Opn1mw2-Färbung markiert den Bereich, welcher in der Vergrößerung gezeigt wird. Maßstabsbalken: 50 µm; Maßstabsbalken Vergrößerung: 10 µm. **(B)** Relative Grünzapfen-Zahlen in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven. 3 dpf:  $p=0,02$ , 5 dpf:  $p=0,03$ , 15 dpf:  $p>0,05$ . Pro Genotyp wurden mindestens sieben Larven untersucht. **(C)** Relative Grünzapfen-Zahlen in 3 dpf und 5 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven im Vergleich zum WT,  $p>0,05$ . Pro Genotyp wurden mindestens fünf Larven untersucht.

Im Alter von 3 dpf war die Zahl der Grünzapfen-Außensegmente in *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Larven um 28,9 % (SD 32,3 %) und im Alter von 5 dpf um 10,6 % (SD 9,2 %) reduziert (Abb. 27B). Die absoluten Grünzapfen-Zahlen sind für beide Genotypen in Abb. S1 gegeben. In 15 dpf alten Zebrafischlarven war kein Unterschied in der Zahl der Grünzapfen-Außensegmente zwischen beiden Genotypen mehr nachweisbar (Abb. 27A und 27B).

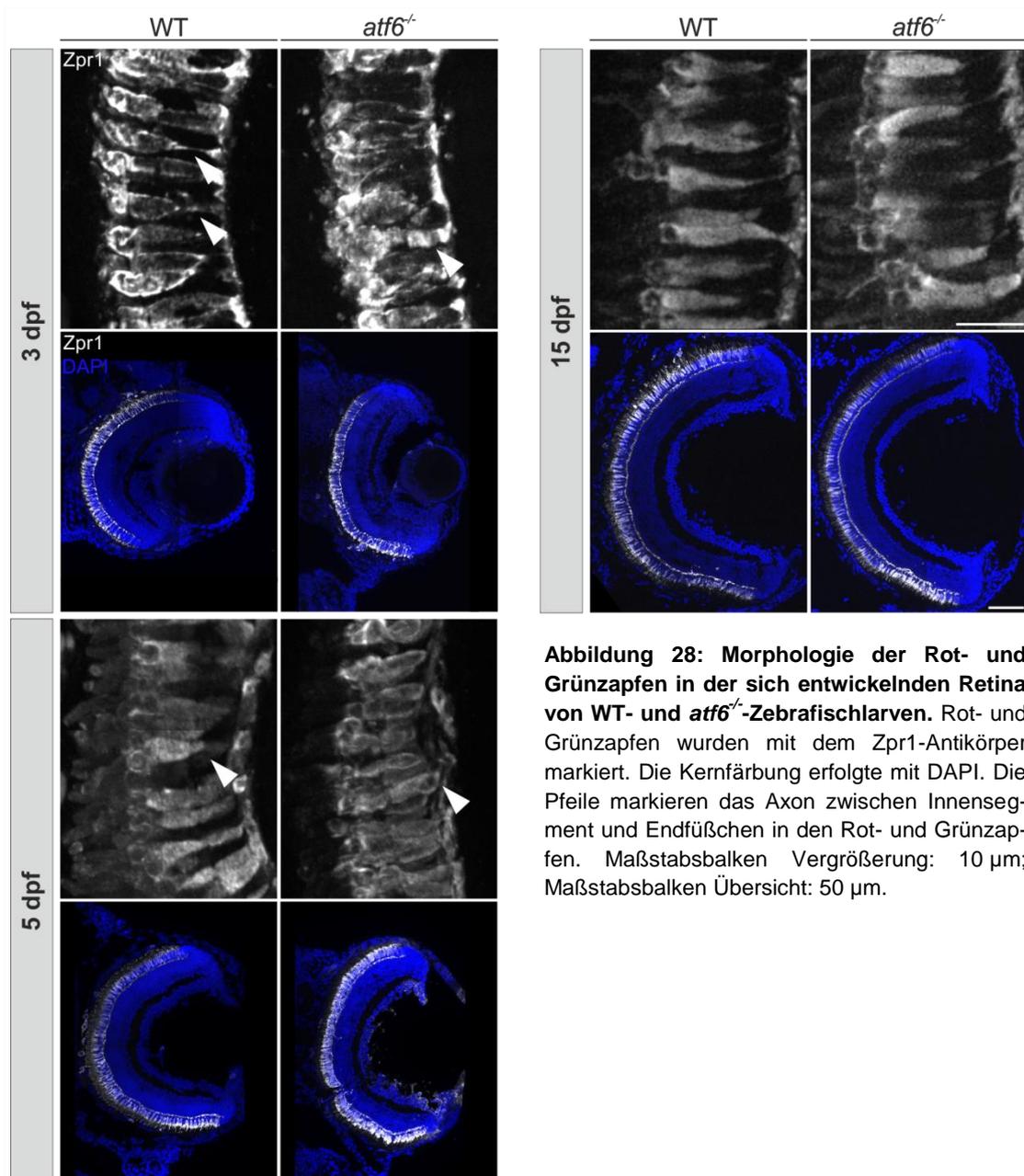
Zur Validierung wurden ebenfalls *atf6*<sup>+/-</sup>-Zebrafischlarven auf Veränderungen in der Zahl der Grünzapfen im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Larven untersucht. Vergleichbar mit der Untersuchung der Rotzapfen konnten auch hier weder im Alter von 3 dpf noch von 5 dpf Unterschiede in der Zahl der Grünzapfen zwischen WT- und *atf6*<sup>+/-</sup>-Zebrafischlarven beobachtet werden (Abb. 27C)

#### 4.3.1.3. Morphologie von Rot- und Grünzapfen und Lokalisation des Rhodopsins in den Stäbchen während der Entwicklung der Zebrafischretina

Die Untersuchungen zur Morphologie der Rot- und Grünzapfen (Doppelzapfen) sowie zur Lokalisation des Rhodopsins in den Stäbchen-Photorezeptoren in der sich entwickelnden Zebrafischretina erfolgten ebenfalls über immunhistologische Färbungen. Hierfür wurden Primärantikörper gegen das in den Rot- und Grünzapfen gebildete Arrestin 3a (Zpr1) und in den Stäbchen gebildete Rhodopsin (Zpr3) verwendet.

Die Morphologie der Rot- und Grünzapfen in *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven zeigte einen verzögerten Entwicklungsverlauf im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Larven. Im Alter von 3 dpf schienen die Rot- und Grünzapfen der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven in ihrer Form kürzer und gedrungenener als in den WT-Tieren. In diesen waren die Rot- und Grünzapfen zu diesem Zeitpunkt schon elongiert und jeder Rot- und Grünzapfen war in seiner Struktur klar und einzeln erkennbar (Abb. 28). Mit 5 dpf war die Elongation der Rot- und Grünzapfen in den WT-Retinae weiter ausgeprägt, die Struktur des Innensegments, des Axons sowie des Endfüßchens war klar zu erkennen. In der Retina der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven war die Elongation der Rot- und Grünzapfen weniger ausgeprägt. Wie schon im Alter von 3 dpf wirkten die Rot- und Grünzapfen in ihrer Form gestaucht. Ferner schien das Axon verkürzt zu sein (Abb 28, Pfeile), wodurch sich das Innensegment und das Endfüßchen fast berührten. Zudem war ihre regelmäßige Anordnung nicht in dem Maße ausgeprägt wie es in gleichaltrigen WT-Larven der Fall war (Abb 28). Erst im Alter vom 15 dpf waren keine Unterschiede in der Morphologie der Rot- und Grünzapfen zwischen WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven mehr zu erkennen. Hier lagen in den

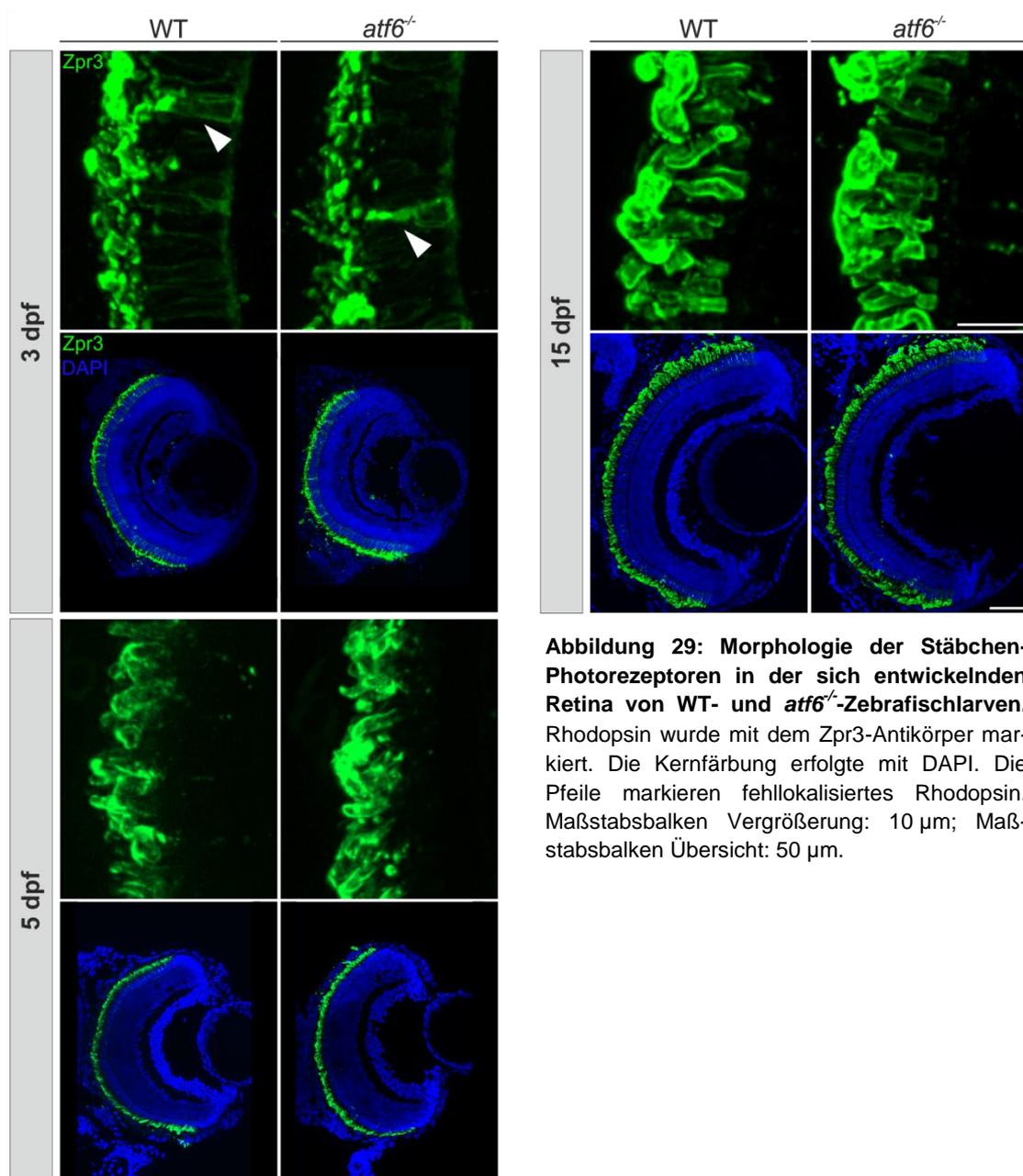
Retinae beider Genotypen die Rot- und Grünzapfen geordnet nebeneinander vor. Das Innensegment, das Axon und das Endfüßchen waren jeweils als separate Strukturen erkennbar (Abb. 28).



**Abbildung 28: Morphologie der Rot- und Grünzapfen in der sich entwickelnden Retina von WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven.** Rot- und Grünzapfen wurden mit dem Zpr1-Antikörper markiert. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Pfeile markieren das Axon zwischen dem Innensegment und dem Endfüßchen in den Rot- und Grünzapfen. Maßstabsbalken Vergrößerung: 10 µm; Maßstabsbalken Übersicht: 50 µm.

Als letzter Zelltyp der äußeren Retina wurden die Stäbchen-Photorezeptoren untersucht. Hier wurde die Lokalisation des Rhodopsins in den Stäbchen analysiert. Bei den Stäbchen-Photorezeptoren waren zu keinem der untersuchten Alterszeitpunkte Unterschiede in der Lokalisation des Rhodopsins erkennbar. Sowohl in der Retina von *atf6*<sup>-/-</sup>- als auch in WT-Zebrafischlarven war das Rhodopsin größtenteils und vergleichbar in den Außensegmenten

lokalisiert. In geringem Maße lag im Alter von 3 dpf noch eine Fehllokalisierung des Rhodopsins in den Innensegmenten, Axonen und Endfüßchen in beiden Linien vor (Abb. 29, Pfeile). Im Alter von 5 dpf sowie 15 dpf war das Rhodopsin fast vollständig im Außensegment lokalisiert. Hier unterschied sich nur noch die Länge der Außensegmente voneinander, die in den älteren Larven deutlich länger, jedoch wieder vergleichbar zwischen beiden Linien waren. Da die Rhodopsin-Färbung keine Identifizierung einzelner Stäbchen-Außensegmente ermöglichte, wurde weder die Zahl noch die Länge der Stäbchen-Außensegmente quantifiziert.



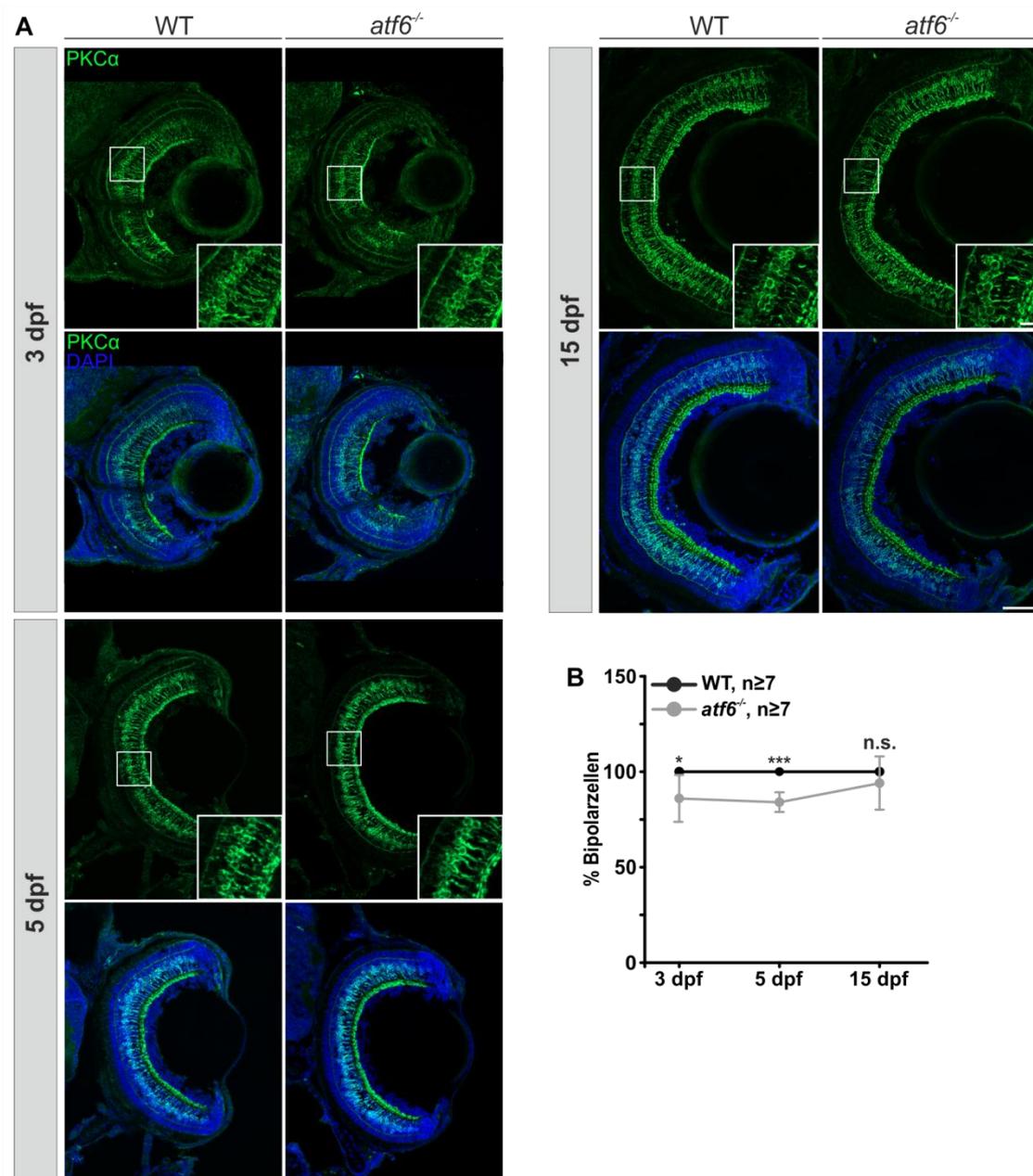
**Abbildung 29: Morphologie der Stäbchen-Photorezeptoren in der sich entwickelnden Retina von WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven.** Rhodopsin wurde mit dem Zpr3-Antikörper markiert. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Pfeile markieren fehllokalisiertes Rhodopsin. Maßstabsbalken Vergrößerung: 10 µm; Maßstabsbalken Übersicht: 50 µm.

#### 4.3.1.4. Untersuchung der Bipolar- und Ganglienzellen während der Entwicklung

Immunhistologische Färbungen wurden ebenfalls genutzt, um zu untersuchen, ob der Verlust von *atf6* einen Effekt auf die Entwicklung und Integrität der inneren Retina, insbesondere auf Bipolar- und Ganglienzellen hat. Eine Bipolarzell-Subpopulation wurde mithilfe des Proteinkinase- $\alpha$  (PKC $\alpha$ )-Primärantikörpers markiert. Die PKC $\alpha$  gilt als Marker verschiedener ON-Bipolarzellen in der Zebrafischretina (Haug et al., 2019).

Die Morphologie der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen in den Retinae von *atf6*<sup>-/-</sup> entsprach der von gleichaltrigen WT-Larven in allen drei untersuchten Altersstufen (Abb. 30A). Die Zellkörper der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen waren in den Retinae beider Zebrafischlinien in der medialen Hälfte des INLs lokalisiert und gleichmäßig nebeneinander angeordnet. Im Alter von 3 dpf war dieses Muster hauptsächlich auf den zentralen Bereich der Retina beschränkt, die PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen im peripheren dorsalen und peripheren ventralen Bereich der Retina schienen noch unorganisiert vorzuliegen. Ab einem Alter von 5 dpf lagen die PKC $\alpha$ -positive Bipolarzellen auch in den peripheren retinalen Bereichen beider Zebrafischlinien gleichmäßig angeordnet vor (Abb. 30A).

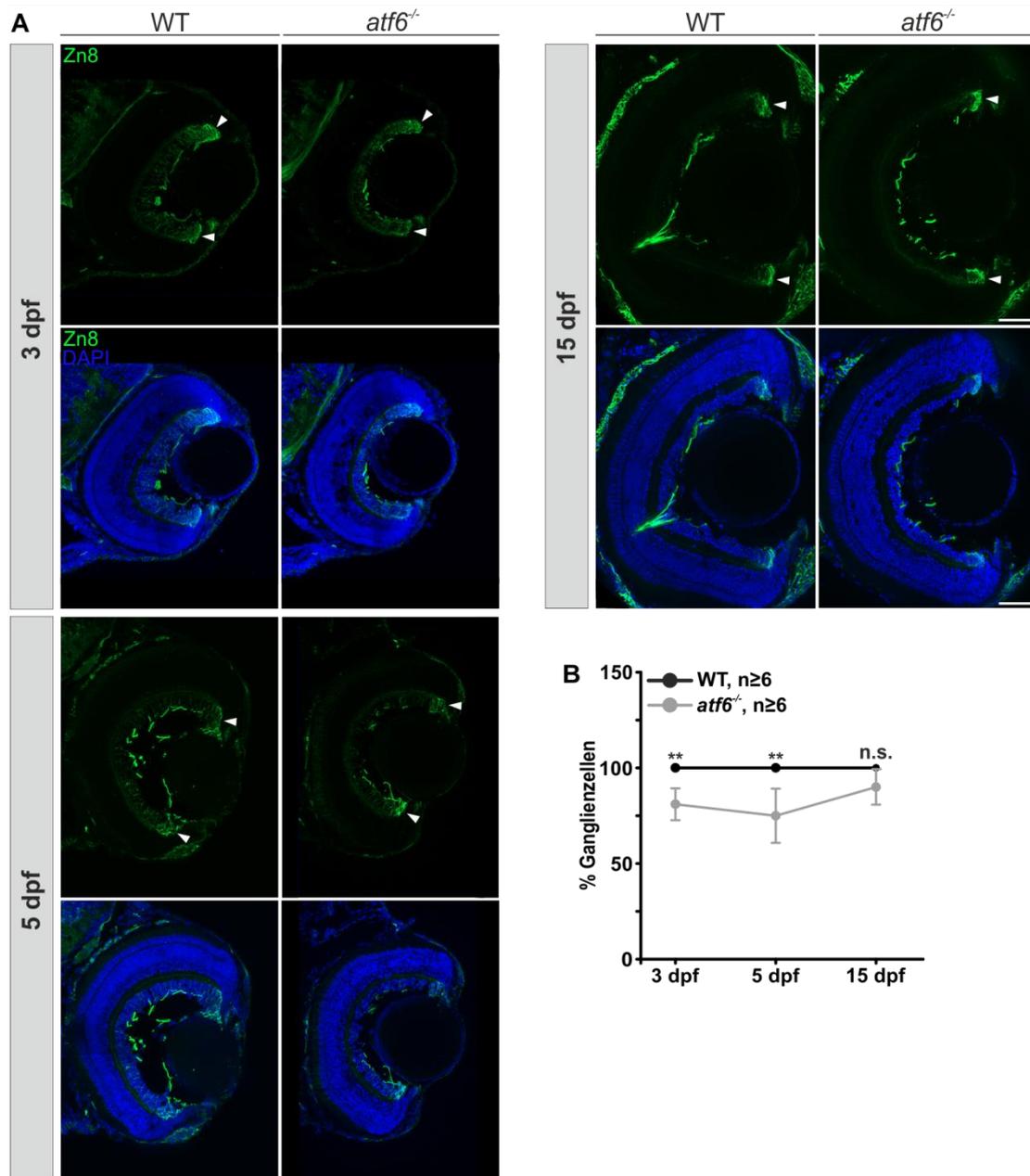
Die Quantifizierung der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen erfolgte über die Auszählung der Zellkörper. Ihre Zahl war in den Retinae der 3 dpf bzw. 5 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven im Vergleich zu WT-Larven um 14,2 % (SD 11,7 %) bzw. 15,7 % (SD 5,0 %) reduziert. Während die Retina von WT-Tieren im Schnitt 81,4 (SD 6,6) bzw. 158,6 (SD 18,5) PKC $\alpha$ -positive Bipolarzellen besaß, enthielt die *atf6*-defiziente Retina durchschnittlich 69,9 (SD 9,5) bzw. 133,7 (SD 8,0) PKC $\alpha$ -positive Bipolarzellen (Abb. S1). Dieser Unterschied war in einem Alter von 15 dpf nicht mehr zu beobachten (Abb. 30B).



**Abbildung 30: Untersuchung der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten Zebrafischlarven. (A)** Immunhistologische Färbungen der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen und Zellkerne (DAPI) in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten *atf6<sup>-/-</sup>*- und WT-Larven. Die Lokalisation der Vergrößerungen ist in der Retina mit einer weißen Box gekennzeichnet. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m; Maßstabsbalken Vergrößerung: 10  $\mu$ m. **(B)** Quantifizierung der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten *atf6<sup>-/-</sup>*- und WT-Zebrafischlarven. 3 dpf:  $p=0,02$ , 5 dpf:  $p=0,001$ , 15 dpf:  $p>0,05$ . Pro Genotyp wurden mindestens sieben Larven untersucht.

Die Axone der retinalen Ganglienzellen wurden unter Verwendung eines Neurolin-Primärantikörpers (Zn-8) visualisiert. Neurolin ist ein Zelladhäsionsprotein, welches an der Wegfindung der Ganglienzellaxone zur Papille, an der der optische Nerv das Auge in Richtung Gehirn verlässt, beteiligt ist (Paschke et al., 1992). Durch die Färbung der Ganglienzell-

axone war es möglich die Grenzen des GCLs zu markieren (Abb. 31A, Pfeile) und die Ganglienzellen anhand ihrer Kerne auszuzählen.



**Abbildung 31: Untersuchung der Ganglienzellen in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten Zebrafischretinae.**  
**(A)** Immunhistologische Färbungen der GCL-Axone (Zn-8) und Ganglienzell-Zellkerne (DAPI) in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten *atf6<sup>-/-</sup>*- und WT-Larven. Pfeile markieren die GCL-Grenzen. Maßstabsbalken: 50 µm **(B)** Relative Ganglienzell-Zahlen in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten *atf6<sup>-/-</sup>*- und WT-Zebrafischlarven. 3 dpf:  $p=0,004$ , 5 dpf:  $p=0,002$ , 15 dpf:  $p>0,05$ . Pro Genotyp wurden mindestens sechs Larven untersucht.

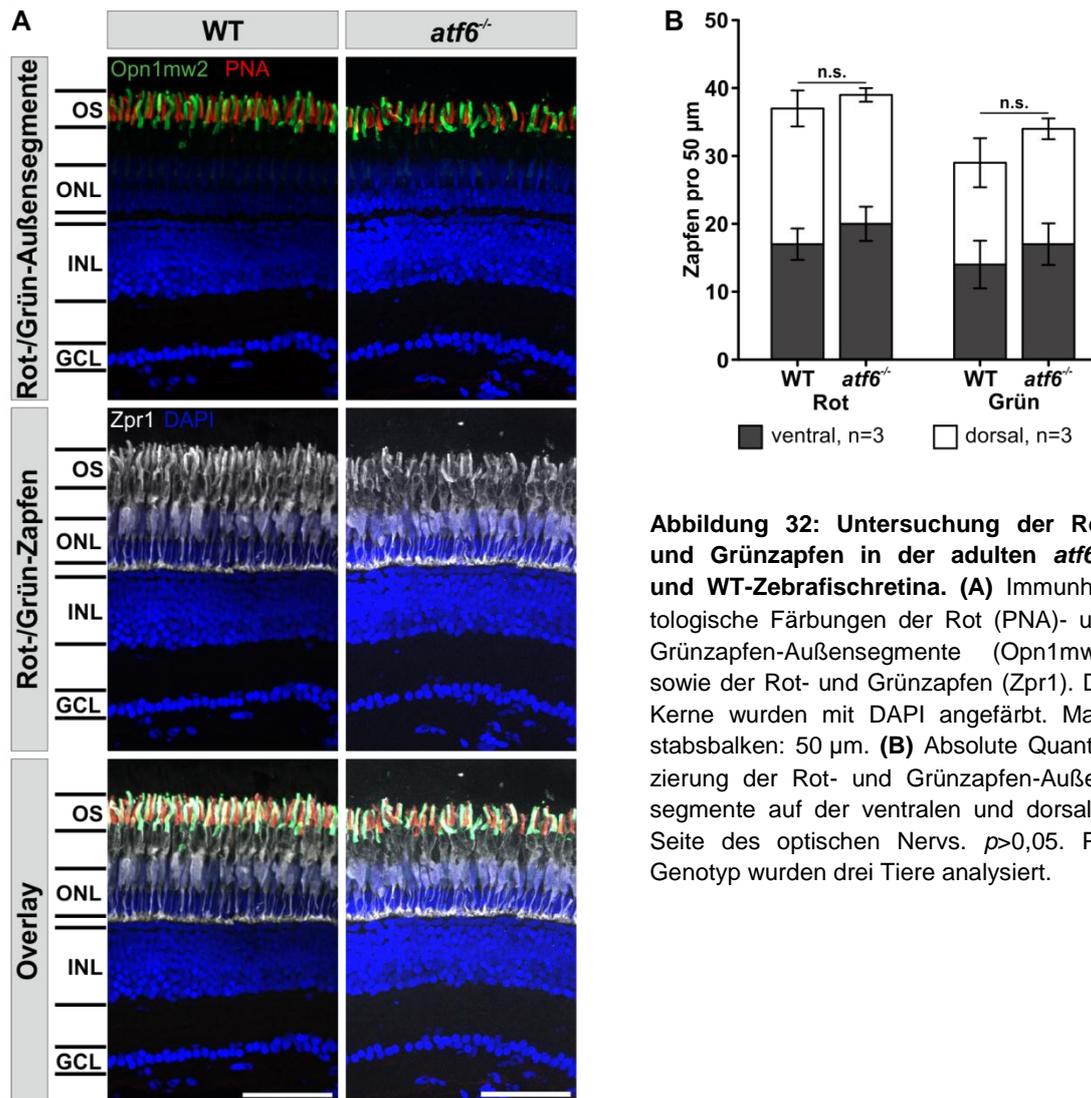
Auch die Quantifizierung der Ganglienzellen zeigte vergleichbar mit den bisherigen Untersuchungen eine signifikante Reduktion in den Retinae 3 dpf und 5 dpf alter *atf6<sup>-/-</sup>*-Zebrafischlarven im Vergleich zu WT-Larven. Die Zahl der Ganglienzellen war in der *atf6<sup>-/-</sup>*-

defizienten Retina bis zu einem Alter von 5 dpf um bis zu 24,7 % (SD 14,0 %), d.h. um bis zu 91,6 (SD 10,9) Zellen verringert (Abb. 31B, Abb. S1). Im Alter von 15 dpf waren keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen mehr zu beobachten.

#### 4.3.1.5. Untersuchung der Rot- und Grünzapfen in der adulten Zebrafischretina

Weiterhin sollte untersucht werden, ob der Verlust von *atf6* altersabhängige Effekte im Aufbau der adulten, maturierten Zebrafischretina auslöst. Eine spät beginnende, altersabhängige Degeneration der Retina mit einhergehendem Funktionsverlust der Photorezeptoren konnte bereits in *Atf6*<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen werden (Kohl et al., 2015). Um potentielle im Alter auftretende *atf6*-abhängige Veränderungen in der Zebrafischretina nachweisen zu können, wurden vergleichbar zu den untersuchten Larvenstadien, histologische Färbungen der Doppelzapfen sowie der Rot- und Grünzapfen-Außensegmente an Retina-Schnitten von 13 mpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Tieren durchgeführt.

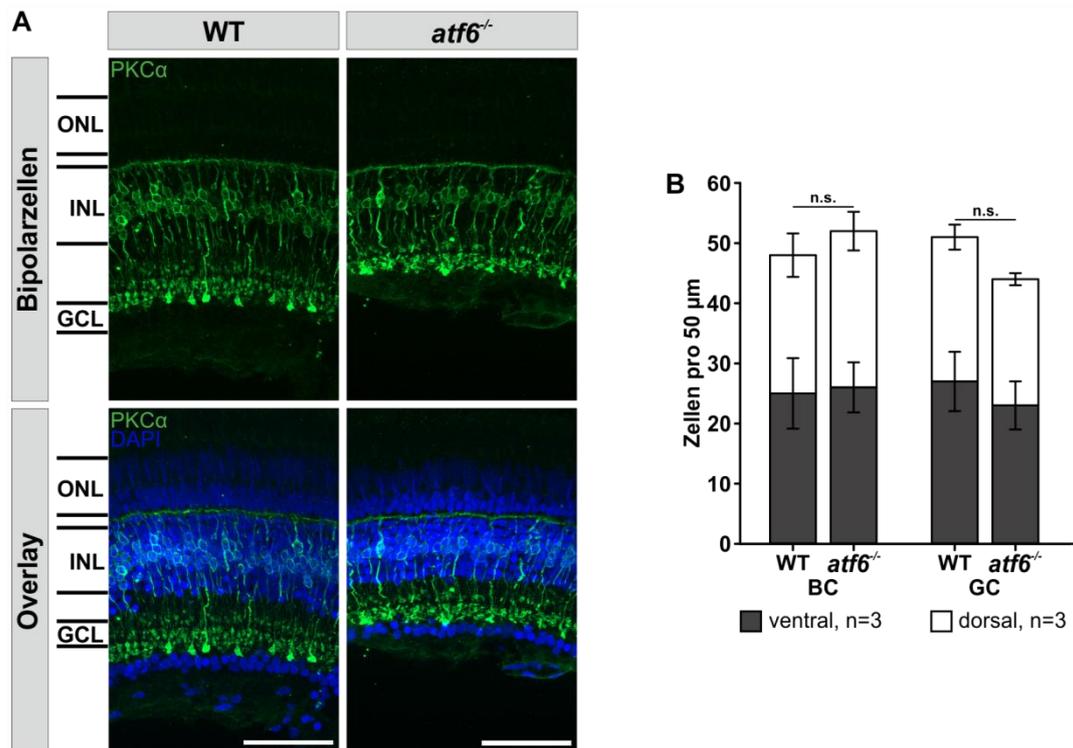
Es konnten in den adulten Zebrafischretinae jedoch keine quantitativen oder morphologischen Unterschiede (Abb. 32A) bei den Rot- und Grünzapfen-Außensegmenten im ventral zentralen und dorsal zentralen Bereich der Retina beobachtet werden. (Abb. 32B). Die Morphologie der Rot- und Grünzapfen war in *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Tieren vergleichbar. Diese lagen gleichmäßig angeordnet in elongierter Form vor. Ihre Endfüßchen waren in jeder der beiden untersuchten Zebrafischlinien auf gleicher Höhe im IPL lokalisiert. Auch die Zahl der Rot- sowie Grünzapfen im dorsal zentralen sowie im ventral zentralen Bereich der Retina unterschieden sich nicht zwischen der WT- und der *atf6*-defizienten Tieren.



**Abbildung 32: Untersuchung der Rot- und Grünzapfen in der adulten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischretina. (A)** Immunhistologische Färbungen der Rot (PNA)- und Grünzapfen-Außensegmente (Opn1mw2) sowie der Rot- und Grünzapfen (Zpr1). Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 50 µm. **(B)** Absolute Quantifizierung der Rot- und Grünzapfen-Außensegmente auf der ventralen und dorsalen Seite des optischen Nervs.  $p > 0,05$ . Pro Genotyp wurden drei Tiere analysiert.

#### 4.3.1.6. Untersuchung der Bipolar- und Ganglienzellen in der adulten Zebrafischretina

Um zu untersuchen, ob der Verlust von *atf6* einen altersabhängigen Einfluss auf die PKC $\alpha$ -positiven Bipolar- und Ganglienzellen in der adulten Zebrafischretina hat, wurden diese ebenfalls in retinalen Schnitten 13 mpf alter *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Tiere immunhistologisch analysiert. Die Färbung der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen ergab keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Morphologie zwischen *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischen. In beiden Linien waren die Zellkörper in der oberen Hälfte des INLs lokalisiert. Ihre Dendriten und Axone durchspannten diesen über dessen gesamte Breite und bildeten synaptische Kontakte mit den Zellen des ONL und GCLs aus (Abb. 33A). Die quantitative Analyse der Bipolarzellen ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen zwischen beiden Linien (Abb. 33B).



**Abbildung 33: Untersuchung der Bipolar- und Ganglienzellen in der adulten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischretina. (A)** Immunhistologische Färbungen PKCα-exprimierender Bipolarzellen. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 50 μm. **(B)** Absolute Quantifizierung der PKCα-positiven Bipolarzellzahlen und Ganglienzellzahlen auf der ventralen und dorsalen Seite des optischen Nervis. BC:  $p > 0,05$ ; GC:  $p > 0,05$ . BC: PKCα-positive Bipolarzellen; GC: Ganglienzellen. Pro Genotyp wurden drei Tiere analysiert.

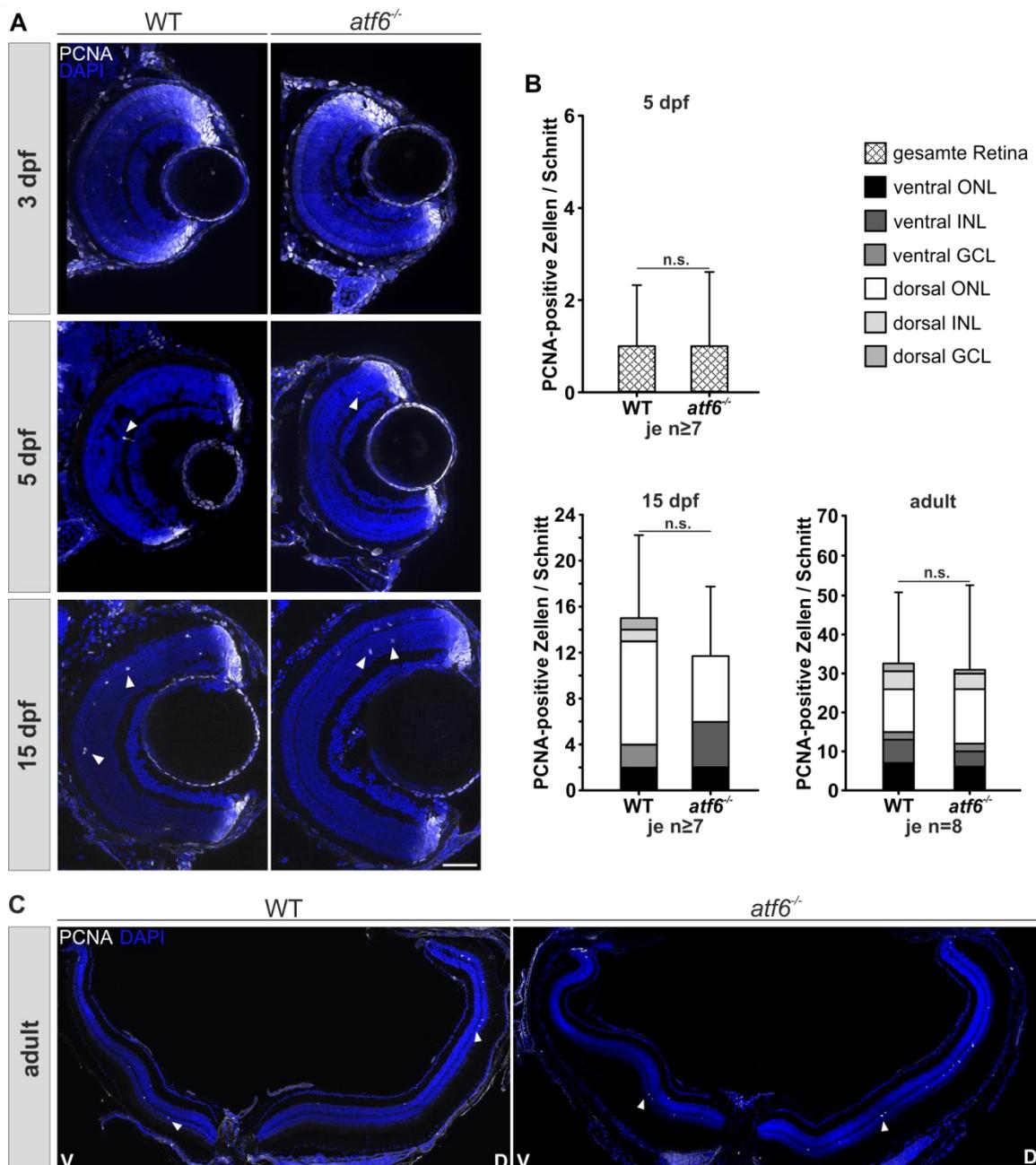
Die Ganglienzellen wurden in diesen Bereichen anhand ihrer mit DAPI angefärbten Kerne ausgezählt. Die Zahl der Ganglienzellen unterschied sich weder im ventral zentralen noch im dorsal zentralen Bereich zwischen der adulten *atf6*<sup>-/-</sup>- und der WT-Retina (Abb. 33B).

#### 4.3.1.7. Untersuchung der Proliferation und des Zelltods in der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischretina

Um zu überprüfen, ob ein Fehlen von *atf6* Auswirkungen auf die Proliferation retinaler Zellen hat oder die Zelltodrate beeinflusst, wurden immunhistologische Färbungen sterbender und sich teilender Zellen sowie ein Zelltod-Assay an retinalen Schnitten durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten gemäß den vorherigen Analysen an den Altersstufen 3 dpf, 5 dpf, 15 dpf und 13 mpf bzw. 16 mpf.

Zur Detektion der Zellen, die sich in der Proliferation befanden, wurden immunhistologische Färbungen unter Verwendung eines Primärantikörpers gegen das *Proliferation-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA), einem Marker der eukaryotischen Replikation (Mathews et al., 1984), durchgeführt. Bei allen untersuchten Altersstufen wurden PCNA-positive Zellen wie zu erwarten in der CMZ detektiert. Die Zahl PCNA-positiver Zellen in der CMZ war dabei wäh-

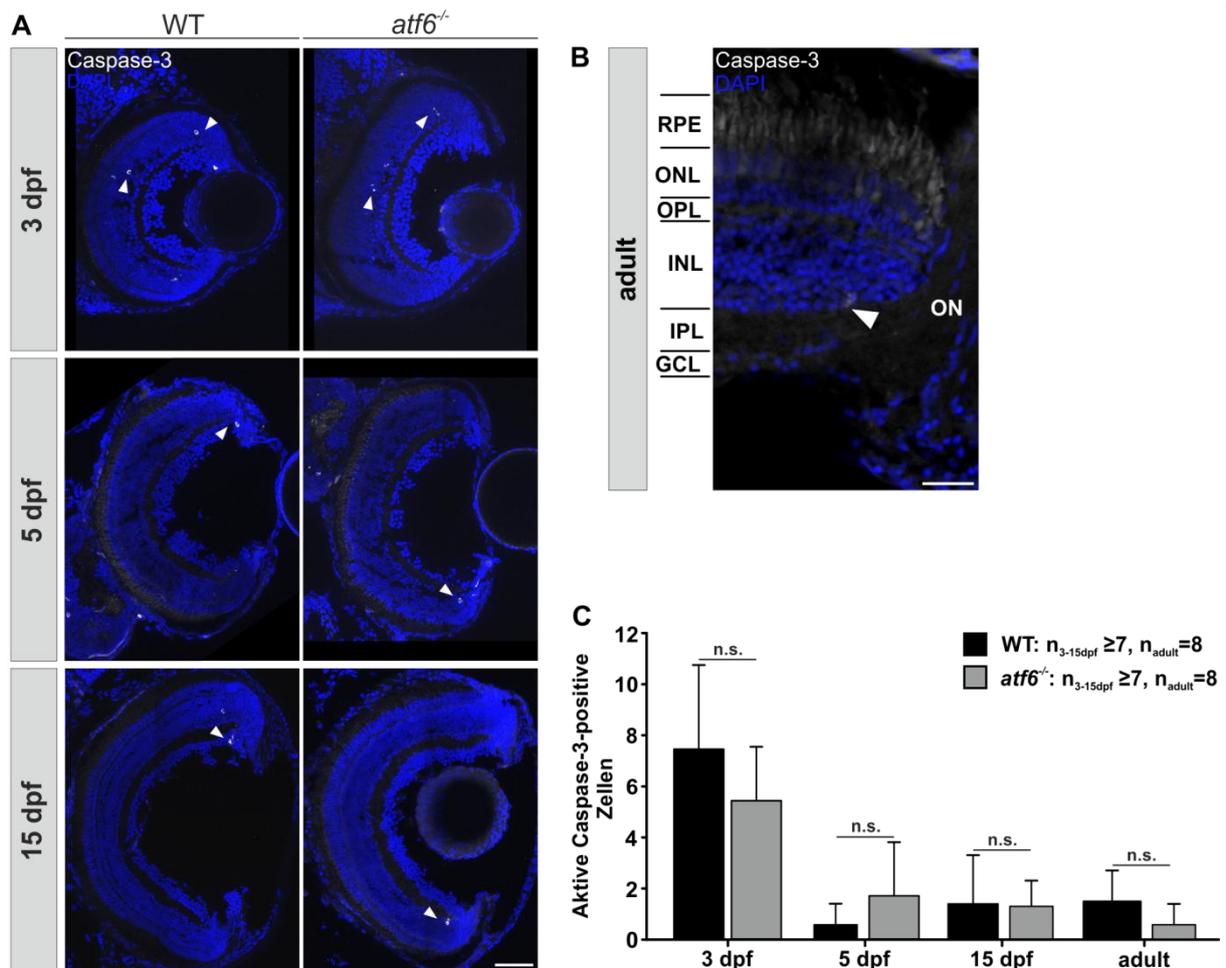
rend der untersuchten Larvalstadien (3 dpf bis 15 dpf) deutlich höher als bei adulten Tieren. Eine Quantifizierung war aufgrund der Zelldichte PCNA-positiver Zellen in der CMZ nicht möglich. Bei 3 dpf alten Larven zeigte der Großteil der retinalen Zellen eine PCNA-Immunität, wodurch eine Quantifizierung der PCNA-positiven Zellen in dieser Altersstufe nicht möglich war (Abb. 34A).



**Abbildung 34: Untersuchung der Proliferation in *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischretinae.** (A) und (C) Immunhistologische Färbungen von proliferierenden (PCNA-positiven) Zellen. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken (A): 50 µm; (C) 200 µm. (B) Quantitative Auswertung der Zahl PCNA-positiver Zellen außerhalb der CMZ.  $p > 0,05$ . Im Alter von 5 dpf und 15 dpf wurden pro Genotyp sieben Larven, bei den adulten Tieren pro Genotyp acht Tiere untersucht. V: ventral, D: dorsal, Pfeile markieren PCNA-positive Zellen.

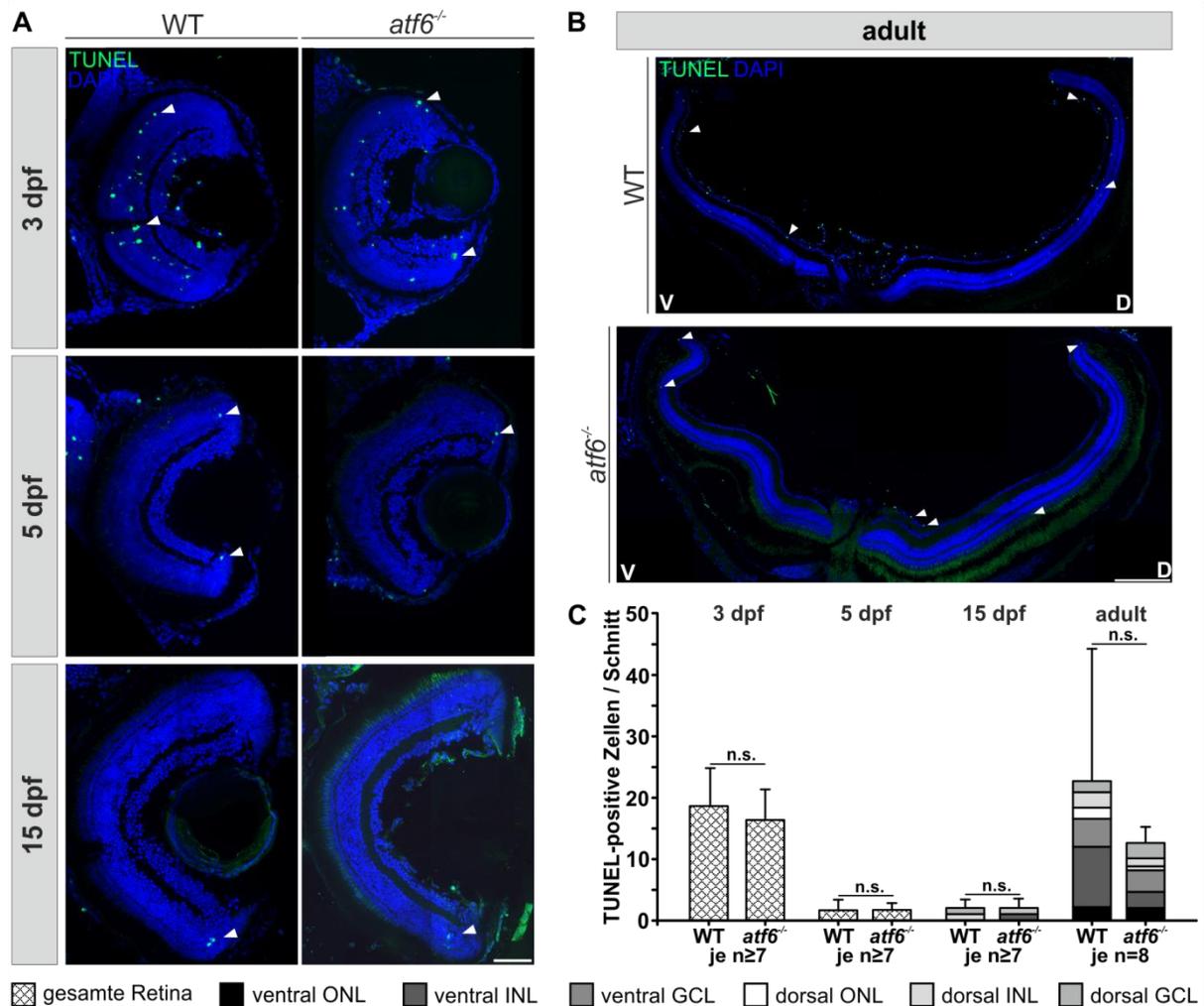
Die Quantifizierung der PCNA-positiven Zellen (außerhalb der CMZ) im Alter von 5 dpf, 15 dpf und 13 bzw. 16 mpf zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischen. Im Alter von 5 dpf wurden in der Retina von WT- wie auch *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven 1,3 (SD 1,3) bzw. 1,4 (SD 1,6) PCNA-positive Zellen detektiert. Bis 15 dpf stieg die Zahl auf 15,4 (SD 6,8) bzw. 11,6 (SD 6,2) an und verdoppelte bzw. verdreifachte sich danach bis ins adulte Alter (Abb. 34B). Die Auszählung PCNA-positiver Zellen in 5 dpf alten Larven erfolgte über die gesamte Retina. Die Auszählung PCNA-positiver Zellen in der 15 dpf und adulten Retina erfolgte getrennt nach ventraler und dorsaler Retina und den retinalen Schichten, wobei die Zahl PCNA-positiver Zellen im dorsalen ONL generell am höchsten war (Abb. 34B).

In der Zelltodrate konnte mit keiner der angewandten Methoden signifikante Unterschiede zwischen *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Larven bzw. -fischen im Alter von 3 dpf bis 13 mpf bzw. 16 mpf beobachtet werden. Zellen, die sich in der Apoptose befanden wurden immunhistologisch unter Verwendung eines Primärantikörpers gegen die aktive Caspase-3 detektiert (Abb. 35A,B). Bei der quantitativen Analyse zeigte sich, dass im Alter von 3 dpf die höchste Zahl aktiver-Caspase-3-positiver Zellen vorlag. In der WT-Retina wurden zu diesem Alterszeitpunkt 7,4 (SD 3,3) und in der *atf6*-defizienten Retina 5,5 (SD 2,1) Caspase-3-positiv Zellen detektiert. Ab 5 dpf bis ins adulte Alter sank die Zahl in beiden Genotypen auf 0,5 (SD 0,8) bis 1,6 (SD 2,1) Caspase-3-positiv Zellen pro retinalem Schnitt (Abb. 35C).



**Abbildung 35: Untersuchung der Caspase-3 vermittelten Apoptose in der *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischretina mittels immunhistologischer Färbungen. (A) und (B) Immunhistologische Färbungen apoptotischer (aktive Caspase-3 positiver) Zellen. Pfeile markieren apoptotische Zellen. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt. ON: Optischer Nerv. Maßstabsbalken (A): 50 µm; (B) 20 µm. (C) Quantitative Auswertung der Zahl aktiver-Caspase-3-positiver Zellen.  $p > 0,05$ . Für die Altersstufen 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf wurden pro Genotyp mindestens sieben Larven untersucht. Die Quantifizierung in der adulten Retina erfolgte an acht verschiedenen Tieren. Pfeile markieren Caspase-3-positiv Zellen.**

Zur weiteren Detektion der Zelltodrate in WT- und *atf6*-defizienten Retinae wurde der TUNEL-Assay genutzt (Abb. 36A und 36B). Die Auszählung der TUNEL-positiven Zellen in 3 dpf und 5 dpf alten Larven erfolgte über die gesamte Retina. WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Larven wiesen im Alter von 3 dpf mit 18,6 (SD 6,0) bzw. 16,3 (SD 4,9) eine höhere Zelltodrate im Vergleich zu 5 dpf [1,6 (SD 1,6) bzw. 1,7 (SD 1,1)] und 15 dpf alten Tiere [2,0 (SD 1,3) bzw. 2,0 (SD 1,4)] (Abb. 36C) auf. Bei adulten *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischen wurden ein Anstieg in der Zahl TUNEL-positiver Zellen auf 12,3 (SD 2,5) und bei WT-Tieren auf 22,5 (SD 21,4) detektiert, sodass deren Zahl höher als in 5 dpf und 15 dpf, jedoch ähnlich im Vergleich zu 3 dpf lag. In keiner der untersuchten Altersstufen konnte ein signifikanter Unterschied in der Zahl TUNEL-positiver Zellen zwischen den beiden Linien ermittelt werden (Abb. 36C).

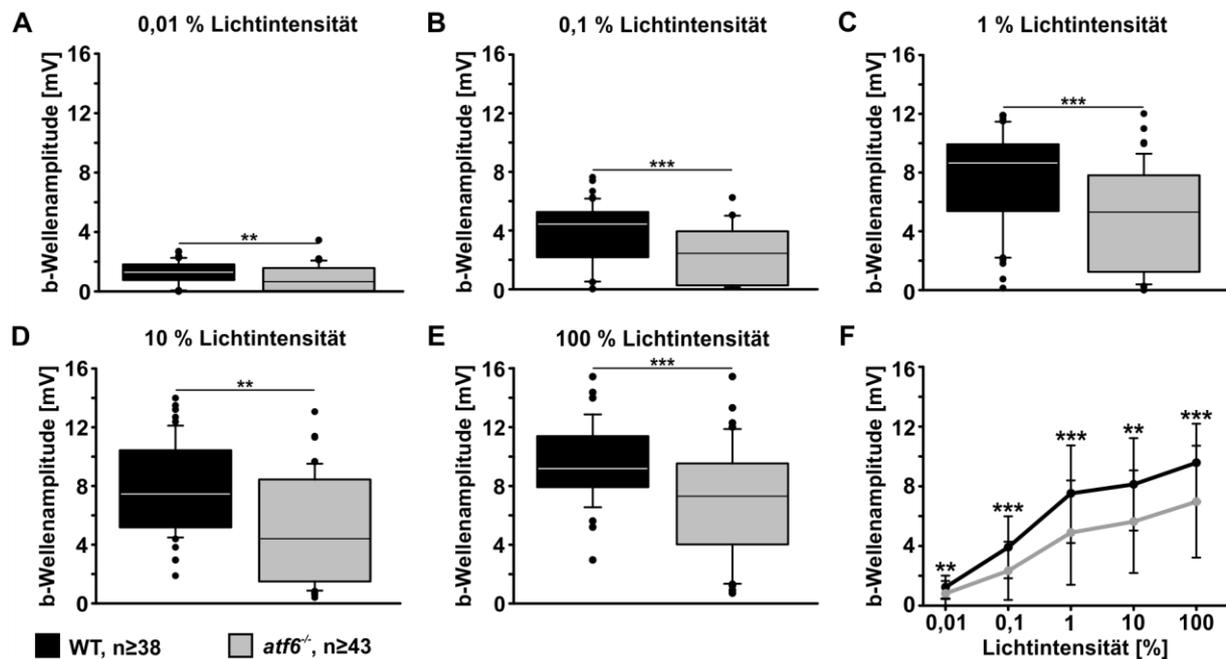


**Abbildung 36: Detektion sterbender Zellen in der *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischretina mithilfe des TUNEL-Assays. (A) und (B) Aufnahmen von Schnitten, die mit dem TUNEL-Assay untersucht wurden. TUNEL-positive Zellen sind in grün dargestellt und durch Pfeile markiert. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. D: dorsal, V: ventral. Maßstabsbalken (A): 50 µm; (B) 200 µm. (C) Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen. *p*>0,05. Im Alter von 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf wurden mindestens sieben Larven pro Genotyp untersucht. Die Quantifizierung in der adulten Retina erfolgte an acht verschiedenen Tieren.**

### 4.3.2. Funktionelle Charakterisierung des *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafisches mittels ERG-Messungen

Um zu untersuchen, ob *atf6* für die Funktionalität der Retina essentiell ist, wurden ERG-Messungen an 5 dpf alten WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven durchgeführt. Da die Stäbchen-Photorezeptoren erst ab einem Alter von 15 dpf funktionstüchtig sind, kann so selektiv das Zapfen-Photorezeptor-basierte Sehen untersucht werden (Raymond et al., 1995; Bilotta et al., 2001). Die ERG-Messungen erfolgten in der Gruppe von Prof. Stephan Neuhauss an der Universität Zürich und wurden von Dr. Jingjing Zhang durchgeführt. Die ERG-Messungen der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven ergaben bei allen fünf gemessenen Lichtintensitäten eine signifikant

verringerte b-Wellenamplitude, d.h. ein verringertes Gesamtpotential im Vergleich zu WT-Larven (Abb. 37A, B, C, D, E).



**Abbildung 37: Übersicht der b-Wellenamplituden der ERG-Messungen in *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven im Vergleich zu WT-Larven. (A) - (E)** Vergleich der gemessenen b-Wellenamplituden in 5 dpf alten WT und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven bei unterschiedlichen aufsteigenden Lichtintensitäten. **(F)** Übersicht der gemessenen b-Wellenamplituden bei allen eingesetzten Lichtintensitäten. 0,01 %:  $p=0,01$ , 0,1 %:  $p<0,001$ , 1 %:  $p<0,001$ , 10 %:  $p=0,003$ , 100 %:  $p<0,001$ . Pro Genotyp wurden mindestens 38 Larven untersucht.

Gemittelt über alle Lichtintensitäten besaßen *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven eine um 33,5 % reduzierte b-Wellenamplitude im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Larven. Vergleicht man die b-Wellenamplitude zwischen *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven pro gegebener Lichtintensität, so wurde die größte Differenz bei einer Lichtintensität von 0,1 % beobachtet. Das gemessene Gesamtpotential von *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven betrug hier 2,3 mV (SD 2,0 mV) und war damit um 40,4 % geringer als das gemessene Gesamtpotential von WT-Zebrafischlarven mit 3,9 mV (SD 2,1 mV). Die geringste Abweichung der b-Wellenamplitude zwischen beiden Genotypen wurde bei einer Lichtintensität von 100 % beobachtet. Bei dieser Lichtintensität war diese in *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven, bei denen Gesamtpotential-Werte von 7,0 mV (SD 3,8 mV) gemessen werden konnten, im Vergleich zu WT-Larven mit Messwerten von 9,6 mV (SD 2,6 mV), um 27,3 % reduziert.

### 4.3.3. Expressionsanalyse von UPR-Komponenten in der WT- und *atf6*-defizienten Zebrafischretina

Da *Atf6* eine essentielle Komponente der UPR darstellt, wurde anhand von ISH- und qRT-PCR-Experimenten untersucht, wie sich der Verlust von *atf6* auf die Expression der beiden *atf6*-Zielgene *hspa5* (*Bip/GRP78* Ortholog im Zebrafischgenom) und *hsp90b1* (*GRP94* Ortholog im Zebrafischgenom), von *atf6β*, sowie weiterer UPR-Komponenten im Zebrafisch auswirkt.

Eine Übersicht der untersuchten Gene, sowie deren Gen-/Proteinbezeichnungen im Mensch und Zebrafisch ist in Tabelle 37 zusammengestellt. Die zugehörigen NCBI-Referenznummern sind in Tabelle S2 gelistet.

**Tabelle 37: Gen- und Proteinbezeichnungen verschiedener UPR-Komponenten, sowie deren Funktion in Mensch und Zebrafisch**

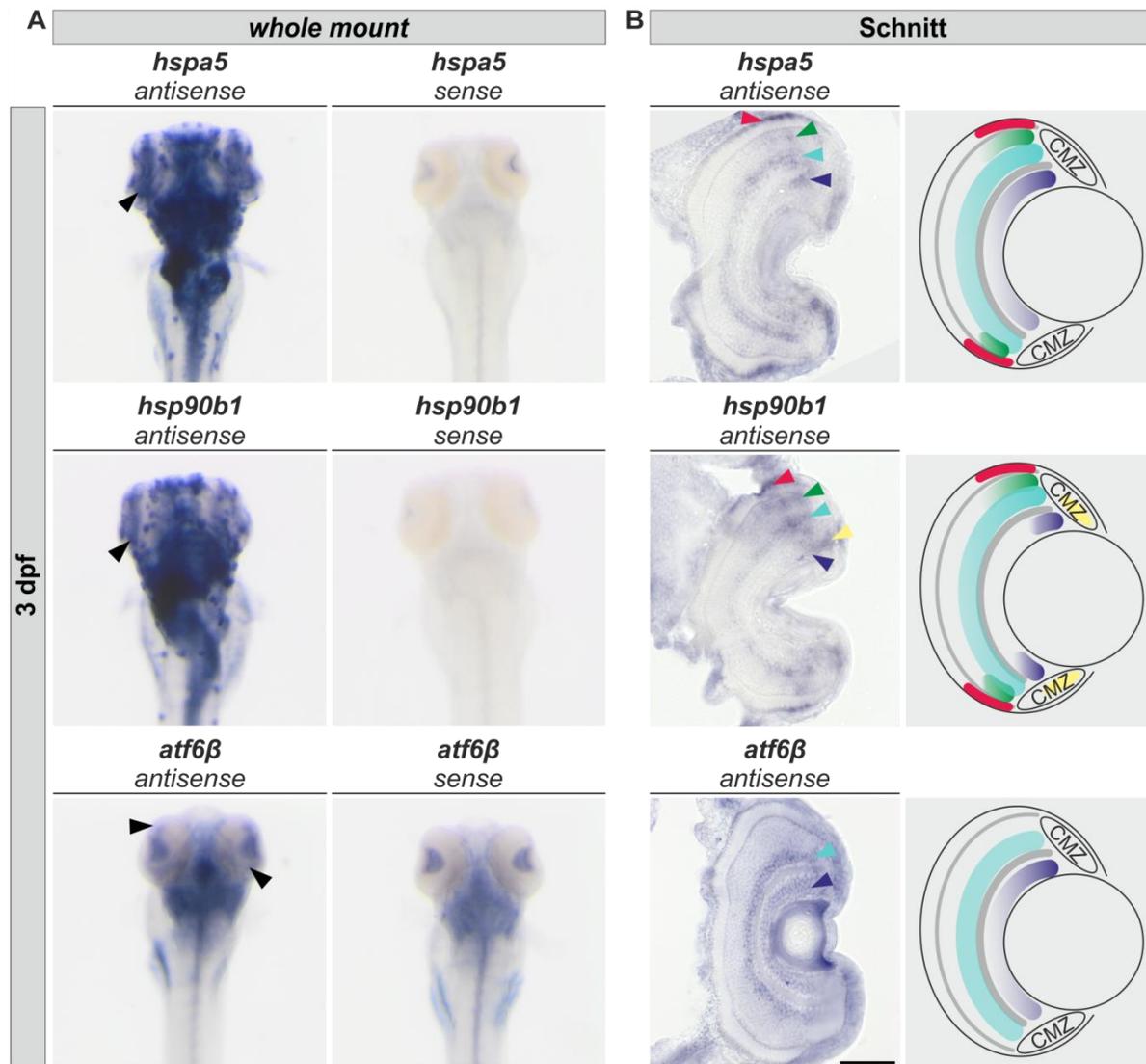
Genname (human)	Genname (Zebrafisch)	Beschreibung
<i>HSPA5</i> ( <i>BiP/GRP78</i> )	<i>hspa5</i>	Hitzeschock-Protein (Chaperon)
<i>HSP90B1</i> ( <i>GRP94</i> )	<i>hsp90b1</i>	Hitzeschock-Protein (Chaperon)
<i>ATF6β</i>	<i>atf6β</i>	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6β
<i>ERN1</i> ( <i>IRE1</i> )	<i>ern1</i>	Proteinkinase
<i>EIF2AK3</i> ( <i>PERK</i> )	<i>eif2ak3</i>	Proteinkinase
<i>EDEM1</i>	<i>edem1</i>	ER-Degradierungsverstärker
<i>CHOP/DDIT3</i>	<i>ddit3</i>	Pro-apoptotisches Protein
<i>ERO1β</i>	<i>ero1β</i>	ER-Oxidoreduktase
<i>PDIA3</i> ( <i>GRP58</i> )	<i>pdia3</i>	Protein-Disulfid-Isomerase

#### 4.3.3.1. Lokalisation der Expression von *hspa5*, *hsp90b1* und *atf6β* in der WT-Retina

Die Analyse der Expressionsmuster der *atf6*-Zielgene *hspa5* und *hsp90b1* sowie des Transkriptionsfaktors *atf6β*, wurden in *whole mount* ISH-Experimenten an 3 dpf und 5 dpf alten WT-Larven durchgeführt. Von einem Teil der in der ISH angefärbten Zebrafischlarven wurden anschließend histologische Schnitte angefertigt, um die Expression der untersuchten Gene in der Zebrafischretina zu lokalisieren.

In den *whole mount*-Färbungen der 3 dpf alten Zebrafischlarven war eine starke Expression von *hspa5* und *hspa90b1* im Gehirn der Larven zu erkennen. Zusätzlich konnte eine deutliche Färbung im Bereich des Auges (Abb. 38A, schwarze Pfeile) beobachtet werden. Zudem wurden in den *whole mount*-Präparaten eine Expression von *hspa5* und *hspa90b1* in Neuromasten und Vorläuferzellen des Seitenlinienorgans detektiert. Die mit den jeweiligen Kontrollsonden zu *hspa5* und *hsp90b1* hybridisierten Larven zeigten keine Färbung. Die Lokalisation der Expression von *atf6β* konnte nur in eingeschränktem Maße analysiert werden, da auch die *sense*-

Kontrollsonde eine starke Färbung im Bereich des Gehirns aufwies. Lediglich die Färbung im Bereich des Auges war nur in mit der *antisense*-Sonde gegen *atf6β* behandelten Larven zu erkennen (Abb. 38A). In der Kontrolllarve war in dieser Region keine Färbung zu erkennen.



**Abbildung 38: ISH zur Detektion der *atf6*-Zielgene *hspa5* und *hsp90b1* sowie gegen *atf6β* in 3 dpf alten Zebrafischlarven. (A) Nachweis der Expression von *hspa5*, *hsp90b1* und *atf6β* in 3 dpf alten WT-Zebrafischlarven mittels *whole mount* ISH. (B) Histologische Schnitte der in der *whole mount* ISH angefärbten Zebrafischlarven. Die Lokalisation der Expression der unterschiedlichen Gene in den verschiedenen retinalen Schichten ist zur Verdeutlichung schematisch neben dem jeweiligen histologischen Schnitt abgebildet. Rot: Photorezeptoren, Türkis: Amakrinzellen im lateralen INL, Grün: Zellen im medialen INL, Blau: Zellen im GCL, Gelb: Zellen der CMZ. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.**

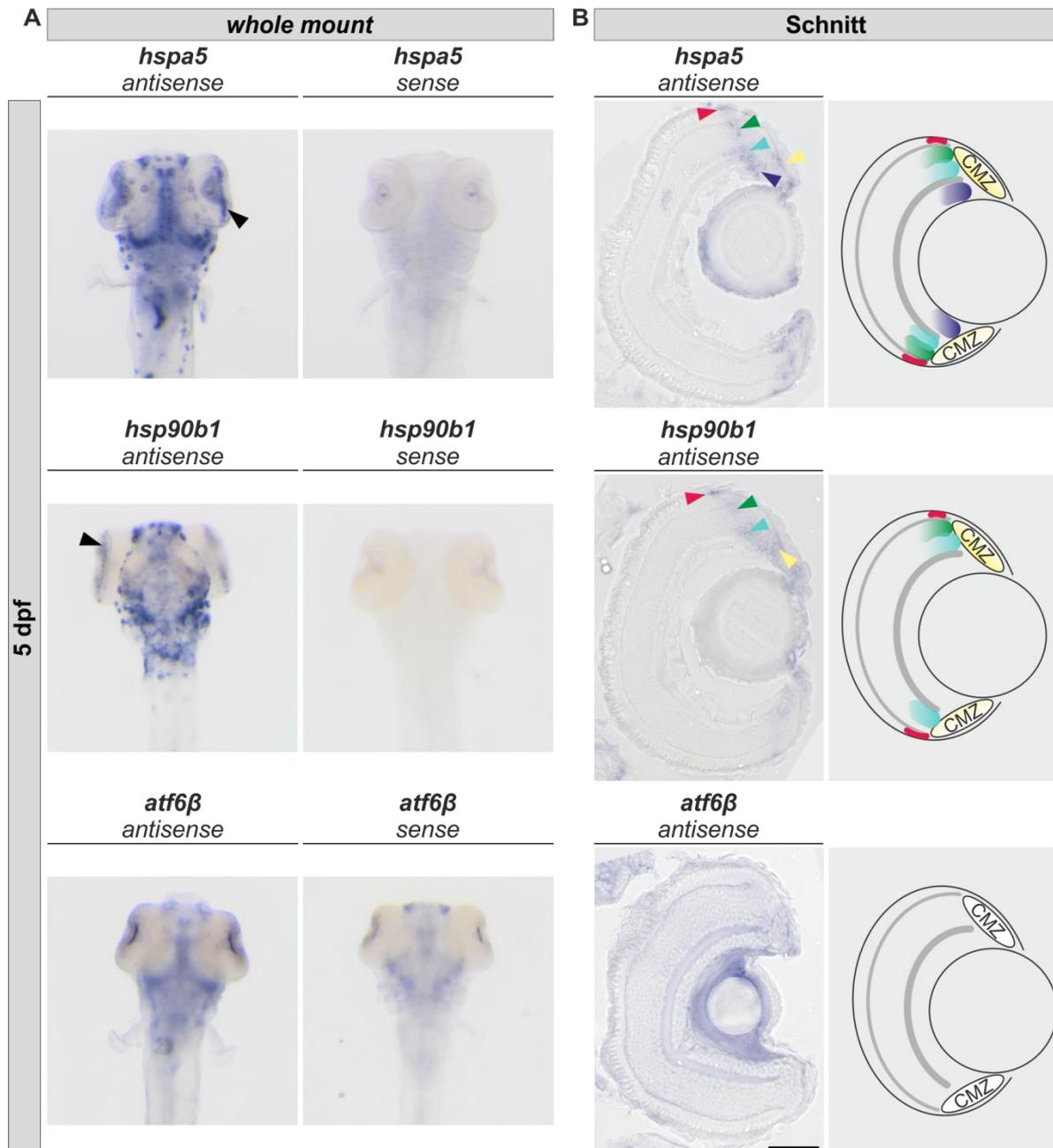
Die histologischen Schnitte der in der ISH angefärbten Larven zeigten in welchen Regionen und Lagen der Zebrafischretina die untersuchten Gene exprimiert sind. *hspa5* wurde im Alter von 3 dpf in den peripheren – jedoch nicht zentralen – Bereichen der Photorezeptoren-Schicht (Abb. 38B, roter Pfeil), in den Amakrinzellen (Abb. 38B, türkisfarbener Pfeil) sowie im GCL

(Abb. 38B, blauer Pfeil) exprimiert. Die Expression im GCL folgte einem Gradienten mit einer stärkeren Expression in den peripheren Regionen als im zentralen Bereich. *hsp90b1* zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie *hspa5* im Alter von 3 dpf. Es wurde ebenfalls nur in den peripheren, nicht in den zentralen Bereichen der Photorezeptoren-Schicht (Abb. 38B, roter Pfeil) und in den Amakrinzellen (Abb. 38B, türkisfarbener Pfeil) exprimiert. Hinzu kam eine Expression in Zellen des medialen peripheren INLs (Abb. 38B; grüner Pfeil) sowie in wenigen Zellen der CMZ (Abb. 38B, gelber Pfeil). Die Expression im GCL war für *hsp90b1* auf die peripheren retinalen Bereiche beschränkt (Abb. 38B, blauer Pfeil). *atf6 $\beta$*  wurde im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Genen restriktiv nur in den Amakrinzellen (Abb. 38B, türkisfarbener Pfeil) und in den peripheren Bereichen des GCLs (Abb. 38B, blauer Pfeil) exprimiert. Verglich man im Alter von 3 dpf die Expression der untersuchten Gene mit der Expression von *atf6* (vgl. Abb. 16A Abschnitt 4.1.2) war ein überlappendes Expressionsmuster in den peripheren, der CMZ zugewandten Bereichen der Photorezeptor-Schicht, den Amakrinzellen sowie im GCL zu erkennen. Für den GCL galt auch hierbei, dass die Expression aller drei Gene einem Gradienten folgte, sodass die Expression in den Randbereichen des GCLs am stärksten und im zentralen Bereich am schwächsten ausgeprägt war.

Bei der Analyse der Expression aller drei Gene im Alter von 5 dpf zeigte sich eine starke Reduktion der ISH-Signale im Vergleich zu 3 dpf (vgl. Abb. 39 und Abb. 39). *hspa5* wie auch *hsp90b1* sind zwar jeweils weiterhin im Gehirn sowie im Bereich des Auges exprimiert (Abb. 39A), die Expression war im Vergleich zu 3 dpf alten WT-Larven jedoch deutlich reduziert (vgl. Abb. 39A). *atf6 $\beta$*  konnte im Alter von 5 dpf nicht mehr im Bereich des Auges detektiert werden (Abb. 39A). Eine Aussage über dessen Expression im Bereich des Gehirns war aufgrund der Färbung in der mit der Kontrollsonde hybridisierten Larve wie schon bei 3 dpf alten Larven nicht möglich.

Die histologischen Schnitte der in der ISH angefärbten Larven zeigten, dass sich die Expression sowohl von *hspa5* als auch von *hsp90b1* im Alter von 5 dpf auf die peripheren, der CMZ zugewandten Regionen der Photorezeptor-Schicht, des medialen INLs und der Amakrinzellen beschränkt. Eine geringe Expression konnte ebenfalls in der CMZ detektiert werden. *hspa5* wurde im Gegensatz zu *hsp90b1* weiterhin in der Peripherie des GCLs detektiert (Abb. 39B). Auffällig ist, dass im Vergleich zu 3 dpf alten Larven, *hspa5* und *hsp90b1* in 5 dpf alten Larven eine restriktive Expression in den peripheren Bereichen des GCLs und INLs zeigten. Eine Expression von *atf6 $\beta$*  war zu diesem Alterszeitpunkt in der Retina nicht zu detektieren. Vergleicht man auch im Alter von 5 dpf das Expressionsmuster von *atf6* mit dessen Zielgenen, überlappte die Expression von *atf6* in den peripheren Amakrinzellen mit *hspa5* und *hsp90b1*

sowie in den Randbereichen des GCLs mit *hspa5* (vgl. Abb. 16A, Abschnitt 4.1.2). Während beide *atf6*-Zielgene in dieser Altersstufe ebenso noch eine geringe Expression in den peripheren, der CMZ zugewandten Regionen der Photorezeptor-Schicht aufwiesen, konnte eine *atf6*-Expression hier nicht mehr detektiert werden (vgl. Abb. 16A, Abschnitt 4.1.2).



**Abbildung 39: ISH zur Detektion der *atf6*-Zielgene *hspa5* und *hsp90b1* sowie gegen *atf6β* in 5 dpf alten Zebrafischlarven. (A) Whole mount ISH gegen *hspa5*, *hsp90b1* und *atf6β* in 5 dpf alten WT-Zebrafischlarven. (B) Histologische Schnitte der in der whole mount ISH angefärbten Zebrafischlarven. Die Lokalisation der Expression der unterschiedlichen Gene in den verschiedenen retinalen Schichten ist zur Verdeutlichung schematisch neben dem jeweiligen histologischen Schnitt abgebildet. Rot: Photorezeptoren, Türkis: Amakrinzellen im INL, Grün: Zellen im medialen INL, Blau: Zellen im GCL, Gelb: Zellen der CMZ. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.**

#### 4.3.3.2. Die Expression weiterer UPR-Komponenten in der *atf6*-defizienten Zebrafischretina

Um zu überprüfen, ob der Verlust von *atf6* zu einer veränderten Expression anderer UPR-Komponenten führt, wurden qRT-PCR-Experimente mit RNA aus 3 dpf und 5 dpf alten Larven und adulten Zebrafischretinae durchgeführt. Hierbei wurden Komponenten des ATF6-Signalweges (*hspa5*, *hsp90b1*, *pdia3*), des IRE1-Signalweges (*ern1*, *edem1*) und des PERK-Signalweges (*eif2ak3*, *ddit3*) untersucht. Zusätzlich wurde noch die Expression von *atf6β* und der ER-Oxidoreduktase *ero1β* bestimmt. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass *ero1β* ein Zielgen von *atf6* in murinem Gewebe darstellt (Adachi et al., 2008), in Medaka-Larven jedoch nicht von diesem reguliert wird (Ishikawa et al., 2013). Die jeweilige Expression der unterschiedlichen UPR-Komponenten in *atf6*<sup>-/-</sup>- im Vergleich zu WT-Tieren in jeder der analysierten Altersstufen sind in Tabelle 38 aufgeführt.

Betrachtete man die Expression der einzelnen Komponenten des ATF6-Signalweges so konnten keine Veränderungen in der Expression von *hspa5*, *hsp90b1* und *pdia3* im Larvalstadium (3 dpf und 5 dpf) im Vergleich zu WT-Larven beobachtet werden. In der adulten Retina war die Expression von *hspa5* jedoch um das 1,3-fache und von *hsp90b1* um das 1,6-fache im Vergleich zu WT-Retinae verringert. Für *pdia3* konnte auch in der adulten Retina keine veränderte Expression im Vergleich zum WT detektiert werden (vgl. Tabelle 38).

Die Analyse des IRE1-Signalweges zeigte eine um das 1,6-fach bzw. 1,9-fach reduzierte *ern1*-Expression im Alter von 3 dpf bzw. 5 dpf im Vergleich zu WT-Larven. Auch für *edem1* konnte im Alter von 3 dpf, nicht aber für 5 dpf, eine um das 1,2-fache reduzierte Expression im Vergleich zu WT-Larven detektiert werden. In der adulten *atf6*-defizienten Retina wurden keine Veränderungen in der Expression von *ern1* und seinem Zielgen *edem1* im Vergleich zu WT-Tieren beobachtet (vgl. Tabelle 38).

Weiterhin wurde die Expression von *eif2ak3* und dessen Zielgen *ddit3* analysiert. Hier konnten in keiner der untersuchten Altersstufen (3 dpf, 5 dpf und adult) Unterschiede in der Expression der beiden Gene gegenüber WT-Tieren festgestellt werden. Analog verhielt es sich mit Expression von *ero1β* (vgl. Tabelle 38).

Die Analyse von *atf6β* zeigte eine um das 1,4-fach bzw. 1,5-fach erhöhte Expression in *atf6*<sup>-/-</sup>- Zebrafischlarven im Alter von 3 dpf bzw. 5 dpf im Vergleich zu WT-Tieren. In der adulten Retina wurden keine Expressionsunterschiede für *atf6β* zwischen beiden Genotypen detektiert (vgl. Tabelle 38).

**Tabelle 38: Quantifizierung der relativen Expression unterschiedlicher UPR-Komponenten in *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischen im Vergleich zu WT-Fischen.** Für die Analyse in 3 dpf und 5 dpf alten Larven wurde RNA aus 12 bis 15 Köpfen isoliert. Für die Analyse adulter Tiere wurden sechs isolierte Retinae zur RNA-Gewinnung genutzt. Gene, des ATF6-Signalwegs sind rot, die des IRE1-Signalwegs grün und die des PERK-Signalwegs blau unterstrichen. *atf6β* und *ero1β* wurden keinem der drei Signalwege zugeordnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des *Pair-Wise Fixed Reallocation Randomisation-Tests*, mittels der REST<sup>®</sup>-Software. Für *p*<0,05 liegt eine Signifikanz vor, für *p*>0,05 liegt keine Signifikanz vor. Gene, die eine signifikant veränderte Expression aufwiesen sind grau hinterlegt.

Alter	3 dpf			5 dpf			adult		
	Relativer Expressionsunterschied <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> versus WT	<i>p</i> -Wert	Ergebnis	Relativer Expressionsunterschied <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> versus WT	<i>p</i> -Wert	Ergebnis	Relativer Expressionsunterschied <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> versus WT	<i>p</i> -Wert	Ergebnis
<i>hspa5</i>	1,05	0,698	unverändert	0,92	0,714	unverändert	0,79	0,009	1,3-fach ↓
<i>hsp90b1</i>	0,90	0,206	unverändert	0,86	0,556	unverändert	0,63	0,036	1,6-fach ↓
<i>ndia3</i>	1,13	0,362	unverändert	0,92	0,556	unverändert	1,05	0,703	unverändert
<i>ern1</i>	0,62	0,002	1,6-fach ↓	0,53	0,001	1,9-fach ↓	0,80	0,196	unverändert
<i>edem1</i>	0,81	0,024	1,2-fach ↓	0,91	0,415	unverändert	0,90	0,339	unverändert
<i>eit2ak3</i>	0,97	0,722	unverändert	0,92	0,567	unverändert	0,81	0,087	unverändert
<i>ddit3</i>	1,20	0,169	unverändert	0,77	0,217	unverändert	1,32	0,154	unverändert
<i>atf6β</i>	1,36	0,000	1,4-fach ↑	1,48	0,022	1,5-fach ↑	0,96	0,609	unverändert
<i>ero1β</i>	1,20	0,120	unverändert	0,97	0,820	unverändert	0,91	0,335	unverändert

↓: Reduzierte Expression, ↑: Erhöhte Expression.

#### 4.3.4. Charakterisierung des *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells nach pharmakologischer Induktion von ER-Stress

ER-Stress kann pharmakologisch durch eine Behandlung mit Tunicamycin induziert werden. Tunicamycin hemmt die N-Glykosylierung (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Durch die fehlende N-Glykosylierung wird die Proteinfaltung beeinträchtigt, wodurch es zu einer Akkumulation von fehl- bzw. ungefalteten Proteinen im ER und infolgedessen zu einer Aktivierung der UPR kommt. Fehlt einer der drei UPR-Signalwege, wie es im *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodell der Fall ist, kann es zu einer Einschränkung der UPR gegenüber WT-Tieren kommen, sodass eine Behandlung mit Tunicamycin in diesen Tieren möglicherweise zu erhöhtem ER-Stress im Vergleich zu WT-Tieren führen kann.

##### 4.3.4.1. Die Expression verschiedener ER-Stressgene nach pharmakologischer Induktion der UPR mit Tunicamycin

Es wurden qRT-PCR-Experimente durchgeführt, um anhand der Expression verschiedener UPR-Gene zu überprüfen, ob und wie durch die Behandlung mit Tunicamycin die UPR aktiviert wurde und ob diesbezüglich Unterschiede zwischen *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Tieren auftraten. Es wurde die Expression von *hspa5*, *ddit3* und *edem1* in für 48 h mit Tunicamycin bzw. als Kontrolle mit DMSO behandelte 5 dpf alten WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven analysiert. Die untersuchten Gene wurden so gewählt, dass aus jedem der drei UPR-Signalwege ein Zielgen getestet wurde. Die Expressionen der einzelnen Gene in den Kontroll- sowie in den mit Tunicamycin-behandelten Zebrafischlarven sind in Tabelle 39 dargestellt.

**Tabelle 39: Relative Expression von *hspa5*, *ddit3* und *edem1* in WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven nach der Behandlung mit Tunicamycin.** Der relative Expressionsunterschied bezieht sich für WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven auf Tunicamycin- versus DMSO-behandelte Larven. Die Differenz des relativen Expressionsunterschieds (letzte Spalte) wurde zwischen Tunicamycin-behandelten WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven ermittelt.  $p < 0,001$  für alle untersuchten Gene.

Gen	WT		<i>atf6</i> <sup>-/-</sup>		Differenz <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> versus WT
	Relativer Expressionsunterschied	Ergebnis	Relativer Expressionsunterschied	Ergebnis	Relativer Expressionsunterschied
<i>hspa5</i>	22,37	22,4-fach ↑	5,65	5,6-fach ↑	Δ 16,72
<i>ddit3</i>	4,98	5-fach ↑	4,81	4,8-fach ↑	Δ 0,17
<i>edem1</i>	2,81	2,8-fach ↑	1,62	1,6-fach ↑	Δ 1,18

↑: Erhöhte Expression

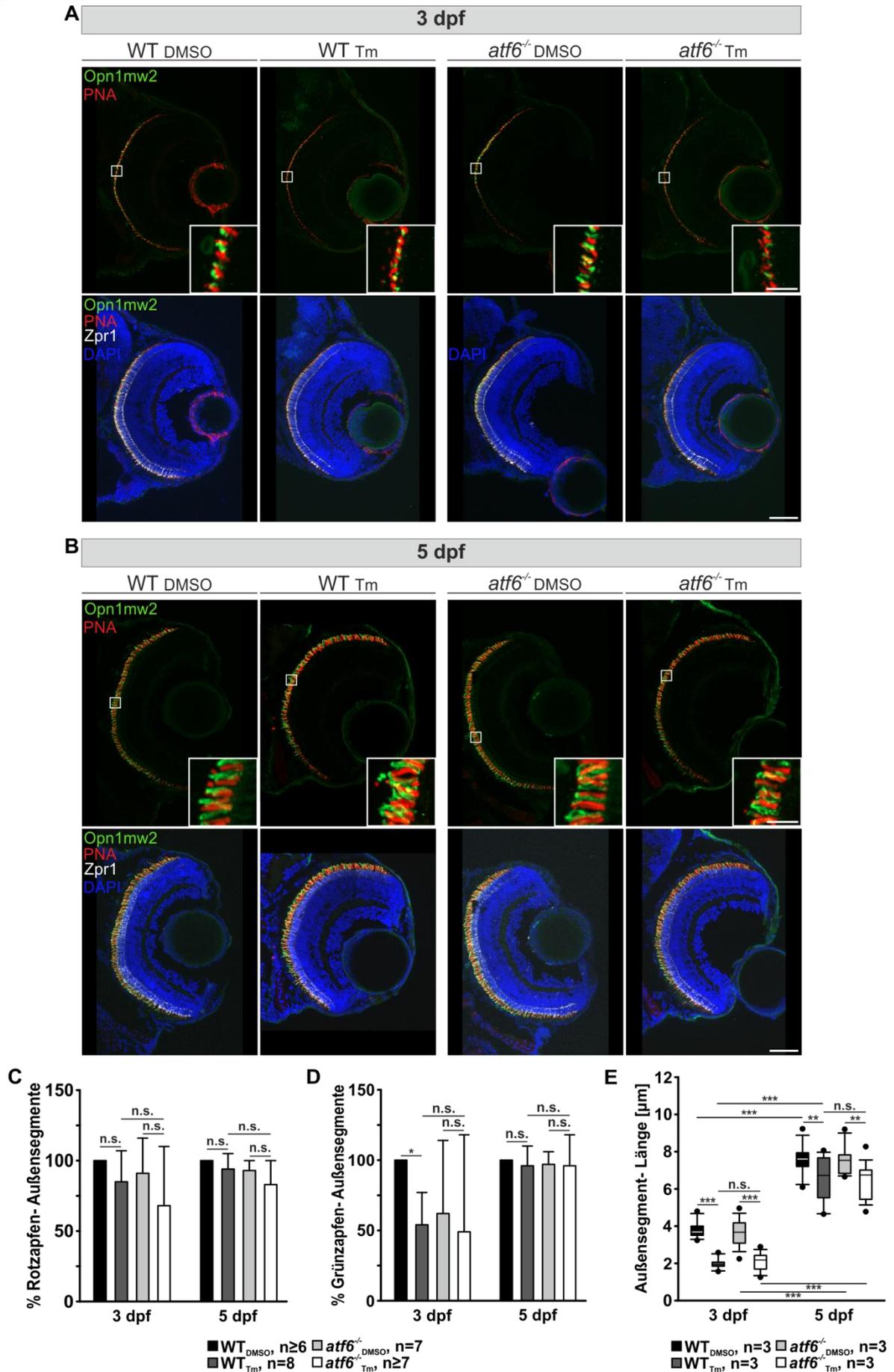
Die quantitative Analyse der Expression von *hspa5*, *ddit3* und *edem1* zeigte, dass durch die Behandlung mit Tunicamycin ER-Stress ausgelöst und die UPR aktiviert werden konnte. Die

Expression von *hspa5*, dem Zielgen des ATF6-Signalweges, stieg in WT-Larven durch die Behandlung mit Tunicamycin um das 22,4-fache an. In den *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven wurde durch die Tunicamycin-Behandlung eine 5,6-fach erhöhte *hspa5*-Expression induziert, welche somit 4-fach geringer war als bei WT-Larven. Die Expression von *edem1* stieg nach der Behandlung mit Tunicamycin in den *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven um das 1,6-fache an, während die Expression in WT-Larven um das 2,8-fache anstieg und damit 1,75-fach höher war als in *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven. Die Behandlung mit Tunicamycin bewirkte in WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven eine vergleichbare Erhöhung des *ddit3*-Expressionsniveaus – in den WT-Larven um das 5-fache und in den *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven um das 4,8-fache.

#### 4.3.4.2. Der Effekt von Tunicamycin auf die Zellen der äußeren Zebrafischretina

Es ist bislang nicht bekannt, ob zusätzlicher pharmakologisch induzierter ER-Stress den retinalen Phänotyp in *atf6*-defizienten Larven verstärkt bzw. wie induzierter ER-Stress die Retina von WT-Larven beeinflusst. Daher wurden in dieser Arbeit Zebrafischlarven im Alter von 1 dpf bzw. 3 dpf für 48 h mit 1 mg/ml Tunicamycin behandelt. Die Retina von 3 dpf und 5 dpf alten Larven wurde mittels immunhistologischen Färbungen charakterisiert. Die Rot- und Grünzapfen-Außensegmente wurden wie in Abschnitt 4.3.1.2 beschrieben angefärbt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI.

Die Analyse der Rotzapfen ergab keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der Rotzapfen-Außensegmente zwischen WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven in beiden Altersstadien nach Tunicamycin-Behandlung. Obwohl die Tunicamycin-Behandlung in 3 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven zu einer verringerten Rotzapfen-Zahl von 23,1 % (SD 31,3 %) im Vergleich zu mit DMSO-behandelten Kontrolltieren, und in WT-Tieren zu einer Reduktion von 14,5 % (SD 18,5 %) führte, resultierte die Behandlung mit Tunicamycin in keiner der beiden Linien in einer signifikant verringerten Zahl an Rotzapfen-Außensegmenten (Abb. 40C). Im Alter von 5 dpf konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der Rotzapfen-Außensegmente durch die Tunicamycin-Behandlung in beiden Genotypen beobachtet werden. Ebenso unterschied sich die Zahl dieser zwischen Tunicamycin-behandelten WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven in beiden Altersstufen nicht (Abb. 40C).



**Abbildung 40: Untersuchung der Rot- und Grünzapfen-Außensegmente in 3 dpf und 5 dpf alten Zebrafischlarven nach 48 h Tunicamycin-Behandlung. (A) und (B)** Immunhistologische Färbungen der Rot- (PNA) und Grünzapfen-Außensegmente (Opn1mw2) sowie der Zellkerne (DAPI) in 3 dpf und 5 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Larven. Zur Orientierung wurden Rot- und Grünzapfen zusätzlich mit dem Zpr1-Antikörper markiert. Die weiße Box markiert den Bereich, welcher in der Vergrößerung gezeigt wird. Maßstabsbalken: 50 µm; Maßstabsbalken Vergrößerung: 10 µm. **(C)** Relative Zahl der Rotzapfen-Außensegmente in 3 dpf und 5 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven.  $p > 0,05$ . Pro Genotyp und Behandlung wurden mindestens sechs Larven untersucht. **(D)** Relative Zahl der Grünzapfen-Außensegmente in 3 dpf und 5 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven. 3 dpf:  $p_{WT}=0,01$ ,  $p > 0,05$ , 5 dpf:  $p > 0,05$ . Pro Genotyp und Behandlung wurden mindestens sechs Larven untersucht. **(E)** Länge der Rotzapfen-Außensegmente in 3 dpf und 5 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven. 3 dpf:  $p < 0,001$ , 5 dpf: WT:  $p=0,006$ , *atf6*<sup>-/-</sup>:  $p=0,001$ , 3 dpf auf 5 dpf:  $p < 0,001$ . Pro Genotyp wurden je fünf Außensegmente in drei Larven vermessen.

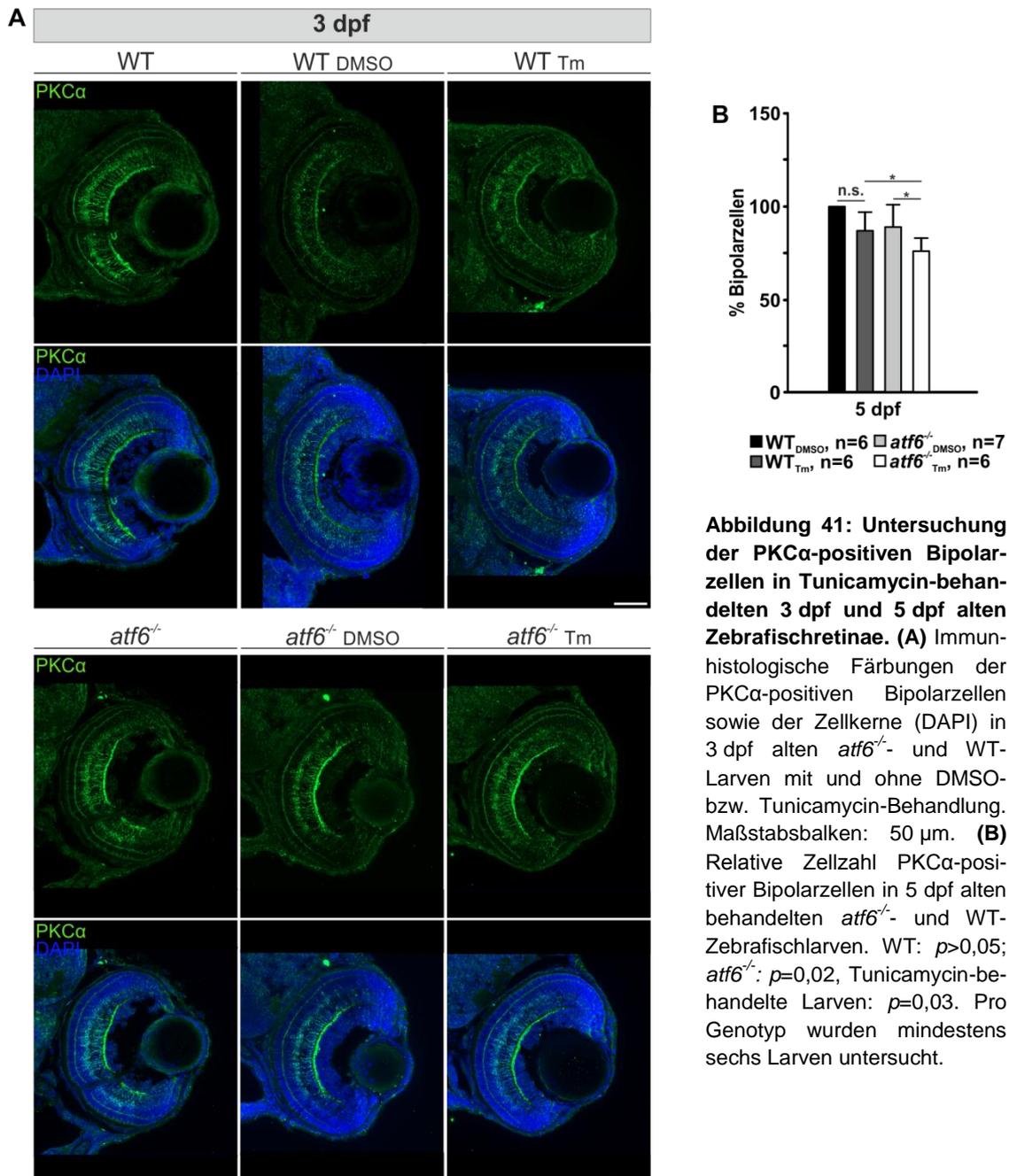
Betrachtet man die Länge der Rotzapfen-Außensegmente, so führte eine Behandlung mit Tunicamycin bei 3 dpf und 5 dpf alten WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven in beiden Genotypen zu einer Reduktion der Außensegment-Längen im Vergleich zu mit DMSO-behandelten Kontroll-Larven. Im Alter von 3 dpf besaßen Tunicamycin-behandelte WT-Larven um 1,8 µm und *atf6*-defiziente Larven um 1,5 µm verkürzte Rotzapfen-Außensegmente im Vergleich zu DMSO-behandelten Tieren (Abb. 40E). Im Alter von 5 dpf war dieser Effekt weiterhin zu erkennen. Hier waren diese in Tunicamycin-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren um 1,1 µm verkürzt (Abb. 40E). Zwischen beiden Genotypen selbst konnte jedoch zu keiner Zeit ein Tunicamycin-basierter signifikanter Unterschied in der Rotzapfen-Außensegment-Länge detektiert werden. Die Länge der Außensegmente nahm außerdem vergleichbar mit unbehandelten Larven von 3 dpf auf 5 dpf in beiden Genotypen trotz DMSO- oder Tunicamycin-Behandlung signifikant zu.

Die Untersuchung der Grünzapfen-Außensegmente zeigte bei 3 dpf alten WT-Larven eine signifikante und bei *atf6*<sup>-/-</sup>-Larven eine nicht-signifikante Reduktion der Grünzapfen-Zahl nach Behandlung mit Tunicamycin (Abb. 40A und 40D). Tunicamycin-behandelte WT-Larven besaßen im Alter von 3 dpf 45,7 % (SD 23,3 %) und damit signifikant weniger Grünzapfen-Außensegmente im Vergleich zu gleichaltrigen DMSO-behandelten Kontrolltieren. Im Alter von 5 dpf konnten bei den Grünzapfen-Außensegmenten keine Unterschiede zwischen DMSO- und Tunicamycin-behandelten Larven beider Genotypen beobachtet werden. Auch unterschied sich die Zahl der Grünzapfen-Außensegmente zwischen Tunicamycin-behandelten WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven in beiden Altersstufen nicht (Abb. 40D).

#### 4.3.4.3. Der Effekt von Tunicamycin auf die Zellen der inneren Zebrafischretina

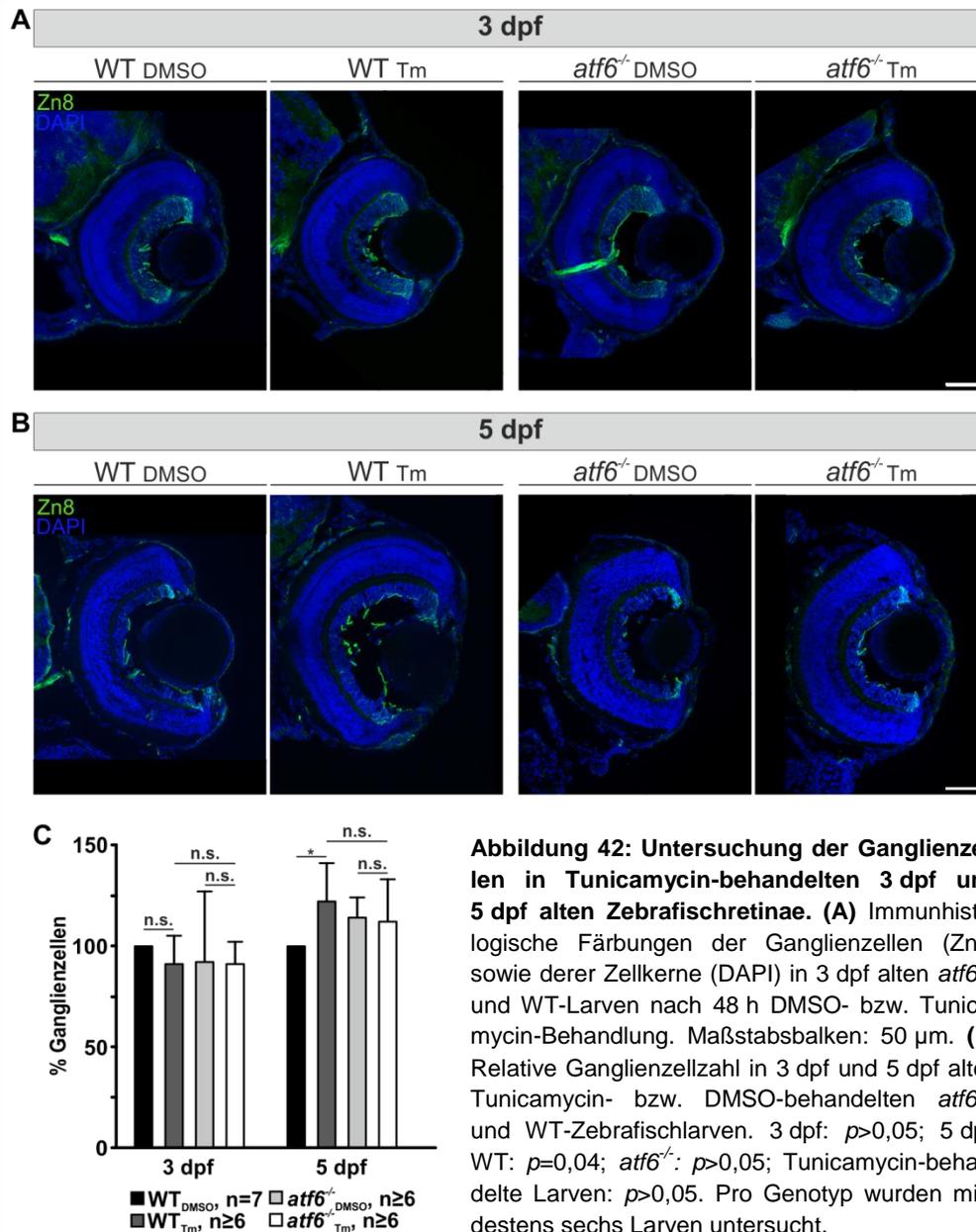
Es sollte der Effekt der Aktivierung der UPR auf die Zellen der inneren Retina untersucht werden. Hierzu wurden in histologischen Färbungen von 3 dpf und 5 dpf alten Tunicamycin- und DMSO-behandelten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Larven Bipolar- und Ganglienzellen untersucht (sie-

he Abschnitt 4.3.1.6). Die PKC $\alpha$ -Färbung der Bipolarzellen zeigte in 3 dpf alten Tunicamycin- und DMSO-behandelten Larven, zusätzlich zur Markierung dieser, eine diffuse Färbung über die gesamte Retina (Abb. 41A). Somit war eine valide Auszählung der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen in dieser Altersstufe nicht möglich. Die Färbung der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen in 5 dpf alten behandelten Zebrafischlarven ähnelte der von unbehandelten Larven und konnte ausgewertet werden (Abb. 30A).



Die quantitative Analyse ergab im Alter von 5 dpf eine durch Tunicamycin bedingte signifikante Reduktion von 14,6 % (SD 6,4 %) der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen in *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven. In gleichaltrigen WT-Tieren wurde keine signifikante Reduktion an PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen nach Tunicamycin-Behandlung beobachtet (Abb. 41B). Zudem besaßen 5 dpf alte Tunicamycin-behandelte *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven 12,1 % (SD 6,6 %) und damit signifikant weniger PKC $\alpha$ -positive Bipolarzellen verglichen mit Tunicamycin-behandelten WT-Zebrafischlarven.

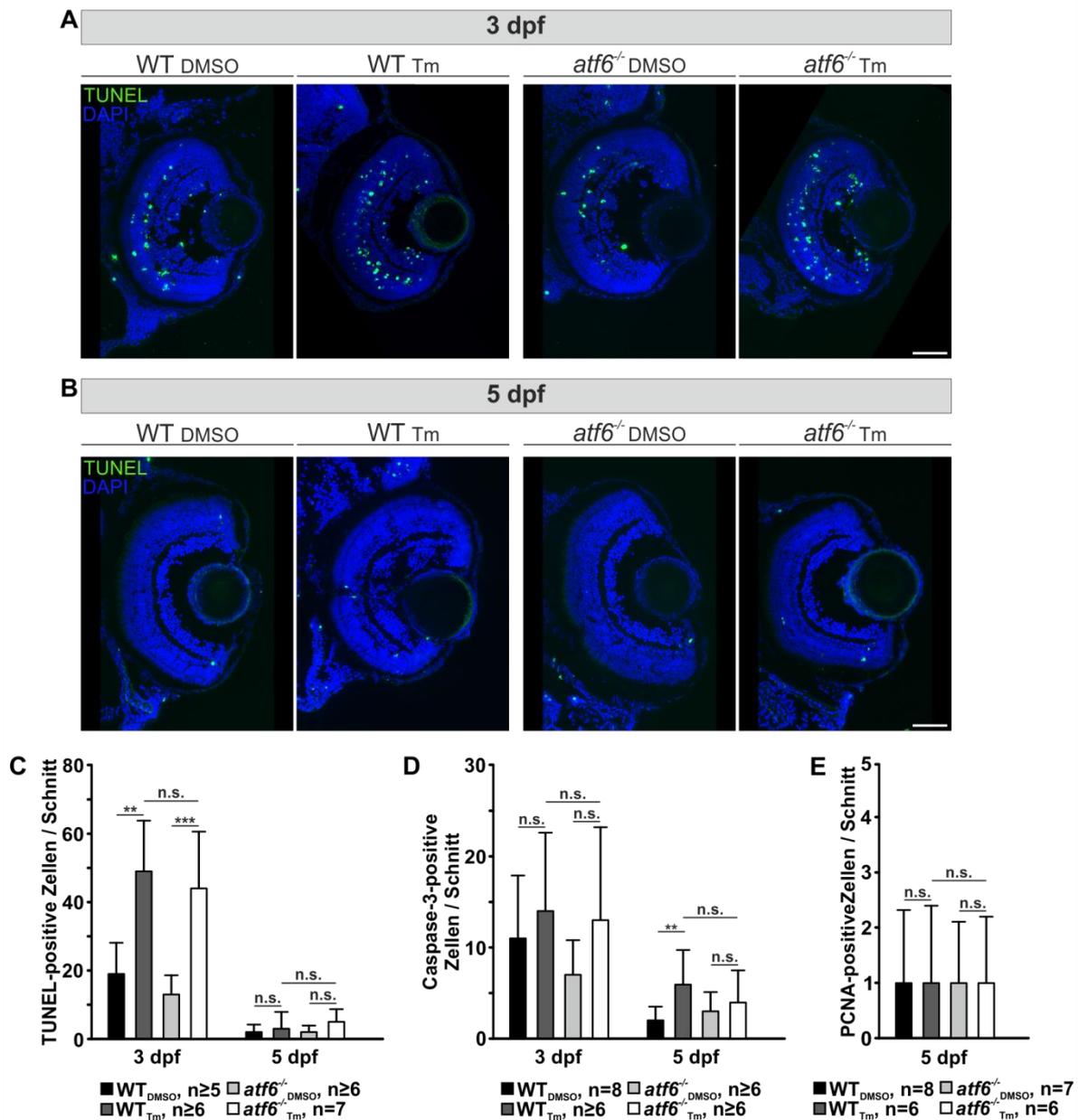
Die quantitative Analyse der Ganglienzellen erfolgte über die Auszählung der Zellkerne im GCL. Im Alter von 3 dpf konnte kein signifikanter Unterschied in der Ganglienzellzahl nach Behandlung mit Tunicamycin in beiden Genotypen beobachtet werden. In 5 dpf alten WT-Larven war die Zahl der Ganglienzellen durch die Behandlung mit Tunicamycin signifikant erhöht (30,6 % (SD 19,0 %), Abb. 42A, 42B). Für *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Der Vergleich von Tunicamycin-behandelten WT- mit Tunicamycin-behandelten *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven ergab keine Unterschiede in der Ganglienzellzahl in beiden Altersstufen (Abb. 42).



#### 4.3.4.4. Der Effekt von Tunicamycin auf Proliferation und Zelltod in der Zebrafischretina

Um zu überprüfen, ob die Aktivierung der UPR mit einer erhöhten Zelltodrate einhergeht bzw. ob die Proliferation der retinalen Zellen beeinflusst wird, wurde ein TUNEL-Assay sowie immunhistologische Färbungen zur Detektion apoptotischer (aktive-Caspase-3-positiver) sowie proliferierender (PCNA-positiver) Zellen durchgeführt. Basierend auf den Daten des TUNEL-Assays lag im Alter von 3 dpf eine signifikant höhere Zahl TUNEL-positiver Zellen in den Retinae von Tunicamycin-behandelten Larven im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollarven vor. Dieser Effekt konnte sowohl in WT- als auch in den *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven beobachtet werden (Abb. 43A,C). Retinae von mit Tunicamycin-behandelten Larven beider

Genotypen enthielten durchschnittlich pro Schnitt 30 TUNEL-positive Zellen mehr als DMSO-behandelte Kontroll-Larven. Im Alter von 5 dpf hatte die Behandlung mit Tunicamycin in beiden Linien keinen Einfluss mehr auf die Zahl TUNEL-positiver Zellen (Abb. 43B,C). Zwischen Tunicamycin-behandelten WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven konnte in beiden Altersstufen kein Unterschied in der Zahl TUNEL-positiver Zellen detektiert werden.



**Abbildung 43: Untersuchung der Proliferation und des Zelltods in Tunicamycin-behandelten 3 dpf und 5 dpf alten Zebrafischretinae. (A) und (B) TUNEL-Assay auf Gewebeschnitten von 3 dpf und 5 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Larven mit und ohne Tunicamycin-Behandlung. Maßstabsbalken: 50 µm. (C) Zahl TUNEL-positiver Zellen in 3 dpf und 5 dpf alten Tunicamycin- bzw. DMSO-behandelten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven. 3 dpf: WT:  $p=0,003$ ; *atf6*<sup>-/-</sup>:  $p<0,001$ ; 5 dpf:  $p>0,05$ . (D) Zahl Caspase-3-positiver Zellen in 3 dpf und 5 dpf alten Tunicamycin- bzw. DMSO-behandelten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven. 3 dpf:  $p>0,05$ ; 5 dpf: WT:  $p=0,03$  *atf6*<sup>-/-</sup>:  $p>0,05$ . (E) Zahl PCNA-positiver Zellen in 3 dpf und 5 dpf alten Tunicamycin- bzw. DMSO-behandelten *atf6*<sup>-/-</sup>- und WT-Zebrafischlarven. 3 dpf:  $p>0,05$ ; 5 dpf:  $p>0,05$ .**

Die Quantifizierung apoptotischer, d.h. aktive Caspase-3-positiver Zellen in Tunicamycin- und DMSO-behandelten Larven im Alter von 3 dpf zeigte keinen signifikanten Unterschied in beiden Linien. Dennoch ähnelten sie den Ergebnissen des TUNEL-Assays: im Alter von 3 dpf wiesen Tunicamycin-behandelte Larven beider Genotypen eine erhöhte Zahl aktive Caspase-3-positiver Zellen im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontroll-Larven auf (Abb. 43D). Im Alter von 5 dpf konnte ein signifikanter Unterschied in der Zahl apoptotischer Zellen in Tunicamycin-behandelten WT-Larven im Vergleich zu gleichaltrigen Kontroll-Larven detektiert werden (Abb. 43D). Dieser Effekt war in behandelten *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven nicht nachweisbar. Zwischen Tunicamycin-behandelten WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven konnte in beiden Altersstufen kein Unterschied in der Zahl aktive Caspase-3-positiver Zellen beobachtet werden.

Die quantitative Analyse der Proliferationsrate in Tunicamycin-behandelten Retinae konnte valide nur in 5 dpf alten Larven durchgeführt werden. In WT- sowie in *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven konnten keine Unterschiede in der Zahl PCNA-positiver Zellen zwischen DMSO- und Tunicamycin-behandelten Larven detektiert werden. Dasselbe galt für den Vergleich von Tunicamycin-behandelten WT- und *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven (Abb. 43E).

## 5. Diskussion

### 5.1. *atf6* als einziges Ortholog im Zebrafischgenom

Viele Gene liegen in Teleosteen in zwei oder mehr Kopien vor. Frühere komparative Studien zeigten, dass es während des evolutionären Verlaufs der Teleosteen zu einer Duplikation des gesamten Zebrafischgenoms kam (Amores et al., 1998; Postlethwait et al., 1998; Gates et al., 1999). Daher ist es bei genetischen Arbeiten mit dem Zebrafisch als Modellsystem unumgänglich zu überprüfen, ob das zu untersuchende Gen, in diesem Falle *atf6*, im Genom des Zebrafisches einzeln oder dupliziert vorliegt, bzw. ob mehrere Paraloge vorhanden sind.

*In silico*-Analysen unter Verwendung verschiedener Datenbanken wie dem *UCSC Genome Browser* und dem *Ensembl Genome Browser* wiesen auf keine Duplikation von *atf6* oder auf das Vorhandensein mehrerer *atf6*-Paraloge im Zebrafischgenom hin. *atf6* konnte auf Chromosom 20 im Zebrafischgenom als einzelnes Gen lokalisiert werden, wo es mit einer Transkriptlänge von 4192 bp insgesamt 16 Exons umspannt. Dies entspricht derselben Zahl an Exons, die *ATF6* auch im humanen Genom besitzt.

Der Sequenzvergleich des humanen und des Zebrafisch-Atf6-Proteins mithilfe der Alignment-Software Clustal Omega ergab eine Aminosäure-Sequenzidentität von 44,91 % (vgl. Abb. 15). Die Sequenzidentität der einzelnen funktionellen Domänen lag zwischen 12 % und 76 %. Im cytosolischen Bereich besitzt das humane ATF6 zwei saure Domänen (p.E25 bis p.L35 und VN8-Domäne:p.D61 bis p.P68; siehe auch Abb. 2). Diese sind durch ein vermehrtes Vorliegen saurer Aminosäuren (insbesondere Asparaginsäure) gekennzeichnet und sind für die transkriptionelle Aktivität des humanen ATF6 sowie dessen Degradierung verantwortlich (Thuerauf et al., 2007). Das acht Aminosäure lange Motiv – DFDL DLLP – (p.D61 bis p.P68) des humanen ATF6 ist dabei zu 75% identisch zum Motiv – DFDL DMLG – der VN8-Domäne des VP16 – einem hoch potenten Transkriptionsaktivator des *Herpes simplex* Virus. In heterologen Expressionssystemen konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren p.F62 und p.L64 in der VN8-ähnlichen Domäne für die optimale transkriptionelle Aktivität des humanen ATF6 essentiell sind (Thuerauf et al., 2007). Im Zebrafisch-Atf6-Protein ist diese VN8-ähnliche Domäne nur sehr gering konserviert. Die Sequenzidentität beträgt nur 12 % und lediglich das Phenylalanin (Zebrafisch: p. F66) ist konserviert. Zudem ist auch die Anzahl saurer Aminosäuren im Atf6 im Vergleich zur VN8-ähnlichen Domäne des humanen ATF6 stark reduziert. Der Vergleich zeigt, dass die VN8-Domäne, wie sie in ihrem Aufbau und ihrer Struktur im humanen ATF6 zu finden ist, in dieser Art im Zebrafisch-Atf6 nicht vorliegt. Die transkriptionelle Aktivität eines Transkriptionsfaktors basiert jedoch nicht nur

auf dem Vorhandensein (funktioneller) transkriptioneller Domänen, sondern auch auf der Promotorsequenz selbst. Die Promotorsequenz kann aufgrund multipler Bindestellen parallel mehrere Transkriptionsfaktoren rekrutieren und so die Induktion der Transkription initiieren. Dieser Prozess geschieht unabhängig davon, ob der Transkriptionsfaktor selbst eine funktionelle Transaktivierungsdomäne enthält (Tanaka et al., 1996), weswegen angenommen werden kann, dass Atf6 trotz fehlender VN8-Domäne in der Lage ist als Transkriptionsfaktor zu agieren. Im Gegensatz dazu weist die zweite, weiter N-terminal gelegene, saure Domäne (human p.E25 bis p.L35; Zebrafisch p.G28 bis p.L38) mit einer Sequenzidentität von 55 % eine höhere Konservierung zwischen humanem und Zebrafisch-Atf6 auf. Auch findet sich hier die für die sauren Aktivierungsdomänen charakteristische Anhäufung typischer Aminosäuren wie Asparagin- und Glutaminsäure. Da für die Funktionalität von Transaktivierungsdomänen weniger deren exakte Aminosäure-Sequenz als vielmehr die Zahl ihrer negativen Ladungen von essentieller Bedeutung ist (Hirai et al., 2010), kann davon ausgegangen werden, dass die saure Domäne im Zebrafisch-Atf6 eine ähnliche Aktivität wie die des humanen ATF6 aufweist, und somit vermutlich die transkriptionelle Aktivität des Zebrafisch-Atf6 als Transkriptionsfaktor sicherstellt.

Strukturelle und funktionelle Domänen und Aminosäure-Motive, die für die Aktivierung und die grundlegende Funktion von ATF6 essentiell sind, wie beispielsweise die bZiP-Domäne, die BiP-Bindedomäne, die GLS-Domänen oder auch die Aminosäure-Motive für die Serinproteasen 1 und 2 wiesen Sequenzidentitäten von 38 % bis zu 100 % auf. Der basische, für die Bindung der DNA verantwortliche Teil der bZiP-Domäne ist gekennzeichnet durch das hohe Vorkommen basischer Aminosäuren wie Lysin oder Arginin. Ein Vergleich dieses Bereiches (human: p.R308-p.Y330; Zebrafisch: p.R294-p.Y316) zeigte eine Konservierung aller Lysine und Arginine zwischen Mensch und Zebrafisch. Auch die für die Stabilisierung des Leucin-Zippers verantwortlichen Leucine an den sogenannten d-Positionen (Moitra et al., 1997; Deppmann et al., 2004) sind zwischen Mensch und Zebrafisch vollständig konserviert (human: p.L334, p.L348, p.L355, p.L369; Zebrafisch: p.L320, p.L334, p.L341, p.L355). Ebenso sind die für die Bildung von Disulfidbrücken relevanten Cysteine an den Positionen 467 und 618 des humanen ATF6 (Nadanaka et al., 2007), sowie das Erkennungsmotiv – RHLL – für die Serinprotease 1 und die beiden Aminosäuren p.N391 und p.P394 (Zebrafisch: p.N377 und p.P380), welche für die Spaltung von ATF6/Atf6 durch die Serinprotease 2 essentiell sind (Ye et al., 2000), zwischen dem humanen und Zebrafisch-Atf6-Protein hoch konserviert.

Die hohe Sequenzidentität in den funktionellen Domänen sowie die Konservierung bedeutsamer Aminosäuren deuten darauf hin, dass der Mechanismus, der zu einer Aktivierung von Atf6 im Zebrafisch führt vermutlich analog zu dem Mechanismus ist, der zu einer Aktivierung des humanen ATF6 führt und damit evolutionär konserviert ist. Auch wenn der Vergleich des humanen ATF6 mit dem anderer Säugetieren wie der Maus oder Ratte eine Sequenzidentität von bis zu 88,1 % aufweist (Abb. S2B), kann man aufgrund der Konservierung funktionell wichtiger Domänen zwischen Mensch und Zebrafisch annehmen, dass der Zebrafisch ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der ATF6-Funktion darstellt.

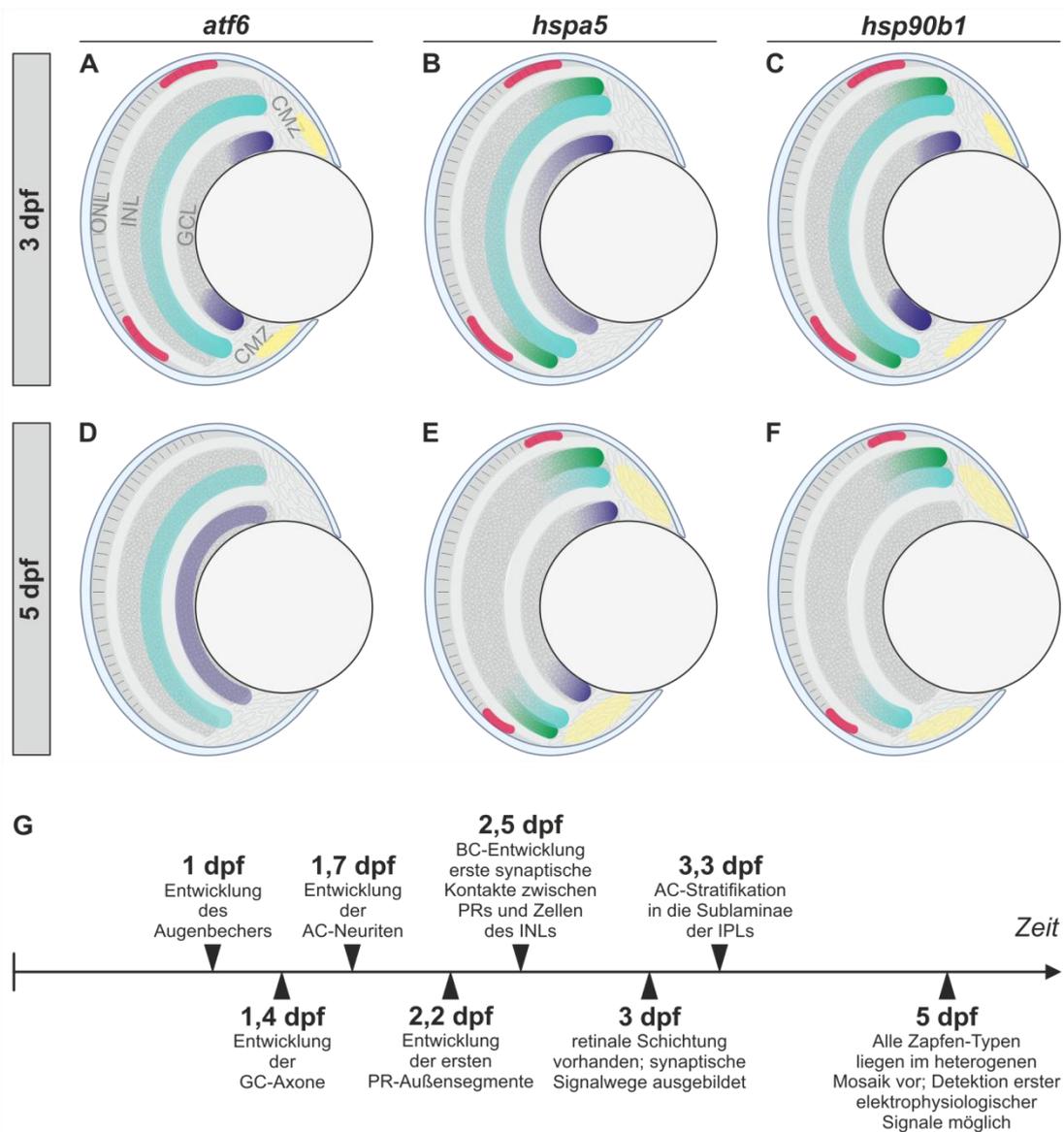
## 5.2. Expression von *atf6* und *atf6*-assoziierter UPR-Komponenten in der Retina

Die Expression von *atf6* in der Zebrafischretina wurde mittels ISH (siehe Abschnitt 3.7.3 und Abschnitt 3.7.4) an 3 dpf und 5 dpf alten WT-Larven und an adulten retinalen WT-Schnitten untersucht. Zusätzlich sollte die Aktivierung des ATF6-Signalwegs, durch ISH-Untersuchungen zur Expression der Atf6-Zielgene *hspa5* und *hsp90b1* analysiert werden. Beide Gene liegen wie *atf6* auch einzeln und nicht in duplizierter Form im Zebrafischgenom vor. *Hspa5* wie auch *hsp90b1* kodieren beide für ER-Chaperone und sind somit für die Aufrechterhaltung der Proteinfaltungskapazität des ERs zuständig. Hspa5/Bip agiert zusätzlich noch als Regulator der UPR, indem er die einzelnen UPR-Schlüsselkomponenten ATF6, IRE1 und PERK inaktiviert, wenn kein ER-Stress vorliegt (Walter und Ron, 2011).

In den larvalen Altersstufen wurde ein teilweise überlappendes Expressionsmuster von *atf6* und seinen Zielgenen detektiert. *atf6* sowie beide Zielgene zeigten in beiden untersuchten Altersstufen eine Expression im Gehirn als auch im Bereich des Auges (vgl. Abb. 16A, Abb. 38A, Abb.39A). Eine Expression von *hspa5* und *hsp90b1* wurde weiterhin in den Neuromasten, den Vorläuferzellen des Seitenlinienorgans detektiert (siehe Abb. 38A, Abb. 39A). Um die genauen Expressionsmuster aller Gene in der Retina untersuchen zu können, wurden Gewebeschnitte von den in der ISH angefärbten Larven angefertigt. Im Alter von 3 dpf wurde eine überlappende Expression aller untersuchter Gene in den Amakrinzellen sowie in den Zellen des GCLs beobachtet, wobei die Expression hier in den peripheren Regionen stärker als in der zentralen Retina war (vgl. Abb. 44A-C). Zusätzlich konnte eine Expression von *atf6*, *hspa5* und *hsp90b1* in den der CMZ zugewandten Randbereichen der Photorezeptorschicht beobachtet werden (siehe Abb. 44A-C, vgl. Abb. 17). Für *hspa5* und *hsp90b1* wurde

die Expression zusätzlich auf Zellen im medialen INL und für *atf6* und *hsp90b1* in der CMZ lokalisiert (siehe Abb. 44 B+C).

Im Alter von 3dpf konnte in der Zebrafischretina die Expression von *atf6* nachgewiesen und lokalisiert werden. Dass auch die Expression der Zielgene *hspa5* und *hsp90b1* gezeigt werden konnte und die Lokalisation mit der *atf6*-Expression überlappt, zeigt deutlich, dass im Alter von 3dpf der ATF6-Signalweg der UPR aktiviert ist.



**Abbildung 44: Schematische Darstellung der Expression von *atf6* sowie der *atf6*-Zielgene *hspa5* und *hsp90b1*.** (A)-(C): Schematische Übersicht der Lokalisation der Expression der unterschiedlichen Gene in den verschiedenen retinalen Regionen in 3 dpf alten Zebrafischlarven. (D)-(F): Schematische Übersicht der Lokalisation der Expression der unterschiedlichen Gene in den verschiedenen retinalen Regionen in 5 dpf alten Zebrafischlarven. (G): Zeitachse zum Entwicklungsverlauf der Zebrafischretina. Rot: Photorezeptoren, Türkis: Amakrinzellen im INL, Grün: Zellen im medialen INL, Blau: Zellen im GCL, Gelb: Zellen der CMZ, PR: Photorezeptoren.

Im Alter von 5 dpf wurde die *atf6*-Expression weiterhin im Bereich der Amakrinzellen und in den peripheren, der CMZ zugewandten Regionen des GCLs detektiert (vgl. Abb. 44D). *hspa5* wurde in der CMZ als auch im Bereich, in dem die CMZ in die periphere Retina übergeht, d.h. in den peripheren Bereichen jeder retinalen Schicht, exprimiert (vgl. Abb. 44E). Selbiges gilt mit Ausnahme des GCLs für die Expression von *hsp90b1* in diesem Altersstadium (vgl. 44F). Die Lokalisierung der Expression von *atf6* und seinen Zielgenen *hspa5* und *hsp90b1* zeigte im Alter von 5 dpf in der Zebrafischretina kaum Überlappungen. Mögliche Gründe hierfür könnten rückläufiger ER-Stress sowie die transiente Aktivierung von *atf6* sein. Da die UPR ein dynamisches Netzwerk bildet und die einzelnen UPR-Signalwege zeitlich unabhängig sowie transient, angepasst auf den vorherrschenden ER-Stress, aktiviert werden (DuRose et al., 2006), bestünde bei abnehmendem ER-Stress die Möglichkeit, dass die Expression von *atf6* bereits deaktiviert wurde, in unterschiedlichen Zelltypen jedoch noch eine Expression der unterschiedlichen Zielgene zu finden ist.

Die Lokalisation der Expression von *atf6*, *hspa5* und *hsp90b1* war in diesem Alter (5 dpf) auffällig: die Gene wurden besonders stark in der inneren und/oder äußeren zentralen CMZ, und nur sehr lokal in der peripheren CMZ exprimiert (Einteilung der CMZ-Bereiche nach Raymond et al., 2006). In der peripheren CMZ finden sich Zellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften. In der anschließenden mittleren CMZ liegen noch im Zellzyklus befindliche retinale Vorläuferzellen und determinierte Vorläuferzellen vor. Vorläuferzellen, die sich in der Differenzierung befinden, lokalisieren in der zentralen CMZ. Dies wird z. B. durch die Expression von *cdkn1c*, welches für den Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor 1C kodiert, deutlich. *Cdkn1c* ist für den Austritt aus den Zellzyklus und die Differenzierung retinaler Neurone essentiell und wird sehr restriktiv in der zentralen CMZ exprimiert (Cervený et al., 2010). Man kann somit annehmen, dass die hier untersuchten Gene *atf6*, *hspa5* und *hsp90b1* insbesondere in postmitotischen differenzierenden Zellen exprimiert werden. Dass es sich tatsächlich um sich in der Differenzierung befindliche Photorezeptoren und Amakrinzellen handelt, belegen die überlappenden Expressionsmuster der hier untersuchten Gene und *rx1*, *rx2* und *pax6*. Für *rx1* und *rx2* konnte bereits gezeigt werden, dass diese in sich differenzierenden (Zapfen-) Photorezeptoren exprimiert werden (Raymond et al., 2006). Gleiches gilt für *pax6*, ein Gen, das nachweislich in sich differenzierenden Amakrinzellen exprimiert wird (Raymond et al., 2006). Auch der Transkriptionsfaktor *egr1*, welcher für die Differenzierung retinaler Zellen im Zebrafisch notwendig ist (Hu et al., 2006; Zhang et al., 2013), zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie die hier untersuchten Gene. Im Alter von 3 dpf wird *egr1* im GCL, den Amakrinzellen, dem medialen Bereich des INL, der hier den Horizontalzellen zu-

geordnet wird, und in den peripheren, der CMZ zugewandten Regionen der Photorezeptor-Schicht exprimiert (Zhang et al., 2013).

Die Expression aller untersuchten UPR-Komponenten im Alter von 3 dpf und im Falle von *atf6* auch im Alter von 5 dpf war nicht nur in den peripheren, der CMZ zugewandten Bereichen der Amakrinzellen, sondern auch in der zentralen Retina lokalisiert. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Amakrinzellen im Alter von 1,7 dpf erste Neuriten ausbilden, die im Alter von 3,3 dpf dann in die Sublaminae des IPLs stratifizieren (Godinho et al., 2005; Jussuf und Harris et al., 2009). Möglicherweise kommt es dabei aufgrund des Zellwachstums bzw. Wachstums der Neuriten während dieser (Differenzierungs-) Phase zu einer erhöhten Proteinproduktion, und somit zu erhöhtem ER-Stress.

### **5.2.1. Während der Entwicklung entsteht ER-Stress**

In den hier durchgeführten ISH-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression von *atf6* sowie *hspa5* und *hsp90b1* mit steigendem Alter abnahm (vgl. Abb. 16A und B, Abb. 38A und B, Abb. 39A und B). Die Untersuchung der Expression von *atf6* in der adulten Retina ergab kein Signal. Dass in den larvalen Altersstufen die Expression der beiden *atf6*-Zielgene *hspa5* und *hsp90b1* in der Retina als auch im Gehirn detektiert werden konnte, diese jedoch mit zunehmendem Alter nachließ, deutet darauf hin, dass Zebrafischlarven während ihrer Entwicklung temporären ER-Stress erfahren und dieser die UPR aktiviert. Diese Erkenntnisse spiegeln die Ergebnisse anderer Studien wieder, in denen ebenfalls eine Aktivierung der UPR und damit intrinsischer ER-Stress während der Entwicklung in unterschiedlichen Tiermodellen festgestellt wurde (Li et al., 2015; Zhang et al., 2007; Lee et al., 2011; Ishikawa et al., 2013; Chen et al., 2014). Ähnlich zu dieser Arbeit wurden auch im Mausmodell erhöhte Mengen der ER-Chaperone BIP/HSPA5 und GRP94/HSP90B1 während der Embryonalstadien in Retina und Gehirn im Vergleich zu adulten Tieren auf Proteinebene mittels Western Blot detektiert. ATF6 wurde hier hingegen in der embryonalen als auch der adulten Retina in vergleichbaren Mengen detektiert. Jedoch wurde im Gehirn eine erhöhte Menge an glykosyliertem ATF6 detektiert, welche mit zunehmendem Alter abnahm, und auf eine vermehrte Aktivierung von ATF6 in frühen Entwicklungsstadien hindeutet (Zhang et al., 2007). Wie wichtig die Expression von ER-ständigen Chaperonen wie Hspa5/Bip während der Embryonalentwicklung von Mäusen und Fischen ist, konnte bereits gezeigt werden (Luo et al., 2006; Ishikawa et al., 2013): Der *knockout* von Hspa5/Bip bzw. der Verlust der

ATPase-Aktivität von Hspa5/Bip resultierte in beiden Tiermodellen in einem embryonal letalem Phänotyp (Luo et al., 2006; Ishikawa et al., 2013).

Dass während der Entwicklung intrinsischer ER-Stress entsteht, konnte weiterhin mittels verschiedener Fisch-Modelle gezeigt werden. So konnte beispielsweise in Medaka-Larven unter Verwendung von eGFP-Reporter-Linien die ubiquitäre Expression von Hspa5/Bip sowie von Atf6 im Bereich der Leber sowie im Gastrointestinaltrakt in 1 dpf und 2 dpf alten Medakalarven visualisiert werden – spätere Entwicklungszeitpunkte wurden nicht untersucht (Ishikawa et al., 2013).

Dass es während der Entwicklung ebenfalls zur Aktivierung des IRE1-Signalweges kommt, zeigten Untersuchungen an einer Reporter-Zebrafischlinie, in denen der unkonventionelle Spleißvorgang der *xbp1*-mRNA verfolgt werden konnte. Die gespleißte, d.h. aktive Form von *xbp1* wurde hier während des gesamten Entwicklungsverlaufes (bis 7 dpf) ubiquitär detektiert. Ähnlich zur Expression von *atf6* in dieser Arbeit, wurde aber auch hier eine dynamische Expression mit erhöhtem aktivem *xbp1*-Niveau in frühen Larvalstadien beobachtet (Li et al., 2015). Diese Studie bestätigt zudem ältere Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass *Xbp1* während der Embryonalentwicklung in Maus und Schwein aktiviert wird (Zhang et al., 2012a; Zhang et al., 2012b). In der Maus konnte die gespleißte Form der *Xbp1*-mRNA während der Entwicklung des Gehirns und der Retina detektiert werden. Sie war jedoch im adulten Stadium kaum nachweisbar (Zhang et al., 2007), sodass auch hier von einer Aktivierung des IRE1-Signalweges während der Entwicklung ausgegangen werden kann.

Auch der dritte UPR-Signalweg, der PERK-Signalweg sowie weitere ER-Stress-abhängige Komponenten, die beispielsweise die ERAD-Antwort vermitteln, sind während der Entwicklung aktiv (Lee et al., 2011; Chen et al., 2014). Im Alter von 96 hpf konnte im Kopfbereich der Zebrafischlarve die Expression von *chop*, einer *downstream*-Komponente des PERK-Signalweges, mittels ISH-Experimenten detektiert werden (Lee et al., 2011). Ebenso konnte eine Expression der E3-Ubiquitin-Ligase Gp78, welche kein direktes Zielgen einer der drei UPR-Signalwege, sondern vermutlich eine ERAD-Komponente darstellt, im Alter von 4 dpf und 5 dpf im Gehirn, der Leber und dem Gastrointestinaltrakt der Zebrafischlarven beobachtet werden. Mittels RT-PCR-Experimenten war es hier möglich, mRNA-Transkripte von 0 hpf bis 6 dpf zu detektieren (Chen et al., 2014). Betrachtet man all diese Erkenntnisse, so deuten auch die ISH-Daten dieser Arbeit (vgl. Abb. 16, Abb. 38, Abb. 39) auf die Entstehung intrinsischen ER-Stresses und die damit verbundene Aktivierung der UPR während der Entwicklung der Zebrafischlarve im Hirnbereich, den Neuromasten und in der Retina hin.

Betrachtet man die mittels *whole mount* ISH detektierte Expression von *atf6*, *hpsa5* und *hsp90b1* in 3 dpf und 5 dpf alten Zebrafischlarven (siehe Abb. 16A, Abb. 38A, Abb. 39A), so fällt auf, dass scheinbar hauptsächlich Zellen, die im weiteren Sinne zum zentralen Nervensystem (ZNS) zählen und die sich vermutlich gerade in der Entwicklung bzw. Differenzierung befinden, von dem entstehenden temporären ER-Stress betroffen sind. Durch die erhöhten Mengen an gebildeten und sekretierten Proteinen in sich differenzierender Zellen während der ZNS-Entwicklung, spielt die Aktivierung der UPR hier vermutlich eine wichtige Rolle (Shen et al., 2001). Untersuchungen in Medaka untermauern diese Hypothese weiter: Hier werden während der Entwicklung des Notochords beispielsweise erhöhte Mengen des Kollagens Typ VIII gebildet, die zu erhöhtem ER-Stress während der Embryonalentwicklung führen (Ishikawa et al., 2013) und dessen korrekte Faltung nur mittels verschiedener ER-Chaperone gewährleistet werden kann (Lamandé und Bateman, 1999).

### **5.3. Evaluierung der unterschiedlichen Antikörper gegen humanes, murines und Zebrafisch-Atf6**

Die immunhistologische Lokalisierung von ATF6 in der Maus- und Zebrafischretina, sowie die immunologische Detektion der Spezies-spezifischen ATF6-Proteine im Western Blot erfordern spezifische Antikörper. Für die Evaluierung von Antikörpern standen für Maus und Zebrafisch jeweils wildtypische und *knockout*-Tiere, und für humane Antikörper Zell-Linien aus ATF6-ACHM Patienten mit vermutlichen Null-Allelen, zur Verfügung. Hierdurch war eine genaue Charakterisierung der verschiedenen Antikörper und Seren möglich. Diese lieferten jedoch durchweg unspezifische Ergebnisse (vgl. Tabelle S1), sodass alle getesteten Antikörper und Seren verworfen werden mussten.

Es wurden sieben kommerziell erhältliche und 47 für dieses Projekt generierte Antikörper gegen die unterschiedlichen ATF6-Proteine aus Mensch, Maus und Zebrafisch mittels Western Blot-Analysen, Immuncytochemie und Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten evaluiert (siehe Abschnitt 3.5.3, 3.8.6, 3.8.3; vgl. Tabelle S1). Die Evaluation zeigte, dass keiner der getesteten Antikörper das jeweilige ATF6-Protein spezifisch detektieren konnte (siehe Tabelle S1). Drei der ursprünglich kommerziell erhältlichen Antikörper (ab11909, ab65838, PA-20215) können mittlerweile zu Recht nicht mehr erworben werden.

Es ist wichtig zu verstehen, dass Antikörper, die in dieser Arbeit im Western Blot als auch in der Immuncyto- und Immunhistochemie in *knockout*-Tieren als auch humanen ATF6-ACHM Patienten unspezifische Ergebnisse zeigten (IMG-273, ab62576), in anderen Studien gegen

humanes und murines Atf6 im Western Blot (Liu et al., 2016; Burman et al., 2018; Fink et al., 2018; Przystal et al., 2019), aber auch in der Immuncytochemie (Ayaub et al., 2019) eingesetzt werden. Desweiteren werden in verschiedenen Studien Antikörper gegen das humane ATF6 verwendet, die aber nicht näher spezifiziert werden (Chiang et al., 2017; Kroeger et al., 2018). Daher ist ein Vergleich mit den von uns getesteten Antikörpern hier nicht möglich. Mit dem kommerziell erhältlichen Antikörper (ab37149), konnte am Anfang des Projekts im Western Blot prozessiertes wie auch natives humanes ATF6 spezifisch detektiert werden (Abcam, LOT-Nr. unbekannt (aus 2012); vgl. Tabelle S1). Dieser wurde auch in anderen Studien erfolgreich und überzeugend verwendet und zeigte dort auf murinen retinalen Schnitten eine spezifische Färbung von Atf6 im GCL (Ansar et al., 2015). Nach Neubestellung zeigte sich leider, dass das neue LOT (LOT-Nr.: GR182362-2 (aus 2015)) ATF6 nicht mehr spezifisch detektieren kann.

Die für dieses Projekt spezifisch gegen humanes, murines oder Zebrafisch-Atf6 hergestellten Antikörper konnten ebenso nicht überzeugen. In der Evaluation mittels Western Blot, Immuncyto- und Immunhistochemie konnten unter Verwendung dieser Antikörper entweder keine Signale, oder nur unspezifische Signale detektiert werden (siehe Tabelle S1). Antikörper, mit denen im Western Blot oder in der Immuncytochemie in transfizierten HEK293T-Zellen ATF6/Atf6 spezifisch detektiert werden konnte, zeigten jedoch keine spezifischen Signale auf Spezies-entsprechenden Gewebeschnitten oder in Patienten-Fibroblasten (vgl. Tabelle S1). Daher konnte die Spezifität dieser Antikörper gegenüber ATF6/Atf6 nicht verifiziert werden.

Als wahrscheinlichsten Grund für die unzureichende Detektionsfähigkeit der evaluierten Antikörper ist eine geringe Sensitivität der Antikörper anzunehmen. Da ATF6/Atf6 nur unter auftretendem ER-Stress, d.h. nur transient exprimiert wird und nur eine geringe Halbwertszeit aufweist (Thuerauf et al., 2007), müsste ein Antikörper eine sehr hohe Sensitivität aufweisen, um intrinsisches ATF6/Atf6 im Gewebe ohne die Induktion von ER-Stress detektieren zu können. Eine andere Möglichkeit, warum ATF6/Atf6 nicht oder nur unspezifisch detektiert werden konnte, ist die Lage des Antigens. Ist dieses aufgrund der Tertiärstruktur des Proteins verdeckt, kann der entsprechende Antikörper nicht daran binden. Diese Hypothese unterstützt die Ergebnisse der Evaluation insofern, als mittels Western Blot, wo die Proteine in denaturierter Form vorliegen, vermehrt Banden detektiert werden konnten, hingegen in der Immunhistochemie an Gewebeschnitten kein ATF6/Atf6-Signal detektiert werden konnte. Umgekehrt war es mit keinem der getesteten Antikörper möglich, ATF6/Atf6 spezifisch im Western Blot zu detektieren. Neben den zu erwartenden Banden, wurden generell viele Ne-

benbanden detektiert, was eine spezifische Lokalisation von ATF6/Atf6 im Gewebe unmöglich machen würde.

Insgesamt zeigte die Evaluation der 54 gegen humanes, murines bzw. Zebrafisch-Atf6 gerichteten Antikörper, dass keiner von ihnen geeignet war ATF6/Atf6 im Gewebe spezifisch zu detektieren. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit *atf6* auf Transkript-Ebene mittels ISH im Zebrafisch bzw. in der Zebrafischretina lokalisiert.

#### **5.4. Generierung und Evaluierung der verschiedenen TALEN-Paare**

*ATF6* wurde neben *CNGB3*, *CNGA3*, *GNAT2*, *PDE6C* und *PDE6H* als sechstes ACHM-assoziiertes Gen beschrieben (Kohl et al., 2015). Während die bislang bekannten Gene alle für Komponenten der Phototransduktionskaskade kodieren und damit in direktem Zusammenhang mit dem Sehprozess stehen, steht *ATF6* als ER-Stress-Sensor und Schlüsselkomponente der UPR am Anfang einer neuen Klasse an Genen, in welcher Mutationen zur Entstehung einer ACHM führen. Erste Untersuchungen in *Atf6*<sup>-/-</sup>-Mäusen, die zur Aufklärung des Pathomechanismus der ATF6-assoziierten ACHM beitragen sollten, zeigten, dass diese Mäuse den humanen ATF6-ACHM-Phänotyp nicht rekapitulieren und sich daher nicht zur Aufklärung der Rolle von ATF6 im Zusammenhang mit einer ACHM eignen.

Aufgrund ihrer zapfenreichen Retina, in der die Zapfen einer regelmäßigen Anordnung im Mosaik folgen und auch anhand ihrer morphologischen Merkmale leicht voneinander unterscheidbar sind, stellen Zebrafische ein weit genutztes Tiermodell für Zapfen-basierte, retinale Erkrankungen dar. Es sind verschiedene Zebrafischmodelle generiert und erfolgreich charakterisiert worden, so z.B. Zebrafischmodelle für EYS-RP (*Retinitis pigmentosa*), *C2orf71*-RP, *PDE6C*-ACHM oder *AIPL1*-LCA (Lebersche kongenitale Amaurose (Stearns et al., 2007; Iribarne et al., 2017; Corral-Serrano et al., 2018; Messchaert et al., 2018)).

Da kein Zebrafischmodell für die ATF6-ACHM zur Verfügung stand, um den Zusammenhang von Mutationen in *ATF6* und deren Auswirkungen auf die Entstehung einer ACHM zu untersuchen, sollte in dieser Arbeit ein *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodell generiert werden, um Einsichten in diese Fragestellung zu erlangen.

Die Generierung des *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells erfolgte mittels der TALEN-Technologie (siehe Abschnitt 3.3.9). Unter Zuhilfenahme des Prädiktionsprogrammes TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 wurden zwei TALEN-Zielsequenzen ausgewählt, die in Exon 5 und Exon 6 von *atf6* lokalisiert waren (siehe Abb. 18). Im Falle von TALEN-induzierten Leseras-

termutationen käme es aufgrund dieser Lokalisation zu einem frühzeitigen Stop-Codon vor allen funktionell wichtigen Domänen. Die resultierende mRNA würde von der Zelle vermutlich mittels NMD vorzeitig abgebaut werden bzw. das generierte Stop-Codon würde zu einem frühzeitigen Abbruch der Proteintranslation führen. Das Atf6-Protein wäre somit verkürzt und würde außer der sauren Domäne keine funktionell und strukturell essentiellen Domänen mehr enthalten und müsste somit ein Null-Allel darstellen.

Die weiteren Prädiktionseinstellungen wurden so gewählt, dass sowohl die *Spacer*- als auch die TALEN-Zielsequenz inklusive der initialen Thymin-Base eine Länge von 15-20 bp nicht überschritt, da bereits gezeigt werden konnte, dass TALEN mit diesen Eigenschaften eine hohe Schnitteffizienz aufweisen (Miller et al., 2011). Da Experimente von Streubel und Kollegen beweisen konnten, dass die Aktivität eines TALEN mit der Zahl starker *RVDs* korreliert (Streubel et al., 2012), sollte jede Bindedomäne der ausgewählten TALENs mindestens drei bis vier starke *RVDs* (HD oder NN) enthalten. Als starke *RVDs* werden solche bezeichnet, die mit hoher Affinität an Cytosin bzw. Guanin binden und dabei Wasserstoffbrücken mit diesen ausbilden. Die Bildung von Wasserstoffbrücken resultiert in einer stärkeren DNA-Bindung verglichen mit der Bindung durch Van-der-Waals-Kräfte, die manche schwache *RVDs* (z.B. NI oder NG) mit der DNA eingehen (Streubel et al., 2012).

Die zwei eigens generierten TALEN-Paare TALEN1 und TALEN2 bestanden aus 17 bzw. 18 Monomeren und enthielten mindestens 11 starke *RVDs* (siehe Tabelle 34). Als drittes TALEN-Paar wurde ein bereits gegen *atf6* publiziertes TALEN-Paar ausgewählt (Sander et al., 2011). Diese beiden TALEN bestanden aus 17 Monomeren und enthielten mindestens sieben starke *RVDs* (siehe Tabelle 34). Alle drei gewählten TALEN-Paare erfüllten damit die aufgezeigten Kriterien.

Betrachtet man noch einmal die einzelnen Kriterien, die zur Generierung der einzelnen TALEN-Paare herangezogen worden sind, so fällt auf, dass das bereits publizierte TALEN-Paar mit der geringsten Zahl starker *RVDs* (TALEN3) die höchste Genom-Editierungseffizienz und geringste Toxizität besaß (vgl. Abb. 19 und Abb. 20). Im Gegensatz hierzu war die Effizienz des TALEN1-Paares, welches gleichzeitig auch die meisten starken *RVDs* besaß, geringer, die Toxizität jedoch deutlich erhöht (siehe Abb. 19). Ähnliche Effekte konnten schon in Zellkulturexperimenten beobachtet werden. Diese zeigten, dass die Spezifität von TALEN durch übermäßige chemische Energie, die bei der Bindung an die DNA, beispielsweise durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken entsteht, sinkt (Guilinger et al., 2014). Bezogen auf die generierten TALEN-Paare lässt sich daher vermuten, dass die Zahl

starker RVDs und somit die gebildete chemische Energie in Form von Wasserstoffbrückenbindungen in den TALEN1- und TALEN2-Paaren zu hoch war, was in verminderter Spezifität und damit erhöhter Toxizität resultierte.

Die in der Literatur beschriebenen Editierungseffizienzen variieren stark: Im *Xenopus* eingesetzte TALEN erreichten Editierungseffizienzen zwischen 80 % und 96 %, während in der Fruchtfliege lediglich Effizienzen bis 65 % erreicht wurden (Lei et al., 2012; Wei et al., 2013). Im Zebrafisch getestete und bereits publizierte TALEN-Paare zeigten Effizienzen von 2 % bis 77 % (Cade et al., 2012; Moore et al., 2012, Wei et al., 2013). Die Genom-Editierungseffizienzen der hier getesteten TALEN-Paare (vgl. Abb. 20) lagen mit 32,2 % (TALEN2) bis 48 % (TALEN3) somit im mittleren Bereich der bisher beschriebenen Editierungseffizienzen. Die Genom-Editierungseffizienz des ausgewählten TALEN3-Paares war für die Generierung des *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells jedoch ausreichend: Zum Einen wurde bei 46,7 % der F<sub>0</sub>-Tiere eine somatische Mutationsrate von mindestens 80 % erzielt und zum Anderen zeigten die identifizierten *Founder*-Fischen hohe Transmissionseffizienzen zwischen 42 % und 100 %. Die erzielten Transmissionseffizienzen waren dabei teilweise höher als in vergleichbaren Studien (Cade et al., 2012).

TALEN3 induzierte ausschließlich Deletionen, die zu 38 % zu einer Verschiebung des ORFs und einem frühzeitigen Stopp-Codon führten (vgl. Tabelle 35, Abb. 22). Auch in früheren Studien wurden mehrheitlich TALEN-induzierte Deletionen gefolgt von Leserasterverschiebungen detektiert (Cade et al., 2012; Lei et al., 2012; Moore et al., 2012; Lu et al., 2017). Der direkte Vergleich zeigt, dass das für die Generierung der *atf6*-knockout-Linie ausgewählte TALEN-Paar sowohl in Bezug auf seine Editierungseffizienz als auch in Bezug auf die erreichte Transmissionseffizienz und die weitergegebenen Mutationen mit früheren getesteten TALEN vergleichbar ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierte Zebrafischlinie trägt eine 1 bp-Deletion (c.519delG;p.(V174Cfs\*42)) in Exon 6 (vgl. Abb. 23). Würde man diese Mutation in die von Chiang und Kollegen publizierten Mutationsklassen einordnen, würde es sich um eine Mutation der Klasse 3 handeln (Chiang et al., 2017). Für diese Klasse an Mutationen, die durch den Verlust der bZip-Domäne und/oder Transaktivierungsdomäne gekennzeichnet wird, konnte in Zellkultursystemen bereits gezeigt werden, dass ein verkürztes ATF6-Protein zwar gebildet werden kann, dieses aber keinerlei transkriptionelle Aktivität mehr besitzt (Chiang et al., 2017). Basierend auf diesen Erkenntnissen ist davon auszugehen, dass die generierte 1 bp-

Deletion in *atf6* zu einem vollständigen Funktionsverlust des Atf6-Proteins im Zebrafisch führt.

Verifiziert wurde der erfolgreiche *knockout* von *atf6* im Zebrafisch auf Transkript-Ebene mittels ISH- und qRT-PCR-Experimenten. Eine Verifizierung auf Protein-Ebene war in Ermangelung eines spezifischen Atf6-Antikörpers nicht möglich. ISH-Experimente mit Ribosonden, die den gesamten ORF von *atf6* abdeckten, zeigten ein reduziertes Signal bei 3 dpf und kein Signal bei 5 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven im Vergleich zum WT (siehe Abb. 24). In WT-Larven konnte bereits gezeigt werden, dass *atf6* im Alter von 3 dpf im Vergleich zu 5 dpf verstärkt exprimiert wird (vgl. Abb. 16A). Überträgt man dieses Wissen auf *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven, kann angenommen werden, dass auch hier erhöhte Mengen an *atf6*-mRNA im Vergleich zu 5 dpf alten Larven gebildet werden würden. Da angenommen wird, dass die *atf6*-mRNA jedoch ein frühzeitiges Stopp-Codon enthält, wird diese vermutlich von der Zelle mittels NMD (*nonsense-mediated decay*) abgebaut (Frischmeyer und Dietz, 1999). Durch die erhöhten Mengen an *atf6*-Transkripten im Alter von 3 dpf im Vergleich zu 5 dpf, könnte die in der ISH von 3 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischlarven detektierte *atf6*-Expression auf *atf6*-mRNA-Reste, die noch nicht mittels NMD abgebaut wurden, zurückgeführt werden. Diese können jedoch für kein funktionelles Protein kodieren.

Die qRT-PCR-Experimente untermauern den in der ISH bereits gezeigten *atf6-knockout*. Hier wurde sowohl in den untersuchten Larvalstadien von 3 dpf und 5 dpf als auch in der adulten Zebrafischretina eine signifikant, bis zu 8,9-fach reduzierte *atf6*-Expression detektiert (vgl. Tabelle 36). Diese Daten zeigen, dass der angestrebte *atf6-knockout* im Zebrafisch mittels des ausgewählten TALEN-Paares erfolgreich war.

## 5.5. Charakterisierung des *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells

### 5.5.1. *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafische zeigen eine Verzögerung in der retinalen Entwicklung

Der Grund für die Generierung des *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells war die Schaffung eines Tiermodells, das zur Aufklärung des Pathomechanismus der ATF6-assoziierten ACHM beitragen sollte. Um durch den Verlust von *atf6* verursachte Veränderungen in der Retina zu analysieren, wurden im ersten Schritt der Charakterisierung unterschiedliche retinale Zelltypen wie Rot- und Grünzapfen, Stäbchen, Bipolarzellen und Ganglienzellen immunhistologisch untersucht. Da Studien an ATF6-ACHM-Patienten die Vermutung nahe legen, dass *ATF6* an der fovealen Entwicklung sowie an der Entwicklung von Zapfen-Photorezeptoren beteiligt ist

(Kohl et al., 2015; Mastey et al., ARVO Abstract Nr. 669-C0227, 2018), wurde die histologische Charakterisierung der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischretina in unterschiedlichen Altersstufen beginnend mit einem Alter von 3 dpf über 5 dpf bis hin zu 15 dpf durchgeführt. Um die Altersreihe zu komplettieren wurden ebenfalls Untersuchungen an adulten Retinae durchgeführt.

In der immunhistologischen Charakterisierung zeigte sich eine reduzierte Zellzahl aller quantitativ untersuchten retinalen Zelltypen (Rotzapfen, Grünzapfen, PKC $\alpha$ -positive Bipolarzellen und Ganglienzellen) im Alter von 3 dpf und 5 dpf. Hierbei waren die untersuchten Zelltypen jedoch nicht gleichmäßig betroffen. Im Alter von 3 dpf war die Zapfenzahl um 30 % (vgl. Abb. 26B und Abb. 27B), die Bipolarzellen um 14 % (vgl. Abb. 30B) und die Ganglienzellen um 19 % (vgl. Abb. 31B) reduziert. Besonders der Unterschied in der Zahl der Zapfen minimierte sich jedoch im Alter von 5 dpf. Hier war die Zapfenzahl in der *atf6*-defizienten Retina im Vergleich zur WT-Retina nur noch um 13 % und damit weniger als halb so viel reduziert (vgl. Abb. 26B und Abb. 27B). Der Unterschied der Bipolarzellzahl blieb mit 16 % im Alter von 5 dpf nahezu konstant (vgl. Abb. 30B), während der Unterschied in der Ganglienzellzahl auf 25 % anstieg (vgl. Abb. 31B). Zudem besaßen Rotzapfen in 3 dpf alten *atf6*<sup>-/-</sup>-Larven ein um 45,2 % verkürztes Außensegment (vgl. Abb. 26C). Eine Quantifizierung der Stäbchen-Photorezeptoren war aufgrund der übermäßigen Expression und Färbung von Rhodopsin nicht möglich. Die Morphologie der Stäbchen-Photorezeptoren in den *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischen entspricht jedoch der von wildtypischen Fischen (vgl. Abb. 29). Auffällig war, dass in den *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischen Zellen aller retinalen Schichten (ONL, INL, GCL) in ihrer Zahl reduziert waren, während sich der retinale Phänotyp in Zebrafischmodellen anderer retinaler Erkrankungen wie autosomal rezessiver Retinitis Pigmentosa, autosomal rezessiver Zapfen-Stäbchen-Dystrophie sowie Leberscher kongenitaler Amaurose hauptsächlich auf Zellen des ONLs auswirkte (Iribane et al., 2017; Lu et al., 2017; Corral-Serrano et al., 2018; Messchaert et al., 2018). Auch der zeitliche Verlauf des retinalen Phänotyps in den *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischen unterschied sich von den bisherigen beschriebenen Modellen: Während die meisten Zebrafischmodelle retinaler Erkrankungen einen mit zunehmendem Alter progressiven retinalen Phänotyp aufweisen (Iribane et al., 2017; Lu et al., 2017; Corral-Serrano et al., 2018; Messchaert et al., 2018), war der des hier generierten *atf6*-knockout-Zebrafischmodells auf frühe larvale Altersstufen (3 dpf und 5 dpf) beschränkt. Im Alter von 15 dpf konnten in diesem Modell keine Veränderungen bezüglich der retinalen Zellzahlen im Vergleich zu WT-Tieren mehr beobachtet werden. Zu allen untersuchten Entwicklungsstadien (3 dpf, 5 dpf und 15 dpf) wurden sowohl in wildtypischen als auch in der *atf6*-defizienten Retina mehr Rotzapfen als Grünzapfen

detektiert. Dies korreliert mit Ergebnissen anderer Studien, die sich mit der Entwicklung des Photorezeptor-Mosaikes in der Zebrafischretina beschäftigten (Allison et al., 2010).

Trotz reduzierter Zellzahlen in der Retina 3 dpf und 5 dpf alter *atf6*-defizienter Zebrafischlarven konnte in diesen keine erhöhte Zelltodrate detektiert werden. Dass sowohl in der wildtypischen als auch in der *atf6*-defizienten Retina im Alter von 3 dpf, in einem Stadium der frühen Entwicklung, überhaupt sterbende Zellen detektiert werden konnten, kann durch das natürlich vorkommende Sterben von Neuronen während der Vertebraten-Entwicklung erklärt werden (Galli-Resta und Ensini, 1996). Ebenso zeigten die Zellen der *atf6*-defizienten-Retina weder ein reduziertes noch ein erhöhtes Proliferationspotential. Die verminderten Zellzahlen in der *atf6*-defizienten Retina sind somit nicht auf Unterschiede in der Zelltod- oder zellulären Proliferationsrate bei den hier untersuchten Entwicklungszeitpunkten (3 dpf, 5 dpf und 15 dpf) zurückzuführen. Der Verlust von *atf6*, einer essentiellen Komponente der UPR, resultiert somit in einer verzögerten retinalen Entwicklung. Zu welchem Zeitpunkt kein Unterschied mehr zwischen wildtypischen- und *atf6*-defizienten Retinae besteht, kann anhand dieser Daten nicht abschließend festgestellt werden. Hierzu müssten weitere Zeitpunkte zwischen 5 dpf und 15 dpf untersucht werden.

Um zu verifizieren, dass der in 3 dpf und 5 dpf alten *atf6*-defizienten Larven detektierte Phänotyp auf den Verlust von *atf6* zurückzuführen ist, wurde zusätzlich die Retina von heterozygoten *atf6*<sup>+/-</sup>-Larven im Alter von 3 dpf und 5 dpf hierzu vergleichend untersucht. Hierbei konnten weder in der Zahl der Rotzapfen- noch in der Zahl der Grünzapfen-Außensegmente Unterschiede zwischen heterozygoten *atf6*<sup>+/-</sup> und wildtypischen Larven detektiert werden. Auch die Länge der Rotzapfen-Außensegmente der heterozygoten *atf6*<sup>+/-</sup>-Larven unterschied sich nicht von der gleichaltriger wildtypischer Tiere.

Um die Beobachtungen der histologischen Charakterisierung zu komplementieren, wurde die Funktionalität der Retina von *atf6*-Larven im Alter von 5 dpf mittels ERG-Messungen untersucht. Zu diesem Zeitpunkt sind lediglich die Zapfen-Photorezeptoren jedoch nicht die Stäbchen-Photorezeptoren funktionstüchtig (Raymond et al., 1995; Bilotta et al., 2001). Bei der ERG-Messung werden Lichtstimuli appliziert und die von der Retina gebildeten elektrischen Potentiale, die die elektrische Aktivität der unterschiedlichen retinalen Zelltypen widerspiegeln, mittels auf dem Auge positionierter Elektroden aufgezeichnet. Die a-Welle spiegelt hierbei die elektrische Aktivität der stimulierten Photorezeptoren wieder. Die b-Welle repräsentiert die elektrische Aktivität aller den Photorezeptoren nachgeschalteter Neuronen (Pugh und Lamb, 1993). Die Abwesenheit funktionaler Zapfen-Photorezeptoren, wie beispielsweise

in der *pde6c*-Zebrafischmutante, ist durch eine fehlende ERG-Antwort gekennzeichnet (Brockerhoff et al., 2003; Stearns et al., 2007).

Die ERG-Messung (siehe Abschnitt 3.6.7) ergab eine Verminderung der b-Wellenamplitude von durchschnittlich 33,5 % bei allen gemessenen Lichtintensitäten (vgl. Abb. 37). Dies entspricht Beobachtungen andere Studien: Zebrafischmodelle mit Mutationen in *eys* oder *c2orf71a*, bei denen im Alter von 5 dpf morphologische sowie quantitative Veränderungen der Zellen im ONL beobachtet wurden, zeigten ebenfalls verminderte b-Wellenamplituden (Corral-Serrano et al., 2018; Messchaert et al., 2018). Beide Gene sind mit der autosomal rezessiven Form der Retinitis Pigmentosa assoziiert (Collin et al., 2010; Littink et al., 2010; Gerth-Kahlert et al., 2017; McGuigan et al., 2017). Für *c2orf71a* konnte gezeigt werden, dass es im Zebrafisch an der Modulation der Cilien-Membran und damit vermutlich an der Entstehung der Disks im Photorezeptor-Außensegment beteiligt ist (Corral-Serrano et al., 2018).

Die Daten der immunhistologischen und funktionellen Charakterisierung des *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodells weisen darauf hin, dass in der Retina *atf6*-defizienter Zebrafischlarven eine Entwicklungsverzögerung vorliegt: Im Alter von 15 dpf entsprachen die Zellzahlen der *atf6*-defizienten Retina der von WT-Tieren. Im Gegensatz dazu, waren im Alter von 3 dpf und 5 dpf die Zahlen der Zapfen-Photorezeptoren, Bipolar- und Ganglienzellen reduziert. Die bei den *atf6*<sup>-/-</sup>-Larven gemessenen reduzierten b-Wellenamplituden verifizierten die immunhistologischen Beobachtungen in diesen Altersstadien. Die reduzierten Zellzahlen in der *atf6*-defizienten Retina waren dabei jedoch nicht auf eine erhöhte Zelltodrate zurückzuführen. Auch in anderen *knockout*-Zebrafischmodellen wurde eine initial reduzierte Zahl retinaler Zellen mit anschließender Regenerierung bereits als Entwicklungsverzögerung gedeutet (Zhang et al., 2013).

### **5.5.2. Expression unterschiedlicher UPR-Signalwegskomponenten in der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischretina**

Da ATF6 eine Schlüsselkomponente der UPR darstellt, wurde mittels qRT-PCR-Experimenten (siehe Abschnitt 3.3.11.2) untersucht, ob sich der Verlust von *atf6* auf die Expression anderer UPR-Komponenten auswirkt. Die Ergebnisse weisen entgegen ersten Erwartungen auf keinen erhöhten ER-Stress in *atf6*-defizienten im Vergleich zu WT-Larven im Alter von 3 dpf und 5 dpf hin. Die RNA-Level von *atf6* waren in den *atf6*<sup>-/-</sup>-Larven um das 5,4-fache reduziert (siehe Tabelle 38). Im Gegensatz dazu, war die Expression der *atf6*-Zielgene *hspa5*, *pdia3* und *hsp90b1* in den *atf6*<sup>-/-</sup>-Larven im Vergleich zu WT-Tieren unverändert (vgl.

Tabelle 38). Eine verringerte Expression von *hspa5* und *hsp90b1* konnte erst in der adulten *atf6*-defizienten Retina beobachtet werden (vgl. Tabelle 38). Dass der Verlust von Atf6 die basale Expression von *Bip* sowie anderer UPR-Komponenten nicht beeinflusst, konnte bereits im Zellkultursystem an *Atf6*-defizienten MEFs beobachtet werden (Wu et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Studie würden somit die Erkenntnisse aus den qRT-PCR- Experimenten der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafische stützen. Umgekehrt konnten mehrere unabhängige Studien in unterschiedlichen Tiermodellen jedoch bereits zeigen, dass *atf6* die Expression von *hspa5* reguliert und induziert, bzw. dass der Verlust von *atf6* zu einer reduzierten *hspa5*-Expression führt (Adachi et al., 2008; Ishikawa et al., 2013), was wiederum im Gegensatz zu den hier erzielten Ergebnissen steht.

Die Expression der pro-apoptotischen PERK-Signalwegkomponenten *eif2ak3* (Perk) und *ddit3* (Chop) blieb im Zebrafisch durch den Verlust von *atf6* unverändert (vgl. Tabelle 38). Dies steht im Gegensatz zu Studien, die sowohl in MEFs als auch im heterologen Expressionssystem zeigen konnten, dass *ddit3* durch Atf6 reguliert wird (Ma et al., 2002; Okada et al., 2002; Adachi et al., 2008). Dass der Verlust von *atf6* den PERK-Signalweg nicht beeinflusst, untermauert jedoch die Ergebnisse der Immunhistologie, dass die reduzierte Zellzahl in *atf6*-defizienten Retinae nicht auf einer erhöhten Zelltodrate basiert.

Da dem Verlust von *atf6* ebenso kein Anstieg in der Expression der IRE1-Signalwegskomponenten folgte, deuten die qRT-PCR-Daten dieser Arbeit darauf hin, dass in den retinalen Zellen der *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafische keine kompensatorischen Mechanismen oder Überschneidungen zwischen den einzelnen UPR-Signalwegen, wie es bereits in anderen Studien beschrieben wurde (Hetz und Papa, 2018), vorzuliegen scheinen. Die Daten lassen eher vermuten, dass der Verlust von *atf6* nicht in erhöhtem ER-Stress resultierte und die Expression von *hspa5*, *hsp90b1* und *pdia3* im Larvalstadium vermutlich nicht ausschließlich über den ATF6-Signalweg gesteuert wird.

### 5.5.3. Die Rolle von *atf6β*

ATF6β ist ebenso wie ATF6 ein membranständiges ER-Protein, das als Reaktion auf vorherrschenden ER-Stress aktiviert und gespalten wird (Haze et al., 2001). Die N-terminalen Abschnitte beider Proteine enthalten eine hochkonservierte bZIP-Domäne, unterscheiden sich aber maßgeblich in ihrer Transaktivierungsdomäne, wodurch die transkriptionelle Aktivität von ATF6β gegenüber ATF6 reduziert ist (Thuerauf et al., 2007). In mehreren unabhängigen Studien wurde mittels heterologer Expressionssysteme gezeigt, dass im Menschen ATF6β

gegenüber ATF6 einen schwächeren Transkriptionsaktivator unterschiedlicher ERSE-Gene darstellt, seine Halbwertszeit dafür aber über der von ATF6 liegt (Yoshida et al., 1998; Thuerauf et al., 2004; Thuerauf et al., 2007). Untersuchungen im heterologen Expressionssystem zur Aufklärung Paralog-spezifischer Charakteristiken ließen auf eine mögliche inhibitorische Rolle von ATF6 $\beta$  in Bezug auf ATF6 schließen. Es zeigte sich, dass ATF6 $\beta$  die Bindung von ATF6 an die DNA, insbesondere an den *BIP/HSPA5*-Promotor, verhindern kann. Umgekehrt führte ein siRNA-vermittelter *knockdown* von *ATF6 $\beta$*  zu einer verstärkten Aktivität des *BIP/HSPA5*-Promotors sowie zu einer erhöhten *BIP*-Expression (Thuerauf et al., 2007). Diese wie auch weitere unabhängige Experimente in einem Mausmodell zur ER-Stress-assoziierten metaphysealen Chondrodysplasie deuten auf eine mögliche regulatorische Funktion ATF6 $\beta$ s auf ATF6 während der ER-Stress-Antwort hin (Forouhan et al., 2018). Die Hinweise verstärken sich jedoch, dass ATF6 und ATF6 $\beta$  in ihrer Funktion teilweise überlappen und sich daher zum Teil kompensieren können. Die Generierung unterschiedlicher *knockout*-Tiermodelle in der Maus oder dem Medaka zeigten, dass der Einzel-*knockout* von *Atf6/atf6* oder *Atf6 $\beta$ /atf6 $\beta$*  keinen Einfluss auf die lebenserhaltenden Funktionen und die Embryonalentwicklung ausübt. Erfolgt jedoch ein Doppel-*knockout* beider Transkriptionsfaktoren ist dieser sowohl in der Maus als auch im Fisch embryonal letal (Wu et al., 2007; Yamamoto et al., 2007; Ishikawa et al., 2013). Dass ATF6 und ATF6 $\beta$  eine ähnliche Gruppe an Genen regulieren, konnte unter anderem in Zellkulturexperimenten in INS-1 Insulinomazellen gezeigt werden. Mittels Micro-Array-Analysen konnten hier unterschiedliche UPR-Gene wie beispielsweise *DDIT3* oder *EDEM1*, detektiert werden, die sowohl von ATF6 als auch von ATF6 $\beta$  reguliert wurden (Odisho et al., 2015). Auch die Tatsache, dass eine weiterhin erhöhte Expression von *Bip* in *Atf6*-defizienten MEFs nach Induktion von ER-Stress detektiert werden konnte, spricht dafür, dass ATF6 hier nicht den alleinigen Transkriptionsaktivator bildet (Wu et al., 2007). Ebenso zeigten *in vivo*-Experimente, dass *Atf6 $\beta$*  die Rolle von *Atf6* offenbar anteilig übernehmen kann. Ishikawa und Kollegen konnten mittels *atf6*-defizienter Medakalaven zeigen, dass trotz des Verlusts von *atf6 hspa5* weiterhin exprimiert wird, auch wenn dessen Expression in triallelischen *atf6<sup>-/-</sup>;atf6 $\beta$ <sup>+/-</sup>*-Larven deutlich schwächer als in triallelischen *atf6<sup>+/-</sup>;atf6 $\beta$ <sup>-/-</sup>*-Larven ausfiel. In Kombination mit neusten Untersuchungen in einem Mausmodell für kardiale Erkrankungen, in dem gezeigt werden konnte, dass *Atf6* und *Atf6 $\beta$*  in gleichem Maße wichtig für die Expression UPR-assoziiierter Gene im Mausherz sind (Correll et al., 2019), deuten diese Daten darauf hin, dass die beiden Transkriptionsfaktoren ATF6 und ATF6 $\beta$  einen kompensatorischen Mechanismus ausbilden können.

Die Expression von *atf6 $\beta$*  wurde in dieser Arbeit mittels *whole mount* ISH (siehe Abschnitt 3.7.3) und qRT-PCR-Experimenten (siehe Abschnitt 3.3.11.2) untersucht. *Atf6 $\beta$*  liegt ebenfalls einzeln und nicht in duplizierter Form im Zebrafischgenom vor. Die Analyse mittels ISH erwies sich aufgrund von Unspezifität der verwendeten Ribosonde als schwierig (vgl. Abb. 38 und Abb. 39). Dennoch konnte in den Amakrin- sowie den Ganglienzellen 3 dpf alter WT-Larven *atf6 $\beta$*  detektiert werden (vgl. Abb. 38B). Die qRT-PCR-Experimente zeigten eine erhöhte *atf6 $\beta$* -Expression im Alter von 3 dpf und 5 dpf. In der adulten Retina waren hingegen keine Veränderungen in der *atf6 $\beta$* -Expression mehr zu beobachten (vgl. Tabelle 38). Vergleicht man die in den qRT-PCR beobachteten und die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse, so könnte die erhöhte *atf6 $\beta$* -Expression die unveränderte Expression des *atf6*-Zielgens *hspa5* im Alter von 3 dpf und 5 dpf erklären. Gestützt wird diese Beobachtung anhand der qRT-PCR Daten der adulten Tiere. Hier ist die retinale Expression von *atf6 $\beta$*  in wildtypischen und *atf6<sup>-/-</sup>*-Zebrafischen vergleichbar, jedoch die *hspa5*-Expression in den *knockout*-Tieren reduziert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ähnlich wie im Medaka, auch im Zebrafisch *atf6 $\beta$*  die Funktion von *atf6* in frühen Entwicklungsstadien zumindest zum Teil kompensieren kann (Abb. 45). Dies könnte auch der Grund für die unveränderte Expression von *hsp90b1*, *pdia3* und *ddit3* sein.

Dass die *edem1*-Expression trotz verminderter *ern1*-Expression nur minimal abnahm, könnte vermutlich ebenso auf eine Induktion durch *atf6 $\beta$*  zurückgeführt werden. Dass *atf6*-defiziente Larven dennoch einen schwachen retinalen Phänotyp aufweisen, ließe sich weiterhin mit einer schwächeren transkriptionellen Aktivität von *atf6 $\beta$*  gegenüber *atf6* erklären (Abb. 45). Um diese Hypothese jedoch zu bestätigen, wären weitere Experimente, die einen zusätzlichen *knockout* von *atf6 $\beta$*  beinhalten notwendig. Hier wäre sowohl ein Morpholino-vermittelter *knockdown* von *atf6 $\beta$*  oder auch ein kompletter *knockout* von *atf6 $\beta$*  unter Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems in *atf6*-defizienten Zebrafischen denkbar. Wäre die Hypothese, dass *atf6 $\beta$*  die Rolle von *atf6* auch im Zebrafisch anteilig übernehmen kann korrekt, so würde man erwarten, dass der Doppel-*knockout* von *atf6* und *atf6 $\beta$*  hier ebenso zu einem embryonal letalen Phänotyp oder zumindest zu einem verstärkten retinalen Phänotyp oder systemischen Phänotyp führt.

#### 5.5.4. Der Einfluss von pharmakologisch induziertem ER-Stress auf den retinalen Phänotyp in der *atf6*-defizienten Zebrafischlarve

Dass die UPR nicht nur während der Entwicklung oder aufgrund anderer intrinsischer ER-Stress-Auslöser aktiviert werden kann, ist weitreichend bekannt. Ob die pharmakologische Induktion der UPR, d.h. zusätzlicher pharmakologisch induzierter ER-Stress, den retinalen Phänotyp in *atf6*-defizienten Larven jedoch verstärkt bzw. wie induzierter ER-Stress die Retina von WT-Larven beeinflusst, wurde bislang nicht untersucht.

qRT-PCR Experimente, in denen untersucht werden sollte, ob eine Behandlung mit 1 µg/ml Tunicamycin für 48 h die Aktivierung der UPR in 5 dpf alten Zebrafischlarven induziert, zeigten eine erhöhte Expression aller getesteten Gene (*hspa5*, *edem1* und *chop*) im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontroll-Larven in beiden Linien (vgl. Tabelle 39). Da jedes der untersuchten Gene ein Zielgen eines der drei UPR-Signalwege darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass die Behandlung mit Tunicamycin zur Aktivierung aller und nicht nur zur selektiven Aktivierung einzelner UPR-Signalwege führte. Die Tunicamycin-induzierte Expression von *edem1* und *hspa5* war in *atf6*-defizienten Larven um etwa das 2- bzw. 4-fache geringer als bei wildtypischen Larven (vgl. Tabelle 39). Dies deutet darauf hin, dass sich der Verlust von *atf6* bei anhaltender pharmakologischer ER-Stress-Induktion, negativ sowohl auf die Induktion seines Zielgens *hspa5* als auch auf die Expression von *edem1* auswirkt. Die Expression der PERK-Signalweg-Komponente *chop* war nach Tunicamycin-Behandlung in beiden Linien vergleichbar (vgl. Tabelle 39). Aus der Studie von Ishikawa und Kollegen ist bekannt, dass Atf6 $\beta$  lediglich während intrinsischem ER-Stress, nicht aber bei pharmakologisch induziertem ER-Stress, den Verlust von Atf6 anteilig kompensieren kann (Ishikawa et al., 2013). Dies stützt die Beobachtung, dass in unbehandelten *atf6*-defizienten Larven keine Veränderung in der *hspa5*-Expression beobachtet werden konnte, dessen Expression nach Behandlung mit Tunicamycin jedoch im Vergleich zu behandelten wildtypischen Larven verringert war. Dass der Verlust von Atf6 zu einer verminderten UPR-Aktivierung nach pharmakologischer ER-Stress-Induktion führt, konnte mittels Micro-Array- und Northern-Blot-Analysen ebenfalls schon in *Atf6*-defizienten MEFs gezeigt werden. Hier konnten in mit Tunicamycin- bzw. Thapsigargin-behandelten MEFs ebenso eine bis zu 2-fach reduzierte *Bip*-Expression sowie eine verringerte *Edem1*-Expression festgestellt werden (Yamamoto et al., 2007; Adachi et al., 2008). Im Gegensatz zum Zebrafisch konnte in MEFs jedoch gezeigt werden, dass auch *Chop/Ddit3* von ATF6 reguliert wird (Adachi et al., 2008). Dass die von ATF6/Atf6 regulierten Gene zwischen Maus und Fisch nicht identisch sind, wurde bereits postuliert. Hierzu gehören beispielsweise verschiedene ER-Chaperone oder *ero1 $\beta$*  (Ishikawa

et al., 2013). Die Tatsache, dass die Expression von *ddit3* durch den Verlust von Atf6 sowohl mit als auch ohne pharmakologische ER-Stress-Induktion unbeeinflusst blieb, deutet daher darauf hin, dass auch *ddit3* im Zebrafisch, anders als in der Maus (Adachi et al., 2008), kein Zielgen von Atf6 darstellt.

Mittels der qRT-PCR-Experimente konnte einerseits gezeigt werden, dass in beiden Zebrafisch-Linien die Induktion der UPR unter Verwendung von Tunicamycin erfolgreich war. Gleichzeitig zeigte sich aber auch, dass die Aktivierung der UPR in *atf6*-defizienten Larven im Vergleich zu WT-Larven weniger ausgeprägt war (vgl. Tabelle 39), was auf eine auf dem Verlust von *atf6*-basierende geschwächte UPR in diesen Larven hindeutet. Daher lag die Vermutung nahe, dass zusätzlicher pharmakologisch induzierter ER-Stress den retinalen Phänotyp, der in *atf6*-defizienten Larven bereits unter vorliegendem intrinsischem ER-Stress beobachtet wurde, weiter verstärken könnte. Diese Hypothese konnte anhand der immunhistologischen Untersuchungen, mit Ausnahme der Bipolarzellen, nicht bestätigt werden. Stattdessen wurden hauptsächlich Veränderungen in der Retina von wildtypischen Larven durch die Behandlung mit Tunicamycin detektiert. Im Alter von 3 dpf sank hier die Zahl der Grünzapfen nach der Behandlung mit Tunicamycin (siehe Abb. 40D). Im Alter von 5 dpf wurde nach pharmakologischer ER-Stress-Induktion eine erhöhte Zahl Ganglienzellen und Caspase-3-positiver Zellen detektiert (siehe Abb. 42C und Abb.43D). Lediglich in den Bipolarzellen führte die Behandlung mit Tunicamycin im Alter von 5 dpf zu verringerten Zellzahlen in *atf6*-defizienten Larven sowohl im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontroll-Larven als auch zu Tunicamycin-behandelten wildtypischen Larven (vgl. Abb. 41B). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Bipolarzellen in diesem Alter gegenüber anhaltendem ER-Stress anfälliger zu sein scheinen als andere Zelltypen. Bipolarzellen weisen ab einem Alter von 3 dpf ein höchst dynamisches Entwicklungsmuster auf, wobei sie am Ende ihres Axons ständig neue Filopodia ausbilden. Diese werden im Laufe der Entwicklung immer wieder verlängert oder verkürzt und wie eine Art „Fühler“ verwendet, mit der die Bipolarzelle ihre Umgebung untersucht. Ab 7 dpf verlieren die Bipolarzellen ihre Filopodien und entwickeln bis zu einem Alter von 14 dpf definierte präsynaptische Endigungen (Connaughton, 2010). Dieser lange und dynamische Entwicklungsverlauf könnte einen möglichen Grund darstellen, warum Bipolarzellen besonders anfällig gegenüber vermehrtem ER-Stress während der Entwicklung der Zebrafischretina sind.

Auffällig war ebenfalls, dass trotz zusätzlichem pharmakologisch induziertem ER-Stress, die Zahl von TUNEL- und Caspase-3-positiver Zellen in der Retina von wildtypischen und *atf6*-defizienten sowohl im Alter von 3 dpf als auch 5 dpf vergleichbar war (siehe Abb. 43C,D).

Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen der qRT-PCR, bei denen keine Veränderungen in der Induktion des pro-apoptotischen PERK-Signalweges bzw. dessen Zielgens *ddit3* zwischen beiden Zebrafischlinien festgestellt werden konnten (vgl. Tabelle 39). Ist der ER-Stress für die Zelle zu hoch, wird die Expression anti-apoptotischer Gene mittels des PERK-Signalweges inhibiert und die Expression pro-apoptotischer Gene, wie beispielsweise Gene der *Bcl2*-Familie induziert (Hetz und Papa, 2018). Die Behandlung mit Tunicamycin resultierte zwar in keinem Unterschied in der Gesamtzahl Caspase-3- und TUNEL-positiver Zellen zwischen beiden Linien, jedoch konnte ein deutlicher Anstieg in der Zelltodrate nach der Tunicamycin-Behandlung in beiden Linien detektiert werden (vgl. Abb. 43A,C,D). Zudem war auffällig, dass die Zahl der mit dem TUNEL-Assay detektierten Zellen die der Caspase3-markierten weit überstieg. Verschiedene unabhängige Studien konnten zeigen, dass Tunicamycin die Caspase-3 aktivieren und damit zur Apoptose, dem am häufigsten mit ER-Stress in Verbindung gebrachten Zelltod, führen kann (Oda et al., 2008; Shen et al., 2014; Abhari et al., 2019). Die Behandlung mit diesem ER-Stress-Induktor kann jedoch ebenso in einem Nekrose-artigem Zelltod oder in Nekroptose resultieren (Ullmann et al., 2008; Saveljeva et al., 2015; Iurlaro und Munoz-Pinedo, 2015). Dass Tunicamycin neben der Apoptose noch weitere Zelltodarten induziert, würde die erhöhte Zahl der TUNEL-positiven Zellen gegenüber der der aktiven Caspase-3-positiven Zellen erklären. Während mithilfe der Caspase-3-Färbung nur apoptotische Zellen detektiert werden können, ist es mittels des TUNEL-Assays möglich, alle sterbenden Zellen zu detektieren. Die Untersuchungen des *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodels deuten darauf hin, dass der durch Tunicamycin-induzierte Zelltod nur zu einem geringen Teil durch die Caspase-3 vermittelte Apoptose hervorgerufen wurde.

Trotz des Tunicamycin-bedingten Anstiegs in der Zelltodrate wurden weder in der wildtypischen noch in der *atf6*-defizienten Retina im Alter von 5 dpf erhöhte Raten an proliferierenden (PCNA-positiven) Zellen beobachtet (vgl. Abb. 43E). Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass die Zebrafischretina auch im Alter von 5 dpf ein gewisses Regenerationspotential besitzt (Fraser et al., 2013; Hagerman et al., 2016). Nach pharmakologischer Ablation der Blau- und/oder UV-Zapfen konnte hier eine erhöhte Proliferationsrate als auch die Entstehung neuer Zapfen-Photorezeptoren beobachtet werden (Fraser et al., 2013; Hagerman et al., 2016). Da die Möglichkeit der Regeneration in der 5 dpf alten Zebrafischretina besteht, kann nicht abschließend geklärt werden, warum die Behandlung mit Tunicamycin ausschließlich in einer Steigerung der Zelltodrate, jedoch nicht in einer gesteigerten Proliferationsrate resultiert.

Da die Behandlung mit Tunicamycin nicht wie vermutet zu einem alle retinalen Schichten betreffenden Phänotyp in *atf6*-defizienten Larven führte, stellt sich die Frage, ob die gewählte

Behandlungsdauer und Konzentration für die durchgeführten Untersuchungen geeignet waren, bzw. ob Tunicamycin selbst einen für die Fragestellung passenden ER-Stress-Induktor darstellt. Die Entscheidung Tunicamycin als ER-Stress-Induktor in dieser Arbeit einzusetzen basiert auf den Ergebnissen verschiedenster unabhängiger Studien, in denen die UPR im Zebrafisch mittels Tunicamycin erfolgreich induziert wurde (Chen et al., 2012; Li et al., 2015; Ogino et al., 2015). In Bezug auf die Behandlungsdauer und Konzentration des Tunicamycins zeigten Vorexperimente unter Verwendung RT-PCR-basierter Analysen (Daten nicht aufgeführt), dass eine Behandlungsdauer von 48 h mit einer Konzentration von 1 µg/ml die UPR in Zebrafischlarven am effizientesten aktiviert. Unterstützt wurde diese Entscheidung durch unterschiedlichste Studien, in denen die UPR in der Zebrafischlarve ebenfalls mit 1 µg/ml Tunicamycin und einer Behandlungsdauer zwischen 24 h und 48 h induziert wurde (Howarth et al., 2013; Chen et al., 2014; Li et al., 2015). Teilweise wurden auch höhere Tunicamycin-Konzentrationen von bis zu 3 µg/ml angewendet (Chen et al., 2012), die in dieser Arbeit jedoch zum Sterben der Larven führten (Daten nicht aufgeführt). Insgesamt muss man jedoch in Abhängigkeit des Experimentes festlegen, wie lange und mit welcher Konzentration die Tunicamycin-Behandlung erfolgen soll. Die erfolgreiche Aktivierung der UPR mittels Tunicamycin in dieser Arbeit zeigt, dass die gewählten Parameter grundsätzlich geeignet waren. Ob eine Steigerung der Tunicamycin-Konzentration zu einem verstärkten retinalen Phänotyp in *atf6*-defizienten Zebrafischlarven geführt hätte, ist schwer einzuschätzen, da eine erhöhte Konzentration, wie unsere Vorexperimente zeigten, ebenso mit einer kürzeren Behandlungsdauer einhergehen hätte müssen, um das Überleben der Larven zu sichern. Ob eine höhere Tunicamycin-Konzentrationen über kurze Dauer den Phänotyp gegenüber einer längeren Behandlungsdauer mit geringerer Konzentration verstärken würde, müsste in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Da Thapsigargin offenbar nur zu einer sehr geringen Induktion der UPR in der Zebrafischlarve (Lee et al., 2011) bzw. nicht zur Induktion ER-Stress-basierter Phänotypen führt (Ishikawa et al., 2013), wurde Thapsigargin als möglicher ER-Stress-Induktor in dieser Arbeit nicht in Betracht gezogen. Generell sollte jedoch berücksichtigt werden, dass unterschiedliche ER-Stress-induzierende Stimuli zum Teil gewebs- oder organspezifische Effekte aufweisen können (Lee et al., 2011; Chen et al., 2014).

## 5.6. Die Eignung des Zebrafisches als Tiermodell der *ATF6*-assozierten ACHM

Da sich zwei zuvor untersuchte *Atf6*<sup>-/-</sup>-Mauslinien nicht als geeignete Modelle zur Aufklärung der *ATF6*-assozierten ACHM erwiesen, wurde in dieser Arbeit ein *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodell generiert, um der Fragestellung des Pathomechanismus der *ATF6*-assozierten ACHM nachzugehen. Da die Retina des Zebrafisches reich an Zapfen ist, ist dieser ein häufig genutztes Tiermodell für zapfenbasierte Erkrankungen.

Vergleicht man den Phänotyp der Patienten mit den retinalen Veränderungen in der Zebrafisch- als auch in der Maus-Retina, so lassen sich Unterschiede in der Ausprägung als auch in der Art der betroffenen Zellen erkennen. In der humanen Retina sind durch den Verlust von *ATF6* ausschließlich kongenitale Veränderungen der Zapfen-Photorezeptoren zu beobachten. Der zapfenreichste Bereich in der humanen Retina ist die *Fovea centralis*. Mittels *adaptive optics split detection* und OCT konnte bei Patienten mit einer *ATF6*-assozierten ACHM der vollständige Verlust bzw. das vollständige Fehlen aller Photorezeptoren in der Fovea als auch in parafovealen Regionen sowie eine foveale Hypoplasie beobachtet werden (Kohl et al., 2015; Mastey et al., Arvo Abstract Nr. 669-C0227, 2018). Auch im ERG konnte bei Patienten keine Zapfen-Antwort mehr detektiert werden (Tabelle 40).

Betrachtet man die Retina des *atf6*-defizienten Zebrafisches so sind hier ebenfalls schon früh in der Entwicklung auftretende Veränderungen in der Zahl der Zapfen-Photorezeptoren zu erkennen. Im Gegensatz zur humanen Retina weist der Zebrafisch jedoch verminderte Zellzahlen in allen retinalen Schichten und nicht nur in Bezug auf die Zapfen-Photorezeptoren auf. Außerdem sind die verbleibenden Zapfen-Photorezeptoren hier im Vergleich zum Patienten noch funktionstüchtig, was aufgrund einer zwar verminderten aber detektierbaren b-Wellenamplitude im ERG gezeigt werden konnte. Einen weiteren Unterschied zum humanen Phänotyp stellt die Verlaufsform im Zebrafisch dar. Während im Patienten kongenitale und permanente retinale Defekte detektiert wurden, war der Phänotyp der *atf6*-defizienten Zebrafischretina lediglich auf die frühen Larvalstadien beschränkt. In 15 dpf alten Larven sowie im adulten Fisch wurden keine retinalen Veränderungen mehr detektiert (Tabelle 40).

**Tabelle 40: Vergleich der durch Verlust von *ATF6* induzierten retinalen Phänotypen zwischen ACHM-Patienten und verschiedenen Tiermodellen**

	Mensch	Zebrafisch	Maus	
<b>Zielgerichtete Mutation in <i>ATF6/atf6/Atf6</i></b>	Verschiedene missense, nonsense und frame-shift Mutationen	c.519delG; p.(V174Cfs*42)	Deletion von Exon 4	Deletion von Exon 8 und 9
<b>Phänotyp</b>	ACHM	Transiente retinale Entwicklungsverzögerung	Altersabhängige Stäbchen-Zapfendysfunktion	Altersabhängige Stäbchen-Zapfendysfunktion
<b>Strukturelle retinale Veränderungen</b>	Foveale Hypoplasie; Verlust der Fovea; Verlust oder Fehlen von Zapfen-Photorezeptoren; Bereiche mit erhöhter bzw. verminderter Autofluoreszenz deuten auf Degeneration hin	Transiente Reduktion der Anzahl an Rot- und Grünzapfen, PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen sowie Ganglienzellen während der okularen Frühentwicklung	Altersabhängige globuläre epi- und subretinale Ablagerungen; späte, altersabhängige progressive Degeneration der Photorezeptorschicht sowie des RPEs	Altersabhängige globuläre epi- und subretinale Ablagerungen; späte, altersabhängige progressive Degeneration der Photorezeptorschicht sowie des RPEs
<b>Funktionelle retinale Veränderungen (Ganzfeld-ERG)</b>	Skotopisch: keine Einschränkungen; Photopisch: nicht zu detektierende Amplituden	Skotopisch: n.d. Photopisch: Verminderte b-Wellenamplitude in 5 dpf alten Zebrafischlarven	Skotopisch und Photopisch: beginnende leichte Altersabhängige progressive Reduktion der b-Wellenamplitude	Skotopisch und Photopisch: beginnende leichte Altersabhängige progressive Reduktion der b-Wellenamplitude
<b>Referenz</b>	Ansar et al., 2015; Kohl et al., 2015; Skorczyk-Werner et al., 2017	Ergebnisse dieser Arbeit	Kohl et al., 2015	unveröffentlichte Daten

n.d.: nicht durchgeführt

Auffällig ist jedoch, dass sowohl im Zebrafisch als auch in Patienten Mutationen in *ATF6* Entwicklungsdefekte, im Fisch in der gesamten Retina und im Patienten in der *Fovea centralis*, verursachen. Die in dieser Arbeit generierten Daten unterstützen damit die Annahme, dass der ATF6-Signalweg an der Entwicklung retinaler Zellen beteiligt ist. Im Menschen scheinen hierbei insbesondere die Zapfen-Photorezeptoren auf den ATF6-Signalweg angewiesen zu sein. Die Maus besitzt im Gegensatz zum Menschen keine *Fovea centralis* (Hubermann und Niell, 2011) und ähnelt bezüglich ihrer Zapfendichte eher der peripheren als der zentralen Primatenretina. Die Zapfendichte der Mausretina pro mm<sup>2</sup> entspricht der Zapfendichte, die in der Primatenretina etwa 3 mm außerhalb der *Fovea centralis* vorliegt (Jeon et al., 1998). Vergleichbar mit der humanen Retina, aber im Gegensatz zur Zebrafischretina, wird die Mausretina von Stäbchen-Photorezeptoren dominiert. Nur etwa 3 % der Photorezeptoren der Mausretina sind Zapfen-Photorezeptoren (Hubermann und Niell, 2011).

Vergleicht man den humanen *ATF6*-basierten Phänotyp mit dem der beiden untersuchten *Atf6*-defizienten Mausmodelle sind gravierende Unterschiede zu erkennen. Betrachtet man das Mausmodell von Wu und Kollegen, so zeigte sich ein altersabhängiger progressiver degenerativer Phänotyp, der sowohl Zapfen- als auch Stäbchen-Photorezeptoren gleichermaßen betraf (Kohl et al., 2015; Tabelle 40). In beiden Mausmodellen wurden zudem erhebliche epir- wie subretinale Ablagerungen detektiert. Die Ergebnisse lassen jedoch nicht darauf schließen, warum die Maus im Vergleich zum Patienten einen mit fortschreitendem Alter zunehmenden Phänotyp zeigt. Man könnte jedoch vermuten, dass die degenerativen Veränderungen in der *atf6*-defizienten Maus von Wu und Kollegen im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Mäusen auf eine auf dem Verlust von *Atf6*-basierenden erhöhten Anfälligkeit gegenüber ER-Stress zurückgeführt werden können. Warum in der Maus sowohl Zapfen- als auch Stäbchen-Photorezeptoren von der Degeneration betroffen sind, bleibt weiter unklar.

Insgesamt untermauern die in dieser Arbeit generierten Daten die Vermutung, dass *ATF6* an der Entwicklung retinaler Zellen beteiligt ist. Das generierte Zebrafischmodell rekapituliert jedoch ebenso wenig wie die zuvor untersuchten Mausmodelle den humanen Phänotyp der *ATF6*-assoziierten ACHM und eignet sich daher ebenfalls nicht als Tiermodell zur Aufklärung des Pathomechanismus der *ATF6*-assoziierten ACHM. Dass die Charakterisierung dreier Tiermodelle lediglich Hinweise auf die Rolle von *ATF6* in der retinalen Entwicklung ergab, lässt vermuten, dass *ATF6* eine spezielle und einzigartige Rolle in der Entwicklung der Primatenretina übernimmt, die mittels der bisher verfügbaren Tiermodelle nicht aufgeklärt werden kann. Ob *ATF6* selbst oder wie im Medaka (Ishikawa et al., 2013) und vermutlich auch im Zebrafisch dessen Zielgen *hspa5* die entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung spielt, ist ebenfalls unklar. Hierzu wären weitere Untersuchungen an Modellen, die der humanen Retina ähnlicher sind, notwendig.

Dass *ATF6* bei der Differenzierung humaner Zellen eine besondere Stellung einnimmt, konnte bereits an hESCs und iPSCs gezeigt werden (Kroeger et al., 2018). *ATF6* fördert die mesodermale Differenzierung von hESCs und unterdrückt gleichzeitig die Bereitschaft zur Pluripotenz. iPSCs, die aus Patienten-Fibroblasten mit einer Missense-Mutation in *ATF6* (p.R324C) generiert worden sind, behielten hingegen ihre pluripotenten Eigenschaften und zeigten ein vermindertes Differenzierungsverhalten (Kroeger et al., 2018). Neuste Forschungsergebnisse aus *ATF6*-ACHM Patienten-Fibroblastenzell-Linien gewonnen iPSCs, welche anschließend zu retinalen Organoiden differenziert wurden, legen nahe, dass diese keine Zapfen-Photorezeptoren entwickeln (Kroeger et al. 2019, Arvo Abstract Nr. 4762). Dies deutet auf eine fundamental andere wichtige Bedeutung von *ATF6* für die Entwicklung der

Zapfen-Photorezeptoren und der Fovea im menschlichen Auge hin. Wahrscheinlich wird sich dieser Zusammenhang jedoch nur an Primaten-Augen bzw. Retinae untersuchen lassen, welche eine wirklich vergleichbare Anatomie der Retina aufweisen. Solche Tierexperimente sind jedoch aus ethischer und tierversuchrechtlicher Sicht schwierig zu realisieren.

## 6. Zusammenfassung

Mutationen im *ATF6*-Gen verursachen autosomal rezessive Achromatopsie beim Menschen. Alle bisher mit Achromatopsie assoziierten Gene kodieren für funktionelle Bestandteile der Phototransduktionskaskade im Zapfen-Photorezeptor. Im Gegensatz dazu besitzt ATF6 keine spezifische oder exklusive Funktion in der Phototransduktion. *ATF6* kodiert für den ubiquitär exprimierten Aktivierenden Transkriptionsfaktor 6, der eine bekannte Schlüsselfunktion bei der Regulation der UPR und der zellulären Homöostase des ERs spielt. Warum *ATF6* als ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor in seiner mutierten Form ausschließlich zu einem retinalen Phänotyp im Menschen führt, sollte in dieser Arbeit unter Verwendung eines eigens generierten Zebrafischmodells untersucht werden.

Da bislang nicht untersucht wurde, wo *atf6* in der Retina exprimiert wird, wurden ISH-Experimente zur Lokalisation von *atf6* in der Zebrafischlarve durchgeführt. *atf6* konnte in sich in der Entwicklung befindenden Photorezeptoren, in Amakrinzellen und in Zellen der peripheren, der CMZ zugewandten Bereichen der Ganglienzellschicht sowie der CMZ in der larvalen Zebrafischretina lokalisiert werden. Vergleicht man im Alter von 3 dpf die Lokalisation der Expression von *atf6* mit der der *atf6* Zielgene *hspa5* und *hspa90b1* sowie von *atf6β*, zeigten sich teilweise überlappende Expressionsmuster aller Zielgene. Mittels dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die UPR während der retinalen Entwicklung aktiv und von Bedeutung ist.

Um Informationen über den Pathomechanismus der *ATF6*-assoziierten Achromatopsie zu erhalten, wurde mithilfe der TALEN-Technologie ein *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafischmodell generiert, welches eine Deletion in Exon 6 des *atf6*-Gens (c.519delG;p.V174fs\*42) trägt. In vorherigen *in silico* Analysen wurde zudem sicher gestellt, dass *atf6* nur einmal im gesamten Zebrafischgenom vorliegt und nicht im Zuge der Genom-Duplikation während der Entwicklung der Teleostei dupliziert wurde.

Die Charakterisierung des Fischmodells erfolgte über immunhistologische Färbungen sowie funktionelle Untersuchungen. Die histologische Analyse zeigte eine im frühen Larvenstadium auftretende, durch den Verlust von *atf6* bedingte, retinale Entwicklungsverzögerung, die sich mit fortschreitendem Alter wieder zurückbildete. Die Entwicklungsverzögerung betraf alle Schichten der Retina und äußerte sich in Form einer verminderten Zahl an Zapfen-Photorezeptoren, Bipolarzellen sowie Ganglienzellen. Elektroretinographische Untersuchungen zeigten, dass die visuelle Funktion in *atf6*-defizienten gegenüber wildtypischen Larven eingeschränkt ist. Untersuchungen, die Auskunft über das Proliferationspotential und die Zell-

todrate geben und damit eine mögliche Erklärung für die verminderten Zellzahlen in der *atf6*-defizienten Retina aufzeigen sollten, lieferten keine Hinweise auf ein verändertes Proliferationsverhalten oder eine gesteigerte Zelltodrate in der *atf6*-defizienten Retina. Ob der Verlust von *atf6* in einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber UPR-induzierender Substanzen resultiert und der retinale Phänotyp in *atf6*-defizienten Zebrafischlarven hierdurch intensiviert wird, wurde an mit Tunicamycin-behandelten Zebrafischlarven untersucht. Die histologische Analyse der behandelten wildtypischen und *atf6*-defizienten Larvenretinae zeigte, dass die pharmakologische Induktion der UPR mittels Tunicamycin lediglich einen Einfluss auf die Zahl der Bipolarzellen in der *atf6*-defizienten im Vergleich zur wildtypischen Retina ausübt. Diese waren in der *atf6*-defizienten gegenüber der wildtypischen Retina in ihrer Zahl im Alter von 5 dpf reduziert. Die Zahl der Zapfen-Photorezeptoren als auch die Zahl der Ganglienzellen blieb trotz der Tunicamycin-Behandlung unverändert.

Um zu überprüfen, ob der Verlust von *atf6* die Expression von Zielgenen der UPR, wie *hspa5* und *hsp90b1* aber auch *atf6 $\beta$*  beeinflusst, wurden Expressionsanalysen mittels qRT-PCR-Experimenten im Larvalstadium (3 dpf und 5 dpf) und der adulten Zebrafischretina durchgeführt. Im Alter von 3 dpf und 5 dpf wurden keine Unterschiede in der Expression der *atf6*-Zielgene *hspa5* und *hsp90b1* detektiert. Die Expression von *atf6 $\beta$*  war in den untersuchten Larvalstadien jedoch signifikant erhöht, was auf einen kompensatorischen Mechanismus von *atf6 $\beta$*  bei vorliegendem Verlust von *atf6* während der Entwicklung des Zebrafisches hinweist.

Abschließend ist festzustellen, dass Atf6 eine Rolle in der retinalen Entwicklung spielt, das *atf6*<sup>-/-</sup>-Zebrafisch-Model jedoch leider kein geeignetes Model für die ATF6-assoziierte ACHM beim Menschen darstellt.

## 7. Summary

Mutations in the *ATF6* gene cause achromatopsia in humans, a rare stationary autosomal recessively inherited retinal disorder characterized by the lack of cones photoreceptor function. In contrast to all other known disease causing genes, *ATF6* does not encode for a component of the phototransduction cascade but for the activating transcription factor 6, a ubiquitously expressed transcription factor and key component of the *unfolded protein response* (UPR) responsible for cellular homeostasis and ER function.

So far, the localization of *ATF6* expression in the retina has not been analyzed. To reveal its expression pattern, ISH experiments using riboprobes against *atf6* were performed on zebrafish larvae. In 3 dpf old larvae *atf6* expression localizes in developing photoreceptors, in amacrine cells as well as in the peripheral regions of the ganglion cell layer close to the CMZ and in the CMZ itself. A comparison of the *atf6* expression pattern with those of its downstream targets as well as *atf6 $\beta$*  revealed a partially overlapping expression pattern for all target genes at this developmental age. In conclusion, these data indicate that the UPR is activated during early retinal development in the zebrafish.

To unravel the mechanism of how mutations in this ubiquitously expressed gene result in a sole retinal phenotype, an *atf6*<sup>-/-</sup>-zebrafish model was generated using TALEN-technology and *atf6*<sup>-/-</sup>-zebrafish line was established. The *atf6*<sup>-/-</sup>-zebrafish model carries a 1 bp deletion in exon 6 of the *atf6* gene predicted to result in a severely truncated protein (c.519delG;p.(V174fs\*42) lacking all structural and functional domains of the *atf6* polypeptide. Since the zebrafish genome was duplicated during teleosts development, the presence of just a single *atf6 $\alpha$*  copy was assured using *in silico* analysis tools.

The histological characterization of the *atf6*-deficient retina revealed an *atf6*-dependent delay in the retinal development of young (3 dpf and 5 dpf) larvae in comparison to WT animals at a comparable age. This delay was no longer detectable in more advanced larval stages (15 dpf) as well as in the retinae of adult fish. Notably, the developmental delay affects all retinal layers resulting in reduced numbers of cone photoreceptors, bipolar cells and ganglion cells. The functional assessment of the retina using ERG measurements substantiates the histological results. *atf6*-deficient larvae exhibit a significantly reduced b-wave amplitude. However, investigations of the proliferative potential and the cell death rate could not explain the differences in the retinal cell numbers between WT and *atf6*<sup>-/-</sup>-zebrafish larvae. To further test whether the loss of *atf6* leads to an increased susceptibility to ER stress, zebrafish larvae were treated with the ER stress inducing agent Tunicamycin. The histological analysis of retinae

obtained from Tunicamycin treated larvae revealed that merely the bipolar cells in WT retinae are affected by the Tunicamycin treatment. Here, the number of bipolar cells was significantly reduced at 5 dpf in comparison to *atf6* deficient retinae. However, cones and ganglion cells remained unaffected in both lines. These data suggest that the loss of *atf6* does not deeply increase the vulnerability of retinal cells to ER stress.

To examine whether the loss of *atf6* results in an expressional dysregulation of other *atf6* associated UPR components, qRT-PCR experiments were performed for several downstream targets of *atf6*. The results of the expression analysis displayed no changes in the expression levels of both *atf6* downstream target genes *hspa5* and *hsp90b1* in 3 dpf and 5 dpf old larvae. However, expression of *atf6 $\beta$*  was highly up-regulated at both developmental stages indicating a compensatory mechanism of *atf6 $\beta$*  during larval development in case *atf6* is lost.

In conclusion, *atf6* plays a role in the development of the retina, but the *atf6*<sup>-/-</sup>-zebrafish is not a suitable model for *ATF6*-associated ACHM.

## 8. Literaturverzeichnis

**Aaji C**, Borst P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochem Biophys Acta* 269(2): 192-200

**AAPOS**-American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus. (2015). USA

**Abhari BA**, McCarthy N, Le Berre M, Kilcoyne M, Joshi L, Agostinis P, Fulda S. (2019). Smac mimetic suppresses tunicamycin-induced apoptosis via resolution of ER stress. *Cell Death Dis* 10(3):155

**Aboshiha J**, Luong V, Cowing J, Dubis AM, Bainbridge JW, Ali RR, Webster AR, Moore AT, Fitzke FW, Michaelides M. (2014). Dark-adaptation functions in molecularly confirmed achromatopsia and the implications for assessment in retinal therapy trials. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:3864-71

**Adachi Y**, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. (2008). ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct* 33(1): 75-89

**Aligianis IA**, Forshew T, Johnson S, Michealides M, Johnson CA, Trembath RC, Hunt DM, Moore AT, Maher ER. (2002). Mapping of a novel locus for achromatopsia (ACHM4) to 1p and identification of a germline mutation in the alpha subunit of cone transducin (GNAT2). *J Med Genet* 39:656-60

**Allison WT**, Barthel LK, Skebo KM, Takechi M, Kawamura S, Raymond PA. (2010). Ontogeny of cone photoreceptor mosaics in zebrafish. *J Comp Neurol* 518(20):4182-4195

**Amores A**, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho RK, Langeland J, Prince V, Wang YL, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait JH. (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282(5394):1711-1714

**Andreasson S**, Tornqvist K. (1991). Electroretinograms in patients with achromatopsia. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 69(6):711-716

**Ansar M**, Santos-Cortez RL, Saqib MA, Zulfigar F, Lee K, Ashraf NM, Ullah E, Wang X, Sajid S, Khan FS, Amin-ud-Din M, Univeristy of Washington Center for Mendelian Genomics, Smith JD, Shendure J, Bamshad MJ, Nickerson DA, Hameed A, Riazuddin S, Ahmed ZM, Ahmad W, Leal SM. (2015). Mutation of ATF6 causes autosomal recessive achromatopsia. *Hum Genet* 134(9):941-950

**Ayoub EA**, Tandon K, Padwal M, Imani J, Patel H, Dubey A, Mekhael O, Upagupta C, Ayoub A, Dvorkin-Gheva A, Murphy J, Kolb PS, Lhotak S, Dickhout JG, Austin RC, Kolb MRJ, Richards CD, Ask K. (2019). IL-6 mediates ER expansion during hyperpolarization of alternatively activated macrophages. *Immunol Cell Biol* 97(2):203-217

- Bilotta J**, Saszik S, Sutherland SE. (2001). Rod contributions to the electroretinogram of dark-adapted developing zebrafish. *Dev Dyn* 222(4):564-570
- Bitinaite J**, Wah DA, Aggarwal AK, Schildkraut I. (1998). FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(18):10570-10575
- Blackwood EA**, Azizi K, Thuerauf DJ, Paxman RJ, Plate L, Kelly JW3, Wiseman RL, Glembotski CC. (2019). Pharmacologic ATF6 activation confers global protection in widespread disease models by reprogramming cellular proteostasis. *Nat Commun* 10(1):187
- Boch J**, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326(5959):1509-1512
- Bommiasamy H**, Back SH, Fagone P, Lee K, Meshinchi S, Vink E, Sriburi R, Frank M, Jackowski S, Kaufman RJ, Brewer JW. (2009). ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 122(Pt 10):1626-1636
- Bradford MM**. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Braissant O**, Wahli W. (1998). A simplified in situ hybridization protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections. *Biochemica* 1:10-16
- Branchek T**, Bremiller R. (1984). The development in photoreceptors in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. I. Structure. *J Comp Neurol* 224(1):107-115
- Bringmann A**, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25(4):397-424
- Brockerhoff SE**, Hurley JB, Janssen-Bienhold U, Neuhauss SC, Driever W, Dowling JE. (1995). A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(23):10545-10549
- Brockerhoff SE**, Rieke F, Matthews HR, Taylor MR, Kennedy B, Ankoudinova I, Niemi GA, Tucker CL, Xiao M, Cilluffo MC, Fain GL, Hurley JB. (2003). Light stimulates a transducin-independent increase of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> and suppression of current in cones from the zebrafish mutant *nof*. *J Neurosci* 23(2):470-480
- Burman A**, Kropski JA, Calvi CL, Serezani AP, Pascoalino BD, Han W, Sherrill T, Gleaves L, Lawson WE, Young LR, Blackwell TS, Tanjore H. (2018). Localized hypoxia links ER stress to lung fibrosis through induction of C/EBP homologous protein. *JCI Insight* 3(16). pii:99543

**Burrill JD**, Easter SS Jr. (1994). Development of the retinofugal projections in the embryonic and larval zebrafish (*Brachydanio rerio*). *J Comp Neurol* 346(4):583-400

**Cade L**, Reyon D, Hwang WY, Tsai SQ, Patel S, Khayter C, Joung JK, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR. (2012). Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. *Nucleic Acid Res* 40(16):8001-8010

**Cervený KL**, Cavodeassi F, Turner KJ, de Jong-Curtain TA, Heath JK, Wilson SW. (2010). The zebrafish flotte lotte mutant reveals that the local retinal environment promotes the differentiation of proliferating precursors emerging from their stem cell niche. *Development* 137(13):2107-2115

**Chang B**, Dacey MS, Hawes NL, Hitchcock MF, Milam AH, Atmaca-Sonmez P, Nusinowitz S, Heckenlively JR. (2006). Cone photoreceptor function loss-3, a novel mouse model of achromatopsia due to mutations in *Gnat2*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(11):5017-5021

**Chang B**, Grau T, Dangel S, Hurd R, Jurklies B, Sener EC, Andreasson S, Dollfus H, Baumann B, Bolz S, Artemyev N, Kohl S, Heckenlively JR, Wissinger B. (2009). A homologous genetic basis of the murine *cpfl1* mutant and human achromatopsia linked to mutations in the *PDE6C* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19581-86

**Chen X**, Shen J, Prywes R. (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 277(15):13045-13052

**Chen YC**, Lu YF, Li IC, Hwang SP. (2012). Zebrafish *Agr2* is required for terminal differentiation of intestinal goblet cells. *PLoS One* 7(4):e34408

**Chen Z**, Ballar P, Fu Y, Luo J, Du S, Fang S. (2014). The E3 ubiquitin ligase *gp78* protects against ER stress in zebrafish liver. *J Genet Genomics* 41(7):357-368

**Chiang WC**, Chan P, Wissinger B, Vincent A, Skorczyk-Werner A, Krawczyński MR, Kaufman RJ, Tsang SH, Héon E, Kohl S, Lin, SH. (2017). Achromatopsia mutations target sequential steps of ATF6 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(2):400-405

**Chinen A**, Hamaoka T, Yamada Y, Kawamura S. (2003). Gene duplication and spectral diversification of cone visual pigments of zebrafish. *Genetics* 163(2):663-675

**Cleland WW**. (1964). Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 3:480-482

**Collin RW**, Safieh C, Littink KW, Shalev SA, Garzosi HJ, Rizel L, Abbasi AH, Cremers FP, den Hollander AI, Klevering BJ, Ben-Yosef T. (2010). Mutations in *C2ORF71* cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 86(5):783-788

- Compton SJ**, Jones CG. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151(2):369-374
- Connaughton VP**. (2010). Bipolar cells in the zebrafish retina. *Vis Neurosci* 28(1):77-93
- Corral-Serrano JC**, Messchaert M, Dona M, Peters TA, Kamminga LM, van Wijk E, Collin RWJ. (2018). C2orf71a/pcare1 is important for photoreceptor outer segment morphogenesis and visual function in zebrafish. *Sci Rep* 8(1):9675
- Correll RN**, Grimes KM, Prasad V, Lynch JM, Khalil H, Molkenin JD. (2019). Overlapping and differential functions of ATF6 $\alpha$  versus ATF6 $\beta$  in the mouse heart. *Sci Rep* 9(1):2059
- Cox JS**, Shamu CE, Walter P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73(6):1197-1206
- Deppmann CD**, Acharya A, Rishi V, Wobbes B, Smeekens S, Taparowsky EJ, Vinson C. (2004). Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in *Arabidopsis thaliana*: a comparison to *Homo sapiens* B-ZIP motifs. *Nucleic Acid Res* 32(11):3435-3445
- DuRose JB**, Tam AB, Niwa M. (2006). Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 17(7):3095-3107
- Easter SS Jr**, Nicola GN. (1996). The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Dev Biol* 180(2):646-663
- Easter SS Jr**. (2000). Let there be sight. *Neuron* 27(2):193-195
- Easter SS Jr**, Malicki JJ. (2002). The zebrafish eye: developmental and genetic analysis. *Results Probl Cell Differ* 40:346-370
- Fadool JM**. (2003). Development of a rod photoreceptor mosaic revealed in transgenic zebrafish. *Dev Biol* 258(2):277-290
- Fink EE**, Moparthy S, Bagati A, Bianchi-Smiraglia A, Lipchick BC, Wolff DW, Roll MV, Wang J, Liu S, Bakin AV, Kandel ES, Lee AH, Nikiforov MA. (2018). XBP1-KLF9 Axis Acts as a Molecular Rheostat to Control the Transition from Adaptive to Cytotoxic Unfolded Protein Response. *Cell Rep* 25(1):212-223
- Frischmeyer PA**, Dietz HC. (1999). Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8(10):1893-1900

**Franze K**, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A, Guck J. (2007). Muller cells are living optical fibres in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(20):8287-8292

**Forouhan M**, Mori K, Boot-Handford RP. (2018). Paradoxical roles of ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  in modulating disease severity caused by mutations in collagen X. *Matrix Biol* 70:50-71

**Fraser B**, DuVa MG, Wang H, Allison WT. (2013). Regeneration of cone photoreceptors when cell ablation is primarily restricted to a particular cone subtype. *PLoS One* 8(1):e55410

**Fu J**, Nagashima M, Guo C, Raymond PA, Wei X. (2018). Novel animal model of crumbs-dependent progressive retinal degeneration that targets specific cone subtypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59(1):505-518

**Galli-Resta L**, Ensini M. (1996). An intrinsic time limit between genesis and death of individual neurons in the developing retinal ganglion cell layer. *J Neurosci* 16(7):2318-2324

**Gates MA**, Kim L, Egan ES, Cardozo T, Sirotkin HI, Dougan ST, Lashkari D, Abagyan R, Schier AF, Talbot WS. (1999). A genetic linkage map for zebrafish: comparative analysis and localization of genes and expressed sequences. *Genome Res* 9(4):334-347

**Genead MA**, Fishman GA, Rha J, Dubis AM, Bonci DM, Dubra A, Stone EM, Neitz M, Carroll J. (2011). Photoreceptor structure and function in patients with congenital achromatopsia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:7298-308

**Gerth-Kahlert C**, Tiwari A, Hanson JVM, Batmanabane V, Traboulsi E, Pennesi ME, Al-Qahtani AA, Lam BL, Heckenlively J, Zweifel SA, Vincent A, Fierz F, Barthelmes D, Branham K, Khan N, Bahr A, Baehr L, Magyar I, Koller S, Azzarello-Burri S, Niedrist D, Heon E, Berger W. (2017). C2orf71 Mutations as a Frequent Cause of Autosomal-Recessive Retinitis Pigmentosa: Clinical Analysis and Presentation of 8 Novel Mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58(10):3840-3450

**Godinho L**, Mumm JS, Williams PR, Schroeter EH, Koerber A, Park SW, Leach SD, Wong RO. (2005). Targeting of amacrine cell neurites to appropriate synaptic laminae in the developing zebrafish retina. *Development* 132(22):5069-5079

**Gorbatyuk MS**, Knox T, LaVail MM, Gorbatyuk OS, Noorwez SM, Hauswirth WW, Lin JH, Muzyczka N, Lewin AS. (2010). Restoration of visual function in P23H rhodopsin transgenic rats by gene delivery of BiP/Grp78. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(13):5961-5966

**Gotoh T**, Mori M. (2006). Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(7):1439-1446

- Guilinger JP**, Pattanayak V, Reyon D, Tsai SQ, Sander JD, Joung JK, Liu DR. (2014). Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nat Methods* 11(4):429-435
- Hagerman GF**, Noel NC, Cao SY, DuVa MG, Oel AP, Allison WT. (2016). Rapid Recovery of Visual Function Associated with Blue Cone Ablation in Zebrafish. *PLoS One* 11(11): e0166932
- Hamaoka T**, Takechi M, Chinen A, Nishiwaki Y, Kawamura S. (2002). Visualization of rod photoreceptor development using GFP-transgenic zebrafish. *Genesis* 34(3):215-220
- Harding HP**, Zhang Y, Ron D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397(6716):271-274
- Harding HP**, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6(5):1099-1108
- Harris WA**, Perron M. (1998). Molecular recapitulation: the growth of the vertebrate retina. *Int J Dev Biol* 42(3):299-304
- Hashida K**, Kitao Y, Sudo H, Awa Y, Maeda S, Mori K, Takahashi R, Iinuma M, Hori O. (2012). ATF6 $\alpha$  promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson disease. *PLoS One* 7(10)
- Haug MF**, Berger M, Gesemann M, Neuhauss SCF. (2019). Differential expression of PKC $\alpha$  and - $\beta$  in the zebrafish retina. *Histochem Cell Biol*
- Hauptmann G**, Söll I, Krautz R, Theopold U. (2016). Multi-target Chromogenic Whole-mount In Situ Hybridization for Comparing Gene Expression Domains in Drosophila Embryos. *J. Vis Exp* (107):e53830
- Hayward GS**, Smith MG. (1972). The chromosome of bacteriophage T5. I. Analysis of single-stranded DNA fragments by agarose gel electrophoresis. *J Mol Biol* 63(3):383-395
- Haze K**, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10(11):3787-3799
- Haze K**, Okada T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. (2001). Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 355(Pt 1):19-28

- Heifetz A**, Keenan RW, Elbein AD. (1979). Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry* 18(11):2186-2192
- Hendrickson A**. (1992). A morphological comparison of foveal development in man and mokey. *Eye (Lond)* 6(Pt2):136-144
- Hetz C**. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(2):89-102
- Hetz C**, Papa FR. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell* 69(2):169-181
- Hirai H**, Tani T, Kikyo N. (2010). Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MyoD and FoxA. *Int J Dev Biol* 54(11-12):1589-1596
- Hitchcock PF**, Raymond PA. (2004). The teleost retina as a model for developmental and regeneration biology. *Zebrafish* 1(3):257-271
- Hofer H**, Carroll J, Neitz J, Neitz M, Williams DR. (2005). Organization of the human trichromatic cone mosaic. *J Neurosci* 25(42):9669-9679
- Hollien J**, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol* 186(3):323-331
- Howarth DL**, Yin C, Yeh K, Sadler KC. (2013). Defining hepatic dysfunction parameters in two models of fatty liver disease in zebrafish larvae. *Zebrafish* 10(2):199-210
- Howarth DL**, Lindtner C, Vacaru AM, Sachidanandam R, Tsedensodnom O, Vasilkova T, Buettner C, Sadler KC. (2014). Activating transcription factor 6 is necessary and sufficient for alcoholic fatty liver disease in zebrafish. *PLoS Genet* 10(5)
- Hu CY**, Yang CH, Chen WY, Huang CJ, Huang HY, Chen MS, Tsai HJ. (2006). Egr1 gene knockdown affects embryonic ocular development in zebrafish. *Mol Vis* 12:1250-1258
- Hu M**, Easter SS. (1999). Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev Biol* 207(2):309-321
- Huberman AD**, Niell CM. (2011). What can mice tell us about how vision works? *Trends Neurosci* 34(9):464-473
- Iribarne M**, Nishiwaki Y, Nakamura S, Araragi M, Oguri E, Masai I. (2017). Aipl1 is required for cone photoreceptor function and survival through the stability of Pde6c and Gc3 in zebrafish. *Sci Rep* 7:45962

- Ishikawa T**, Okada T, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T, Kawei Y, Shigenobu S, Tanaka M, Saito TL, Yoshimura J, Morishita S, Toyoda A, Sakaki Y, Taniguchi Y, Takeda S, Mori K. (2013). ATF6 $\alpha$ / $\beta$ -mediated adjustment of ER chaperone levels is essential for development of the notochord in medaka fish. *Mol Biol Cell* 24(9):1387-1395
- Iurlaro R**, Muñoz-Pinedo C. (2016). Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J* 283(14):2640-2652
- Jeon CJ**, Strettoi E, Masland RH. (1998). The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18(21):8936-8946
- Jin JK**, Blackwood EA, Azizi K, Thuerauf DJ, Fahem AG, Hofmann C, Kaufman RJ, Doroudgar S, Glembotski CC. (2017). ATF6 decreases myocardial ischemia/reperfusion damage and links ER stress and oxidative stress signaling pathways in the heart. *Circ Res* 120(5):862-875
- Jobling AI**, Vessey KA, Waugh M, Millis SA, Fletcher EL. (2013). A naturally occurring mouse model of achromatopsia: characterization of the mutation in cone transducin and subsequent retinal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(5):3350-3359
- Johns PR**. (1977). Growth of the adult goldfish eye. III. Source of new retinal cells. *J Comp Neurol* 176(3):343-357
- Jusuf PR**, Harris WA. (2009). Ptf1a is expressed transiently in all types of amacrine cells in the embryonic zebrafish retina. *Neural Dev* 4:34
- Kainz PM**, Neitz J, Neitz M. (1998). Recent evolution of uniform trichromacy in a New World monkey. *Vision Res* 38(21):3315-3320
- Kimmel CB**, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203(3): 253-310
- Kljavin IJ**, (1987). Early development of photoreceptors in the ventral retina of the zebrafish embryo. *J Comp Neurol* 260(3):461-471
- Kohl S**, Marx T, Giddings I, Jäggle H, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Sharpe LT, Wissinger B. (1998). Total colourblindness is caused by mutations in the gene encoding the alpha-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated cation channel. *Nat Genet* 19:257-59
- Kohl S**, Baumann B, Broghammer M, Jäggle H, Sieving P, Kellner U, Spegal R, Anastasi M, Zrenner E, Sharpe LT, Wissinger B. (2000). Mutations in the CNGB3 gene encoding the beta-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated channel are responsible for achromatopsia (ACHM3) linked to chromosome 8q21. *Hum Mol Genet* 9:2107-16

**Kohl S**, Baumann B, Rosenberg T, Kellner U, Lorenz B, Valada M, Jacobson SG, Wissinger B. (2002). Mutations in the cone photoreceptor G-protein alpha-subunit gene GNAT2 in patients with achromatopsia. *Am J Hum Genet* 71:422-25

**Kohl S**, Coppieters F, Meire F, Schaich S, Roosing S, Brennenstuhl C, Bolz S, van Genderen MM, Riemsdag FC, European Retinal Disease Consortium, Lukowski R, den Hollander AI, Cremers FP, De Baere E, Hoyng CB, Wissinger B. (2012). A nonsense mutation in PDE6H causes autosomal-recessive incomplete achromatopsia. *Am J Hum Genet* 91:527-32

**Kohl S**, Hamel C. (2013). Clinical utility gene card for: Achromatopsia – update 2013. *Eur J Hum Genet* 21(11)

**Kohl S**, Zobor D, Chiang WC, Weisschuh N, Staller J, Gonzalez-Menendez I, Chang S, Beck SC, Garcia Garrido M, Sothilingam V, Seeliger MW, Stanzial F, Benedicenti F, Inzana F, Heon E, Vincent A, Beis J, Strom TM, Rudolph G, Roosing S, van Hollander AI, Cremers FP, Lopez I, Ren H, Moore AT, Webster AR, Michealides M, Koenekoop RK, Zrenner E, Kaufman RJ, Tsang SH, Wissinger B, Lin JH. (2015). Mutations in the unfolded protein response regulator ATF6 cause the cone dysfunction disorder achromatopsia. *Nat Genet* 47:757-65

**Kornfeld R**, Kornfeld S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54:631-664

**Kroeger H**, Grimsey N, Paxman R, Chiang WC, Plate L, Jones Y, Shaw PX, Trejo J, Tsang SH, Powers E, Kelly JW, Wiseman RL, Lin JH. (2018). The unfolded protein response regulator ATF6 promotes mesodermal differentiation. *Sci Signal* 11(517)

**Kroeger H**, Chiang WC, Nguyen A, Lin JH. (2019). Cone photoreceptors fail to form in ATF6-related Achromatopsia retinal organoids. ARVO Abstract Nr. 4762

**Lagman D**, Callado-Pérez A, Franzén IE, Larhammar D, Abalo XM. (2015). Transducin duplicates in the zebrafish retina and pineal complex: differential specialisation after the teleost tetraploidisation. *PLoS One* 10(3)

**Lamandé SR**, Bateman JF. (1999). Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin Cell Dev Biol* 10(5):455-464

**Larison KD**, Bremiller R. (1990). Early onset of phenotype and cell patterning in the embryonic zebrafish retina. *Development* 109(3):567-576

**Lee HC**, Chen YJ, Liu YW, Lin KY, Chen SW, Lin CY, Lu YC, Hsu PC, Lee SC, Tsai HJ. (2011). Transgenic zebrafish model to study translational control mediated by upstream open reading frame of human chop gene. *Nucleic Acid Res* 39(20):e139

- Lei Y**, Guo X, Liu Y, Cao Y, Deng Y, Chen X, Cheng CH, Dawid IB, Chen Y, Zhao H. (2012). Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *Proc Natl Acad Sci USA* 109(43):17484-17489
- Li J**, Chen Z, Gao LY, Colorni A, Ucko M, Fang S, Du SJ. (2015). A transgenic zebrafish model for monitoring *xbp1* splicing and endoplasmic reticulum stress in vivo. *Mech Dev* 137:33-44
- Li M**, Baumeister P, Roy B, Phan T, Foti D, Luo S, Lee AS. (2000). ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Mol Cell Biol* 20(14):5098-5106
- Littink KW**, van den Born LI, Koenekoop RK, Collin RW, Zonneveld MN, Blokland EA, Khan H, Theelen T, Hoyng CB, Cremers FP, den Hollander AI, Klevering BJ. (2010). Mutations in the *EYS* gene account for approximately 5% of autosomal recessive retinitis pigmentosa and cause a fairly homogeneous phenotype. *Ophthalmology* 117(10):2026-2033
- Liu J**, Ma Y, Sun CL, Li S, Wang JF. (2016). High Mobility Group Box1 Protein Is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress Induced by *Clostridium difficile* Toxin A. *Biomed Res Int* 2016:4130834
- Livak KJ**, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta-Delta C(T)) method. *Methods* 25(4):402-408
- Livesey FJ**, Cepko CL. (2001). Vertebrate neural-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* 2(2):109-118
- Lu Z**, Hu X, Liu F, Soares DC, Liu X, Yu S, Gao M, Han S, Qin Y, Li C, Jiang T, Luo D, Guo AY, Tang Z, Liu M. (2017). Ablation of *EYS* in zebrafish causes mislocalisation of outer segment proteins, F-actin disruption and cone-rod dystrophy. *Sci Rep* 7:46098
- Luo S**, Mao C, Lee B, Lee AS. (2006). GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 26(15):5688-5697
- Lytton J**, Westlin M, Hanley MR. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 266(26):17067-17071
- Ma Y**, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. (2002). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* 318(5):1351-1365
- Maiuolo J**, Bulotta S, Verderio C, Benfante R, Borgese N. (2011). Selective activation of the transcription factor ATF6 mediates endoplasmic reticulum proliferation triggered by a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(19):7832-7837

**Makhankov YV**, Rinner O, Neuhauss SC. (2004). An inexpensive device for non-invasive electroretinography in small aquatic vertebrates. *J Neurosci Methods* 135(1-2):205-210

**Marciniak SJ**, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 18(24):3066-3077

**Marciniak SJ**, Ron D. (2006). Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 86(4):1133-1149

**Mastey RR**, Georgiou M, Langlo CS, Kalitzeos A, Patterson EJ, Kane T, Singh N, Vincent A, Moore AT, Tsang SH, Lin JH, Young M, Hartnett ME; Héon E, Kohl S, Michaelides M, Carroll J. (2018). Characterization of retinal structure in ATF6-associated achromatopsia. ARVO Abstract Nr. 669-C0227

**Mathews MB**, Bernstein RM, Franza BR Jr, Garrels JI. (1984). Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309(5966):374-376

**Mayer AK**, Van Cauwenbergh C, Rother C, Baumann B, Reuter P, De Baere E, Wissinger B, Kohl S; ACHM Study Group. (2017). CNGB3 mutation spectrum including copy number variations in 552 achromatopsia patients. *Hum Mutat* 38(11):1579-1591

**Messaert M**, Dona M, Broekman S, Peters TA, Corral-Serrano JC, Slijkerman RWN, van Wijk E, Collin RWJ. (2018). Eyes shut homolog is important for the maintenance of photoreceptor morphology and visual function in zebrafish. *PLoS One* 13(7): e0200789

**McGuigan DB**, Heon E, Cideciyan AV, Ratnapriya R, Lu M, Sumaroka A, Roman AJ, Batmanabane V, Garafalo AV, Stone EM, Swaroop A, Jacobson SG. (2017). EYS Mutations Causing Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa: Changes of Retinal Structure and Function with Disease Progression. *Genes (Basel)* 8(7)

**Miller JC**, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 29(2):143-148

**Moitra J**, Szilák L, Krylov D, Vinson C. (1997). Leucine is the most stabilizing aliphatic amino acid in the d position of a dimeric leucine zipper coiled coil. *Biochemistry* 36(41):12567-12573

**Moore FE**, Reyon D, Sander JD, Martinez SA, Blackburn JS, Khayter C, Ramirez CL, Joung JK, Langenau DM. (2012). Improved somatic mutagenesis in zebrafish using transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *PLoS One* 7(5):e37877

- Mori K**, Sant A, Kohno K, Normington K, Gething MJ, Sambrook JF. (1992). A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J* 11(7):2583-2593
- Mori K**, Ma W, Gething MJ, Sambrook J. (1993). A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 74(4):743-756
- Moscou MJ**, Bogdanove AJ. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326(5959):1501
- Müller F**, Kaupp UB. (1998). Signal transduction in photoreceptor cells. *Naturwissenschaften* 85(2):49-61
- Mullis KB**, Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
- Nadanaka S**, Yoshida H, Mori K. (2006). Reduction of disulfide bridges in the luminal domain of ATF6 in response to glucose starvation. *Cell Struct Funct* 31(2):127-134
- Nadanaka S**, Okada T, Yoshida H, Mori K. (2007). Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 27(3):1027-1043
- Neuhauss SCF**. (2010). Structure and function of the zebrafish visual system. *Fish Physiol* 29:81-122
- Oda T**, Kosuge Y, Arakawa M, Ishige K, Ito Y. (2008). Distinct mechanism of cell death is responsible for tunicamycin-induced ER stress in SK-N-SH and SH-SY5Y cells. *Neurosci Res* 60(1):29-39
- Odisho T**, Zhang L, Volchuk A. (2015). ATF6 $\beta$  regulates the Wfs1 gene and has a cell survival role in the ER stress response in pancreatic  $\beta$ -cells. *Exp Cell Res* 330(1):111-122
- Ogino K**, Low SE, Yamada K, Saint-Amant L, Zhou W, Muto A, Asakawa K, Nakai J, Kawakami K, Kuwada JY, Hirata H. (2015). RING finger protein 121 facilitates the degradation and membrane localization of voltage-gated sodium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(9):2859-2864
- Okada T**, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. (2002). Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 366(Pt 2):585-594

**Osterberg G.** (1935). Topography of the layer of rods and cones in the human retina. *Acta Ophthalmol Suppl* 13(6):1-102

**Paschke KA,** Lottspeich F, Stuermer CA. (1992). Neurolin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration. *J Cell Biol* 117(4):863-875

**Pedurupillay CR,** Landsend EC, Vigeland MD, Ansar M, Frengen E, Misceo D, Strømme P. (2016). Segregation of Incomplete Achromatopsia and Alopecia Due to PDE6H and LPAR6 Variants in a Consanguineous Family from Pakistan. *Genes (Basel)* 7(8): pii: E41

**Pfaffl MW.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res* 29(9):e45

**Pfaffl MW,** Horgan GW, Dempfle L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30(9):e36

**Pfaffl MW.** (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* pp.92-95

**Postlethwait JH,** Yan YL, Gates MA, Horne S, Amores A, Brownlie A, Donovan A, Egan ES, Force A, Gong Z, Goutel C, Fritz A, Kelsh R, Knapik E, Liao E, Paw B, Ransom D, Singer A, Thomson M, Abduljabbar TS, Yelick P, Beier D, Joly JS, Larhammar D, Rosa F, Westerfield M, Zon LI, Johnson SL, Talbot WS. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet* 18(4):345-349

**Powell C,** Grant AR, Cornblath E, Goldman D. (2013). Analysis of DNA methylation reveals a partial reprogramming of the Müller glia genome during retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(49):19814-19819

**Pringle NP,** Richardson WD. In situ Hybridization Protocols, Wolfson Institute for Biomedical Research and Biology Department, University College London,  
<https://www.ucl.ac.uk/~ucbzwdr/In%20Situ%20Protocol.pdf>

**Pugh EN Jr, Lamb TD.** (1993). Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction. *Biochim Biophys Acta* 1141(2-3):111-149

**Przystal JM,** Waramit S, Pranjol MZI, Yan W, Chu G, Chongchai A, Samarth G, Olaciregui NG, Tabatabai G, Carcaboso AM, Aboagye EO, Suwan K, Hajitou A. (2019). Efficacy of systemic temozolomide-activated phage-targeted gene therapy in human glioblastoma. *EMBO Mol Med* 11(4). pii. e8492

- Ramachandran R**, Fausett BV, Goldman D. (2010). *Ascl1a* regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway. *Nat Cell Biol* 12(11):1101-1107
- Raymond PA**. (1985). The unique origin of rod photoreceptors in the teleost retina. *Trends Neurosci* 8:12-17
- Raymond PA**. (1986). Movement of retinal terminals in goldfish optic tectum predicted by analysis of neuronal proliferation. *J Neurosci* 6(9):2479-2488
- Raymond PA**, Barthel LK, Curran GA. (1995). Developmental patterning of rod and cone photoreceptors in embryonic zebrafish. *J Comp Neurol* 359(4):537-550
- Raymond PA**, Barthel LK, (2004). A moving wave patterns the cone photoreceptor mosaic array in the zebrafish retina. *Int J Dev Biol* 48(8-9):935-945
- Raymond PA**, Barthel LK, Bernados RL, Perkowski JJ. (2006). Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol* 6:36
- Reichenbach A**, Bringmann A. (2013). New functions of Muller cells. *Glia* 61(5):651-678
- Reyon D**, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol* 30(5):460-465
- Robinson J**, Schmitt EA, Hárosi FI, Reece RJ, Dowling JE. (1993). Zebrafish ultraviolet visual pigment: absorption spectrum, sequence and localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(13):6009-9012
- Ron D**, Walter P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Cell Mol Biol* 8(7):519-529
- Roy B**, Lee AS. (1995). Transduction of calcium stress through interaction of the human transcription factor CBF with the proximal CCAAT regulatory element of the *grp78/BiP* promoter. *Mol Cell Biol* 15(4):2263-2274
- Roy B**, Li WW, Lee AS. (1996). Calcium-sensitive transcriptional activation of the proximal CCAAT regulatory element of the *grp78/BiP* promoter by the human nuclear factor CBF/NFY. *J Biol Chem* 271(46):28995-29002
- Roy B**, Lee AS. (1999). The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress-inducible complex. *Nucleic Acid Res* 27(6):1437-1443
- Rutkowski DT**, Hegde RS. (2010). Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol* 189(5):783-794

- Saiki RK**, Scharf S, Faloona FA, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732): 1350-1354
- Sander JD**, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, Yeh JR. (2011). Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol* 29(8):697-698
- Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12):5463-5467
- Sanjana NE**, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F. (2012). A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc* 7(1):171-192
- Saszik S**, Bilotta J, Givin CM. (1999). ERG assessment of zebrafish retinal development. *Vis Neurosci* 16(5):881-888
- Saveljeva S**, Mc Laughlin SL, Vandenabeele P, Samali A, Bertrand MJ. (2015). Endoplasmic reticulum stress induces ligand-independent TNFR1-mediated necroptosis in L929 cells. *Cell Death Dis* 6:e1587
- Schindler AJ**, Schekman R. (2009). In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(42):17775-17780
- Schmid-Burgk JL**, Schmidt T, Kaiser V, Höning K, Hornung V. (2013). A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat Biotechnol* 31(1):76-81
- Schmitt EA**, Dowling JE. (1996). Comparison of topographical patterns of ganglion and photoreceptor cell differentiation in the retina of zebrafish, *Danio rerio*. *J Comp Neurol* 371(2):222-234
- Schmitt EA**, Dowling JE. (1999). Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: Light and electron microscopic analysis. *J Comp Neurol* 404(4):515-536
- Schneider CA**, Rasband WS, Eliceiri KW. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7):671-675
- Sharpe LT**, Nordby K. (1990). Total colourblindness: an introduction. In: Hess RF, Sharpe LT, Nordby K, eds. Night vision: basic, clinical and applied aspects. *Cambridge: Cambridge University Press*, 253-89
- Sharpe LT**, Stockman A, Jagle H, Nathans J. (1999). Opsin genes, cone photopigments and colourblindness. In: Gegenfurtner K, Sharpe LT, eds. Colour vision: from genes to perception. *Cambridge: Cambridge University Press*, 3-52

- Shen J**, Chen X, Hendershot L, Prywes R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 3(1):99-111
- Shen M**, Wang L, Yang G, Gao L, Wang B, Guo X, Zeng C, Xu Y, Shen L, Cheng K, Xia Y, Li X, Wang H, Fan L, Wang X. (2014). Baicalin protects the cardiomyocytes from ER stress-induced apoptosis: inhibition of CHOP through induction of endothelial nitric oxide synthase. *PLoS One* 9(2):e88389
- Shen X**, Ellis RE, Lee K, Liu CY, Yang K, Solomon A, Yoshida H, Morimoto R, Kurnit DM, Mori K, Kaufman RJ. (2001). Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* 107(7):893-903
- Sirisi S**, Folgueira M, López-Hernández T, Minieri L, Pérez-Rius C, Gaitán-Peñas H, Zang J, Martínez A, Capdevila-Nortes X, De La Villa P, Roy U, Alia A, Neuhauss S, Ferroni S, Nunes V, Estévez R, Barrallo-Gimeno A. (2014). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 regulates glial surface localization of GLIALCAM from fish to humans. *Hum Mol Genet* 23(19):5069-5086
- Skorczyk-Werner A**, Chiang WC, Wawrocka A, Wicher K, Jarmuż-Szymczak M, Kostrzevska-Poczekaj M, Jamsheer A, Płoski R, Rydzanicz M, Pojda-Wilczek D, Weisschuh N, Wissinger B, Kohl S, Lin JH, Krawczyński MR. (2017). Autosomal recessive cone-rod dystrophy can be caused by mutations in the ATF6 gene. *Eur J Hum Genet* 25(11):1210-1216
- Solomon SG**, Lennie P. (2007). The machinery of colour vision. *Nat Rev Neurosci* 8(4):276-286
- Stearns G**, Evangelista M, Fadool JM, Brockerhoff SE. (2007). A mutation in the cone-specific pde6 gene causes rapid cone photoreceptor degeneration in zebrafish. *J Neurosci* 27(27):13866-13874
- Straznicky K**, Gaze RM. (1971). The growth of the retina in *Xenopus laevis*: an autoradiographic study. *J Embryol Exp Morphol* 26(1):67-79
- Streubel J**, Blücher C, Landgraf A, Boch J. (2012). TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Natu Biotechnol* 30(7):593-595
- Sundin OH**, Yang JM, Li Y, Zhu D, Hurd JN, Mitchell TN, Silva ED, Maumenee IH. (2000). Genetic basis of total colourblindness among the Pingelapese islanders. *Nat Genet* 25:289-93
- Sung CH**, Schneider BG, Agarwal N, Papermaster DS, Nathans J. (1991). Functional heterogeneity of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(19):8840-8844

- Takechi M**, Kawamura S. (2005). Temporal and spatial changes in the expression pattern of multiple red and green subtype opsin genes during zebrafish development. *J Exp Biol* 208(Pt 7):1337-1345
- Tanaka, M.** (1996). Modulation of promoter occupancy by cooperative DNA binding and activation-domain function is a major determinant of transcriptional regulation by activators in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(9):4311-4315
- Teske BF**, Wek SA, Bunpo P, Cundiff JK, McClintick JN, Anthony TG, Wek RC. (2011). The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 22(22):4390-4405
- Thiadens AA**, den Hollander AI, Roosing S, Nabuurs SB, Zekveld-Vroon RC, Collin RW, De Baere E, Koenekoop RK, van Schooneveld MJ, Strom TM, van Lith-Verhoeven JJ, Lotery AJ, van Moll-Ramirez N, Leroy BP, van den Born LI, Hoyng CB, Cremers FP, Klaver CC. (2009). Homozygosity mapping reveals PDE6C mutations in patients with early-onset cone photoreceptor disorders. *Am J Hum Genet* 85:240-47
- Thiadens AA**, Somervuo V, van den Born LI, Roosing S, van Schooneveld MJ, Kuijpers RW, van Moll-Ramirez N, Cremers FP, Hoyng CB, Klaver CC. (2010). Progressive loss of cones in achromatopsia: an imaging study using spectral domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:5952-57
- Thomas JL**, Ranski AH, Morgan GW, Thummel R. (2016). Reactive gliosis in the adult zebrafish retina. *Exp Eye Res* 143:98-109
- Thomas MG**, Kumar A, Kohl S, Proudlock FA, Gottlob I. (2011). High-resolution in vivo imaging in achromatopsia. *Ophthalmology* 118:882-87
- Thomas MG**, McLean RJ, Kohl S, Sheth V, Gottlob I. (2012). Early signs of longitudinal progressive cone photoreceptor degeneration in achromatopsia. *Br J Ophthalmol* 96:1232-36
- Thuerauf DJ**, Morrison LE, Hoover H, Glembotski CC. (2002). Coordination of ATF6-mediated transcription and ATF6 degradation by a domain that is shared with the viral transcription factor, VP16. *J Biol Chem* 277(23):20734-20739
- Thuerauf DJ**, Marcinko M, Belmont PJ, Glembotski CC. (2007). Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *J Biol Chem* 282(31):22865-22878
- Todd DJ**, Lee AH, Glimcher LH. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8(9):663-674

- Uemura A**, Oku M, Mori K, Yoshida H. (2009). Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response. *J Cell Sci* 122(Pt 16):2877-2886
- Ullman E**, Fan Y, Stawowczyk M, Chen HM, Yue Z, Zong WX. 2008. Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress. *Cell Death Differ* 15(2):422-425
- Vacaru AM**, Di Narzo AF, Howarth DL, Tsedensodnom O, Imrie D, Cinaroglu A, Amin S, Hao K, Sadler KC. (2014). Molecularly defined unfolded protein response subclasses have distinct correlation with fatty liver disease in zebrafish. *Dis Model Mech* 7(7):823-835
- Vattem KM**, Wek RC. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(31):11269-11274
- Viets K**, Eldred K, Johnston RJ Jr. (2016). Mechanisms of photoreceptor patterning in vertebrates and invertebrates. *Trends Genet* 32(10):638-659
- Wada I**, Rindress D, Cameron PH, Ou WJ, Doherty JJ 2nd, Louvard D, Bell AW, Dignard D, Thomas DY, Bergeron JJ. (1991). SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* (266):29:19599-19610
- Walter F**, O'Brien A, Concannon CG, Düssmann H, Prehn JHM. (2018). ER stress signaling has an activating transcription factor 6 $\alpha$  (ATF6)-dependent "off-switch". *J Biol Chem* 293(47):18270-18284
- Walter P**, Ron D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334(6059):1081-1086
- Wässle H**, Riemann HJ. (1978). The mosaic of nerve cells in the mammalian retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 200(1141):441-461
- Wei C**, Liu J, Yu Z, Zhang B, Gao G, Jiao R. (2013). TALEN or Cas9 - rapid, efficient and specific choices for genome modifications. *J Genet Genomics* 40(6):281-289
- Wek RC**, Cavener DR. (2007). Translational control and the unfolded protein response. *Antioxid Redox Signal* 9(12):2357-2371
- Wetts R**, Serbedzija GN, Fraser SE. (1989). Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev Biol* 136(1):254-263
- Williams RW**. (1991). The human retina has a cone-enriched rim. *Vis Neurosci* 6(4):403-406

**Wissinger B**, Gamer D, Jäggle H, Giorda R, Marx T, Mayer S, Tippmann S, Broghammer M, Jurklies B, Rosenberg T, Jacobson SG, Sener EC, Tatlipinar S, Hoyng CB, Castellan C, Bitoun P, Andreasson S, Rudolph G, Kellner U, Lorenz B, Wolff G, Verellen-Dumoulin C, Schwartz M, Cremers FP, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Salati R, Sharpe LT, Kohl S. (2001). CNGA3 mutations in hereditary cone photoreceptor disorders. *Am J Hum Genet* 69(4):722-737

**Wu J**, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, Song B, Yau GD, Kaufman RJ. (2007). ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell* 13(3):351-364

**Xu C**, Bailly-Maitre B, Reed JC. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115(10):2656-2664

**Xu M**, Gelowani V, Eblimit A, Wang F, Young MP, Sawyer BL, Zhao L, Jenkins G, Creel DJ, Wang K, Ge Z, Wang H, Li Y, Hartnett ME, Chen R. (2015). ATF6 is mutated in early onset photoreceptor degeneration with macula involvement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56(6):3889-3895

**Yamamoto K**, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell* 13(3):365-376

**Ye J**, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6(6):1355-1364

**Yoshida H**, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. (1998). Identification of the *cis*-acting endoplasmic reticulum stress responsible response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 273(50):33741-33749

**Yoshida H**, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107(7):881-891

**Yoshida H**, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. (2001(a)). Endoplasmic reticulum stress-induced formation of a transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 21(4):1239-1248

**Zhang JY**, Diao YF, Kim HR, Jin DI. (2012a). Inhibition of endoplasmic reticulum stress improves mouse embryo development. *PLoS One* 7(7):e40433

**Zhang JY**, Diao YF, Oqani RK, Han RX, Jin DI. (2012b). Effect of endoplasmic reticulum stress on porcine oocyte maturation and parthenogenetic embryonic development in vitro. *Biol Reprod* 86(4):128

**Zhang K**, Kaufman RJ. (2004). Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279(25):25935-25938

**Zhang L**, Cho J, Ptak D, Leung YF. (2013). The role of egr1 in early zebrafish retinogenesis. *PLoS One* 8(2):e56108

**Zhang X1**, Szabo E, Michalak M, Opas M. (2007). Endoplasmic reticulum stress during the embryonic development of the central nervous system in the mouse. *Int J Dev Neurosci* 25(7):455-463

**Zimmermann MJY**, Nevala NE, Yoshimatsu T, Osorio D, Nilsson DE, Berens P, Baden T. (2018). Zebrafish differentially process color across visual space to match natural scenes. *Curr Biol* 28(13):2018-2032

## 9. Geleisteter Eigenbeitrag

### „Statement of own contribution“

Alle Experimente in dieser Arbeit wurden von Prof. Bernd Wissinger, Dr. Susanne Kohl, Dr. Peggy Reuter und **Julia Felden** gemeinsam geplant.

**Julia Felden** hat alle Experimente in dieser Arbeit sowie die Auswertung der in dieser Arbeit generierten Daten mit Ausnahme der im Folgenden aufgeführten Experimente, selbst durchgeführt.

- **ERG-Messungen:** Die ERG-Messungen an 5 dpf alten Zebrafischlarven wurden von Dr. Jingjing Zang in der Arbeitsgruppe von Prof. Stephan Neuhaus an der Universität Zürich durchgeführt. **Julia Felden** hat die gewonnenen Daten anschließend ausgewertet.
- **Herstellung von Semi-Dünnschnitten:** Die Einbettung der Zebrafischlarven zur Herstellung der Semi-Dünnschnitte erfolgte im Histologischen Labor des Forschungsinstituts für Augenheilkunde in Tübingen durch Silvia Bolz. Die Semi-Dünnschnitte selbst wurden von Christine Henes ebenfalls im Histologischen Labor des Forschungsinstituts für Augenheilkunde in Tübingen angefertigt. **Julia Felden** fertigte die mikroskopischen Aufnahmen der Semi-Dünnschnitte an.

## 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Leuten bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben und mich während ihrer Anfertigung unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Bernd Wissinger, der mir die Möglichkeit gab, diese umfassende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Forschungsinstitut für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Tübingen anzufertigen und mir damit gleichzeitig das Vertrauen schenkte, dass ich es auch schaffen würde. Desweiteren danke ich Frau Dr. Susanne Kohl, die mich mit einem ihrer Projekte betraute und mir somit die Chance auf eine sehr interessante Forschungsarbeit gab. Ich möchte mich bei ihr ebenso für Ihre kompetente Unterstützung sowie für ihr stetig offenes Ohr und ihre ermutigenden Worten auch in Zeiten des Haderns, die wohl jeder Doktorand während seiner Doktorarbeit mindestens einmal durchleben muss, bedanken.

Weiterer Dank gilt meinem Zweitgutachter Herrn Dr. Thorsten Schmidt, der mich durch seine Position in meinem Advisory Board die gesamte Zeit meiner Doktorarbeit durchweg begleitet hat und mit seinen konstruktiven Gedanken und ermutigenden Worten maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Alfred Nordheim bedanken, der sich ebenfalls als Mitglied meines Advisory Boards die Zeit genommen hat die Entstehung dieser Arbeit zu begleiten und zu unterstützen.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Peggy Reuter bedanken. Sie stand mir nicht nur bei der praktischen Umsetzung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite, sie arbeitete sich dazu intensivst in die Thematik meines Projektes ein, sodass sie mir mit Ihrem herausragenden Fachwissen zu jedem Zeitpunkt meiner Arbeit zur Seite stand. Liebe Peggy, ich danke dir hierfür!

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Stephan Neuhauss, der so freundlich war, die funktionellen Untersuchungen meine Zebrafischlarven in seinem Labor zu ermöglichen, sowie Frau Dr. Jingjing Zang, die die ERG-Messungen final durchführte.

Für die umfassende Hilfe bei der Probenvorbereitung und der finalen Durchführung der Elektronenmikroskopie danke ich meinen Kolleginnen Sylvia Bolz und Christine Henes.

Neben allen anderen lieben Kolleginnen und Kollegen, die meine Zeit in der Arbeitsgruppe zu der gemacht haben, was sie war und mit denen ich oftmals viele spaßige Momente sowie lustige Gespräche erleben durfte, möchte ich bei Jenny Staller, die mittlerweile nicht mehr nur eine Kollegin ist, sondern mir eine sehr gute Freundin geworden ist, bedanken. Tausend

Dank, liebe Jenny, dass du immer für mich da warst, dass du zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich hattest, dass du mit mir gelacht und dich mit mir geärgert hast und dass du es letztlich immer wieder geschafft hast mir ein Lächeln ins Gesicht zu zaubern.

Der letzte, aber aus tiefsten Herzen kommende Dank gilt meiner Familie – meinen Eltern und Großeltern sowie meinem Mann Timm – und meinen Freundinnen Eva Haas und Jana Kern. Ihr habt mich unablässig und vorbehaltlos unterstützt, ihr habt mir Kraft gegeben und mir durch konstruktive Gespräche und manchmal auch Kritik die Augen für neue Sichtweisen geöffnet.

## 11. Anhang

### 11.1. Absolute Quantifizierung der untersuchten retinalen Zelltypen

Die Graphen der absoluten Quantifizierungen zeigen die gemittelten gezählten Zellzahlen der einzelnen retinalen Zelltypen in wildtypischen und *atf6*-defizienten Retinae im Alter von 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf.

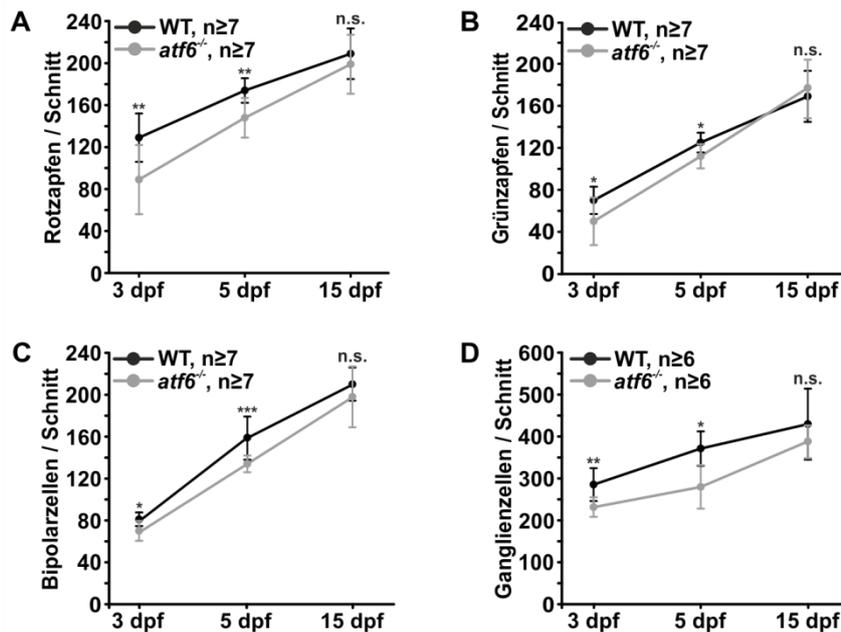


Abbildung S1: Absolute Quantifizierung der (A) Rotzapfen, (B) Grünzapfen (C) PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen und (D) Ganglienzellen in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten WT- und *atf6*-defizienten Zebrafischretina.

### 11.2. Aminosäure-Vergleich von ATF6 in unterschiedlichen Spezies

Vergleich der ATF6-Proteinsequenz von Zebrafisch (*D. rerio*, Q5RH85), Medaka (*O. latipes*, H2MQ49), Xenopus (*X. tropicalis*, F6Y1T0), Mensch (*H. sapiens*, P18850), Maus (*M. musculus*, F6VAN0) und Ratte (*R. norvegicus*, G3V909) mittels Clustal Omega. Die *Genbank entries* der einzelnen Formen von ATF6 sind zusätzlich in Klammern gegeben. Die einzelnen funktionellen Domänen sind im *Alignment* markiert.

**A**

	saure Domäne			
<i>D. rerio</i>	MSSNLMLDLMNPSMSS---KEVGDISI-DQDGEWDISLDELEDELGDADLELLEALVKVSG	56		
<i>O. latipes</i>	MSTDLMDFTNHQYVPMDEAPITSIDHGGEWDISLDELEDDLGDADLLEAL-ESAG	59		
<i>X. tropicalis</i>	-----MAAVLKSCVLGGQGGPGGGSPVEELDWDSSLELELTLVDVQNMFPDE-KNDL	54		
<i>H. sapiens</i>	-----MGEPAGVAGTMESPFPGLFHRLEDEWDSALFAELGYFTDTDELQLEA-ANET	52		
<i>M. musculus</i>	-----MESPFSPVLPHPGDEWESTLFAELGYFTDTDDVHFDA-AHEA	42		
<i>R. norvegicus</i>	-----MESPFSPVLPHPGDEWESTLFAELGYFTDTDDVQFDA-AHET	42		
	VN8			
<i>D. rerio</i>	YDTSVPDLNFGTEQPAWSSDGWRETSRPSRD--GDVTVDLSLENHTFSVSSPASVEPQS	114		
<i>O. latipes</i>	YVTEGPDLEDFDIDIPQWSEGV---GSTCTD--GGVSEDSLSLPAHTFSSVSPSSVEALS	114		
<i>X. tropicalis</i>	YGNHFDNLDLNDMLMANTCPWDVPGDVIK-----LDPLSPSSISSVSPSSVDSL	107		
<i>H. sapiens</i>	YENNFDNLDLFDLDMFWESDIWDINNIQICTVKDIKAEPQLSPASSSSVSSPRSDYS	112		
<i>M. musculus</i>	YENNFDNLDLFDLDMFWESDLWSPGSHFCS--DMKAEPQLSPASSSSVSSPRSDTDCS	100		
<i>R. norvegicus</i>	YENNFDNLDLFDLDMFWESDIWSPSHFCS--DIKAEPQLSPASSSSVSSPRSDTDCS	100		
<i>D. rerio</i>	PYSTHDEALSPDSWRSHPSPLSVCSDSGGFTEA---PNEKKPSKRTNQTAKPLQPAKR	171		
<i>O. latipes</i>	PYSSQDEALSPQ---QQSPSLVCSDSGGFSEV---SPPEKKV-AKRTTKATQAQPLRRP	167		
<i>X. tropicalis</i>	SSSQFVPEDSD-VSSSQSPSISLSDCSKSPKSPD-FPEEKPLISARQ--TTGSIPTQRKL	163		
<i>H. sapiens</i>	STQ-HVPEELDLSSSQSPSISLSDCSKSPKSPD-FPEEKPLISARQ--TTGSIPTQRKL	170		
<i>M. musculus</i>	STQ-HVPEELDLSSSQSPSISLSDCSKSPKSPD-FPEEKPLISARQ--TTGSIPTQRKL	157		
<i>R. norvegicus</i>	STQ-HVPEELDLSSSQSPSISLSDCSKSPKSPD-FPEEKPLISARQ--TTGSIPTQRKL	157		
<i>D. rerio</i>	IQVCPKVSQPKPIIT-AVPISRPAAPLQ-TKTIIDPLQATVLPVVKPPVTTQPAFPTG	229		
<i>O. latipes</i>	IQTGPKISQPKPVIT-AMPLAPTPATLQPKTIIDPLQATVLPVVKPPVTTQPAFPTG	226		
<i>X. tropicalis</i>	PPVVKPKSQPKPIITPATADIQASATVAPKTIIDPLQATVLPVVKPPVTTQPAFPTG	221		
<i>H. sapiens</i>	IQVNSKPSQPKPELLLPAAPKTQTNSSVPAKTIIDPLQATVLPVVKPPVTTQPAFPTG	230		
<i>M. musculus</i>	IQMSSKPSQPKPELLLPAAPKTQTNASVPAKTIIDPLQATVLPVVKPPVTTQPAFPTG	217		
<i>R. norvegicus</i>	IQMSSKPSQPKPELLLPAAPKTQTNASVPAKTIIDPLQATVLPVVKPPVTTQPAFPTG	217		
<i>D. rerio</i>	QLMQLPQPTQVLOLQTPQSMPT-----RVVTMPALAQDRPISLVAPV-----	271		
<i>O. latipes</i>	PSIVLSQPSQLLOIQTPQASISG-----GVVAMTTLSQDRPVSAAP-----	267		
<i>X. tropicalis</i>	QPVLAPSTV-VQLPASGIVTT-QQVLTVGGGTATIPSSMN---ILTPTV---PQCAKM	273		
<i>H. sapiens</i>	QTVLSSQPTV-VQLQAPGVLPSAQPVLAVAGGVTLQPNHVVN---VVPAPSANSPVNGKL	286		
<i>M. musculus</i>	QTVLSSQPTV-VQLQSPAVLSSAQPVLAVTGGAQLQPNHVVN---VLPAPVSSPVNGKL	273		
<i>R. norvegicus</i>	QTVLSSQPAV-VQLQTPGVLPSAQPVLAVTGGAQLQPNHVVN---VVPAPVSSPVNGKL	273		
	bZIP-Domäne			
<i>D. rerio</i>	-TTSFVVTMTLQNSTPDDSNASRRQORMIKNRESASLSRKKKKEYLMTLETRLKIALTE	330		
<i>O. latipes</i>	---PLVSVQLCSPSSDDSKLSQRQORMIKNRESASLSRKKKKEYLMLLEARLKVALSE	323		
<i>X. tropicalis</i>	SPVKPVMPTSVQSVDSGTINVLRRQORMIKNRESAFQSRKKKKEYMQTLEARLRVALSE	333		
<i>H. sapiens</i>	SVTKPVLQSTMR--NVGSDIAVLRQORMIKNRESACQSRKKKKEYMLGLEARLKAALSE	344		
<i>M. musculus</i>	SVTKPVLQSATR--SMGSDIAVLRQORMIKNRESACQSRKKKKEYMLGLEARLKAALSE	331		
<i>R. norvegicus</i>	CVTKPVLQSSSTR--STGSDIAVLRQORMIKNRESACQSRKKKKEYMLGLEARLKAALSE	331		
	bZIP-Domäne	TM	S2P	
<i>D. rerio</i>	NEKLNENGLKROVEGLMSENVLKATAPKRRAVCLMVLVFLVNVNLCGMSLGGDRGS			390
<i>O. latipes</i>	NBVLKSENGNKKQLEGLSENIVLKATAPKRRAVCLMVLVFLVNVNLCGMSLGGDRGS			383
<i>X. tropicalis</i>	NBRLKKNGLKQKLEEVVTENQKLVKATAPKRRAVCLMVAALLLNLFNLSLSEKPGS			393
<i>H. sapiens</i>	NBQLKKNGLKQKLEEVVTENQKLVKATAPKRRAVCLMVAALLLNLFNLSLSEKPGS			404
<i>M. musculus</i>	NBQLKKNGLKQKLEEVVTENQKLVKATAPKRRAVCLMVAALLLNLFNLSLSEKPGS			391
<i>R. norvegicus</i>	NBQLKKNGLKQKLEEVVTENQKLVKATAPKRRAVCLMVAALLLNLFNLSLSEKPGS			391
	S1P	GLS1/BIP		
<i>D. rerio</i>	AFPATPV-FNGRHLLGFSPESERN-LDKPQTPSNTVDRLEEGVSEQKALMVVKD-PLYF		447	
<i>O. latipes</i>	SLEVAPMQHSGRHLLGFSSEAVTEGVTDPQ--GNA-HSGAADSPPGRKALMVVKD-PVFL		439	
<i>X. tropicalis</i>	YDVEVSPIRHNRHLLGFSASDENVEA--QKV---PDNTRNDRYISNEKALMVVKEPLLYI		448	
<i>H. sapiens</i>	MNPSVSPANQRHLLGFSAKEAQTSDGI IQ---KNSYRYDHSVSNDKALMVLTEEPFLY		461	
<i>M. musculus</i>	VKPSVSPANQRHLLGFSAKEVKDTSDDGNQ---KDSYSYDHSVSNDKALMVLSEEPFLY		448	
<i>R. norvegicus</i>	VKPSVSPANQRHLLGFSAKEVKDTSDDGNQ---KNSYRYDHSVSNDKALMVLSEEPFLY		448	
	Cys1	GLS2/BIP	BIP	
<i>D. rerio</i>	RTPPPCQFPVNRKCIKIAHELRGWWHRHEVERTKSRRTNSQHRGRTFM-K---ASSKQ			503
<i>O. latipes</i>	RPPPCQFPVNRKCIKIAHELRGWWHRHEVERTKSRRTNSQHRGRTFM-K---ASSKQ			499
<i>X. tropicalis</i>	QPPPCQFPVNRKCIKIAHELRGWWHRHEVERTKSRRTNSQHRGRTFM-K---ASSKQ			499
<i>H. sapiens</i>	IPPPCQFPVNRKCIKIAHELRGWWHRHEVERTKSRRTNSQHRGRTFM-K---ASSKQ			516
<i>M. musculus</i>	MPPPCQFPVNRKCIKIAHELRGWWHRHEVERTKSRRTNSQHRGRTFM-K---ASSKQ			503
<i>R. norvegicus</i>	IPPPCQFPVNRKCIKIAHELRGWWHRHEVERTKSRRTNSQHRGRTFM-K---ASSKQ			503
	BIP			
<i>D. rerio</i>	ADVPOIMSQIQYTD--SEKNPGELOVYAPHRTYNDFDELNRGDTFYVVSFRRDHL	561		
<i>O. latipes</i>	AESAQIVTVPYTGTT--EGRNPGSELQVYAPKHYSDFDELNRGDTFYVVSFRRDHL	557		
<i>X. tropicalis</i>	SGNSELVMTQYTDTS---IRNSNELQVYYSRPSYDFEFAIRRRGDTFYVVSFRRDHL	555		
<i>H. sapiens</i>	GSNSQLMAVQYTTETSSISRNSGSELQVYASPRSYDFEFAIRRRGDTFYVVSFRRDHL	576		
<i>M. musculus</i>	GSNSQLMAVQYTTETSSISRNSGSELQVYASPRSYDFEFAIRRRGDTFYVVSFRRDHL	562		
<i>R. norvegicus</i>	GSNSQLMAVQYTTETSSISRNSGSELQVYASPRSYDFEFAIRRRGDTFYVVSFRRDHL	562		
	Cys2			
<i>D. rerio</i>	LLPATNHNKGRPKMSVLPAMNINDEIKDKDYVMMQIDCQVMDTRILHKSSSIPPI	621		
<i>O. latipes</i>	LLPATNHNKGRPKMSVLPAMNINDEIKDKDYVMMQIDCQVMDTRILHKSSSIPPI	617		
<i>X. tropicalis</i>	LLPATNHNKGRPKMSVLPAMNINDEIKDKDYVMMQIDCQVMDTRILHKSSSIPPI	615		
<i>H. sapiens</i>	LLPATNHNKGRPKMSVLPAMNINDEIKDKDYVMMQIDCQVMDTRILHKSSSIPPI	636		
<i>M. musculus</i>	LLPATNHNKGRPKMSVLPAMNINDEIKDKDYVMMQIDCQVMDTRILHKSSSIPPI	622		
<i>R. norvegicus</i>	LLPATNHNKGRPKMSVLPAMNINDEIKDKDYVMMQIDCQVMDTRILHKSSSIPPI	622		
<i>D. rerio</i>	LRVNQTE-TSSFYHATPSNQPAAVGVLVGSS-	653		
<i>O. latipes</i>	LRVND-----TFYQHSSTDTKAPPPVGVLVGSA-	645		
<i>X. tropicalis</i>	LRHRENTNSFYNSPTSGPEAQQVSAI----	644		
<i>H. sapiens</i>	LRDQQRNQTNTEFGSPPAATEATHVSTIPESLQ	670		
<i>M. musculus</i>	LRDHQRNQTNTEFGSPPTTETTHVSTIPESLQ	656		
<i>R. norvegicus</i>	LRDHQRNQTNTEFGSPPTATETTHVSTIPESVQ	656		

**B**

<i>D. rerio</i>		62,30	42,46	44,23	44,05	44,53
<i>O. latipes</i>	62,30		42,11	42,63	43,14	43,79
<i>X. tropicalis</i>	42,46	42,11		54,46	53,50	53,18
<i>H. sapiens</i>	44,23	42,63	54,46		86,74	88,11
<i>M. musculus</i>	44,05	43,14	53,50	86,74		95,27
<i>R. norvegicus</i>	44,53	43,79	53,18	88,11	95,27	

**Abbildung S2: Vergleich der ATF6-Proteinsequenz. (A) Pairwise Alignment** der ATF6-Aminosäure-Sequenz des Spezies *D. rerio*, *O. latipes*, *X. tropicalis*, *H. sapiens*, *M. musculus*, *R. norvegicus*. **(B)** Matrix zur Übersicht der Sequenzidentitäten von ATF6 zwischen den einzelnen Spezies.

### 11.3. Übersicht der evaluierten anti-ATF6/Atf6-Antikörper

Um ATF6/Atf6 in der Retina zu lokalisieren, wurden insgesamt 54 anti-ATF6/Atf6-Antikörper mittels Western Blot, Immunocytochemie und Immunhistochemie evaluiert. Epitope (sofern bekannt), Herkunft, *species reactivity*, sowie die Ergebnisse der einzelnen Evaluationsschritte jedes getesteten Antikörpers sind in Tabelle S1 gelistet. Falsch positiv getestete Antikörper sind hellgrau unterlegt.

**Tabelle S1: Übersicht aller getesteter Antikörper gegen das humane, das murine und das Zebrafisch-ATF6-Protein**

Kommerziell erhältliche Antikörper gegen ATF6						
Produktdaten						
Name	Herkunft	Epitop	species reactivity	Western Blot (Lysate: HEK293T-Zellen mit humanem und murinem ATF6 transfiziert)	Immunocytochemie (HEK293T-Zellen mit humanem und murinem ATF6 transfiziert)	Immunocytochemie (WT- und <i>atf6</i> -Patienten-Fibroblasten bzw. WT- und <i>atf6</i> -MEFs)
ab37149	Abcam	Humanes ATF6 (N-terminal). 17 Aminosäuren zwischen Aminosäuren 25-75	Mensch, Maus	Altes LOT: spezifische Bande, bei 90 kDa und 50 kDa Neues LOT: unspezifisch	Altes LOT: unspezifisch, Neues LOT: unspezifisch	Altes LOT: X Neues LOT: X
ab62576	Abcam	Humanes ATF6 (C-Terminal). 16 Aminosäuren nahe des C-Terminus	Mensch, Maus	unspezifisch	X	unspezifisch
ab11909	Abcam	-	Mensch, Maus, Ratte, Hase, Hamster	unspezifisch	unspezifisch	unspezifisch / X
ab65838	Abcam	Humanes ATF6 (N-terminal).	Mensch, Maus, Ratte	unspezifisch	X	X
IMG-273	Imgenex	Humanes ATF6 (N-terminal).	Mensch, Maus, Ratte, Hase, Hamster	unspezifisch	unspezifisch	unspezifisch / X
PA.5-20215	Thermo-Fisher	Humanes ATF6 (C-Terminal). 16 Aminosäuren nahe des C-Terminus	Mensch, Maus	X	-	-
HPA005935	Sigma-Aldrich	Humanes ATF6 (C-Terminal). 125 Aminosäuren nahe des C-Terminus	Mensch	Spezifische Bande bei falscher Lauflänge	Spezifische Färbung in mit hATF6 transfizierten Zellen	-
<b>Kunden-spezifische Antikörper gegen humanes ATF6</b>						
Produktdaten						
Name	Herkunft	Epitop	species reactivity	Western Blot (Lysate: HEK293T-Zellen mit humanem ATF6 transfiziert)	Immunocytochemie (HEK293T-Zellen mit humanem ATF6 transfiziert)	Immunocytochemie (WT- und <i>atf6</i> -Patienten-Fibroblasten)
I 5236-14/C216	Abmart	NQRLKVPSPKRR	Mensch	unspezifisch	unspezifisch / X	X
						Immunhistochemie (murine retinale Schnitte)

Fortsetzung Tabelle S1: Übersicht aller getesteter Antikörper gegen das humane, das murine und das Zebrafisch-Atf6-Protein

Name	Herkunft	Epitop	species reactivity	Evaluationsmethode			
				Western Blot (Lysate: HEK293 T-Zellen mit humanem ATF6 ATF6 transfiziert)	Immunocytochemie (HEK293 T-Zellen mit humanem ATF6 transfiziert)	Immunocytochemie (WT- und atf6-Patienten-Fibroblasten)	Immunhistochemie
15236-13/C46	Abmart	PVNGKLSVTKP V	Mensch	unspezi fisch	starke Färbung	X	-
15236-13/C432	Abmart	PVNGKLSVTKP V	Mensch	X	schwache Färbung	X	-
15236-12/C179	Abmart	SSTQHVPEELDL	Mensch	unspezi fisch	schwache Färbung	X	-
15236-17/C362	Abmart	QGALEQGSNSQL	Mensch	unspezi fisch	schwache Färbung	X	-
15236-1-5/C5	Abmart	QPLINTTESLRL	Mensch	X	schwache Färbung	X	-
ATFHA (Klon 29D4)	Helmholtz Institut München	ERTKSRRTMTNNQKKT	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHA (Klon 29BI)	Helmholtz Institut München	ERTKSRRTMTNNQKKT	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATF6HA (Klon 37F7)	Helmholtz Institut München	ERTKSRRTMTNNQKKT	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHB (Klon 6C10)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNK TEN	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHB (Klon24F11)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNK TENG	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHB (Klon5H5)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNK TENG	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHB (Klon12A3)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNK TENG	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHB (Klon23G11)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNK TENG	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHB (Klon9B8)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNK TENG	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHB (Klon22A10)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNK TENG	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHB (Klon10C4)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNK TENG	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHB (Klon7D10)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNK TENG	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHB (Klon16C12)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNK TENG	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHB (Klon12F10)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNK TENG	Mensch	unspezi fisch	X	-	-
ATFHB (Klon7H8)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNK TENG	Mensch	unspezi fisch	X	-	-

Fortsetzung Tabelle S1: Übersicht aller getesteter Antikörper gegen das humane, das murine und das Zebrafisch-Aff6-Protein							
Produktangaben			Evaluationsmethode				
Name	Herkunft	Epitop	species reactivity	Western Blot (Lysate: HEK293T-Zellen mit humanem ATF6 transfiziert )	Immunocytochemie (HEK293T-Zellen mit humanem ATF6 transfiziert)	Immunocytochemie (WT- und <i>atf6</i> -Patienten-Fibroblasten)	Immunhistochemie
ATFHB (Klon4F3)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNKTEENG	Mensch	unspezifisch	X	-	-
ATFHB (Klon19B2)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNKTEENG	Mensch	unspezifisch	X	-	-
ATFHB (Klon14G9)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNKTEENG	Mensch	unspezifisch	X	-	-
ATFHB (Klon29E12)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNKTEENG	Mensch	unspezifisch	X	-	-
ATFHB (Klon15A8)	Helmholtz Institut München	DKPVTGPRNKTEENG	Mensch	X	X	-	-
Kunden-spezifische Antikörper gegen murines ATF6							
Produktangaben			Evaluationsmethode				
Name	Herkunft	Epitop	species reactivity	Western Blot (Lysate: HEK293T-Zellen mit murinem ATF6 transfiziert )	Immunocytochemie (HEK293T-Zellen mit murinem ATF6 transfiziert)	Immunocytochemie (WT- und <i>atf6</i> -MEFs)	Immunhistochemie (murine retinale Schnitte)
22075-119/P11	Abmart	ETTSISRNSGSE	Maus	Schwache spezifische Bande	unspezifisch	X	-
22075-1-18/P9	Abmart	SAKEVKDTSDDG	Maus	Schwache spezifische Bande	unspezifisch	X	-
22075-1-17/P8	Abmart	LEQESRRVKPSV	Maus	unspezifisch	unspezifisch	X	-
22075-1-16/P7	Abmart	LSENEOLKKENG	Maus	unspezifisch	unspezifisch	unspezifisch	X
22075-1-15/P6	Abmart	PALMPLAKOOSI	Maus	unspezifisch	unspezifisch	unspezifisch	X
22075-1-13/P5	Abmart	PALMPLAKQOSI	Maus	unspezifisch	unspezifisch	X	-
22075-1-13/P4	Abmart	GNKTEHGLTPKK	Maus	unspezifisch	unspezifisch	X	-
22075-1-13/P3	Abmart	GNKTEHGLTPKK	Maus	Schwache spezifische Bande	unspezifisch	X	-
22075-1-12/P2	Abmart	KEEKPVTGPGNIK	Maus	Schwache spezifische Bande	Schwache spezifische Färbung	unspezifisch	X
22075-1-11/P2	Abmart	NSPSSVEPLKEE	Maus	unspezifisch	unspezifisch	X	-
22075-1-6/C1	Abmart	LSENEOLKKENG	Maus	unspezifisch	unspezifisch	X	-
22075-1-6/C1B	Abmart	LSENEOLKKENG	Maus	unspezifisch	unspezifisch	unspezifisch / X	X

**Fortsetzung Tabelle S1: Übersicht aller getesteter Antikörper gegen das humane, das murine und das Zebrafisch-Atf6-Protein  
Kunden-spezifische Antikörper gegen Zebrafisch-Atf6**

Name	Herkunft	Epitop	species reactivity	Evaluationsmethode				
				Western Blot (Lysate: HEK293T- Zellen mit Zebrafisch-Atf6 transfiziert )	Immuncytochemie (HEK293T-Zellen mit Zebrafisch-Atf6 transfiziert)	Immunistochemie (whole mount Zebrafischlarven)	Immunistochemie (Schnitte der adulten Zebrafischretina)	
ATFDB (Klon 10B2)	Helmholtz Institut München	SDGWRETSSPRSDGD	Zebrafisch	X	X	X	X	
ATFDB (Klon 36D12)	Helmholtz Institut München	SDGWRETSSPRSDGD	Zebrafisch	X	X	X	X	
ATFDC (Klon 34A11)	Helmholtz Institut München	ESERNLDKPKQTDPSN	Zebrafisch	unspezifisch	X	X	X	
ATFDC (Klon 28G11)	Helmholtz Institut München	ESERNLDKPKQTDPSN	Zebrafisch	unspezifisch	X	X	X	
ATFDC (Klon 34E12)	Helmholtz Institut München	ESERNLDKPKQTDPSN	Zebrafisch	unspezifisch	schwache Färbung	X	X	
ATFDC (Klon 37C7)	Helmholtz Institut München	ESERNLDKPKQTDPSN	Zebrafisch	unspezifisch	schwache Färbung	X	X	
ATFDA (Klon 37F5)	Helmholtz Institut München	APNEKPSKRTNQTK	Zebrafisch	unspezifisch	unspezifisch / X	-	-	
ATFDA (Klon 9D10)	Helmholtz Institut München	ESERNLDKPKQTDPSN	Zebrafisch	X	X	-	-	
ATFDC (Klon 14H7)	Helmholtz Institut München	ESERNLDKPKQTDPSN	Zebrafisch	X	X	-	-	

X: kein detektierbares Signal; -: nicht getestet

## 11.4. NCBI-Referenzsequenzen

**Tabelle S2: Genbezeichnungen verschiedener UPR-Komponenten sowie deren Funktion im humanen und im Zebrafischgenom**

<b>Genname (human)</b>	<b>NCBI-Referenzsequenz (human)</b>	<b>Genname (Zebrafisch)</b>	<b>NCBI-Referenzsequenz (Zebrafisch)</b>
<i>HSPA5(BiP/GRP78)</i>	NM_005347.5	<i>hspa5</i>	NM_213058.1
<i>HSP90B1(GRP94)</i>	NM_003299.3	<i>hsp90b1</i>	NM_198210.2
<i>ATF6<math>\beta</math></i>	NM_004381.5	<i>atf6<math>\beta</math></i>	NM_001077720.1
<i>ERN1 (IRE1)</i>	NM_001433.5	<i>ern1</i>	NM_001020530.1
<i>PERK(EIF2AK3)</i>	NM_001313915.1	<i>eif2ak3</i>	XM_005156585.3
<i>EDEM1</i>	NM_014674.3	<i>edem1</i>	NM_201189.2
<i>DDIT3 (CHOP)</i>	NM_001195056.1	<i>ddit3</i>	NM_001082825.1
<i>ERO1<math>\beta</math></i>	NM_019891.3	<i>ero1<math>\beta</math></i>	NM_001076638.1
<i>PDIA3</i>	NM_005313.5	<i>pdia3</i>	NM_001199737.1

## 11.5. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikro-Liter
µM	Mikro-Molar
µm	Mikro-Meter
µS	Mikro-Sievert
aa	Aminosäureposition
ACHM	Achromatopsie
AC	Amakrinzelle
ATF6	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6
ATF6β	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6β
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BC	Bipolarzelle
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bZiP	Basischer Leuzinzipper
bzw.	beziehungsweise
c	komplementär
ca.	circa
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Chr.	Chromosom
CMZ	<i>Ciliary marginal zone</i> ,
CNG	<i>Cyclic nucleotid gated</i> , zyklisch Nukleotid-gesteuert
COPII	<i>Coat protein complex II</i> , Mantelproteinkomplex II
cRNA	Komplementäre Ribonukleinsäure
CS	<i>cleavage site</i> , Schnittstelle
Cys	Cystein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4'6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH	Deutsche Härte
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxygenin
ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxyribonukleotidphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
dpf	<i>Days post fertilization</i> , Tage nach Befruchtung
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER associated degradation</i> , Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradation
ERG	Elektroretinogramm
ERSE	<i>ER-stress response elements</i>
fs	<i>Frameshift</i>
g	Gramm
GC	Ganglionzelle
GCL	Ganglionzellschicht
GLS	Golgi-Lokalisations-Sequenz
GRP78/BiP	<i>Glucose related protein 78</i>
h	Stunde
HC	Horizontalzelle

---

hESC	<i>Human embryonic stem cell</i> , humane embryonale Stammzelle
hpf	<i>Hours post fertilization</i> , Stunden nach Befruchtung
<i>hsp90b1</i>	<i>Heat shock protein 90 b1</i> , Hitzeschockprotein 90 b1
<i>hspa5</i>	<i>Heat shock protein 5</i> , Hitzeschockprotein 5
INL	<i>Inner nuclear layer</i>
IPL	<i>Inner plexiform layer</i>
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cell</i> , induzierte pluripotente Stammzelle
IRE1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
ISH	<i>In-situ-Hybridisierung</i>
kb	Kilobase (= '1000 bp')
M	Molar
m	Milli
MC	Müllergliazelle
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i> , Fibroblasten aus Mäuse-Embryonen
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mpf	<i>Month post fertilization</i> , Monate nach Befruchtung
mRNA	<i>Messenger RNA</i> , Boten-RNA
n	Anzahl der untersuchten Individuen
NF-Y	<i>Nuclear transcription factor Y</i> , Kerntranskriptionsfaktor Y
ng	Nanogramm
NGS	<i>Normal goat serum</i>
nm	Nanometer
NMD	<i>non-sense mediated mRNA decay</i>
NO	Stickstoffmonoxid
nxg	n-fache Erdbeschleunigung
OCT	Optische Kohärenztomographie
ONL	<i>Outer nuclear layer</i>
OPL	<i>Outer plexiform layer</i>
ORF	Offenes Leseraster
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphatpuffer-Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PERK	Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PFA	Paraformaldehyd
PNA	<i>peanut agglutinin</i>
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RE	Restriktionsenzym
RFLP	Restriktionsenzym-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	<i>rounds per minute</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
RSC	<i>Retinal stem cell</i> , retinale Stammzelle
RPC	<i>retinal progenitor cell</i> , retinal Vorläuferzelle
sek	Sekunde
SD	Standardabweichung
SERCA	Sarco/Endoplasmatische Retikulum-Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SSC	<i>Saline-sodium citrate</i>
TALEN	<i>Transcription activator like effector nuclease</i>
TM	Transmembrandomäne
Tm	Tunicamycin

TUE	Tübingen (Wildtyp-Zebrafischlinie)
U	<i>Unit</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
zf	Zebrafisch
ZNS	Zentralnervensystem

## 11.6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Die verschiedenen UPR-Signalwege der Zelle	<b>2</b>
<b>Abbildung 2:</b>	Schematische Darstellung des ATF6 Proteins und dessen Aktivierung	<b>5</b>
<b>Abbildung 3:</b>	Spektrum der ACHM-assoziierten Gene	<b>12</b>
<b>Abbildung 4:</b>	Funktionelle Klassifikation der ACHM-assoziierten <i>ATF6</i> -Mutationen	<b>13</b>
<b>Abbildung 5:</b>	Schematische Darstellung der unterschiedlichen Photorezeptor-Typen und deren Anordnung in der humanen Retina	<b>17</b>
<b>Abbildung 6:</b>	Schematische Darstellung der unterschiedlichen Photorezeptortypen in der Zebrafischretina	<b>19</b>
<b>Abbildung 7:</b>	Schematische Darstellung der an die DNA gebundenen TALEN-Fusionsproteine	<b>58</b>
<b>Abbildung 8:</b>	Übersicht über die Klonierung eines TALEN-Konstruktes	<b>60</b>
<b>Abbildung 9:</b>	Schematische Darstellung der RFLP-Analyse	<b>65</b>
<b>Abbildung 10:</b>	Schematische Darstellung einer gerichteten Klonierung	<b>68</b>
<b>Abbildung 11:</b>	Exemplarische Amplifikationskurve einer qRT-PCR	<b>70</b>
<b>Abbildung 12:</b>	Aufbau des Messstandes zur ERG-Messung an Zebrafischlarven	<b>83</b>
<b>Abbildung 13:</b>	Vorgehensweise zur Ausrichtung der Gewebeblöckchen zur Anfertigung von Gefrierschnitten	<b>92</b>
<b>Abbildung 14:</b>	Auszählungen und Messungen in der adulten bzw. Larven-Retina	<b>97</b>
<b>Abbildung 15:</b>	<i>Pairwise</i> Alignment des humanen ( <i>H. sapiens</i> ) und des Zebrafisch ( <i>D. rerio</i> ) ATF6-Proteins	<b>100</b>
<b>Abbildung 16:</b>	Übersicht der <i>atf6</i> -Expression in Zebrafischlarven- und der adulten Zebrafischretina	<b>101</b>
<b>Abbildung 17:</b>	Lokalisation von <i>atf6</i> in der larvalen Zebrafischretina	<b>102</b>
<b>Abbildung 18:</b>	Lage der ausgewählten TALEN-Paare in <i>atf6</i>	<b>104</b>
<b>Abbildung 19:</b>	Toxizität der getesteten TALEN-Paare bei unterschiedlichen Injektionsmengen	<b>105</b>
<b>Abbildung 20:</b>	Editierungseffizienz der getesteten TALEN-Paare	<b>106</b>
<b>Abbildung 21:</b>	Spektrum der somatischen Mutationsrate	<b>107</b>
<b>Abbildung 22:</b>	Übersicht der transmittierten Deletionen der <i>Founder</i> -Kandidaten	<b>108</b>
<b>Abbildung 23:</b>	Verifizierung der homozygot vorliegenden 1 bp-Deletion in der F1-Generation	<b>109</b>

<b>Abbildung 24:</b>	Detektion von <i>atf6</i> in WT- und <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafischlarven mittels ISH	<b>110</b>
<b>Abbildung 25:</b>	Vermessung des retinalen Umfangs in Zebrafischlarven	<b>111</b>
<b>Abbildung 26:</b>	Untersuchung der Rotzapfen-Außensegmente in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten Zebrafischretinae	<b>113</b>
<b>Abbildung 27:</b>	Untersuchung der Grünzapfen-Außensegmente in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten Zebrafischretinae	<b>115</b>
<b>Abbildung 28:</b>	Morphologie der Rot- und Grünzapfen in der sich entwickelnden Retina von WT- und <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafischlarven	<b>117</b>
<b>Abbildung 29:</b>	Morphologie der Stäbchen-Photorezeptoren in der sich entwickelnden Retina von WT- und <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafischlarven	<b>118</b>
<b>Abbildung 30:</b>	Untersuchung der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten Zebrafischlarven	<b>120</b>
<b>Abbildung 31:</b>	Untersuchung der Ganglienzellen in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten Zebrafischretinae	<b>121</b>
<b>Abbildung 32:</b>	Untersuchung der Rot- und Grünzapfen in der adulten <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> - und WT-Zebrafischretina	<b>123</b>
<b>Abbildung 33:</b>	Untersuchung der Bipolar- und Ganglienzellen in der adulten <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> - und WT-Zebrafischretina	<b>124</b>
<b>Abbildung 34:</b>	Untersuchung der Proliferation in <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> - und WT-Zebrafischretinae	<b>125</b>
<b>Abbildung 35:</b>	Untersuchung der Caspase-3 vermittelten Apoptose in der <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> - und WT-Zebrafischretina mittels immunhistologischer Färbungen	<b>127</b>
<b>Abbildung 36:</b>	Detektion sterbender Zellen in der <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> - und WT-Zebrafischretina mithilfe des TUNEL-Assays	<b>128</b>
<b>Abbildung 37:</b>	Übersicht der b-Wellenamplituden der ERG-Messungen in <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafischlarven im Vergleich zu WT-Larven	<b>129</b>
<b>Abbildung 38:</b>	ISH zur Detektion der <i>atf6</i> -Zielgene targets <i>hspa5</i> und <i>hsp90b1</i> sowie gegen <i>atf6<math>\beta</math></i> in 3 dpf alten Zebrafischlarven	<b>131</b>
<b>Abbildung 39:</b>	ISH zur Detektion der <i>atf6</i> -Zielgene <i>hspa5</i> und <i>hsp90b1</i> sowie gegen <i>atf6<math>\beta</math></i> in 5 dpf alten Zebrafischlarven	<b>133</b>
<b>Abbildung 40:</b>	Untersuchung der Rot- und Grünzapfen-Außensegmente in 3 dpf und 5 dpf alten Zebrafischlarven nach 48 h Tunicamycin-Behandlung	<b>138</b>
<b>Abbildung 41:</b>	Untersuchung der PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen in Tunicamycin-behandelten 3 dpf und 5 dpf alten Zebrafischretinae	<b>140</b>
<b>Abbildung 42:</b>	Untersuchung der Ganglienzellen in Tunicamycin-behandelten 3 dpf und 5 dpf alten Zebrafischretinae	<b>142</b>

<b>Abbildung 43:</b>	Untersuchung der Proliferation und des Zelltods in Tunicamycin-behandelten 3 dpf und 5 dpf alten Zebrafischretinae	<b>143</b>
<b>Abbildung 44:</b>	Schematische Darstellung der Expression von <i>atf6</i> sowie der <i>atf6</i> -Zielgene <i>hspa5</i> und <i>hsp90b1</i>	<b>148</b>
<b>Abbildung S1</b>	Absolute Quantifizierung der (A) Rotzapfen, (B) Grünzapfen (C) PKC $\alpha$ -positiven Bipolarzellen und (D) Ganglienzellen in 3 dpf, 5 dpf und 15 dpf alten WT- und <i>atf6</i> -defizienten Zebrafischretina	<b>197</b>
<b>Abbildung S2</b>	Vergleich der ATF6-Proteinsequenz	<b>198</b>

## 11.7. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Verwendete Standardvektoren	<b>35</b>
<b>Tabelle 2:</b>	Vektoren der TALEN-Toolbox	<b>35</b>
<b>Tabelle 3:</b>	Verwendete Erstantikörper für immunhistologische Färbungen und ISH	<b>35</b>
<b>Tabelle 4:</b>	Verwendete Zweitantikörper für immunhistologische Färbungen	<b>36</b>
<b>Tabelle 5:</b>	Standardprimer	<b>37</b>
<b>Tabelle 6:</b>	TALEN Toolbox-Primer	<b>37</b>
<b>Tabelle 7:</b>	TALEN Screening-Primer	<b>38</b>
<b>Tabelle 8:</b>	Primer zur Klonierung der ISH-Sonden unterschiedlicher Zebrafisch-Gene	<b>38</b>
<b>Tabelle 9:</b>	Klonierungsprimer und <i>in vitro</i> -Mutagenese-Primer zur Generierung der unterschiedlichen ATF6-Expressionskonstrukte	<b>39</b>
<b>Tabelle 10:</b>	Sequenzierprimer der unterschiedlichen ATF6-Sequenzen (human, murin, Zebrafisch)	<b>39</b>
<b>Tabelle 11:</b>	qRT-PCR Primer für Referenzgene im Zebrafisch	<b>39</b>
<b>Tabelle 12:</b>	qRT-PCR Primer der unterschiedlichen Zebrafisch-UPR Gene	<b>39</b>
<b>Tabelle 13:</b>	Verwendete Zebrafischlinien ( <i>Danio rerio</i> )	<b>40</b>
<b>Tabelle 14:</b>	Verwendete Zell-Linien	<b>41</b>
<b>Tabelle 15:</b>	Verwendete Software	<b>45</b>
<b>Tabelle 16:</b>	<i>Cycling</i> -Protokoll einer Standard-PCR	<b>50</b>
<b>Tabelle 17:</b>	<i>Cycling</i> -Protokoll einer <i>Proofreading</i> -PCR	<b>50</b>
<b>Tabelle 18:</b>	<i>Cycling</i> -Protokoll einer Kolonie-PCR für Kolonie-PCR-Produkte $\leq 1$ kb	<b>51</b>
<b>Tabelle 19:</b>	<i>Cycling</i> -Protokoll für Kolonie-PCR-Produkte $>1$ kb	<b>52</b>
<b>Tabelle 20:</b>	<i>Cycling</i> -Protokoll einer Sequenzier-PCR	<b>55</b>
<b>Tabelle 21:</b>	<i>Cycling</i> -Protokoll der Monomergenerierung	<b>61</b>
<b>Tabelle 22:</b>	<i>Cycling</i> -Protokoll zur Hexamer-Amplifizierung	<b>63</b>
<b>Tabelle 23:</b>	Primer und Restriktionsenzyme für die PCR/RFLP-Analysen	<b>66</b>
<b>Tabelle 24:</b>	Verwendete Expressionsvektoren und Restriktionsenzyme zur Generierung der unterschiedlichen ATF6-Expressionskonstrukte	<b>68</b>
<b>Tabelle 25:</b>	<i>Cycling</i> -Protokoll einer IVM-PCR	<b>69</b>

<b>Tabelle 26:</b>	qRT-PCR- <i>Cycling</i> -Protokoll	<b>72</b>
<b>Tabelle 27:</b>	Pipettierschema zur Erstellung einer BSA-Standardkurve für den Bradford-Assay	<b>76</b>
<b>Tabelle 28:</b>	Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele	<b>76</b>
<b>Tabelle 29:</b>	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot	<b>77</b>
<b>Tabelle 30:</b>	Übersicht der klonierten cDNA-Fragmente und Restriktionsenzyme für die Generierung der ISH-Sonden-Konstrukte	<b>86</b>
<b>Tabelle 31:</b>	Übersicht der verwendeten Antikörper und Blockierlösungen	<b>93</b>
<b>Tabelle 32:</b>	Übersicht der für die DAB-Färbung verwendeten Antikörper	<b>94</b>
<b>Tabelle 33:</b>	Vergleich des Zebrafisch <i>atf6</i> mit dem humanen Ortholog <i>ATF6</i>	<b>99</b>
<b>Tabelle 34:</b>	Zielsequenzen der TALEN gegen Zebrafisch- <i>atf6</i>	<b>104</b>
<b>Tabelle 35:</b>	Übersicht der potentiellen <i>Founder</i> -Fische	<b>107</b>
<b>Tabelle 36:</b>	Quantifizierung der relativen Expression von <i>atf6</i> in <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafischen im Vergleich zu WT-Fischen zur Verifizierung des <i>atf6</i> - <i>knockouts</i>	<b>110</b>
<b>Tabelle 37:</b>	Gen- und Proteinbezeichnungen verschiedener UPR-Komponenten, sowie deren Funktion in Mensch und Zebrafisch	<b>130</b>
<b>Tabelle 38:</b>	Quantifizierung der relativen Expression unterschiedlicher UPR-Komponenten in <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebrafischen im Vergleich zu WT-Fischen	<b>135</b>
<b>Tabelle 39:</b>	Relative Expression von <i>hspa5</i> , <i>ddit3</i> und <i>edem1</i> in WT- und <i>atf6</i> <sup>-/-</sup> -Zebra-fischlarven nach der Behandlung mit Tunicamycin	<b>136</b>
<b>Tabelle 40:</b>	Vergleich der durch Verlust von <i>ATF6</i> induzierten retinalen Phänotypen zwischen ACHM-Patienten und verschiedenen Tiermodellen	<b>168</b>
<b>Tabelle S1:</b>	Übersicht aller getesteten Antikörper gegen das humane, das murine und das Zebrafisch-Atf6-Protein	<b>200</b>
<b>Tabelle S2:</b>	Genbezeichnungen verschiedener UPR-Komponenten sowie deren Funktion im humanen und im Zebrafischgenom	<b>204</b>