

Aus dem Labor für Tumورimmunologie,
LIFE-Zentrum
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Leiter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

Expressionsanalyse von *CEACAM16*, einem neu entdeckten Hörigen des Innenohrs

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Rosemarie Franziska Alexandra Krupar
aus München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Martin Canis Priv. Doz. Dr. Sandra Bense
Mitbetreuung durch den habilitierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. Robert Kammerer
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	24.05.2012

Die Arbeit ist in folgende Publikation miteingefloßen:

Loss of the mammal specific tectorial membrane component CEA cell adhesion molecule 16 (CEACAM16) leads to hearing impairment at low and high frequencies.

Kammerer, R., Rüttiger, L., Riesenberg, R., Schäuble, C., Krupar, R., Kamp, A., Sunami, K., Eisenried, A., Hennenberg, M., Grunert, F., Breß, A., Battaglia, S., Schrewe, H., Knipper, M., Schneider, MR., Zimmermann, W. *J Biol Chem*, in Revision.

Die Arbeit wurde auf folgendem wissenschaftlichen Kongress präsentiert:

Vortrag und Posterpräsentation auf dem

17th Annual International CEA Symposium, 30.09.2007 – 02.10.2007, City of Hope and Lake Arrowhead, Kalifornien, USA

Mit dem Thema:

An uncommon member of the CEA family in an exotic place: What does CEACAM16 do in the inner ear?

1. Einleitung	1
1.1 Genmutationen als Ursachen angeborener Innenohrhörstörungen.....	1
1.2.1 Epidemiologie und Einteilung	1
1.1.2 Die Schallempfindung im Innenohr	2
1.1.3 Mutationen von Genen mit hoher Expressionsrate im Innenohr erzeugen häufig nicht-syndromale Innenohrschwerhörigkeit	6
1.2 Die CEA-Familie.....	11
1.2.1 Einteilung und Aufbau der CEA-Proteine	11
1.2.2 Funktionen von CEACAM-Proteinen.....	14
1.2.3 Die hochkonservierten Mitglieder der CEA-Familie.....	18
1.3 Zielsetzung der Dissertation	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Materialien.....	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.4 Kits.....	25
2.1.5 Zelllinien	26
2.1.6 Oligodesoxyribonukleotide	26
2.1.7 Plasmide	27
2.1.8 Antikörper.....	28
2.1.9 Software und Internetadressen	28
2.1.10. Herstellerverzeichnis.....	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Gewebeisolierung	30
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	31

2.2.3 Herstellung von Antikörpern durch genetische Immunisierung	41
2.2.4 Methoden der Zellkultur	45
2.2.5 Immunologische Methoden	47
2.2.6 Färbemethoden.....	49
3. Ergebnisse	52
3.1. CEACAM16-Sequenzvorhersagen mittels Datenbankanalysen	52
3.2. CEACAM16-mRNA-Nachweis in Maus und Mensch.....	53
3.2.1 Identifizierung von Expressionsorten der murinen CEACAM16-mRNA	53
3.2.2 Klonierung und Sequenzierung muriner und humaner CEACAM16- <i>full-length</i> -Klone.....	56
3.2.3 Sequenzanalyse muriner und humaner CEACAM16-cDNA.....	58
3.3.2 Spezifitätstestung von anti-CEACAM16-Immuns serum.....	64
4. Diskussion	68
4.1. CEACAM16-mRNA-Nachweis und Sequenzierung in Maus und Mensch.....	68
4.2. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen murines CEACAM16 mittels genetischer Immunisierung von Mäusen.....	69
4.3 CEACAM16-Expressionsmuster im murinen Innenohr.....	71
4.4. Mutationen im CEACAM16-Gen führen zu nicht-syndromaler Schwerhörigkeit	72
4.5. Einfluss von CEACAM16 auf die Innenohr- und Schwerhörigkeitsforschung	73
5. Zusammenfassung.....	76
6. Literaturverzeichnis	78
7. Abkürzungsverzeichnis	87
8. Danksagung.....	89
9. Lebenslauf.....	

1. Einleitung

1.1 Genmutationen als Ursachen angeborener Innenohrhörstörungen

1.2.1 Epidemiologie und Einteilung

Schon bei Geburt leidet ein Neugeborenes von 1000 an einer beidseitigen Hörstörung von relevantem Ausmaß (Probst *et al.*, 2008). Man schätzt, dass 50% der kindlichen Schwerhörigkeiten genetische Ursachen haben (Nadol, 1993). Insbesondere bei einem so genannten sensorineuralen Hörverlust ist häufiger Grund eine Mutation im Bereich eines für das Hören relevanten Gens. Sensorineurale Schwerhörigkeit umfasst alle Schallempfindungsstörungen im Bereich des Innenohrs. Meist basieren diese auf einem Defekt des Corti-Organ.

Genetisch bedingte Schwerhörigkeiten werden in syndromale und nicht-syndromale Hörstörungen eingeteilt. Ein syndromaler Hörverlust beinhaltet Symptome auch in anderen Organen. Ein bekanntes Beispiel ist das Usher-Syndrom. Es ist mit einer Prävalenz von $\sim 1/20.000$ die häufigste Ursache für eine kombinierte Blind-Taubheit (Van Kremer *et al.*, 2006). Eine Degeneration im Bereich der Haarzellen führt zu einer meist schon angeborenen erheblichen Hörminderung. Die Blindheit entwickelt sich in der Regel erst nach der Pubertät oder noch später in Form einer *Retinitis pigmentosa*. Bisher sind acht Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen bekannt, deren Genmutationen zu den drei Formen des Usher-Syndroms führen. Neuere Studien haben ergeben, dass die Gemeinsamkeit dieser Proteine in der Eigenschaft besteht, Proteinkomplexe in der Retina und im Innenohr zu bilden (Van Kremer *et al.*, 2006).

Nicht-syndromale Schwerhörigkeiten machen 70% der genetischen Hörstörungen aus. Durch die Mutation eines Gens entsteht eine Hörminderung oder der vollständige Verlust des Gehörs ohne dass weitere Organe betroffen sind. Den Löwenanteil mit $\sim 85\%$ der Fälle stellen autosomal-rezessive Erbgänge mit der Bezeichnung DFNB (*Deafness Locus* Nicht-Syndromaler Schwerhörigkeiten Typ B) dar. $\sim 15\%$ der nicht-syndromalen Hörminderungen werden autosomal-dominant vererbt und deren Genloci als DFNA (*Deafness Locus* Nicht-syndromaler

Schwerhörigkeiten Typ A) bezeichnet (Kalatzis *et al.*, 1998). Ein kleiner Teil der Mutationen wird auch X-chromosomal (DFN) oder mitochondrial vererbt. Autosomal-rezessiv vererbte Schwerhörigkeiten treten in Deutschland in der Regel sporadisch auf und sind gekennzeichnet durch eine bereits kongenital vorhandene mittlere bis hochgradige Schwerhörigkeit. Bei autosomal-dominanter Vererbung ist die Hörminderung dagegen weniger eklatant und tritt oft erst in der zweiten bis dritten Lebensdekade auf (Pfister, 2002). Einen hervorragenden Überblick über derzeit bekannte Gene und Genloci angeborener Hördefekte gibt die *Hereditary Hearing Loss Homepage* (<http://hereditaryhearingloss.org/>). Seit 1996 konnten mehr als 100 Genloci mit nicht-syndromalen Schwerhörigkeiten in Verbindung gebracht werden und meistens auch die Mutation in einem spezifischen Gen nachgewiesen werden. Die Entdeckung dieser Taubheitsgene hat sehr viel zum Verständnis des Hörens auf biochemischer Ebene beigetragen.

1.1.2 Die Schallempfindung im Innenohr

Schallwellen werden über das äußere Ohr aufgenommen und treffen auf das Trommelfell. Auf Mittelohrseite inseriert das erste Gehörknöchelchen, der Hammer, am Trommelfell und überträgt mit Hilfe von Amboss und Steigbügel die Schallwellen auf die Membran des ovalen Fensters. Diese bildet die Grenze zum Innenohr. Dahinter liegt die *Scala vestibuli* der *Cochlea* (Abbildung 1).

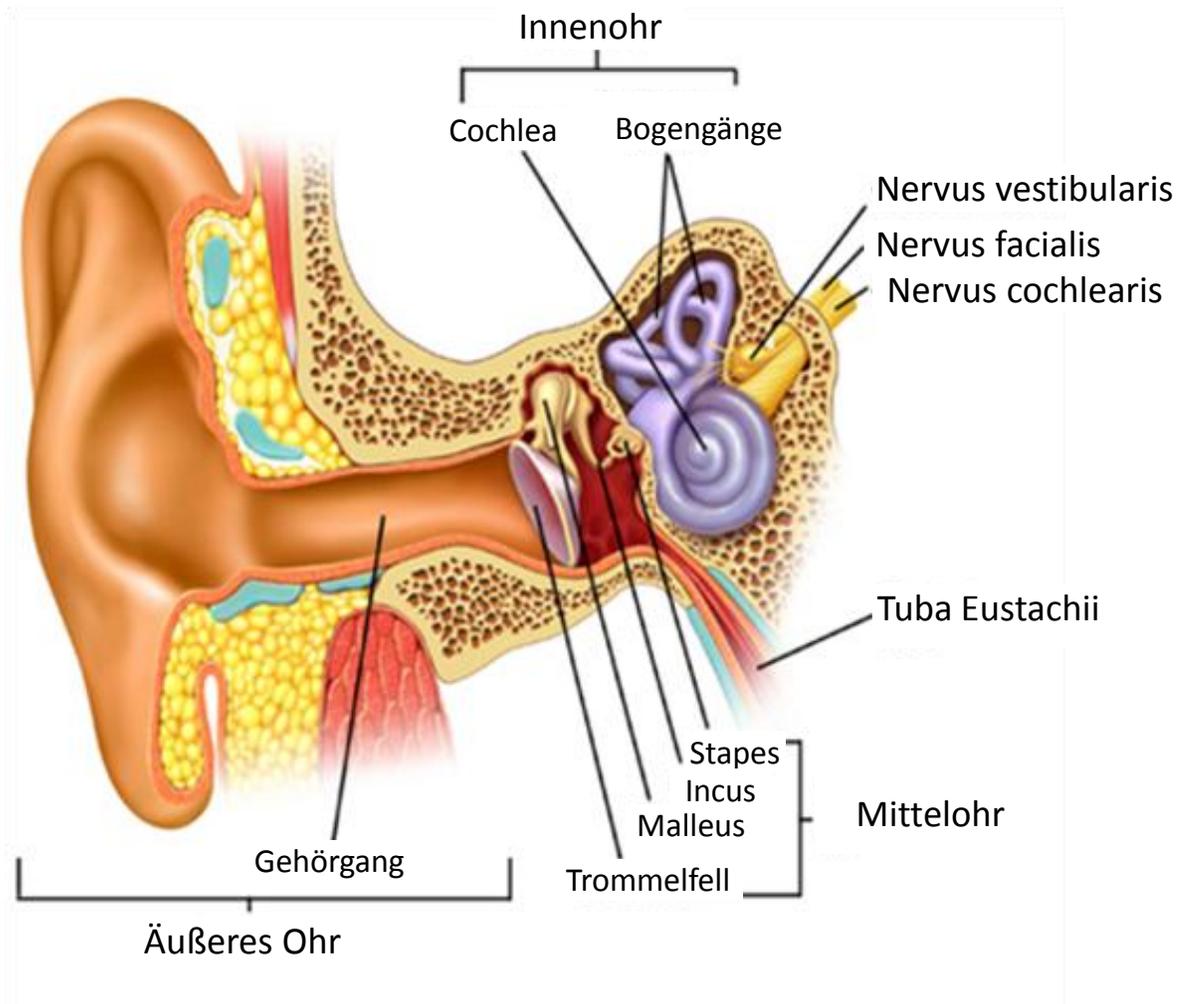


Abbildung 1: Darstellung des äußeren Ohrs, des Mittelohrs und des Innenohrs. Nachdem Schallwellen von der Gehörmuschel aufgefangen worden sind, treffen sie durch den äußeren Gehörgang auf das Trommelfell und werden über die Gehörknöchelchen des Mittelohrs auf das ovale Fenster übertragen, um in der Cochlea des Innenohrs als Sinnesreize wahrgenommen zu werden (<http://www.virtualmedicalcentre.com>).

Das Innenohr ist im Felsenbein eingelagert und wird in das knöcherne Labyrinth, welches mit Perilymphe gefüllt ist und in das häutige Labyrinth, das im knöchernen Labyrinth schwimmt und mit Endolymphe gefüllt ist, differenziert. Die Perilymphe ist ein Ultrafiltrat des Plasmas und ähnelt somit in ihrer Zusammensetzung den extrazellulären Flüssigkeiten mit einem hohen Gehalt an Natriumionen (140 mmol/l) (Klinke *et al.*, 2005). Die Endolymphe dagegen gleicht mit ihrem hohen Kaliumionengehalt einer intrazellulären Flüssigkeit. Sie wird von Zellen der *Stria vascularis*, welche die laterale Begrenzung der *Scala media* bildet, sezerniert. Knöchernes und häutiges Labyrinth formen das Vestibularorgan aus den

Bogengängen, sowie *Sacculus* und *Utriculus* und die Hörschnecke, auch *Cochlea* genannt. Im Querschnitt unterteilt sich die Schnecke in drei Hohlräume: Die *Scala vestibuli* ist mit Perilymphe gefüllt und wird an ihrer Basis vom ovalen Fenster begrenzt. An der Spitze der Schnecke, im *Helicotrema*, geht die *Scala vestibuli* in die ebenso perilymphhaltige *Scala tympani* über, welche an der Schneckensbasis mit der Membran des *Foramen rotundum* abschließt und die *Scala tympani* vom luftgefüllten Mittelohr trennt. Der Endolymphschlauch bildet die *Scala media*. Sie wird durch die Reissner-Membran von der *Scala vestibuli* getrennt und grenzt durch die Basilarmembran an die *Scala tympani*. Auf der Basilarmembran liegt das Corti-Organ. Dies ist das eigentliche Hörorgan, bestehend aus einer Reihe innerer und drei Reihen äußerer Haarzellen und den umgebenden Stützzellen. Die Haarzellen erhalten ihre Bezeichnung von den Stereozilien, die wie Härchen an der Oberfläche der Zellen hervorstehen. Stereozilien sind über so genannte *tip links*, dünne Proteinfäden, miteinander verbunden. Bedeckt wird das Corti-Organ von der gallertartigen Tektorialmembran. Die Stereozilien der äußeren Haarzellen stecken mit ihren Köpfen in dieser Membran (Abbildung 2).

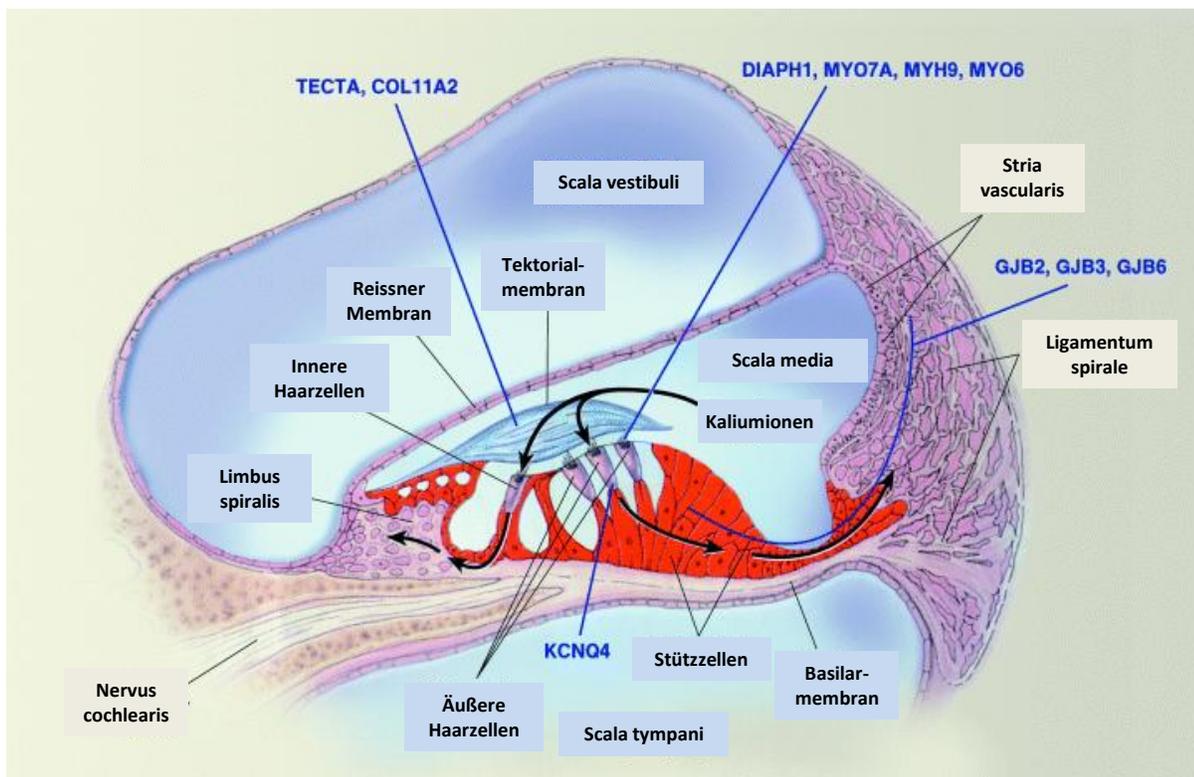


Abbildung 2: Funktionselemente der Cochlea und ihre Beeinträchtigung durch Mutationen (Modifiziert nach Petersen, 2002). Das Corti-Organ ist rot hervorgehoben. Die schwarzen Pfeile stellen den Wiederverwertungskreislauf der Kaliumionen (s. u.) nach Einstrom in die Haarzellen über die Stützzellen in den *Limbus spiralis* oder in die *Stria vascularis* dar. Genmutationen, die bekannt dafür sind, Innenohrschwerhörigkeiten zu verursachen und ihre Expressionsorte sind blau gedruckt.

Eine Schallübertragung vom äußeren Ohr über die Gehörknöchelchen des Mittelohrs führt ab dem ovalen Fenster zu einer Auslenkung der Basilarmembran und erzeugt eine Wanderwelle auf dieser Membran. Die Basilarmembran zeichnet sich durch ihre abnehmende Steifigkeit vom ovalen Fenster bis zum *Helicotrema* aus. Dadurch erzeugt jede Frequenz an einer anderen Stelle der Membran eine maximale Amplitude. Hohe Frequenzen bilden das Schwingungsmaximum in der Nähe des *Stapes*, niedrige in der Nähe des *Helicotremas* aus. Man spricht von einer Frequenz-Ortsabbildung (Klinke *et al.*, 2005). Basilarmembran und Tektorialmembran werden über die Verbindung durch die äußeren Haarzellen gemeinsam ausgelenkt. Bei einer Aufwärtsbewegung werden die Stereozilien abgeknickt; es kommt zu einer Dehnung der *tip links* und zur Öffnung der in den Mikrovilli gelegenen Transduktionskanäle. Der hohe K^+ -Gehalt der Endolymphe und die Membranpotentialdifferenz von 150 mV zwischen dem +80 mV positiv geladenen Endolymphraum und dem -70 mV geladenen Zellinneren führt an den äußeren Haarzellen zum Einstrom von Kaliumionen über die Transduktionskanäle und zur Ausbildung eines Rezeptorpotentials. Bei Abwärtsbewegung der Basilarmembran werden die Stereovilli wieder in die andere Richtung gebogen, es kommt zu einer Entspannung der *tip links*, zum Schluss der Transduktionskanäle und zur Repolarisierung der Zelle. Dieses oszillierende Membranpotential führt bei den äußeren Haarzellen zu einer oszillierenden Längenänderung (Klinke *et al.*, 2005), welche die ortsspezifische Amplitude der Wanderwelle noch verstärkt. Bei ausreichender Schwingungsamplitude werden nach dem gleichen mechanischen Prinzip auch die inneren Haarzellen depolarisiert. Sie schütten den Transmitter Glutamat aus, welcher zur Ausbildung eines Aktionspotentials an den Dendriten des *Nervus cochlearis* führt. Die Kaliumionen werden über die Stützzellen zurück zur *Stria vascularis* geleitet und von dort zurück in die Endolymphe gepumpt oder fließen in den *Limbus spiralis* ab.

1.1.3 Mutationen von Genen mit hoher Expressionsrate im Innenohr erzeugen häufig nicht-syndromale Innenohrschwerhörigkeit

Gene, die nicht-syndromale Formen der Schwerhörigkeit verursachen, können nach den Aufgaben ihrer exprimierten Proteine im Innenohr unterteilt werden. Danach unterscheidet man Proteine des Zytoskeletts, Strukturproteine, Proteine, die für den Ionentransport zuständig sind und Transkriptionsfaktoren. Tabelle 1 gibt einen Überblick über Gene, die mit nicht-syndromaler Schwerhörigkeit assoziiert und deren Funktionen bekannt sind.

Protein	Gen	Schwerhörigkeitslocus	Chromosom
Zytoskelettal			
Myosin IA	MYO1A	DFNA48	12q13-q14
Myosin IIIA	MYO3A	DFNB30	10p11.1
Myosin VI	MYO6A	DFNB37, DFNA22	6q13
Myosin VIIA	MYO7A	DFNB2, DFNA11	11q12.3-q21
Myosin XV	MYO15	DFNB3	17p11.2
Non-muscle Myosin XIV	MYH14	DFNA4	19q13
Non-muscle Myosin IIA	MYH9	DFNA17	22q12.2-q13.3
Gamma-actin	ACTG1	DFNA20/26	17q25
Radixin	RDX	DFNB24	11q23
Diaphanous	DIAPH1	DFNA1	5q31
TRIOBP	TRIOBP	DFNB28	22q13.1
Whirlin	WHRN	DFNB31	9q32-34
Strukturell			
Cadherin 23	CDH23	DFNB12	10q21-22
Protocadherin 15	PCDH15	DFNB23	10q21.1
Stereocilin	STRC	DFNB16	10p12.1
Otoancorin	OTOA	DFNB22	16p12.2
Alpha-Tectorin	TECTA	DFNB21, DFNA8/12	11q23-q25
Collagen 11alpha2	COL11A2	DFNB53, DFNA13	6p21.3
Tricellulin	MARVELD2	DFNB49	5q12.3-q14.1
Ionen-Transport			
Connexin 26	GJB2	DFNB1, DFNA3	13q11-q12
Connexin 30	GJB6	DFNB1, DFNA3	13q11-q12
Connexin 31	GJB3	DFNA2	1p34
Pendrin	SLC26A4	DFNB4	7q31
TMC1	TMC1	DFNB7, DFNA36	9q13-q21
Claudin 14	CLDN14	DFNB29	21q22
Prestin	SLC26A5		
KCNQ4	KCNQ4	DFNA2	1p34
Transkriptionsfaktoren			
Ymer	CCDC50	DFNA44	3q28-29
Pou Domain Class 4 transcription factor	Pou4F3	DFNA15	5q31
Transcription factor Cellular promoter 2-like3	TFCP2L3	DFNA28	8q22

Tabelle 1: Liste von Proteinen, deren Funktion im Innenohr derzeit bekannt ist und deren Mutation zu nicht-syndromaler Schwerhörigkeit führt. Modifiziert nach Petersen *et al.*, 2006 mit weiteren Ergänzungen aus Bork *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2003; Alagramam *et al.*, 2011; Shahin *et al.*, 2006; Kitajiri *et al.*, 2010; MBuru *et al.*, 2003, Mogensen *et al.*, 2007; Modamio Hoybjor 2007).

Die Entdeckung neuer Schwerhörigkeit verursachender Genmutationen und die Auswirkung auf die kodierten Proteine hat viel zum Verständnis über physiologisches

Hören auf molekularer Ebene beigetragen.

Connexin 26 ist das bekannteste Protein, welches mit nicht-syndromalen Schwerhörigkeiten assoziiert ist. Kelsell et al. entdeckten 1997, dass Mutationen im dazugehörigen Gen *GJB2* (*gap junction protein beta 2*) sowohl für autosomal-dominante als auch autosomal-rezessiv vererbte, sensorineurale Hörstörungen verantwortlich ist (Kelsell, 1997). 50% der nicht-syndromalen Hörstörungen können auf Mutationen im Gen *GJB2* zurückgeführt werden (Martínez et al., 2009). Dieses ist auf der chromosomalen Region 13q11-12 lokalisiert (Kiang et al., 1997). Das dazugehörige Protein gehört zur Familie der *gap junction proteins*. Es besteht aus vier Transmembrandomänen, drei Intrazellulärdomänen und zwei Extrazellulärdomänen (Martin et al., 1999). Sechs Connexine fügen sich zu einem als Connexon bezeichneten Hexamer zusammen und können so einen halben Transmembrankanal bilden. Durch den Zusammenschluss zweier Connexone von benachbarten Zellen entsteht ein *gap-junction*-Kanal, der den passiven Austausch von niedermolekularen Substanzen und Ionen ermöglicht (Birkenhäger et al., 2007).

Außerhalb des Innenohrs findet sich eine Expression von Connexin-26 unter anderem in der Haut, der Blase, dem Pankreas, der laktierenden Brust, dem Magen-Darm-Trakt, der Plazenta und dem Sehnerv. Außerdem wird Connexin 26 zu den Tumorsuppressorgenen gerechnet (Nomura et al., 2010).

In der *Cochlea* der Ratte konnten Kikuchi et al. Connexin 26 immunhistochemisch in zwei unterschiedlichen Zellsystemen nachweisen (Kikuchi et al., 2000). Zum einen sind die epithelialen Stützzellen des cortischen Organs über *gap junctions* verbunden. Zum anderen exprimieren Fibrozyten des *Limbus spiralis*, des *Ligamentum spirale* und der Basilarschicht der *Stria vascularis* Connexin 26. Von Connexin 26-Molekülen gebildete Ionenkanäle sind insbesondere für Kaliumionen durchlässig. Daher wird vermutet, dass Connexin 26-*gap-junctions* für die Wiederverwertung von in Haarzellen eingeströmten Kaliumionen aus der K⁺-reichen Endolymph notwendig sind. Sie sorgen für den Rücktransport der Kaliumionen von den Haarzellen über Stützzellen zur *Stria vascularis*, wovon sie erneut in die Endolymph gepumpt werden, um das für den Hörvorgang essentielle cochleäre Aktionspotential aufrechtzuerhalten (Martin et al., 1999).

Derzeit sind 90 Mutationen im Connexin 26-Gen bekannt, die zu mildem bis

schwerem nicht-syndromalem Hörverlust führen. Der größte Teil wird autosomal-rezessiv vererbt (Martínez *et al.*, 2009). Eine Zusammenfassung aller Mutationen findet sich auf der *Connexin deafness homepage* (<http://davinci.crg.es/deafness/index.php>). 35delG ist die häufigste zu paralingualer Taubheit führende Mutation im Gen *GJB2* in der kaukasischen Bevölkerung mit der höchsten Trägerfrequenz von 3.5% in Griechenland (Iliades *et al.*, 2002). Der Verlust eines Guanins (G) in Position 35 der *GJB2* cDNA in einem Streckenbereich von 6 Gs führt zu einer Verschiebung des Leserasters mit vorzeitigem Kettenabbruch (Zelante *et al.*, 1997).

Eine weitere für den cochleären Hörvorgang entscheidende Gruppe von Proteinen gehört zur Myosinsuperfamilie. Mutationen führen sowohl zu autosomal-rezessiv und autosomal-dominant vererblicher nicht-syndromaler Schwerhörigkeit als auch zu syndromaler Schwerhörigkeit. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen in den Myosin-Genen *MYO1A*, *MYO3A*, *MYO6*, *MYO7A*, *MYH9*, *MYH14*, *MYO15* Taubheit verursachen können (Liu *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2002; Ahmed *et al.*, 2003; Di Melchionda. *et al.*, 2001; Van Donaudy *et al.*, 2003; Weil *et al.*, 1997; Lalwani *et al.*, 2000; Van Donaudy. *et al.*, 2004).

Als DFNA4 wurde ein progredienter autosomal-dominant vererbter Hörverlust bezeichnet, der für eine amerikanische und eine deutsche Familie auf dem Chromosom 19q13 lokalisiert werden konnte (Chen *et al.*, 1995; Van Donaudy. *et al.*, 2004). Mutationen in einem Kandidatengen des DFNA4-Locus, *MYH14*, konnten als Ursache nicht-syndromaler Schwerhörigkeit bei der deutschen Familie und weiteren europäischen Familien nachgewiesen werden (Van Donaudy *et al.*, 2004). *MYH14* kodiert für das *Non-muscle-Myosin-14*, oder auch *non muscle myosin heavy chain IIC* (NMHCIIC) und wird in der Myosinsuperfamilie zu den konventionellen Myosinen der Klasse II gezählt (Berg. *et al.*, 2001). Sie setzen sich aus zwei schweren Ketten und zwei nicht identischen Paaren leichter Ketten zusammen (Leal *et al.*, 2003). Leal *et al.* konnten 2003 eine Expression des 41 Exon großen *MYH14*-Gens in zahlreichen Geweben nachweisen, wie Dickdarm, Dünndarm, Skelettmuskulatur, Gehirn, Plazenta, Leber, Pankreas, Prostata etc. Im Innenohr ist Myosin-14 in allen die *Scala media* umgebenden Zellen, bis auf die Reissner-Membran vorhanden (Golomb *et al.*, 2004). Die nächsten Verwandten von *Non-muscle-Myosin-14* sind *Non-muscle-Myosin-IIa*, *Non-muscle-Myosin-IIb* und *Smooth-*

muscle-Myosin-II (MYH9, 10 und 11) (Berg *et al.*, 2001). Auch Mutationen im Gen *MYH9* (DFNA17) wurden als ursächlich für nicht syndromale Schwerhörigkeit erkannt, allerdings sind bis jetzt weder für *MYH9*, noch für *MYH14* die Funktionen der korrespondierenden Proteine im Innenohr bekannt (Lalwani. *et al.*, 2000; Van Donaudy *et al.* 2004).

Neben zytoskelettalen Proteinen und Proteinen für den cochleären Ionentransport, spielen Strukturproteine eine wichtige Rolle für den sensorineuronalen Hörablauf im Innenohr. Dazu werden insbesondere Proteine der Tektorialmembran gezählt. Diese setzt sich zu 50% aus Kollagenen zusammen (Gueta *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass Kollagen Typ II durch kovalente Bindung zu den Kollagen Typen IX und XI in radiärer Anordnung die Steifigkeit der Tektorialmembran in radialer Richtung gewährleistet bei gleichzeitiger Elastizität in longitudinaler Ausrichtung (Masaki *et al.*, 2009). Diese Eigenschaft der Tektorialmembran wird auch als Anisotropie bezeichnet.

Chen *et al.* bewiesen 2005, dass Mutationen im Gen *COL11A2*, welches für Kollagen Typ XI alpha2 kodiert, ebenfalls Ursache von autosomal-dominant sowie autosomal-rezessiv vererbten nicht-syndromalen Schwerhörigkeiten sind (Chen. *et al.*, 2005). *Col11a2-knock-out*-Mäuse weisen eine Desorganisation der radiären Tektorialmembranstruktur auf mit einer Verbreiterung des Abstandes zwischen den einzelnen Kollagenen (Masaki *et al.*, 2009).

Die Kollagenbündel der Tektorialmembran sind eingelagert in eine Matrix, welche sich aus den Glykoproteinen α -Tectorin und β -Tectorin zusammensetzt. Auch Mutationen im α -Tectorin kodierenden Gen *TECTA* führen zu autosomal-rezessiv und autosomal-dominant vererbten nicht-syndromalen Schwerhörigkeiten (Mustapha *et al.*, 2009; Verhoefen *et al.*, 1998). Homozygote *Tecta-knock-out* Mäuse zeigen einen vollständigen Verlust der nichtkollagenen Tektorialmembranmatrix, sowie einen Adhäsionsverlust der äußeren Haarzellen zur Tektorialmembran, welcher bei diesen Mäusen gegenüber Wildtypmäusen zu einer Hörminderung von 35 dB führt (Legan, 2000).

1.2 Die CEA-Familie

1.2.1 Einteilung und Aufbau der CEA-Proteine

Die Proteine der karzinoembryonalen Antigen-Familie (CEA-Familie) werden als CEACAMs (*carcinoembryonic cell adhesion molecule*) bezeichnet. Sie gehören zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie und setzen sich aus zellgebunden Oberflächenproteinen und sezernierten Proteinen zusammen. In Säugern gibt es 5 so genannte orthologe CEACAMs (CEACAM1, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20) (Kammerer und Zimmermann, 2010). Daneben gibt es eine variable Anzahl von nah mit dem jeweiligen CEACAM1 einer Spezies verwandten Proteinen. Dazu zählen auch die in manchen Spezies vorhandenen *pregnancy-specific glycoproteins* (PSGs). Der CEA-Gen-Cluster befindet sich beim Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 19 zwischen *CYP2A* und *D19S15* innerhalb eines 1,8 Mb langen Bereichs und setzt sich zusammen aus 22 CEACAM-Genen (darunter 11 PSG-Genen) und 6 Pseudogenen (Horst *et al.*, 2004; Teglund *et al.*, 1994) (Abbildung 3). Ein weiteres CEACAM-Gen (*CEACAM18*) befindet sich, wie bei allen bisher untersuchten Säugern mit Plazenta, mehrere Mb distal in Richtung Telomer im *SIGLEC*-Gencluster (Kammerer und Zimmermann, 2010). Der murine CEA-Gen-Locus liegt auf Chromosom 7 und überspannt einen 6,5 Mb großen Bereich (Zebhauser *et al.*, 2005).

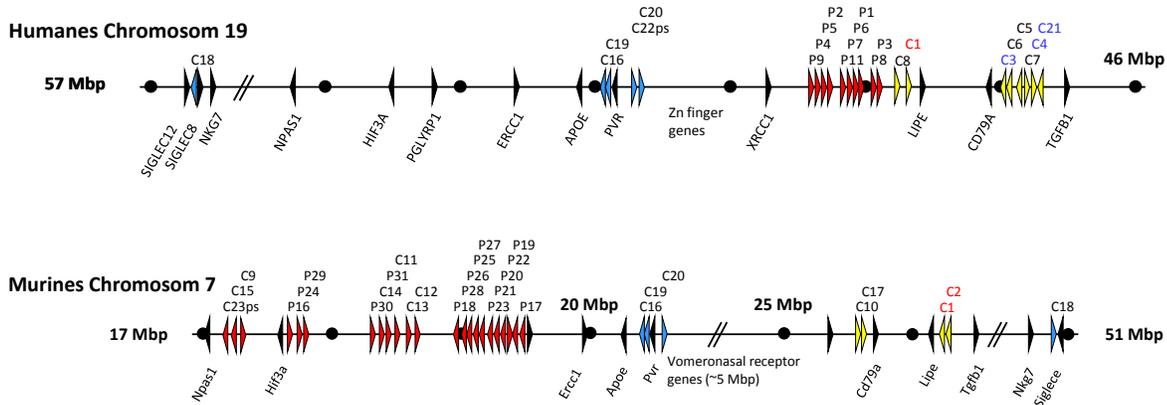


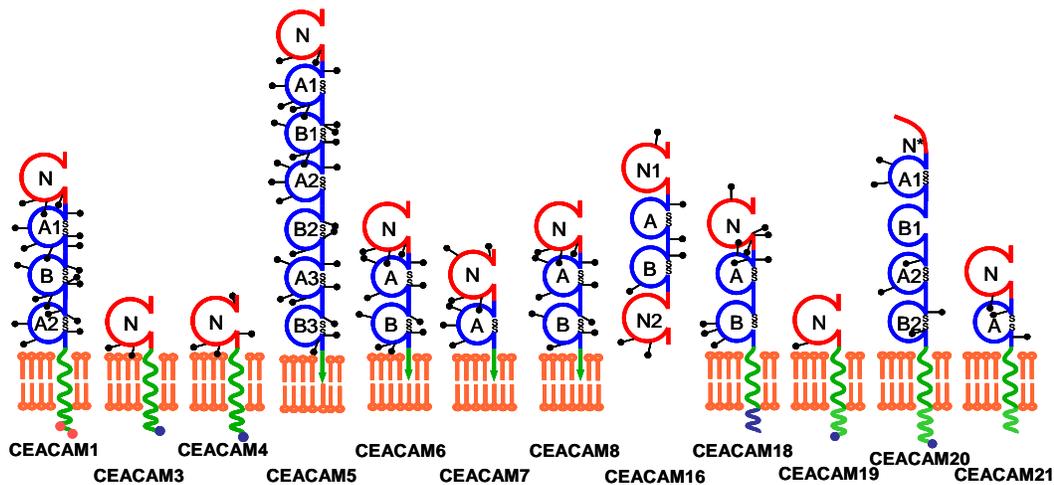
Abbildung 3: Anordnung der humanen und murinen CEA-Genloci. Gene und ihre Leserichtung werden von Pfeilspitzen symbolisiert. CEACAM1-verwandte Gene werden dabei von gelben, respektive roten Pfeilspitzen, wenn sie hauptsächlich in Trophoblastzellen exprimiert werden, repräsentiert. Blaue Pfeilspitzen symbolisieren die hochkonservierten Gene der CEA-Familie und schwarze Pfeilspitzen stehen für Markergene. CEACAMs mit rotem Schriftzug enthalten ein ITIM-Motiv in ihrer Sequenz, CEACAMs mit blauem Schriftzug dagegen ein ITAM-bzw. ein ITAM-ähnliches Motiv.

Strukturell gemeinsam ist allen CEACAMs ein aminoterminaleres Signalpeptid (*leader*), welches für die kotranslationale Adressierung des Proteins in das endoplasmatische Retikulum notwendig ist und danach abgespalten wird. Auf den *leader* folgt eine meist aus 108 Aminosäuren bestehende Domäne die homolog zur variablen Domäne der Immunglobuline ist. Je nach Mitglied der CEACAM-Familie schließen sich daran 0-6 Domänen an, die der konstanten C2-Immunglobulineinheit ähneln und meistens entweder aus 93 Aminosäuren (Typ A) oder aus 85 Aminosäuren (Typ B) bestehen (Hammarström *et al.*, 1999).

Die CEACAMs werden hinsichtlich ihrer Zellmembranverankerung in drei Gruppen unterteilt. Sie können über eine Transmembrandomäne an der Membran befestigt sein. Diese wird von einer zytoplasmatischen Domäne gefolgt, die häufig ein *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM)-, ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)- oder ein ITAM-ähnliches Motiv enthält. Beispiele für ITIM-haltige Mitglieder sind das humane und murine CEACAM1, sowie das murine CEACAM2. CEACAM20 enthält ein ITAM-Motiv. Humanes CEACAM3 und CEACAM4, sowie CEACAM19 dagegen enthalten ein ITAM-ähnliches Motiv, das nicht exakt der ITAM-Konsensussequenz entspricht (xxxYxxLx₇YxxM/I statt E/DxxYxxLx₇YxxL/I). Die humanen CEACAMs CEACAM5 bis CEACAM8 sind über

einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) an die Zellmembran gebunden (Hammarström *et al.*, 1999; Hance *et al.*, 2005). Diese Form der Proteinbefestigung an Zellmembranen existiert bei Nagetier-CEACAMs nicht. In der dritten Gruppe lassen sich lösliche CEACAMs ohne eine Membranverankerung zusammenfassen. Dazu gehören die nahe verwandten murinen CEA-Mitglieder CEACAM9 bis CEACAM15 und das sowohl im Mensch als auch in Nagern exprimierte CEACAM16 (Finkenzeller *et al.*, 2003; Zebhauser *et al.*, 2005) (Abbildung 4A, B).

A



B

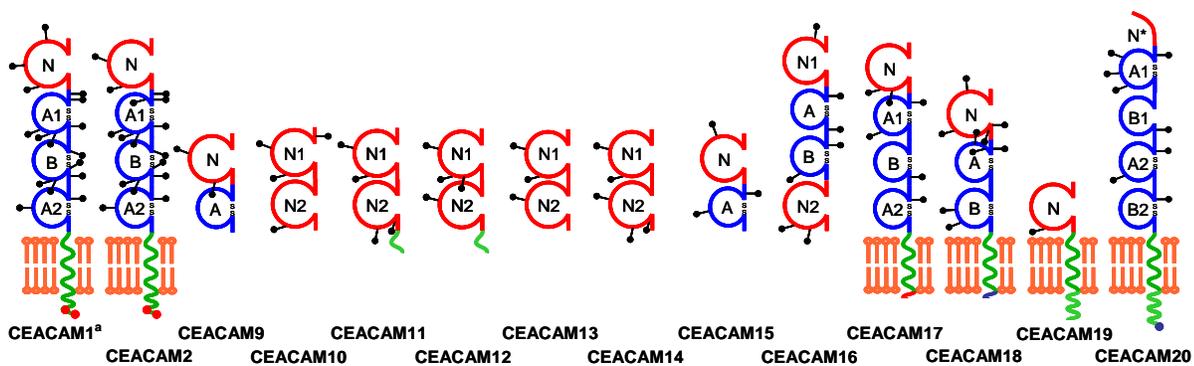


Abbildung 4: Domänenstruktur der humanen (A) und murinen Mitglieder der CEACAM-Familie (B). In Rot sind die IgV-ähnlichen Domänen (N) dargestellt. Die blauen IgC-ähnlichen Domänen (A, B) enthalten Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten (S-S). Gestielte Punkte sind Konsensussequenzen für potentielle N-Glykosylierung. Die Membranbefestigung wird entweder durch eine kurvige Linie für Transmembrandomänen oder einem grünen Pfeil für GPI-Anker symbolisiert. Blaue Punkte in der zytoplasmatischen Domäne stehen für ITAM oder ITAM-ähnliche Domänen, rote Punkte für ITIMs. (Zimmermann, <http://www.carcinoembryonic-antigen.de>)

1.2.2 Funktionen von CEACAM-Proteinen

Als erste klar definierte Funktion eines Mitglieds der CEACAM-Familie konnte homotypische Zell-Zellinteraktion zwischen CEACAM5-Molekülen gezeigt werden (Benchimol *et al.*, 1989). Diese Eigenschaft wird entscheidend von der N-terminalen IgV-ähnlichen Domäne vermittelt. Die allen CEACAM-Proteinen gemeinsame Struktur mit einer IgV-ähnlichen Domäne am N-terminalen Ende deutet an, dass

diese im Allgemeinen zu homotypischen und heterotypischen Interaktionen in der Lage sind. In der Tat konnte für viele Mitglieder der CEA-Familie Zell-Zell-Adhäsionen nachgewiesen werden. Diese Fähigkeit gibt bereits Informationen darüber, dass CEACAMs eine Rolle bei der Adressierung bzw. Lokalisierung von Zellen während der embryonalen Entwicklung, bei der Erhaltung eines Zellverbundes und bei der Integration von Einzelzellen in ein Gewebe spielen (Kuespert *et al.*, 2006).

Das berühmteste Mitglied der CEA-Familie ist CEACAM5, besser bekannt unter dem Namen CEA. CEA wurde als erstes von Freedman und Gold beschrieben (Gold *et al.*, 1965). Sie hatten ein Protein entdeckt, das in fetalem Dickdarm und in Adenokarzinomen des Dickdarms exprimiert wurde, aber nicht in gesundem adulten Kolongewebe vorhanden zu sein schien (Duffy *et al.*, 2001). Aus diesem Grund gaben sie dem Antigen den Namen karzinoembryonales Antigen oder CEA (*carcinoembryonic antigen*). Immunhistochemisch allerdings konnte CEA im Plattenepithel von Mund- und Trachealschleimhaut nachgewiesen werden und gastrointestinal am gastroösophagealen Übergang, im Bereich des Pylorus, im oberen Duodenum, im Kolon und im Appendix, sowohl während der Fetalzeit, als auch im adulten Gewebe (Nap *et al.*, 1988). Hammarström konnte mit Hilfe von *In-situ*-Hybridisierung, Immunhistologie und Immunelektronenmikroskopie die Expressionsorte von CEA im Dickdarm exakt lokalisieren. Demnach befinden sich im gesunden Kolongewebe CEA-Moleküle im apikalen Bereich der Zylinderepithelzellen und ragen in das Lumen hinein. In abnehmender Dichte kann man sie bis in die tiefen Krypten verfolgen. CEA wird durch Phosphatidyl-Inositol-spezifische Phospholipasen von den Enterozyten abgeschnitten und über den Stuhl ausgeschieden. Anders verhält es sich im Tumorgewebe des Dickdarms. In den tief gelegenen neoplastischen Zellen ist CEA über die gesamte Zelloberfläche verteilt, hat von dort Zugang zu Blut- und Lymphgefäßen und eignet sich aus diesem Grund als Tumormarker im Blut (Hammarström *et al.*, 1999). Erhöhte CEA Werte im Serum finden sich beim kolorektalen Karzinom, Magenkarzinom, Lungenkarzinom, Mammakarzinom, Pankreaskarzinom, Karzinomen der Gallen- und Harnblase, beim Ovarialkarzinom und beim Endometriumkarzinom (Hammarström *et al.*, 1999). Neben der Zelladhäsionsfunktion konnte für CEA nachgewiesen werden, dass seine

Überexpression, genauso wie von CEACAM6, welches strukturell und vom Expressionsmuster sehr ähnlich zu CEACAM5 ist, die Differenzierung humaner Kolonozyten hemmt, die Zellpolarisierung blockiert und somit die normale Gewearchitektur zerstört (Benchimol *et al.*, 1989; Ilantzis *et al.*, 1997; Ilantzis *et al.*, 2002).

Ein anderer bekannter Vertreter der CEA-Familie ist CEACAM1, welches sich durch das am weitesten verbreitete Expressionsmuster aller CEACAM-Moleküle auszeichnet (Kuespert *et al.*, 2006). Es konnte sowohl in zahlreichen epithelialen und endothelialen Zellen nachgewiesen werden, als auch in Zellen des hämatopoetischen Systems (Zhou *et al.*, 2009). CEACAM1 besteht aus einer IgV-ähnlichen N-Domäne und bis zu drei, durch alternatives Spleißen in ihrer Anzahl variable IgC-ähnlichen Domänen. Über eine Transmembrandomäne ist das Protein in der Zellmembran verankert. Ein zytoplasmatischer Anteil nach der Transmembrandomäne ist ebenso variabel und kann entweder aus einem 10 Aminosäure kurzen (CEACAM1-S) oder einem 71 Aminosäure langem (CEACAM1-L) zytoplasmatischen Schwanz bestehen. CEACAM1-L enthält im zytoplasmatischen Teil ein ITIM, welche nach Phosphorylierung zweier Tyrosinreste inhibitorische Signale in die Zelle leitet (Chen *et al.*, 2008). Dadurch ist CEACAM1 nicht nur an Zelladhäsionsprozessen beteiligt, sondern auch an regulatorischen Funktionen von Epithel-, Endothel- und Immunzellen. Inzwischen ist ein weites Spektrum von Funktionen für CEACAM1 bekannt. Es spielt eine Rolle in der Angiogenese, fungiert als Tumorsuppressor, sowie als Bestandteil der Internalisierungsmaschinerie für den Insulinrezeptor. Interessanterweise wird es (und eine Reihe anderer Mitglieder der humanen CEACAM-Familie) als Rezeptor von humanpathogenen Keimen genutzt (Kuespert *et al.*, 2006).

In Synergie mit VEGF nimmt CEACAM1 Einfluss auf die Angiogenese kleiner Blutgefäße durch Stimulation der Endothelzellproliferation und Förderung der Endothelzellmigration. Weiterhin ist es gemeinsam mit VEGF für die Ausbildung von Kapillaren notwendig (Ergün *et al.*, 2000). Nachdem 1993 Neumeier *et al.* zeigten, dass es in kolorektalen Karzinomen zu einem Expressionsverlust von CEACAM1 kommt (Neumaier *et al.*, 1993), wurde in zahlreichen weiteren bösartigen Tumoren eine Herunterregulation des Proteins nachgewiesen, wie in Prostata- und

Blasenkarzinomen (Tilki. *et al.*, 2007; Busch *et al.*, 2002), im hepatozellulären Karzinom (Cruz *et al.* 2005), im Mammakarzinom (Riethdorf *et al.*, 1997) oder auch im Endometriumkarzinom (Bamberger *et al.*, 1998). Zwar sind CEACAM1^{-/-}-Mäuse lebensfähig und zeigen keine Neigung zur Tumorbildung (Hemmila *et al.*, 2004), entwickeln allerdings, wenn mit Azoxymethan behandelt, welches zur Induktion von Dickdarntumoren führt, eine höhere Anzahl an Dickdarntumoren mit einer größeren Tumormasse als die entsprechenden Wildtypmäuse. Auch die Apoptose in den Dünndarmzotten ist verringert (Leung *et al.* 2006). Diese Ergebnisse legen nahe, dass CEACAM1 als Tumorsuppressorgen an der Tumorentwicklung beteiligt ist. Nittka *et al.* untersuchten Hyperplasien und Neoplasien des Dickdarms und konnten nachweisen, dass in beiden Proliferationsstörungen durch einen Verlust von CEACAM1 die Apoptoserate sinkt. Interessanterweise konnten sie damit CEA als Aktivator des CEACAM1 gesteuerten Apoptosesignalwegs in Verbindung bringen (Nittka *et al.*, 2004; Nittka *et al.*, 2008). Im gesunden Brustgewebe ist die Expression von CEACAM1 auf die apikale Seite des Epithels beschränkt. Im invasiven und nicht-invasiven Karzinom der Mamma jedoch kommt es zu einer gleichmäßigen CEACAM1-Expression um die ganze Zelle (Riethdorf *et al.*, 1997). Zu dieser Tatsache passt die Erkenntnis, dass CEACAM1, und zwar die Variante mit der kurzen zytoplasmatischen Domäne (CEACAM1-S), in der gesunden Brustdrüse notwendig ist für die Lumenformation, indem es zur Apoptose der zentralen Zellen in den Acini führt und an einem Signalweg der Zytoskelettorganisation beteiligt ist (Chen *et al.* 2007). Schließlich nutzen zahlreiche Pathogene CEACAM1 als Rezeptor zur Bindung an Epithelzellen und anschließender Internalisierung. So können einige *Escherichia-coli*-Stämme und *Salmonella typhimurium* über bakterielle Typ I Fimbrien an CEACAM1 binden (Leusch *et al.* 1991). *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae* binden über Opa-Proteine an CEACAM1, um sich so einen Zutritt in die Epithelzellen der Schleimhaut zu verschaffen (Bos *et al.* 2002). Auch *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* nutzen mit Hilfe des Oberflächenproteins P5 bzw. UspA1 CEACAM1 als Anheftungsstelle an Epithelzellen (Hill *et al.* 2001; Hill *et al.*, 2003). Auch virale Pathogene haben in CEACAM1 eine Bindungsstelle gefunden. So identifizierten bereits 1991 Dveksler *et al.* das CEACAM1-Allel a (CEACAM1^a) als Rezeptor für das murine Hepatitis-Virus (MHV), ein zu den Coronaviren zählendes

Mauspathogen (Dveksler *et al.*, 1991). Eindrucksvoll konnte aufgrund der Immunität von CEACAM1^{a/-}-Mäusen gegenüber MHV bewiesen werden, dass CEACAM1^a den einzigen Rezeptor für dieses Virus darstellt (Hemmila *et al.*, 2004).

1.2.3 Die hochkonservierten Mitglieder der CEA-Familie

Neben den oben beschriebenen gut bekannten CEA-Mitgliedern wurde vor einigen Jahren eine etwas weiter entfernt verwandte Gruppe von CEA-verwandten Molekülen entdeckt, die vor allem durch ihre hohe Konservierung zwischen verschiedenen Säugerspezies auffallen. Zu diesen werden CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20 gezählt. Für diese konnten orthologe Gene im menschlichen und murinen Genom, wie auch im Genom der Ratte und in einer Reihe anderer Säuger nachgewiesen werden (Zebhauser *et al.*, 2005) (Abbildung 5).

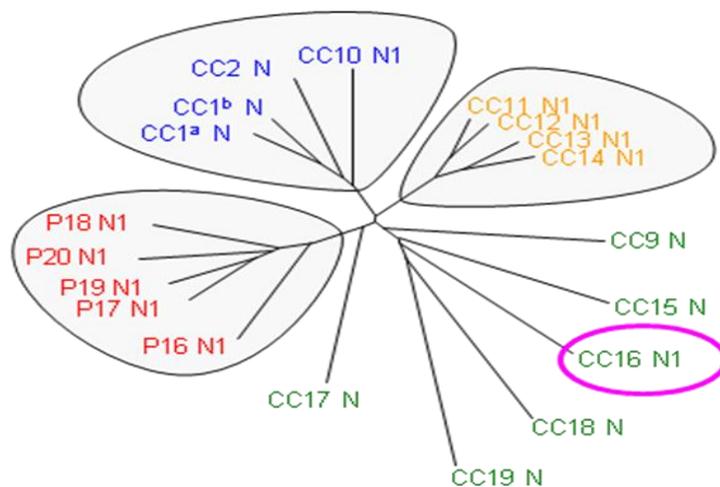


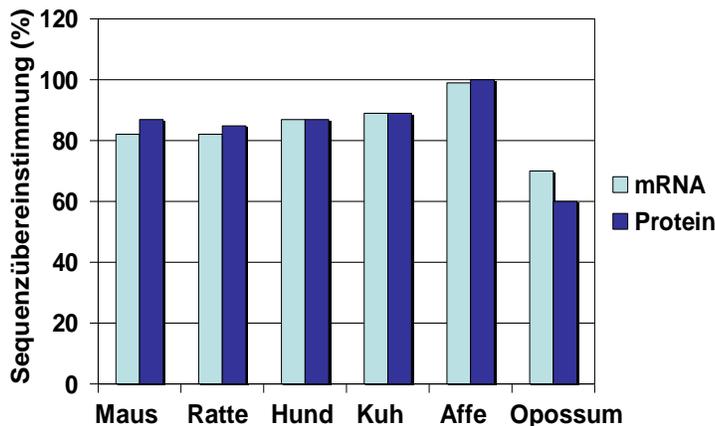
Abbildung 5: Dendrogramm der Verwandtschaftsverhältnisse der murinen CEA-Familie. Die Aminosäuresequenzen der N-Domänen muriner CEACAMs (CC) und PSGs (P) wurden in einem *Alignment* verglichen und anhand des Grades ihrer Sequenzübereinstimmung in Subgruppen unterteilt. Da CEACAM20 nur über eine unvollständige N-Domäne verfügt wurde es nicht zum Vergleich herangezogen. Anhand des N-Domänenalignments wird die verwandtschaftliche Entfernung von CEACAM16, CEACAM18 und CEACAM19 zu den übrigen Mitgliedern der CEA-Familie demonstriert. CC, CEACAM.

Die meisten Informationen zu Mitgliedern dieser hochkonservierten CEACAM-Untergruppe liegen derzeit über CEACAM20 vor, welches auf mRNA-Ebene unter anderem in Dünndarm, Kolon, Prostata und Hoden nachgewiesen werden konnte (Eisenried, 2009; Paptistella, 2009; Zebhauser *et al.*, 2005). Eisenried und Paptistella

zeigten, dass CEACAM20 im gesunden Gewebe von Prostata und Dünndarm auf der apikalen Seite des Drüsenepithels exprimiert wird, jedoch nicht in Prostatakarzinomzellen. In Anbetracht der Tatsache, dass in Epithelzellen (über)exprimiertes ITAM zu Proliferationssteigerung bis hin zur malignen Transformation führen kann (Grande *et al.*, 2006) könnte das im CEACAM20 enthaltene ITAM-Motiv möglicherweise Einfluss auf die Proliferationsrate von CEACAM20-exprimierenden Zellen haben (Eisenried, 2009). Paptistella wies die Phosphorylierbarkeit von Tyrosinresten des CEACAM20-ITAM-Motivs und eine Interaktion zwischen CEACAM20 und SYK nach (Paptistella, 2009). SYK ist Bestandteil einer ITAM-vermittelten Signalkaskade, welche Einfluss hat auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptoseresistenz.

Das am stärksten konservierte Mitglied der CEACAM-Familie ist CEACAM16. Aufgebaut aus zwei IgV-ähnlichen N-Domänen (N1, N2) und zwei IgC-ähnlichen Domänen (A, B) ist es das einzige sezernierte CEACAM-Molekül der humanen CEACAM-Familie (Abbildung 4A). Charakteristisch ist die hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von humanem und murinem CEACAM16 (Abbildung 6A). Aber auch in anderen verwandtschaftlich weiter entfernten Säugetieren wie dem Opossum und sogar im Schnabeltier (nicht gezeigt) konnte CEACAM16 mit einer erstaunlich hohen Konservierung seiner Aminosäuresequenz nachgewiesen werden. Diese Eigenschaft wird insbesondere augenscheinlich beim Interspeziesvergleich der N1-Domäne (Abbildung 6B), deren Bedeutung, wie im Falle von CEACAM1 und anderer CEACAMs, in der Bindung von bakteriellen und viralen Liganden aber auch in der Vermittlung von Zell-Zelladhäsion liegt (Virji *et al.*, 1996).

A



B

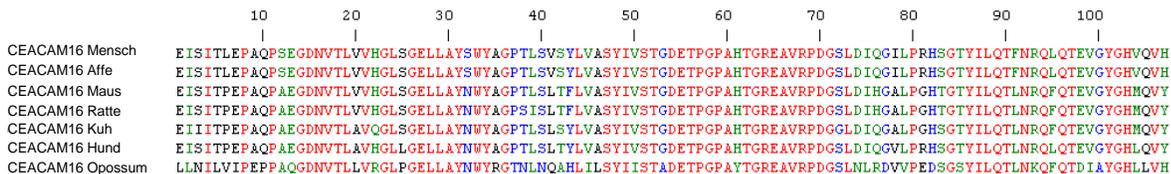


Abbildung 6: Konservierung der CEACAM16-N1-Domänensequenzen. (A) Sequenzübereinstimmung der CEACAM16-N1-Domäne des Menschen mit denen der CEACAM16-N1-Domänen verschiedener Säugetiere bis hin zum Beuteltier sind auf mRNA- (hellblaue Balken) bzw. Proteinebene (dunkelblaue Balken) dargestellt. Die Aminosäuresequenzen der N-Domänen von humanem und murinem CEACAM1 zeigen im Vergleich nur eine Übereinstimmung von unter 60% (Zebhauser *et al.*, 2005). Die Konservierung auf mRNA-Ebene ist kaum niedriger als auf Proteinebene (im Falle des Opossums sogar höher). Dies kann ein Hinweis sein, welchem hohen Selektionsdruck CEACAM16 im Laufe der Evolution ausgesetzt war. In **(B)** wurden die Aminosäuresequenzen der N-Domänen mittels *ClustalW-Alignment* auf interspeziell konservierte Sequenzabschnitte untersucht, welche rot dargestellt sind. Rote Sequenzbereiche könnten aufgrund ihrer Konservierung Bindungsstellen für potentielle Liganden sein.

Interessant ist auch das selektive Expressionsmuster von CEACAM16. Infolge von *Expressed-sequence-tag* (EST)-Datenbankenanalysen scheint das Gen ausschließlich im zentralen Nervensystem (ZNS) transkribiert zu werden, wobei die Transkription auf das Corti-Organ des Innenohrs, die Hypophyse und das Kleinhirn beschränkt zu sein scheint. Die hohe Interspezieskonservierung und die selektive Expression im Innenohr könnten ein Hinweis sein, dass CEACAM16 funktionell wichtig ist für den Hörvorgang.

1.3 Zielsetzung der Dissertation

CEACAM16 ist ein kürzlich entdecktes Protein der CEA-Familie und zählt gemeinsam mit CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20 zu den konservierten Mitgliedern. Es wird als einziges humanes CEACAM-Molekül sezerniert und ist nicht nur das am stärksten konservierte Mitglied der CEA-Familie, sondern unterscheidet sich auch durch ein hochspezifisches Expressionsmuster im ZNS von den übrigen CEA-Familienmitgliedern. *EST*-Datenbanken legen nahe, dass CEACAM16 vor allem im Innenohr exprimiert wird. Anhand von genomischen Datenbanken konnte das für CEACAM16 kodierende Gen bereits in etlichen Säugern bis hin zum Schnabeltier nicht aber in Nischsäuger-Vertebraten nachgewiesen werden (Kammerer und Zimmermann, 2010). Diese Informationen über das ansonsten bislang kaum untersuchte CEACAM16 sprechen für eine essentielle Funktion, zum Beispiel als wichtiger Bestandteil des Gehörs.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst den Transkriptionsort muriner und humaner CEACAM16-mRNA nachzuweisen. In einem nächsten Schritt sollte als Grundlage für weitere molekularbiologische Arbeiten CEACAM16-*full-length*-mRNA kloniert und sequenziert werden. Mithilfe von CEACAM16-*full-length*-cDNA sollten dann mittels genetischer Immunisierung polyklonale Antikörper gegen CEACAM16 hergestellt werden, welche den CEACAM16-Nachweis auf Proteinebene ermöglichen. Von der Identifizierung des Expressionsortes von CEACAM16 im Innenohr erwarteten wir uns schließlich Rückschlüsse auf dessen Funktionen für das Gehör.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Cryotom LEICA CM 350	Leica Microsystems
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson
DNA Speed VacR DNA 110	Savant
Elektrophoresekammer HorizonR 11.14	GIBCO BRL
<i>Electrophoresis Power Supply PS304</i>	GIBCO BRL
Fluoreszenzmessgerät 1420 V VICTOR	PerkinElmer
Geldokumentationssystem	Bio-Rad
Fluor-S Multilmager TM	
<i>gene gun</i> Helios	Bio-Rad
<i>gene gun</i> -Zubehör	Bio-Rad
Helium-Reduzierventil	Bio-Rad
Tefzel-Schläuche	Bio-Rad
<i>tubing prep station</i>	Bio-Rad
<i>tubing cutter</i>	Bio-Rad
Inkubator, B 5060 E	Heraeus Instrumente
Magnetrührer mit Heizplatte RCTbasic	IKA Labortechnik
Mikroskop Leica 110/120	Leica Microsystems
Mikrowelle MICROMAT	AEG
Photometer Gene Quant II	Amersham Pharmacia Biotech Europe
Pipettierhilfe PIPETBOY acu	Integra Biosciences
PIPETBOY IBS	Integra Biosciences
Pipetten Pipetman	Gilson
Eppendorf Research	Eppendorf
Schüttler CERTOMATR	B. Braun Biotech International
Sterilwerkbank HERA safe HS12	Heraeus Instrumente

Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Group
Thermocycler PTC 200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research
UV-Transilluminator UVT 400 M	International Biotechnology
Ultraschallgerät Transsonic 460/H	Elma
Ultra Turrax	IKA Labortechnik
VF2	IKA Labortechnik
REAXtop	Heidolph
MC1, Research RC210P	Sartorius
Acculab Atilon	Sartorius
M12 Lauda	Lauda
Julabo 19	Julabo Labortechnik
Zählkammer Neubauer	VWR International
MIKRO 20	Hettich Zentrifugen
SiGMA 4K15C	Sigma
Megafuge 2.0	Heraeus Instrumente
Varifuge 3.0R	Heraeus Instrumente
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zytospin Zentrifuge Cytospin 2	Shandon

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Clondisc-Platten	BD Biosciences
Deckgläschen (18 x 18 mm, 24 x 32 mm)	Menzel
Einfrierröhrchen CryoTube™ Vials	Nunc
Einmalhandschuhe SempercareR Nitril	Semperit Technische Produkte
FACS-Röhrchen	Greiner Labortechnik
Helium 4.6	Messer Group
Stickstoff 5.0	Messer Group
Glaspipetten (2,5; 10; 25; 50 ml)	Greiner Labortechnik
Gold <i>microcarrier</i> , 1 µm	Bio-Rad
Küvetten Quartz <i>spectrometer cell micro</i>	Bio-Rad
LidBac Membrandeckel	Eppendorf

PCR <i>tubes</i> (0,2 ml)	Biozym Diagnostik
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym Diagnostik
Polystyrol-Röhrchen (5 ml)	BD Biosciences
Reagenzröhrchen (15 ml; 50 ml)	BD Biosciences
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml) <i>Safelock</i>	Eppendorf
Skalpelle (Nr. 20)	Feather
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ²)	BD Biosciences
Zellkulturplatten (6- <i>well</i> , 96- <i>well</i> Rundboden, 96- <i>well</i> schwarz)	Nunc

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Invitrogen
Aminoethylcarbazol	Sigma
Ampicillin	Sigma
Amplex TM	MoBiTec
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Sigma
β-Mercapthoethanol	Cell Concepts
BSA (<i>Albumine bovine fraction V</i>)	Sigma
Express Ladder	Fermentas
Hyper Ladder	Bioline
Dimethylformamid	Sigma
dNTP-Mix	Fermentas
Enthaarungscreme Veet sensitive	Reckitt Benckiser AG
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Invitrogen
FACS <i>flow</i>	BD Biosciences
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	PAA Laboratories
Fugene 6	Roche Diagnostics
Glyzerin	VWR International

Isopropanol	VWR International
Ketavet	Pharmacia
LB Broth EZMix	Sigma
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Natriumdihydrogenphosphat	VWR International
MgCl ₂ (50 mM)	Fermentas
PCR-Buffer BioTherm™	GeneCraft
High Fidelity PCR Buffer mit MgCl ₂	Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	GeneCraft
High-Fidelity-Polymerase	Fermentas
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNA _{later}	Ambion
RPMI 1640, Medium	Gibco BRL
Spermidin	Sigma
TAE Buffer, 10x	Invitrogen
Trypsin/EDTA, 10x	Invitrogen
Trypanblau	Sigma
Wasserstoffperoxid	VWR International

2.1.4 Kits

MinElute PCR Purification Kit	Qiagen
StrataClone PCR Cloning Kit	Agilent Technologies
Liga Fast Ligation Kit	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Perfect Prep Gel Clean Up	Eppendorf
Plasmid Maxi Prep	Qiagen
Plasmid Mini Prep	Qiagen
Reverse Transcription System	Promega
Mouse-To-Mouse IHC Detection System	Chemicon, Millipore

Kit

2.1.5 Zelllinien

Hela-Zellen	LTI, LMU
BOSC23-Zellen	LTI, LMU
SP2/0-Zellen	LTI, LMU
COS7-Zellen	LTI, LMU

2.1.6 Oligodesoxyribonukleotide

Bei den Oligodesoxyribonukleotiden sind vorhandene Restriktionsschnittstellen durch Fettdruck markiert. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Die Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

Gen	Primer	Sequenz	Temp. (°C)
<i>murines</i> <i>β-Actin</i>	bActin fo	ATGGATGACGATATCGCT	58
	bActin re	ATGAGGTAGTCTGTCAGGT	58
<i>murines</i> <i>CEACAM16</i>	CEACAM1-like N1f	TCCTGGTGGCCAGTTACATT	60
	CEACAM1-like 4Ar	GCTGCTACAGACGAGACGAA	60
<i>murines</i> <i>CEACAM16</i>	mC16-5UT-f	CGGAATTCCATCTCGAACATCAGCCTT	59
	mC16-3UT-r	TGGCTCGAGGCGTTTCTCTCCAGGTCTCA	59
<i>murines</i> <i>CEACAM16</i>	mC16-VV1-f	ACCAAAGCTTGGAGATCTCCATCA	64
	mC16-VV1-r	TCCCTCGAGCGGCCACCTGTAGCTCCACC	64
<i>humanes</i> <i>CEACAM16</i>	hC16-5UT-f	CGGAATTCACCTCGGTTTGGGGTGAAAG	59
	hC16-3UT-r	TGGCTCGAGCTCCAGGGTCACGCTGTTA	59
<i>humanes</i> <i>CEACAM16</i>	hC16-VV8-for	ACCAAAGCTTGGAGATCTCTATCACCCCTGG	58

2.1.7 Plasmide

Neben den Standardplasmiden pCMV-SPORT6 und Strataclone PCR Cloning Vector pSC-A-amp/kan (Agilent Technologies, Waldbronn) (s. a. Kapitel 3.2.2), dienten zur Herstellung des polyklonalen anti-CEACAM16-Immunsersum der Immunisierungsvektor pVV8 in Verbindung mit dem *Screening* Vektor pVV1 (Abbildung 7). Diese kodieren beide für eine Signalpeptidsequenz, ein Markerpeptid (*flag*, bzw. *myc*) und eine GPI-Verankerungssignalsequenz. Als eukaryontischer Promoter dient der Zytomegalivirus (CMV)-Promoter. Zur Selektion in transformierten Bakterien, bzw. transfizierten eukaryontischen Zellen verfügen die Plasmide über Ampicillin-, bzw. Hygromycin-Resistenzgene.

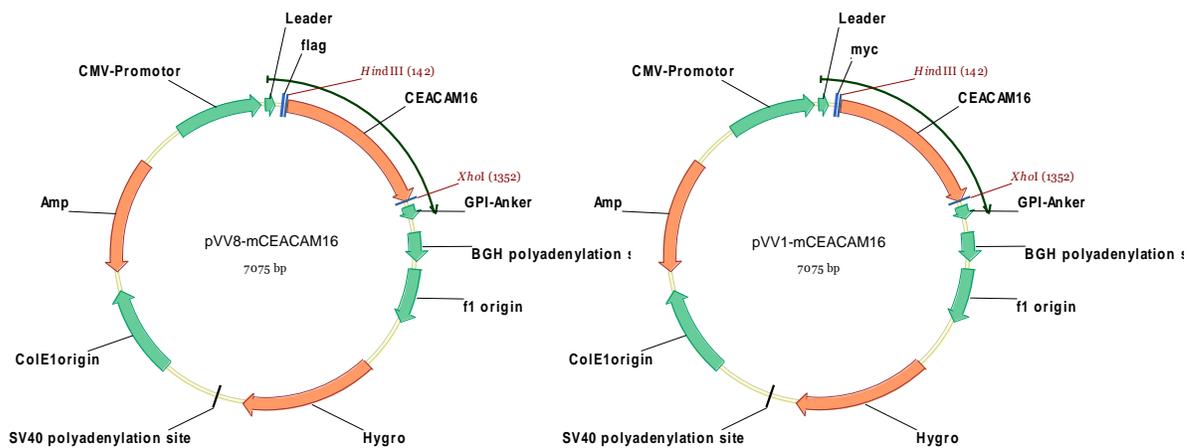


Abbildung 7: Vektorkarten des *Screening*-Vektors pVV1 und des Immunisierungsvektors pVV8. Beide Plasmide besitzen die gleiche *Leader*- und GPI-Verankerungssequenz. Sie unterscheiden sich ausschließlich durch die unterschiedlichen N-terminal kodierten Markerpeptidsequenzen *flag*, bzw. *myc*. Im Bereich der Klonierungsstelle (MCS, *multiple cloning site*) sind die in dieser Arbeit relevanten Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XhoI* notiert. Offene Leseraster sind als Pfeile dargestellt. Die Abbildungen beinhalten bereits das CEACAM16-cDNA-*insert*, wie es in der Arbeit in die Vektoren kloniert wurde (s. a. Ergebnisteil). Beide Vektoren verfügen über ein prokaryontisches Ampicillinresistenzgen (Amp), sowie eine eukaryontisches Hygromycinresistenzgen (Hygro).

Zur Verbesserung einer Immunantwort wurde des Weiteren das Maus-GM-CSF-Expressionsplasmid RJB-GM (Geschenk der Firma Genovac, Freiburg) verwendet. Dies besitzt als Promoter die Rous-Sarkomvirus-LTR (*long terminal repeat*), sowie

eine bovine Wachstumshormon-Gen polyA-Signalsequenz und einen SV40 *origin of replication*.

2.1.8 Antikörper

Nicht-konjugierte Antikörper

Maus-anti-c-MYC-Ig Sigma

Maus-anti-flag M2-Ig Sigma

Horseradish peroxidase (HRP)-gekoppelte Antikörper

Ziege-anti-Maus-Ig-HRP Southern Biotech

Kaninchen-anti-Maus-Ig-HRP DAKOCytomation

Fluoreszenzmarkierte Antikörper

Ziege-anti-Maus-Ig-FITC Jackson ImmunoResearch

2.1.9 Software und Internetadressen

Vektor NTI™ Invitrogen

WinMDI 2.8 Joe Trotter

Brainmapping www.brainmapping.org

CEA Homepage <http://www.carcinoembryonic-antigen.de/>

ClustalW [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html)

[bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html)

Ensembl Genome Browser <http://www.ensembl.org>

Expasy Proteomics Server <http://www.expasy.org/tools/dna.html>

Translate Tool

Hereditary Hearing loss Homepage <http://hereditaryhearingloss.org/>

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

SignalP <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

The Connexin-deafness homepage <http://davinci.org.es/deafness/index.php>

Virtualmedicalcentre <http://virtualmedicalcentre.com>

2.1.10. Herstellerverzeichnis

AEG	Nürnberg, Deutschland
Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Ambion	Austin, Texas, USA
Amersham Pharmacia Biotech Europe	Wien, Österreich
BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
B. Braun Melsungen	Melsungen, Deutschland
Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
Bioline	Luckenwalde, Deutschland
Bio-Rad	Richmond, Kalifornien, USA
Biozym Diagnostik	Oldendorf, Deutschland
Chemicon Millipore	Billerica, Massachusetts, USA
Cell Concepts	Umkirch, Deutschland
DAKOCytomation	Glostrup, Dänemark
Elma	Singen, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Feather	Seki, Japan
Fermentas	Leon-Rot, Deutschland
GeneCraft	Lüdinghausen, Deutschland
Genovac	Freiburg, Deutschland
Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Gilson	Middleton, Wisconsin, USA
Greiner Labortechnik	Nürtingen, Deutschland
Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Heraeus Instrumente	Hanau, Deutschland
Hettich Zentrifugen	Bäch, Schweiz
Integra Biosciences	Fernwald, Deutschland
International Biotechnology	New Haven, Connecticut, USA
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Jackson ImmunoResearch	Suffolk, Großbritannien
Julabo Labortechnik	Seelbach, Deutschland
Leica Microsystems	Mannheim, Deutschland

MoBiTec	Göttingen, Deutschland
Menzel-Gläser	Braunschweig, Deutschland
Messer Group	Sulzbach, Deutschland
Nunc	Naperville, Illinois, USA
PAA Laboratories	Pasching, Österreich
PerkinElmer	Rodgau, Deutschland
Pharmacia	Karlsruhe, Deutschland
Promega	Mannheim, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Reckitt Benckiser	Mannheim, Deutschland
Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Semperit Technische Produkte	Wien, Österreich
Shandon	Pittsburgh, Pennsylvania, USA
Sigma	Taufkirchen, Deutschland
Southern Biotech	Birmingham, Alabama, USA
Thermo	Langenselbold, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebeisolierung

Innenohr-, Hypophysen- und Kleinhirngewebe wurde aus drei Mäusen gewonnen. Die Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert und dann durch Genickbruch getötet und mit Nadeln auf einer Styroporunterlage fixiert. Mit einer Präparierschere wurde zuerst die Kopfhaut entfernt und dann der Schädel von der hinteren Schädelbasis mit einem Schnitt in Richtung Augen eröffnet. Das Kleinhirn wurde herausgenommen und ebenso wie die anderen Gewebe sofort in *RNAlater RNA Stabilization Reagent* aufbewahrt. *RNAlater* dringt schnell in das Gewebe ein und schützt die enthaltene RNA vor Degradierung. Nach Entfernung des Großhirns konnte die Hypophyse aus der *Fossa pinealis* präpariert werden. Aus der Schädelbasis wurde das komplette Felsenbein herausgeschnitten und in PBS unter dem Mikroskop bis zur *Cochlea* freipräpariert. Die *Cochlea* wurde mit der Pinzette zerbrochen, um zu garantieren,

dass auch in das häutige Labyrinth *RNAlater* eindringt. Die gewonnenen Gewebe können nun bis zu vier Wochen bei 2-8°C aufbewahrt werden.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Aus den Geweben wurden mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* RNA gewonnen. Pro Probe wurde nicht mehr als 30 mg Gewebe verwendet. Nach Entfernung von *RNAlater* wurde der im Kit enthaltene Guanidiniumthiocyanat-haltige Puffer RLT nach Hinzufügen von 1% 2-Mercaptoethanol zur Lyse der im Gewebe enthaltenen Zellen und zur Freisetzung der enthaltenen RNA benutzt. Das Lysat wurde mit Hilfe des Ultra Turrax homogenisiert und dann nach Angaben des Herstellers und unter Verwendung aller enthaltenen Reagenzien weiterverarbeitet. Im letzten Schritt wurde die RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Proben können bei -80°C aufbewahrt werden.

2.2.2.2 Konzentrationsmessung und Qualitätskontrolle der RNA-Proben

Die RNA-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe von Absorptionsmessungen festgestellt. Nach 50-facher Verdünnung der Eluate mit RNase-freiem Wasser wurde die Absorption photometrisch bei 260 und 280 nm mit dem *Gene Quant II* gemessen. Die Qualitätsmessung der isolierten RNA wurde am *Agilent Bioanalyzer 2100* mit dem *RNA 6000 Pico Kit* nach Angaben des Herstellers *Agilent Technologies* durchgeführt. Bei dieser Methode wird eine Kapillarelektrophorese und gleichzeitig eine Fluoreszenzmessung durchgeführt, die auf einer laserinduzierten Fluoreszenz eines RNA-bindenden Cy-3-Farbstoffes beruht (Mueller, O. *et al.*, 2000). Die Auswertung erfolgte mit der „*Software 2100 Expert*“ im „*Eukaryote Total RNA Pico Assay Modus*“. Man erhält sowohl eine Konzentrationsangabe relativ zum eingesetzten RNA 6000 Pico Marker, sowie eine *RNA Integrity Number* als Maß für die Qualität der RNA, die über das Verhältnis der 28 S rRNA zur 18 S rRNA der eingesetzten Probe berechnet wird (Schroeder, A. *et al.*, 2006).

2.2.2.3 Reverse Transkription (RT) der isolierten RNA

Um die isolierte mRNA zur Amplifikation in der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) nutzen zu können, wird sie während der RT-PCR in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben. Zur Initiation der Transkription werden zufällige Kombinationen aus Desoxynukleotid-Hexameren (*random primers*) genutzt.

Für einen Reaktionsansatz wird 1 µg mRNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 9,9 µl verdünnt. Der weitere Ansatz und die Reaktionsschritte sind aus der Tabelle 1 und 2 zu entnehmen. Alle benötigten Komponenten stammen von der Firma Promeg und die Reaktionsschritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Reaktionsansatz

<i>Endkonzentration</i>	<i>Komponenten</i>	<i>Konzentration Stammlösung</i>	<i>Volumen (µl)</i>
50 ng/µl	RNA (1 µg) in RNase-freiem H ₂ O		9,9
10 pmol/l	<i>Random primer</i>	0,5 M	1,0
1x	RT-Puffer	10x	2,0
5 mM	MgCl ₂	25 mM	4,0
1 mM	dNTP	10 mM	2,0
1 U/µl	RNase-Inhibitor (RNasin)	40 U/µl	0,5
0,75 U/µl	AMV-Reverse-Transkriptase	25 U/µl	0,6
			20,0

Reaktionsschritte

	<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Dauer (min)</i>
Denaturierung	70	10
	4	3
Primeranlagerung	25	10
Verlängerung	42	60
Denaturierung	95	5
	4	3

2.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR diente zum Nachweis von cDNA-Sequenzen nach reverser Transkription der mRNA. Des Weiteren wurden mit ihrer Hilfe Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen an das 5'- und 3'- Ende von cDNA angehängt und diese amplifiziert, um die Produkte schließlich in unterschiedliche Vektoren zu klonieren.

Das Programm „Primer3“ (neue Version des Programms Primer 0.5 von Steve Lincoln, Mark Daly und Eric S. Lander) wurde zum Entwurf der Primer unter Berücksichtigung von Schmelztemperatur und ausgewogenem Guanin/Cytosin- und Adenin/Thymin-Gehalt der Oligodesoxyribonukleotide genutzt. Für Expressionsanalysen wurde die BioTherm™-DNA-Polymerase von GeneCraft verwendet. Da bei der Amplifikation von cDNA für den Einbau in Vektoren großer Wert auf fehlerfreie Nukleotidsequenzen gelegt wurde, wurde für diese Fälle die *High-Fidelity*-Polymerase von Fermentas mit *Proof-Reading*-Funktion benutzt. Je nach gewünschter Produktmenge fanden zwischen 30 und 35 Zyklen statt.

Reaktionsansatz unter Verwendung der BioTherm™-DNA-Polymerase

<i>Komponenten (Endkonzentration)</i>	<i>Volumen (µl)</i>
cDNA-Template (1,0 µg)	1,00
PCR-Puffer 10x (0,2 µM)	2,50
Forward Primer 10 pmol/µl (0,2 µM)	1,00
Reverse Primer 10 pmol/µl (0,2 µM)	1,00
MgCl ₂ 25 mM (3,0 mM)	2,50
dNTP 25 mM (0,2 mM)	0,20
BioTherm™ DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,13
H ₂ O	17,67
	25,00

Reaktionsansatz unter Verwendung der *High-Fidelity*-Polymerase

<i>Komponenten (Endkonzentration)</i>	<i>Volumen (µl)</i>
cDNA-Template (1,0 µg)	1,00
PCR-Puffer 10x mit MgCl ₂ (0,2 µM)	2,50
Forward Primer 10 pmol/µl (0,2 µM)	1,00
Reverse Primer 10 pmol/µl (0,2 µM)	1,00
MgCl ₂ 25 mM (3,0 mM)	2,50
dNTP 25 mM (0,2 mM)	0,20
<i>High-Fidelity</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,13
H ₂ O	17,67
	25,00

Reaktionsbedingungen

Versuchsschritte	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Erste Denaturierung	95	0,5
Amplifikation (30-35 Zyklen):		
Denaturierung	94	0,5
Primeranlagerung	58-68 ¹	1,0-3,0
Verlängerung	72	1,5-4,0 ²
Letzte Verlängerung	72	10,0

¹ Die Temperatur richtet sich nach der Nukleotidsequenz und Länge der jeweiligen Primer (s. a. Kapitel 2.1.7 Oligodesoxyribonukleotide)

² Abhängig von der Länge des PCR-Produktes und der jeweiligen Polymerase (kurze Verlängerungszeit für Taq-Polymerase, längere Verlängerungszeit für *High-Fidelity*-Polymerase)

2.2.2.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die entstandenen PCR-Produkte sowie Vektoren vor und nach Restriktionsendonukleaseverdau wurden mit Hilfe der DNA-Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatgruppen von DNA-Sequenzen wandern DNA-Fragmente im Gel entsprechend ihrer Länge zur Anode bei einer angelegten Spannung von 80-100 V. Für die optimale Trennung von DNA-Fragmenten zwischen 500-5000 bp Länge wurden Gele aus TAE-Puffer und einer Agarosekonzentration zwischen 1-2% durch Erhitzen der Mischung in der Mikrowelle und darauf folgendem Abkühlen auf 50-60 °C hergestellt. Zu den noch flüssigen Agaroselösungen wurden 0,2 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt, um die DNA-Fragmente in der UV-Transillumination sichtbar zu machen.

Die DNA-Proben wurden vor der Applikation in die Geltaschen mit einem 6x-DNA-Auftragspuffer versetzt. Der Auftragspuffer markiert die Elektrophoresefront durch den enthaltenen Farbstoff und erhöht die Dichte der DNA-Proben. Um die Größe der DNA-Fragmente abschätzen zu können und einen ungefähren Anhalt über die DNA-Menge zu bekommen, lief eine DNA-Leiter im Gel mit. Mittels eines UV-Transilluminators wurden die DNA-Banden im Gel dargestellt und digital fotografiert.

2.2.2.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Bei präparativen Gelen wurde das gewünschte DNA-Fragment im Transilluminator

mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des *Perfect Prep Gel Cleanup Kit* nach Angaben des Herstellers extrahiert.

2.2.2.7 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Aufgereinigte PCR-Produkte und Vektoren wurden mit Hilfe von *Fast-Digest*-Restriktionsenzymen unter Verwendung des mitgelieferten *Fast-Digest*-Puffers verdaut.

Restriktionsansatz für Vektoren

<i>Komponenten</i>	<i>Volumen</i>
10x Fast Digest Puffer	2 μ l
DNA (200 ng)	1 μ l
Restriktionsenzym I	1 μ l
Restriktionsenzym II	1 μ l
H ₂ O	15 μ l

Restriktionsansatz für PCR-Produkte

<i>Komponenten</i>	<i>Volumen</i>
10x Fast Digest Puffer	2 μ l
DNA (mind. 1 μ g)	10 μ l
Restriktionsenzym I	1 μ l
Restriktionsenzym II	1 μ l
H ₂ O	15 μ l

2.2.2.8 Ligation

Mit Hilfe des *LigaFastTM Rapid DNA Ligation System* wurden nach dem Restriktionsendonukleaseverdau *inserts* in die gewünschten Vektoren kloniert. Zuvor wurden beide Verdauansätze über ein Agarosegel und darauf folgende Extraktion aus dem Gel aufgereinigt. Um die DNA-Konzentrationen von Vektor und *insert* abschätzen zu können erfolgte ein weiterer Analyselauf im Gel mit 10% des Gesamtvolumens der aufgereinigten DNA. Anhand der DNA-Konzentrationsangabe des *DNA Hyper Ladder* konnte die Menge des Vektors und des zu integrierenden DNA-Fragments abgeschätzt und im molaren Verhältnis 1:3 nach folgendem Ansatz ligiert werden:

Ligationsansatz

<i>Komponenten</i>	<i>Volumen</i>
Insert	1 molares Äquivalent
Vektor (50-100 ng)	3 molare Äquivalente
2x Rapid Ligation Puffer	5 µl
T4-DNA-Ligase (3 U/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 30 µl

Der Ligationsansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um dann anschließend für die Transformation von Bakterien weiterverwendet zu werden,

2.2.2.9 Transformation von kompetenten Bakterien**XL1-Blue-Competent Cells**

Zur Transformation von Bakterien mit spezifischen eukaryotischen Expressionsplasmiden, wie dem Immunisierungskonstrukt, diente der kompetente *E. coli*-XL1-Blue-Stamm von Stratagene. Für die Transformation wurden 25 µl Aliquots der Zellen in 2 ml Eppendorf Röhrchen verwendet. Je ein Aliquot für die Positivkontrolle mit dem pUC18-Kontrollplasmid und für den Transformationsvektor wurden auf Eis aufgetaut und regelmäßig vorsichtig gemischt. Pro Aliquot wurden 2,5 µl Reaktionsansatz (2.2.2.8) oder 1 µl der pUC18-Positivkontrolle hinzugefügt, sanft geschüttelt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden exakt 45 sec bei 42°C ins Wasserbad getaucht und für weitere 2 min auf Eis inkubiert. In jeden Ansatz wurden 225 µl SOC-Medium pipettiert und die Röhrchen wurden für 1 h im Thermomixer bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Schließlich wurden 5 µl der Positivkontrolle und je 100 µl, 50 µl und 10 µl des Transformationsansatzes auf Clondisk™-Platten verteilt und im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert.

StrataClone™ PCR Cloning Kit

Das *StrataClone™ PCR Cloning Kit* ermöglicht die sofortige Klonierung beliebiger DNA-Fragmente in den StrataClone™-Vektor, die mit einer *Taq*-Polymerase amplifiziert worden sind. PCR-Produkte mit einem Adenosin-Überhang am 3'-Ende, wie er üblicherweise von der *Taq*-Polymerase matrizenunabhängig synthetisiert wird,

können mit dem Uridin-Überhang des StrataClone Vectors hybridisiert und ligiert werden. Dies macht vorherige Restriktionsendonukleaseansätze unnötig. Zur Überprüfung der Ligationseffizienz wurde auch ein Kontrollinsert in den Vektor kloniert

Ligationsansatz

Komponenten	Volumen
<i>StrataClone™ Cloning Buffer</i>	3 µl
PCR-Produkt oder <i>Strata Clone™ Control Insert</i>	2 µl
<i>StrataClone™-Vektor-Mix</i>	1 µl

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf Eis aufbewahrt. Die Transformation der kompetenten Zellen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Als Positivkontrolle der Transformation diente wieder eine Transformation mit dem pUC18-Kontrollplasmid. Bevor die kompetenten Zellen auf den LB-Ampicillin-Platten aufgetragen wurden, wurden die Platten mit X-Gal bestrichen. Der *StrataClone™ PCR Cloning Vector* enthält eine lacZ-Genkassette, die für eine β -Galactosidase kodiert. β -Galactosidase katalysiert die Spaltung des chromogenen Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal), was zu einer Blaufärbung der Zellen führt. Die lacZ-Genkassette wird bei erfolgreicher Klonierung des gewünschten *Inserts* allerdings zerstört und die Bakterienkolonien stellen sich weiß dar.

2.2.2.10 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient dem Nachweis des *Inserts* nach erfolgreicher Ligation und Transformation. Einzelne Bakterienkolonien wurden als Quelle für DNA-Matrizen verwendet. Dafür wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze eine Kolonie aufgepickt und in den PCR-Ansatz getaucht. Ansonsten waren der Reaktionsansatz und die Reaktionsschritte identisch zu einer PCR mit der BioTherm-*Taq*-Polymerase (GeneCraft, Lüdinghausen). Als Primer dienten die Klonierungsprimer. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese.

2.2.2.11 Herstellung von *E.-coli*-Dauerkulturen

Bakterienkolonien wurden zunächst in ein 2-ml-Eppendorfröhrchen mit 2 ml LB-Medium und 2 µl Ampicillin mit Hilfe einer sterilen Pipette überführt und für mindestens acht Stunden bei 300 rpm und 37°C im Thermomixer hochgezogen. Für eine verbesserte Sauerstoffversorgung wurden *Lidbacs* mit einer luftdurchlässigen Membran auf die Röhrchen gesetzt. 470 µl des Bakterienansatzes wurden mit 100 µl 87%igem autoklavierten Glycerin in ein 2 ml Röhrchen gegeben, gut gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.2.2.12 Plasmidpräparation

Miniprep

Eine Bakterienkolonie wurde kultiviert (2.2.2.11) und anschließend konnten die Plasmide mithilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kits nach Angaben des Herstellers extrahiert werden.

Maxiprep

Für eine Maxiprep-Plasmidpräparation zur Gewinnung größerer DNA-Mengen wurden 250 µl der kultivierten Bakteriensuspension (2.2.2.11) mit 250 ml LB-Medium und 250 µl Ampicillin in einem Erlenmeyerkolben über Nacht im Schüttler bei 180 rpm und 37°C angesetzt. Am nächsten Tag konnten die Plasmide nach Angaben des Herstellers mit dem Qiagen Plasmid Maxiprep gewonnen werden.

2.2.2.13 Konzentrationsbestimmung und Reinheit der DNA

Die Konzentration der DNA wurde mithilfe eines Photometers durch die Messung der Extinktion oder optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm bestimmt. Dabei berechnet sich die Konzentration doppelsträngiger (ds) DNA folgendermaßen nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

Konzentration dsDNA (µg/ml) = $OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Der Quotient aus der OD_{260} und OD_{280} lässt Rückschlüsse auf die Reinheit zu. So sollte der Quotient für einen hohen Reinheitsgrad $> 1,8$ sein. Niedrigere Werte deuten auf eine Verschmutzung mit Proteinen hin.

2.2.2.14 DNA-Sequenzierung

Die Firma MWG Biotech übernahm die DNA-Sequenzierung nach der „*Cycle-Seqenzierungsmethode*“ (Sanger *et al.*, 1977). Zu diesem Zweck wurde 1 µl der DNA mit einer Konzentration von 1 µg/µl mit einer Speed-Vac-Zentrifuge 10 min bei mittlerer Erwärmung eingedampft. Die ermittelten Sequenzen wurden mithilfe von Sequenz-*Alignment*-Programmen mit entsprechenden Sequenzen aus Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) verglichen und auf ihre Übereinstimmung überprüft.

2.2.3 Herstellung von Antikörpern durch genetische Immunisierung

Die genetische Immunisierung mit Hilfe der *gene gun* ist eine etablierte Methode im Labor für Tumorummunologie zur Herstellung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen beliebige Proteine. Polyklonale Antikörper gegen murines CEACAM16 wurden nach einer Methode für genetische Immunisierungen der Firma Genovac hergestellt.

2.2.3.1 Klonierung des Immunisierungs- und Kontrollvektors

Zur Vorhersage des Signalpeptides diente das Programm SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Es erkennt anhand der Aminosäuresequenz die Anlagerungsstelle der Signalpeptidase I (Bendtsen *et al.* 2004). Zur Übersetzung der Nukleotidsequenz der sequenzierten CEACAM16-cDNA in eine Aminosäuresequenz diente das Programm *translate tool* von Expasy (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>).

Im nächsten Schritt wurden Primer entworfen, die so an die CEACAM16-cDNA binden, dass bei Amplifizierung der DNA mittels PCR für das Signalpeptid und Stoppkodon kodierende Sequenzen nicht enthalten sind. Um für den Vorwärts- und Rückwärtsprimer eine gleiche Anlagerungstemperatur und optimale Bindungsqualität zu garantieren, wurden die letzten sechs Nukleotide vor dem Stoppkodon ebenfalls nicht in den Rückwärtsprimer integriert, da diese sehr G/C-reich waren. Zur Klonierung in den Immunisierungsvektor wurden weiterhin in den Vorwärtsprimer eine *HindIII*-Schnittstelle und in den Rückwärtsprimer eine *XhoI*-Schnittstelle eingefügt. Die entworfenen Primer mC16-VV1-f und mC16-VV1-r (s. a. 2.1.6.

Oligodesoxyribonukleotide) wurden mit Hilfe des *Primer3*-Programms auf ihre Funktionalität geprüft. Der Immunisierungsvektor (Abbildung 7) kodiert für ein *flag*-Epitop und ein Signalpeptid für GPI-Verankerung. So kann bei korrekter Klonierung der CEACAM16-cDNA in das Plasmid ein membranständiges Fusionsprotein mit einem *flag*-Markerpeptid am Aminoterminus (N-Terminus) exprimiert werden.

Für die Planung des Klonierungsexperiments und den Entwurf der dafür notwendigen Primer wurde das Programm *Vektor NTI* verwendet. Damit lässt sich virtuell die gewünschte Sequenz in einen Vektor einbauen. Dies wird sowohl auf einer Vektorkarte als auch in Form einer Nukleotidsequenz dargestellt. *Vektor NTI* erleichtert dabei insbesondere die Überprüfung des offenen Leserasters (ORF, *open reading frame*). Beim Einbau der CEACAM16-Nukleotidsequenz ist darauf zu achten, dass sich das Leseraster zwischen Startkodon vor dem *flag*-Epitop und Stoppkodon nach dem GPI-Anker nicht verschiebt. Die Insertion oder Deletion eines einzigen Nukleotids beim Einbau der CEACAM16-Sequenz in den Vektor würde zu einer Verschiebung des ORFs und später bei der Translation zu einem defekten Protein mit einer vollkommen anderen Struktur führen.

Nach Amplifizierung, Nachweis über Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung wurden DNA und Immunisierungsvektor in einem Doppelverdau mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Anschließend wurden beide erneut aufgereinigt und nach Ligation zur Transformation von XL1-Blue-Zellen verwendet. Die erfolgreiche Transformation wurde mittels Kolonie-PCR und Gelelektrophorese überprüft. Von positiven Kolonien wurde nach Vervielfältigung in einer Übernachts-Flüssigkultur Plasmid-DNA mit Hilfe des Maxi-Prep-Kits extrahiert und sequenziert.

BOSC23-Zellen wurden mit einem Immunisierungsvektor, der die korrekte CEACAM16-cDNA-Sequenz enthielt, transient transfiziert. In einem zellbasiertem ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*; *Cell ELISA*) konnte mit Hilfe eines Anti-Flag-Antikörpers überprüft werden, ob das Fusionsprotein korrekt von den BOSC23-Zellen an der Oberfläche exprimiert wurde. Zusätzlich wurde die CEACAM16-cDNA in einen Kontrollvektor kloniert. Dieser kodiert für ein *myc*-Epitop anstatt für ein *flag*-Epitop. Auch der Kontrollvektor wurde sequenziert und die Expression des Fusionsproteins mit Hilfe eines Anti-*myc*-Antikörpers im *Cell ELISA* überprüft.

2.2.3.2 Herstellung der „DNA-Munition“ für die *gene gun*

Für die genetische Immunisierung mittels *gene gun* wurde die Plasmid-DNA des Immunisierungsvektors an Goldpartikelchen mit 1- μ m-Durchmesser adsorbiert und anschließend wurde die Innenseite eines Teflonsschlauchs mit den beladenen Goldkugelchen beschichtet.

Zunächst wurden 25 mg Goldpartikel in ein Eppendorfröhrchen überführt. Zum abgewogenen Gold wurden 200 μ l einer 0,05 M Spermidin-Lösung in wasserfreiem Ethanol (8 μ l Spermidin [$d = 0,93 \text{ g/cm}^3$; $M_r = 145,25$] in 0,992 ml 100% wasserfreiem Ethanol) hinzugefügt. Das Gemisch wurde 5 s mit Hilfe eines Vortex intensiv gemischt und danach 5 s im Ultraschallbad beschallt. Nach Zugabe von 200 μ l der Plasmid-DNA (1 mg/ml) wurden unter vorsichtigem Mixen für weitere 5 s 200 μ l einer 1 M CaCl_2 -Lösung dazugetropft. Durch Zugabe der Spermidin- und CaCl_2 -Lösung wird die Adsorption des DNA-Präzipitats an die Goldpartikelchen optimiert. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal mit jeweils mit 1 ml 100%-Ethanol gewaschen. Die Goldpartikel wurden durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge für 5 s bei 5000 rpm gesammelt. Der Überstand wurde nach jedem Zentrifugationsschritt abgenommen und verworfen. Um die Plasmid-DNA an den Goldpartikeln vor Degradierung zu schützen, wurden sie in eine Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Ethanol-Lösung überführt. Dafür wurden 1 mg PVP in 1 ml 100%-Ethanol gelöst und anschließend 53 μ l dieser Stammlösung mit 3 ml 100%-Ethanol in einem 15-ml-Röhrchen verdünnt. Das Goldstaubsediment wurde mit 200 μ l der Lösung resuspendiert und zuletzt so auf den Boden des 15 ml Röhrchens pipettiert, dass es zu keiner Durchmischung mit der Arbeitslösung kommt. Im nächsten Schritt konnte die Innenseite des Teflonschlauchs beschichtet werden. Zunächst wurde ein 75 cm langer Tefzelschlauch in die *Tubing Prep Station* eingespannt und für 15-20 min mit N_2 bei einer Flussrate von 0,3-0,4 L/min begast. Dann kann der Tefzelschlauch an eine 5-ml-Spritze angesteckt werden und während die Goldsuspension vorsichtig gemischt wurde (Vortex), wurde sie über die Spritze in den Teflonschlauch eingezogen. Der Schlauch wurde in die *Tubing Prep Station* geschoben und nach 5-minütiger Inkubationszeit wurde die Lösung vorsichtig über die Spritze abgezogen. Darauf wurde der Schlauch um 180° gedreht, für weitere 5 s inkubiert, anschließend für 1 min rotiert und dann bei einer

Stickstoffflussrate von 0,3-0,4 L/min 10 min unter Rotation getrocknet. Im letzten Schritt wurde der Teflonschlauch in 1,5 cm lange Stücke geschnitten, die in einem Exsikkator bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden.

2.2.3.3 Immunisierung der Mäuse mit der *gene gun*

Es wurden 6 weibliche BALB/c-Mäuse über 8 Wochen immunisiert. Die Tierhaltung erfolgte im Tierstall des Instituts für chirurgische Forschung. Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, Großhadern. Diese Tierversuche waren bei der genehmigenden Behörde (Regierung von Oberbayern) angezeigt (55.2-1-54-2531.6-12-03).

Vor der ersten Immunisierung und dann in regelmäßigen Abständen wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene abgenommen und in ein *Microtainer*-Gefäß (BD Biosciences, Heidelberg) überführt (s. a. Immunisierungsschema). Nach 30 min bei Raumtemperatur, wurde dieses in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor bei 3000 rpm für 12 min abzentrifugiert und das gewonnene Serum bei -20° C aufbewahrt.

Vor der Immunisierung wurden die Mäuse mit 2 µl/g Körpergewicht Narkosemittel (0,6 ml Rompun, 0,6 ml Ketavet, 0,7 ml isotonische Kochsalzlösung) intraperitoneal narkotisiert.

Dann wurden den Mäusen in der Inguinalregion mit einem Elektrorasierer die Haare entfernt. Die *gene gun* wurde mit der Plasmidmunition (4 µg DNA/Patrone) beladen und an eine Heliumflasche angeschlossen. Mit einem Druck von 400 psi wurden die Goldkugelchen mit zwei Schüssen auf die Haut rechts und links in der Leistengegend der Mäuse appliziert.

Immunisierungsschema

Tag	
1	Abnahme Präimmunserum
2	Immunisierung mit GM-CSF-Expressionsplasmid
5	1. Immunisierung mit dem Immunisierungsvektor
19	2. Immunisierung mit dem Immunisierungsvektor
23	3. Immunisierung mit dem Immunisierungsvektor
30	Abnahme Zwischenserum
37	4. Immunisierung mit dem Immunisierungsvektor
44	Abnahme Endserum

2.2.4 Methoden der Zellkultur

2.2.4.1 Kultivierung von Zelllinien

In der Zellkultur wurden BOSC23- und COS7-Zellen in einem Inkubator mit Wasserdampfsättigung bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert und für weitere Experimente verwendet. Beide Zelllinien wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (Falcon) in RPMI-Medium versetzt mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin/Glutamin (PSG; 100-fach konzentriert) kultiviert und je nach Wachstumsverhalten alle zwei bis drei Tage passagiert. Dazu wurden die semiadhärenten Zellen durch wiederholte Aspiration des Mediums vom Zellkulturflaschenboden gelöst und in ein 15-ml-Falconröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 340x g wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in neues Medium resuspendiert. Nach Auszählung der Zellen wurden 1×10^6 Zellen in einer frischen Kulturflasche mit 15 ml Standardmedium neu angesetzt.

2.2.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Um tote Zellen zu markieren wurde in einem Verhältnis von 1:1 der Farbstoff Trypanblau (0,4% in PBS gelöst) zur Zellsuspension hinzugefügt. Lebendige Zellen wurden in allen vier Großquadranten der Zellkammer ausgezählt und ein Mittelwert wurde

gebildet. Mit folgender Formel lässt sich die Zellzahl pro ml Zellsuspension berechnen:

$$\text{Zellzahl pro ml Suspension} = \text{mittlere Zellzahl pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zellen wurden in ihrer exponentiellen Wachstumsphase bei einer Konfluenz von 60-80% vom Kulturflaschenboden abgelöst und nach Überführung in ein 15-ml-Falconröhrchen bei Raumtemperatur mit 340x g für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Zellpellet in ein spezielles Einfriermedium (FCS, 10% DMSO steril) in einer Konzentration von 5×10^6 pro ml resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt und in einem Styroporbehälter bei -80°C eingefroren. Die langfristige Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Um Zellen in Kultur zu nehmen wurden sie nach Entnahme aus dem Stickstofftank in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und so lange inkubiert, bis sich das Medium verflüssigt hatte. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem 15-ml-Falconröhrchen mit 10 ml 37°C warmen Mediums verdünnt und bei RT mit 340x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und in einer 75-cm^2 -Kulturflasche im Inkubator aufbewahrt.

2.2.4.4 Transiente Transfektion von Zelllinien

Transfektion mit Lipofectamine™

Einen Tag vor der Transfektion wurden $0,5 \times 10^6$ BOSC23-Zellen in 2 ml Medium suspendiert pro Vertiefung einer 6-well-Platte ausplattiert. Hatten die Zellen am nächsten Tag eine Konfluenz von circa 90%, konnte mit der Lipofectamine™-Transfektion nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) begonnen werden.

Vor Beginn der Transfektion wurde das alte Medium der 6-well-Platte durch frisches Antibiotika-freies Medium ersetzt. Laut Hersteller kann der Zusatz von Antibiotika zum Zellmedium während der Transfektion zum Zelltod führen. Für die Transfektion von allen 6 wells wurden 60 µl Lipofectamine in 1,5 ml RPMI-Medium ohne FCS und PSG in einem 2 ml-Eppendorf-Röhrchen gelöst. In einem weiteren Reaktionsgefäß

wurden 24 µg Plasmid-DNA in 1,5 ml FCS- und PSG-freiem RPMI-Medium angesetzt.

Beide Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA- und Lipofectamin-haltigen Medien wurden gemischt und für weitere 30 min inkubiert, währenddessen sich der DNA-Lipofectamin-Komplex bildete. Nach der Inkubation wurden 500 µl der DNA-Lipofectaminlösung pro Well pipettiert und die Zellen für 48 h Stunden bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert

Transfektion mit Fugene 6

Fugene 6 Transfection Reagent wurde für die Transfektion von BOSC23- und COS7-Zellen verwendet. Einen Tag vor der geplanten Transfektion wurden in einer 6-*well*-Platte je nach Wachstumsverhalten der Zellen zwischen 1-3 x 10⁵ Zellen pro *well* in 2 ml Medium ohne Antibiotikazusätze angesetzt, um am nächsten Tag eine Konfluenz der Zellen von 50-80% vorzufinden. Üblicherweise wurde ein Verhältnis von Fugene 6 zu Plasmid-DNA von 3:1 gewählt. Die Transfektion für eine 6-*well*-Platte erfolgte nach folgendem Protokoll:

In ein 5 ml Polystyrol-Röhrchen wurden 18 µl Fugene 6 in 582 µl RPMI-Medium ohne Zusätze, beide auf Zimmertemperatur gebracht, gegeben. Dabei war darauf zu achten, dass das Fugene 6 nicht mit der Wand des Reaktionsgefäßes in Berührung kam. Nach dem Vortexen für 1 s wurde der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 6 µg Plasmid-DNA in das Fugene-6-Gemisch gegeben, kurz kräftig gemischt und dann für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden 100 µl pro *well* tröpfchenweise über das ganze *well* verteilt. Die 6-*well*-Platte wurde für 48 h im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.5 Immunologische Methoden

2.2.5.1 Analyse transient transfizierter Kulturzellen mittels zellbasiertem ELISA (Cell ELISA)

Mit Hilfe des *Cell ELISA* wurde die Expressierbarkeit von Proteinen nach transienter Transfektion von Kulturzellen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid und murine Immunseren nach genetischer Immunisierung auf die Anwesenheit

spezifischer Antikörper überprüft. Nach Inkubation von transfizierten Zellen mit Serum oder einem spezifischem Antikörper kann die erfolgreiche Bindung durch einen fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörper, der an die Fc-Region des Erstantikörpers bindet, überprüft werden.

Zunächst wurde eine schwarze 96-*well*-Platte zur Vermeidung von Streulicht bei der späteren fluoreszenzbasierten Auswertung mit je 200 µl pro *well* einer Blockierungslösung (1% BSA in PBS) 1 h bei 37°C inkubiert, um unspezifischen Bindungen von Proteinen an den Plattenboden vorzubeugen. Als Erstantikörper wurden entweder ein Anti-*myc*- und ein Anti-*flag*-Antikörper in einer Konzentration von 50 µg/ml oder Immun- und Präimmunsereen 100-fach mit PBS/1% BSA verdünnt verwendet. Pro *well* wurden 50 µl des Erstantikörperansatzes pipettiert. Die transfizierten Zellen wurden vom Plattenboden gelöst, bei 340x g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet wurde in 1% BSA/PBS gelöst. Pro *well* wurden 50 µl der Zellsuspension pipettiert und 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2000 rpm für 3 min wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Als Zweitantikörper diente Ziege-Anti-Maus-Ig gekoppelt an Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*; HRP) in einer Verdünnung von 1:5000. Nach Pipettierung von 50 µl pro *well* wurde die 96-*well*-Platte erneut 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Ansätze erneut 5x mit PBS gewaschen. Zur Messung der HRP-Aktivität diente das Amplex™-Red-Reagenz (10-Acetyl-3,7-dihydrophenoxazin) als Substrat. Dies führt bei Bindung an H₂O₂ durch eine Peroxidase-katalysierte Reaktion zur Bildung des fluoreszierenden Produktes Resorufin. Für eine 96-*well*-Platte wurde die Entwicklerlösung folgendermaßen kurz vor der Fluoreszenzmarkierung frisch angesetzt:

<i>Endkonzentration</i>	<i>Reagenzien</i>	<i>Konzentration Stammlösung</i>	<i>Volumen</i>
50 mM	NaH ₂ PO ₄ , pH: 7,4	250 mM	1 ml
	H ₂ O		3,975 ml
50 µM	Amplex	10 mM	25 µl
0,4 mM	H ₂ O ₂	30% (8,8 M)	0,23 µl

Die *wells* wurden für 30-60 min mit je 50 µl der Reaktionslösung im Dunkeln bei

Raumtemperatur inkubiert und anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung im Victor bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm.

2.2.5.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine weitere immunologische Methode zur Überprüfung von Proteinexpression an der Oberfläche von Kulturzellen und zur Testung von Seren auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper.

Nach Transfektion von COS7-Zellen ($1,5 \times 10^6$) 2 Tage zuvor, wurden diese in PBS suspendiert und rund $1,5 \times 10^6$ Zellen pro *well* in eine 96-*well*-Platte pipettiert, abzentrifugiert und einmal mit 150 μ l pro *well* mit FACS-Puffer (PBS mit 1% BSA, 1% Na-Azid) gewaschen. Die monoklonalen Anti-*myc*- und Anti-*flag*-Antikörper wurden in einer Konzentration von 25 μ g/ml verwendet, und murine Immun- und Präimmunseren wurden mit FACS-Puffer 50-fach verdünnt. Ein Volumen von je 25 μ l wurde auf die Zellen pipettiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen 3x mal mit je 150 μ l FACS-Puffer gewaschen und dazwischen jedes Mal bei 340x g für 5 min zentrifugiert. Als Zweitantikörper diente ein Fluoresceinisothiocyanat gekoppelter Ziege-Anti-Maus-Ig-Antikörper. Er wurde in einer Endkonzentration von 10 μ g/ml und 25 μ l pro *well* eingesetzt und mit den Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit je 150 μ l FACS-Puffer wurde jedes Zellpellet in 150 μ l FACS-Puffer aufgenommen und in ein FACS-Messröhrchen überführt. Pro Röhrchen wurden 50 μ l einer Propidiumjodidlösung (Stammlösung 1 mg/ml PBS 1:250 verdünnt mit FACS-Puffer) zur Markierung der toten Zellen hinzugefügt. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte bei einer maximalen Flussrate von 1000 Zellen pro Sekunde. Mit Hilfe der *WinMDI 2.8* Software von Joseph Trotter wurden die Ergebnisse ausgewertet.

2.2.6 Färbemethoden

2.2.6.1 Herstellung von Zytospins

Nach transienter Transfektion von BOSC23-Zellen wurden die Zellen 48 h später mit PBS gewaschen, trypsiniert und gezählt. Auf jeden Objektträger wurden 4×10^6

Zellen resuspendiert in 100 µl PBS aufgetragen. Auf den Schleudergang in der Shandon-Zentrifuge folgte die Lufttrocknung der Objektträger. Anschließend konnten die Zytospins bis zur immunhistologischen Färbung bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.6.2 Immunzytologische Färbung von Zytospins

Zunächst wurden die Zytospins für 10 min mit 20°C warmem Aceton fixiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS erfolgte die Blockierung endogener Peroxidasen durch 5-minütige Inkubation mit 80 ml PBS, 10 ml Methanol und 10 ml 30% H₂O₂. Die Zytospins wurden erneut 3x mit PBS gewaschen, um dann mit 2,5% Pferdeserum für 20 min blockiert zu werden. Die Inkubation mit 100 µl einer Lösung aus PBS und Primärantikörper bzw. Immunserum (Konzentrationen: 1:100, 1:300) fand für 2 h in feuchter Atmosphäre statt. Für die Negativkontrolle wurde ein MOPC-Antikörper (Konzentration: 10 µg/ml) verwendet. Anschließend wurden die Zytospins für 30 min mit einem HRP-gekoppelten Pferd-Anti-Maus-Antikörper in der feuchten Kammer inkubiert und zuvor und danach dreimal mit PBS gewaschen. Nach der Peroxidasefärbung Aminoethylcarbazol/H₂O₂-Lösung (16 mg Aminoethylcarbazol, 4 ml Dimethylformamid, 46 ml Acetat-Puffer (pH 5,2; 10,75 g Na-Acetat x 3 H₂O; 1,21 ml Eisessig ad 1 l H₂O) und 60 µl 30% H₂O₂) für 15 min erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun und die Objektträger konnten eingedeckelt werden.

2.2.6.3 Immunhistologische Aufarbeitung von murinen Innenohrschnitten

In Paraffin eingebettete murine Innenohrschnitte wurden von Dr. med. Matthias Klein (Neurologische Klinik und Poliklinik der Universität München) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Schnitte wurden zunächst mit Rotihistol® für 10 min entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 75% Ethanol) und schließlich in destilliertem Wasser für je fünf Minuten rehydriert. Die Paraffineinbettung verknüpft mit einer vorangehenden Fixierung mit Formaldehyd verändert die Immunreaktivität des Gewebes durch Quervernetzung und Denaturierung von Proteinen. Um die Bindung von Primärantikörpern an Epitope des entparaffinierten Gewebes zu ermöglichen erfolgte eine Antigendemaskierung durch 30 min Garen in fast siedendem Tris/EDTA pH 9,0. Die Peroxidaseblockierung erfolgte in gleicher Manier wie bereits oben beschrieben. Das *Mouse-to-Mouse IHC*

Detection System Kit ermöglicht die immunhistochemische Färbung muriner Innenohrschnitte mit murinen Antikörpern. Zunächst wurden die Schnitte für 60 min mit der im Kit enthaltenen Prä-Antikörper-Blockierung in der feuchten Kammer inkubiert und dann nach dreimaligen Waschen mit PBS mit Immunsereum bzw. dem MOPC-Antikörper als Negativkontrolle für weitere 60 min reagiert. Die Mausimmunsereen wurden dabei in einer Verdünnung von 1:100, 1:300, 1:500 und 1:800 aufgetragen. Zwischen zwei PBS-Waschgängen wurde die im Kit enthaltene Post-Antikörper-Blockierung für 10 min auf den Schnitten angewendet. Nach Inkubation von 10 min mit einem HRP-gekoppelten Pferd-Anti-Maus-Ig-Antikörper und erneutem dreimaligen Spülen mit PBS erfolgte die Peroxidasefärbung und Hämalaun-Gegenfärbung wie bereits oben beschrieben.

3. Ergebnisse

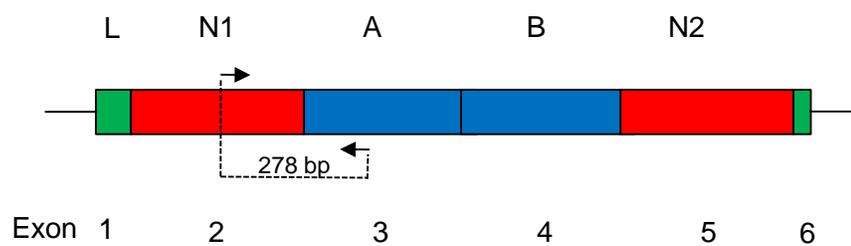
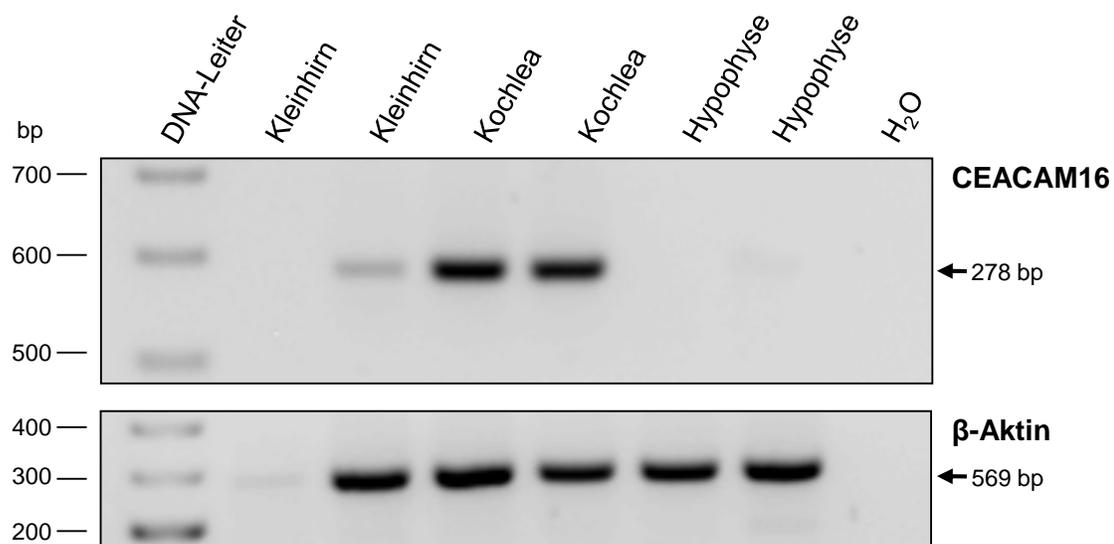
3.1. CEACAM16-Sequenzvorhersagen mittels Datenbankanalysen

Zu Beginn dieser Arbeit war weder das CEACAM16-Gen mit seinen exakten Exon/Introngrenzen, noch dessen vollständige mRNA-Sequenz bekannt. Genvorhersageprogramme wie Ensembl schlugen eine Reihe unterschiedlicher Genstrukturen vor (Abbildung 8A, B). Aufgrund der hohen Interspezieskonservierung von CEACAM16 konnte wir mittels *Est*-Sequenzen verschiedener Spezies die CEACAM16-Exonstruktur vorhersagen (Abbildung 8C). *Est*-Sequenzen sind kurze einzelsträngige cDNA-Sequenzen (300-1000 bp), die den gesamten mRNA-Gehalt einer Zelle repräsentieren und in cDNA-Datenbanken, wie der dbEST (*database of expressed sequence tags*) von NCBI, gesammelt werden. Über ein *alignment* von *Est*-Sequenzen mit Sequenzen aus genomischen Datenbanken kann die Lage von Exonen eines Gens vorhergesagt werden.

Anhand der von uns vorhergesagten Sequenz der CEACAM16-mRNA wurden Primer aus den Exonen des Gens ausgewählt, die für die N1- und A-Domänen kodieren. Die erwartete Größe des Amplifikationsprodukts betrug 278 bp (Abbildung 9A).

Aus mRNA-Datenbanken gab es zu Beginn dieser Arbeit Hinweise, dass CEACAM16 im Innenohr, in der Hypophyse und im Kleinhirn exprimiert wird. Diese Gewebe wurden zunächst in der Maus mithilfe der PCR auf die Anwesenheit von CEACAM16-mRNA getestet. In beiden Innenohrproben und in der Kleinhirnprobe, die auch positiv auf β -Aktin getestet wurde, sowie ganz schwach in einer der Hypophysenproben ließ sich die Teilsequenz nachweisen (Abbildung 9B).

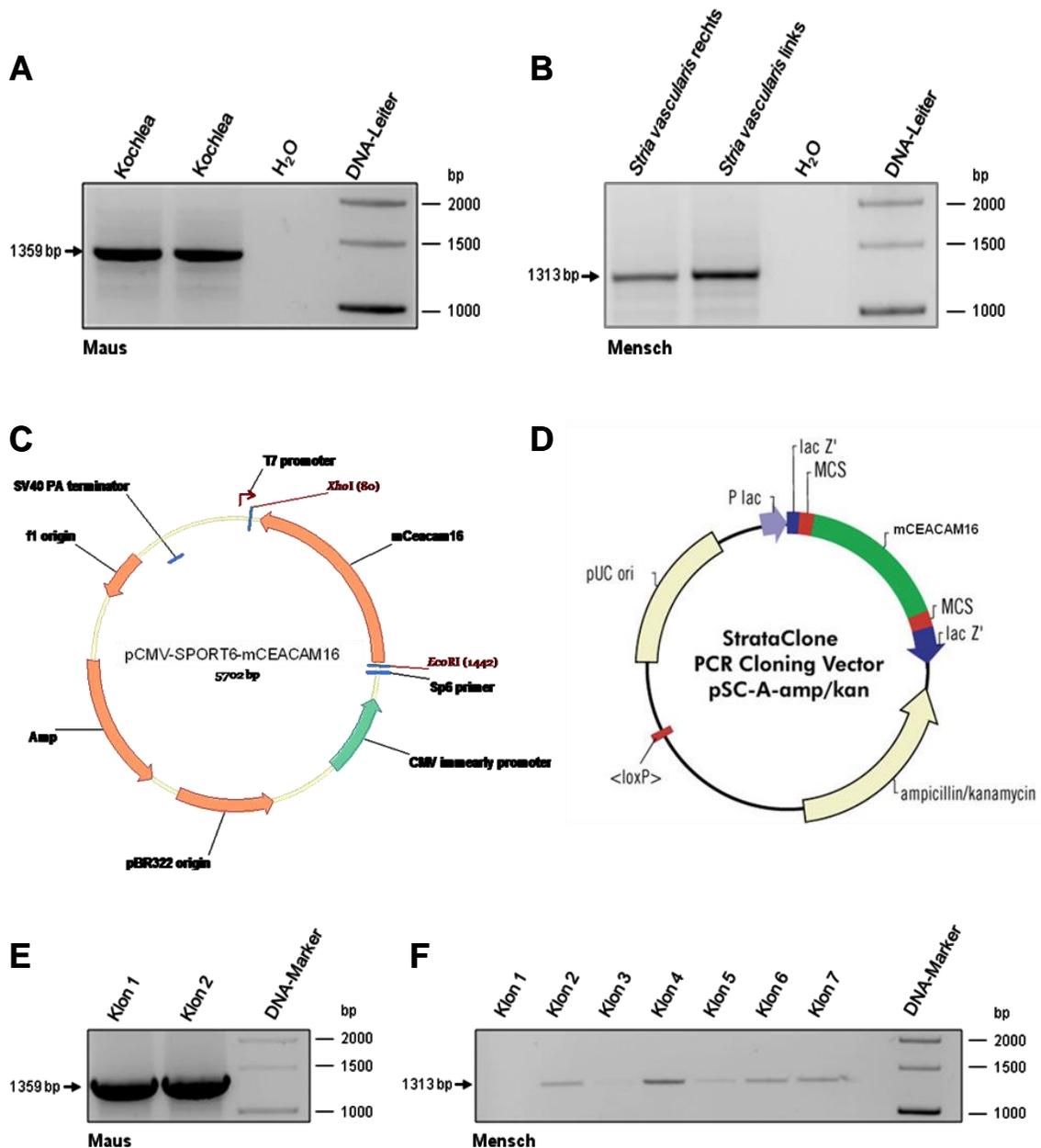
Abbildung 9: Nachweis von CEACAM16-mRNA in Mausgeweben. (A) Für den Nachweis von CEACAM16-cDNA wurden Primer gewählt, die einen Teil der N1- und A-Domäne kodierenden Sequenzen amplifizieren. Bei der Auswahl der Primer wurde auf einen ausgeglichenen G/C- und A/T-Gehalt und eine ähnliche Schmelztemperatur zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer geachtet. Das Programm *Primer3* gab eine Vorhersage über die Qualität der ausgewählten Primer. (B) Nach reverser Transkription von 0,5 μ g bis 1,0 μ g mRNA in einem Gesamtvolumen von 20 μ l der zu testenden Gewebe, wurde ein 1 μ l DNA-*Template* bzw. 1 μ l Wasser für einen PCR-Ansatz unter Verwendung der *Taq*-Polymerase benutzt. Als Primer dienten *CEACAM1-like Nf* und *CEACAM1-like Ar* (die Namen der Primer wurden vor der endgültigen Benennung des CEACAM16-Gens vergeben). Die Produkte wurden in 40 Zyklen amplifiziert. Der Nachweis der Amplifikationsprodukte erfolgte in einem 2%igem Agarosegel. Die 278 bp lange Teilsequenz konnte sowohl in beiden Cochlea-Proben als auch in geringer Menge in der Kleinhirnprobe nachgewiesen werden, die ebenso positiv auf β -Aktin getestet wurde. Spuren der Teilsequenz waren auch in einer Hypophysenprobe nachweisbar.

A**B**

3.2.2 Klonierung und Sequenzierung muriner und humaner CEACAM16-*full-length*-Klone

Nach dem ersten Nachweis einer murinen CEACAM16-Teilsequenz erfolgte die Amplifizierung der murinen und humanen CEACAM16-Gesamtsequenz. Mit Hilfe der CEACAM16-Genstrukturvorhersage durch *Ensembl* und unter Einbeziehung partieller cDNA-Sequenzen unterschiedlicher Spezies aus *EST*-Datenbanken wurden Primer entworfen, die an den 5'- und 3'-untranslatierten Bereich der murinen bzw. humanen cDNA binden. Beide Primerpaare wurden für spätere Klonierungen der PCR-Produkte bereits mit den Restriktionsschnittstellen *EcoRI* (Vorwärtsprimer) und *XhoI* (Rückwärtsprimer) synthetisiert.

Abbildung 10: Nachweis und Klonierung muriner und humaner CEACAM16-*full-length*-cDNA. (A) Für die Amplifikation der *full-length*-Sequenz von murinem CEACAM16 wurden die gleichen *templates* und Ansätze wie für die PCRs zum Nachweis der CEACAM16-mRNA-Teilsequenzen verwendet. Als Primer dienten mC16-5UT-f und mC16-3UT-r. Nach einer PCR mit 40 Zyklen wurden die Amplifikationsprodukte in einem 1%-Agarosegel analysiert. Das erwartete 1359 bp große Produkt konnte in beiden murinen Kochlea-Proben identifiziert werden. Auch in der cDNA-Probe des Kleinhirns konnte CEACAM16-*full-length*-cDNA nachgewiesen werden (nicht abgebildet). (B) Für die PCR-Amplifikation der CEACAM16-cDNA des Menschen wurde 1 µg des cDNA-*Templates* mit den Primern CEACAM16-5UT-f und CEACAM16-3-UT-r, sowie eine *Taq*-Polymerase in 35 Zyklen amplifiziert und in einem 1%-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die 1313 bp lange humane CEACAM16-Sequenz ließ sich in beiden *Striae vasculares* nachweisen. (C) Murine CEACAM16-cDNA wurde mittels der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pCMV-SPORT6 kloniert. Dieser verfügt neben einem CMV-Promoter auch über ein Ampicillinresistenzgen (D). Für die Klonierung von humaner CEACAM16-cDNA diente der StrataClone PCR Cloning Vector, welcher als Vektor für Topoisomerase-vermittelter Ligation keine spezifischen Primer benötigt. Mit einer *Taq*-Polymerase amplifizierte humane CEACAM16-cDNA kann ohne Vorbehandlung in diesen Vektor kloniert werden. (E), (F) Mittels Kolonie-PCRs erfolgt der Nachweis einer korrekten Insertion von CEACAM16-cDNA in die Klonierungsplasmide. In einen PCR-Ansatz mit *Taq*-Polymerase und den Primern mC16-5UT-f und mC16-3UT-r, bzw. hCEACAM16-5UT-f und hCEACAM16-3UT-r wurde jeweils ein Teil der Bakterienkolonien mit Hilfe einer Pipettenspitze übertragen. Nach 30 Zyklen wurden die PCR-Produkte in einem 1%-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf das Vorhandensein von CEACAM16-cDNA hin analysiert. In beiden pCMV-SPORT6-CEACAM16 transformierten Bakterienkolonien, sowie in fünf von sieben StrataClone-CEACAM16 transformierten Bakterienkolonien war ein Nachweis von CEACAM16-cDNA möglich.



Die Amplifizierung der murinen *full-length*-cDNA erfolgte unter Verwendung der bereits in 3.2.1 beschriebenen DNA-*templates* der murinen Kochleaprobe. Für humanes CEACAM16 zeigte Kishiko Sunami (Department of Otolaryngology, Osaka University, Osaka, Japan) in einer Kooperation mit dem Labor für Tumormimmunologie, dass nur in mRNA der *Stria vascularis*, nicht aber in RNA aus dem Corti-Organ oder dem Spiralganglion des Menschen CEACAM16-mRNA nachgewiesen werden konnte (Sunami, K., unveröffentlichte Ergebnisse; Kammerer et al., in Revision). cDNA der *Stria vascularis* eines rechten und linken Innenohrs wurde von Kishiko Sunami freundlicherweise für die Klonierung der *full-length*-

CEACAM16-cDNA des Menschen zur Verfügung gestellt.

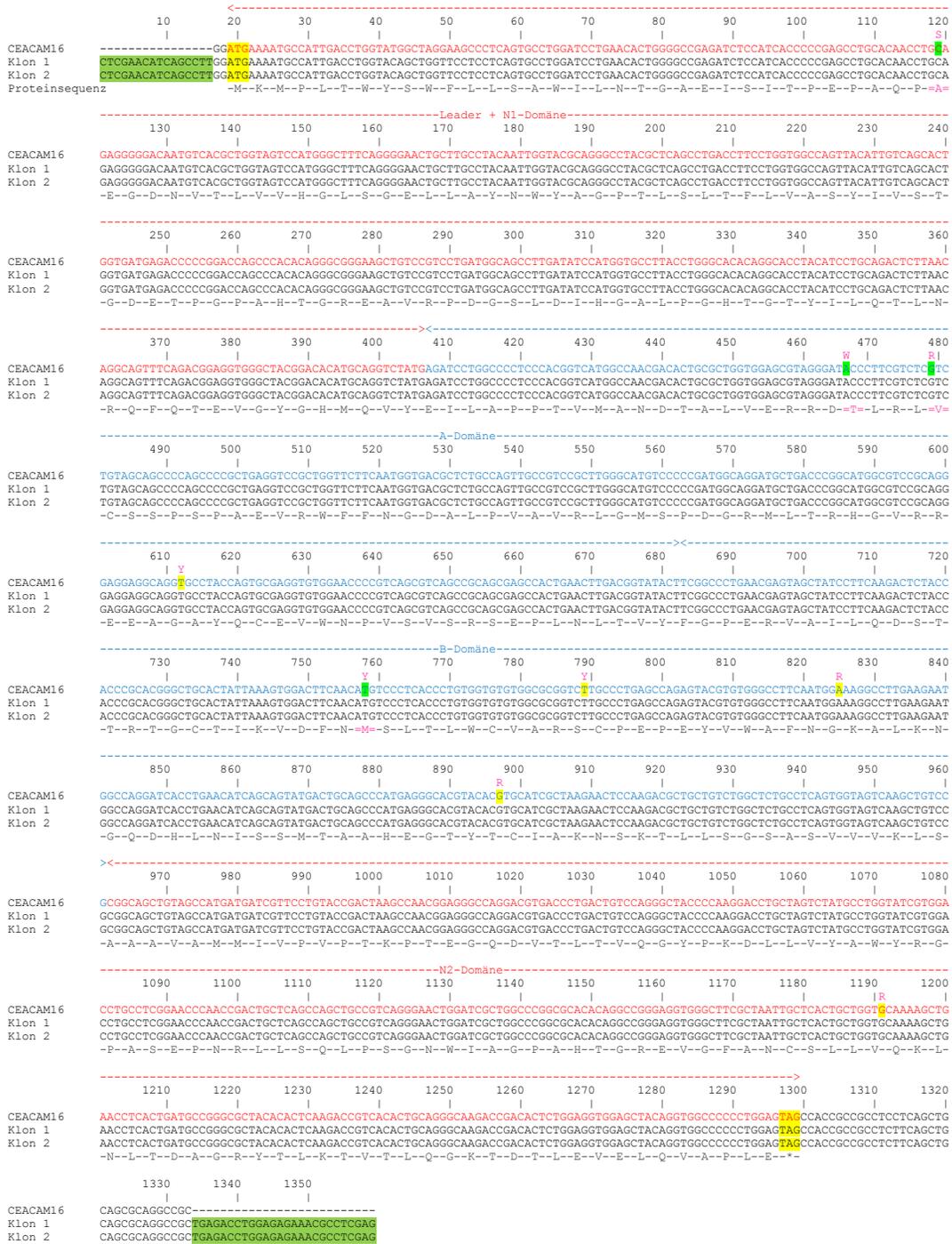
Sowohl in beiden Kochleaproben konnte das 1359 bp lange murine PCR-Produkt nachgewiesen werden, als auch das 1313 bp lange humane PCR-Produkt in beiden *Stria-vascularis*-Proben (Abbildung 10A, B). Auch in der positiven murinen Kleinhirnprobe war ein Nachweis der *full-length*-Sequenz möglich (nicht gezeigt).

Für anschließende Arbeiten wurde die murine cDNA mittels der Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pCMV-SPORT6 kloniert (Abbildung 10C). Die humane CEACAM16-cDNA konnte nach Amplifizierung durch eine *Taq*-Polymerase aufgrund von Adenosin-Überhängen direkt in den *StrataClone*TM-Vektor kloniert werden ohne vorherige Behandlung durch Restriktionsendonukleasen (Abbildung 10D). Mit dem Ligationsprodukt transformierte Bakterienkolonien wurden auf das Vorhandensein des CEACAM16-*insert* untersucht und im Falle eines positiven Nachweises als Dauerkulturen angelegt (Abbildung 10E, F).

3.2.3 Sequenzanalyse muriner und humaner CEACAM16-cDNA

Zur Sequenzanalyse der murinen CEACAM16-cDNA wurden die *inserts* der zwei in 3.2.2 beschriebenen positiv getesteten Bakterienkolonien sequenziert. Beide Klone stimmen mit der in *Ensembl* notierten Sequenz überein. Weitere in *Ensembl* vermerkte Allele sind in den sequenzierten Klonen nicht vertreten (Abbildung 11).

Abbildung 11: Alignment der murinen CEACAM16-Datenbanksequenz (Accession number: ENSMUSG00000014686) mit den Sequenzen der pCMV-SPORT6-CEACAM16 transformierten Bakterienkolonien. Die Sequenzierung erfolgt mit im Vektor liegenden Primern. Für die Sequenzvergleiche diente die Software ClustalW des *Pôle Bio-Informatique Lyonnais*. Die Primer mC16-5UT-f und mC16-3UT-r sind grün hinterlegt. Gelb hinterlegt sind Start- und Stoppkodon. Bekannte SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) sind im Falle einer nicht zu einem Aminosäure (AS)-Austausch führenden Mutation gelb, im Falle eines AS-Austauschs hellgrün hinterlegt. Mögliche Nukleotidvariationen sind folgendermaßen angegeben: S = G/C, W = A/T, R = G/A, Y = T/C. Beide Klone stimmen mit der murinen CEACAM16-cDNA-Datenbanksequenz überein.



Die Sequenzanalyse der humanen CEACAM16-cDNA-Sequenz erfolgte mit den inserts der in 3.2.2 beschriebenen Kolonien 2, 4, 5 und 7 (Abbildung 12).

Abbildung 12: Alignment der humane CEACAM16-cDNA-Datenbanksequenz (Accession number: ENSG00000178679) mit den Sequenzen der transformierten Bakterienkolonien 2, 4, 5 und 7. Die Sequenzierung erfolgt mit im Vektor liegenden Primern. Für die Sequenzvergleiche diente die Software ClustalW des *Pôle Bio-Informatique Lyonnais*. Grün hinterlegt sind die Primersequenzen hC16-5UT-f und hC16-3UT-r. Start- und Stoppkodon sind gelb hinterlegt. Da die zur Vektorligation verwendete CEACAM16-cDNA zuvor mit der *Taq*-Polymerase amplifiziert worden war, welche über keine *proof-reading*-Funktion verfügt, erhöhte das die Anzahl an SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) in den sequenzierten Klonen. Durch Ensembl bereits annotierte SNPs sind im Falle einer nicht zu einem AS-Austausch führenden Mutation gelb hinterlegt, im Falle einer zu einem AS-Austausch führenden Mutation hellgrün hinterlegt. Mögliche Nukleotidvariationen sind folgendermaßen angegeben: S = G/C, W = A/T, R = G/A, Y = T/C. Bezüglich der sequenzierten Klone sind hier SNPs rot hinterlegt, mit der Datenbanksequenz (rot) übereinstimmende Basen grau hinterlegt. Damit bestätigt die Klon-5-Sequenz (weinrot) die *Ensembl*-CEACAM16-cDNA-Sequenz zu 100%. Klon 7 verfügt an Position 133 über einen SNP, welcher bereits so als ein weiteres *CEACAM16*-Allel in *Ensembl* notiert ist. Weitere SNPs könnten Hinweise auf bisher unbekannte *CEACAM16*-Allele geben, wie zum Beispiel der sowohl in Klon 2, als auch Klon 4 vorhandene Basenaustausch von Thymin zu Guanin an Position 86, welcher zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Prolin führen würde.

3.3. CEACAM16-Proteinexpression in der Maus

3.3.1 Herstellung eines polyklonalen Immunerums gegen murines

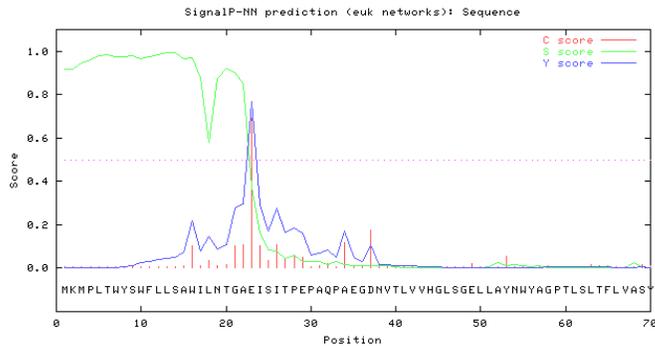
CEACAM16 durch genetische Immunisierung

Zur Herstellung von Antikörpern gegen das murine CEACAM16-Protein durch genetische Immunisierung wurde zunächst die murine Ceacam16-cDNA in den Immunisierungsvektor VV1 kloniert (Abbildung 7). CEACAM16-cDNA wurde so in den Immunisierungsvektor ligiert, dass bei Expression des Vektors ein *myc*-Epitop an das N-terminale Ende und eine Signalsequenz für eine GPI-Verankerung an das C-terminale Ende des Proteins gehängt wird. Somit exprimieren Zellen, die erfolgreich mit diesem Vektor transfiziert wurden, ein GPI-verankertes Fusionsprotein an ihrer Oberfläche an dessen N1-Domäne ein *myc*-Epitop angefügt ist.

Als Immunisierungsvektor diente pVV8 (Abbildung 7). Für eine erfolgreiche Expression des membranverankerten CEACAM16-Fusionsproteins musste der Bereich der CEACAM16-cDNA entfernt werden, der für das Signalpeptid kodiert, da eine solche Sequenz bereits im Immunisierungsvektor enthalten ist. Weiterhin war darauf zu achten, dass die CEACAM16-cDNA ohne ihr Stoppkodon in den Vektor eingebaut wird, um eine Translation des Fusionsproteins einschließlich seines GPI-Ankers zu gewährleisten (Abbildung 13). Für die Klonierung wurden die Primer

mC16-VV1-f und mC16-VV1-r entworfen. Als *template* diente cDNA des Vektors pCMV-SPORT6-CEACAM16

A



D

```

MEIDLLLLWLLRWFGSTDAAQHFQ
KLISEEDLQSLTPEPAQPAEGDNV
ELVWRGLSREELANWAGPTLSLFLF
ASYIIVSTGDETPGPAHTGREANRFDGSL
RHHGALPGHTGTTLQTLNROPQTEVGV
SHMQNVLLAKSEVWVARDALVRSDDI
LVKSSSEPAEIVMETFGDALVAVVFL
NSFDQRMILTRHGVRSEAGAYQCEWVF
VSVSSEPLALVYVYPERVALLDQSTL
RQCTLLKDFWMSLLTWVARSQPEPV
WVAVKPAALVYQDHLVYSSMTAAHEGT
VDTLVANSKPTLSSTASVWVWLSAAVA
SMIVFVPTKPTGGQVTLTVGGYPKDLL
VIAWVRFQFASENRLLSQLPSSGNWIAGF
AHTGREVGFANCSLLVQKINLITDAGVYS
RKNVFGQGTDLVVDLVAARAMITVS
DALVQSSSPGLSARATVSIITGVLARVA
IT
  
```

B

```

-----Leader----->-----N1-Domäne-----
          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
CEACAM16  ATGAAAATGCCATTGACCTGGTATGGCTAGGAAGCCCTCAGTGCCTGGATCCTGAACACTGGGGCCGAGATCTCCATCACCCCGAGCCTGCACAACCTGCAGAGGGGGCAATGTCCAG...
          M K M P L T W Y S W F L L S A W I L N T G A E I S I T P E P A Q P A E G D N V T ...
  
```

C

```

          HinDIII
          ACCAAT
GGAGAGCCTCAAGCCTTGAGATCTCCATCACCCCGAGCC.....CTGTGAGACCAAGTGGAGCTACAGTGGCCGCTCGAGCAATGATCAGACTCTCTGATGCTTTAGTACAAAGGAAGTCTCC
|||||.....
CCTTCACCTGCAAAGCTTGGAGATCTCCATCACCCCGAGCC.....CTGTGAGACCTGACCTCGAGTCCAGCCTGTTACTAGTGTCCAGACTACGAAATCATGTTCTCTCAAGAGG
          XhoI
  
```

Abbildung 13: Voralysen zur Entwicklung der Screening- und Immunisierungsplasmide. (A) Vorhersage der CEACAM16-*leader*-Sequenz durch die Software SignalP 3.0. Für die Vorhersage der *leader*-Sequenz wurde die vollständige murine CEACAM16-AS-Sequenz verwendet. SignalP errechnete die wahrscheinlichste Signalpeptidase-I-Schnittstelle zwischen AS 22 und 23 (TGA-EI). Mit dieser Information ließ sich der Übergang von Signalpeptid zu N1-Domäne zwischen Nukleotid 66 und 67 der Gesamtsequenz festlegen (B). (C) Insert/Vektorübergänge des Screening-Vektors pVV1-CEACAM16. Die pinkfarbene Sequenz stellt einen Anteil der *myc*-Epitop kodierenden Sequenz dar. Diese geht nach einer neun Nukleotid langen Zwischensequenz über in den die N1-Domäne kodierenden Sequenzbereich der CEACAM16-cDNA. Um ein offenes Leseraster vom *leader* (von der Immunglobulin- κ -Kette) über das *myc*-Epitop und CEACAM16-cDNA-*insert* bis zur GPI-Ankersignalsequenz zu gewährleisten, musste mit Hilfe des entworfenen Vorwärtsprimers mC16-VV1-f vor Beginn der N-Domänensequenz ein weiteres Nukleotid eingefügt werden (grau hinterlegt). Der Vorwärtsprimer ist gelb hinterlegt, der Rückwärtsprimer grün. Die türkisfarbene Sequenz zeigt einen Anteil des GPI-Ankers. (D) Proteinsequenz des von pVV1-CEACAM16 kodierten Fusionsproteins. Das Signalpeptid ist grün hinterlegt, das *myc*-Epitop pink, N1- und N2-Domänen rot, A- und B-Domäne blau, die GPI-Verankerungssignalsequenz türkis. Für die Klonierung des Immunisierungsvektors dienten dieselben Primer. Die Sequenz des Immunisierungsvektors unterscheidet sich aufgrund des Markerpeptids (*flag*-Epitop, anstatt *myc*-Epitop).

Zusätzlich wurde CEACAM16-cDNA in den *Screening*-Vektor pVV1 kloniert. Das resultierende Plasmid diente als Kontrollexpressionskonstrukt. Für die Überprüfung der Mausseren nach der Immunisierung auf ihren Gehalt an Antikörpern werden mit dem Kontrollvektor transfizierte Zellen im *Cell-ELISA* und FACS getestet, da nicht auszuschließen ist, dass die Versuchsmäuse während der Immunisierungsreihe ebenso Antikörper gegen das *flag*-Epitop im Fusionsprotein des Immunisierungsplasmids gebildet haben. Um deshalb falsch positive Testergebnisse zu vermeiden, wurden die Zellen mit dem Kontrollvektor pVV1 transfiziert. Dieser exprimiert statt des *flag*-Epitops ein *myc*-Epitop. Ansonsten ist der Kontrollvektor von seiner Struktur gleich dem Immunisierungsvektor und die CEACAM16-cDNA kann über die gleichen Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XhoI* in den VV8-Vektor kloniert und dem zufolge auch mit Hilfe der gleichen Primer mC16-VV1-f und mC16-VV1-r amplifiziert werden.

Beide Vektoren pVV1-CEACAM16 und pVV8-CEACAM16 wurden durch Sequenzierung auf den korrekten Einbau der CEACAM16-cDNA überprüft. Nachdem durch Sequenzanalyse sichergestellt worden war, dass die CEACAM16-cDNA an der geplanten Stelle fehlerfrei in beide Vektoren eingebaut worden war, wurde die Expression der Fusionsproteine durch transient transfizierte Zellen im *Cell-ELISA* (Abbildung 14) und FACScan überprüft. Die transfizierten Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche ein membrangebundenes CEACAM16-Protein, an dessen N-terminalem Ende entweder ein *myc*- oder ein *flag*-Epitop mit Hilfe von Anti-*myc*- und Anti-*flag*-Antikörpern nachweisbar war.

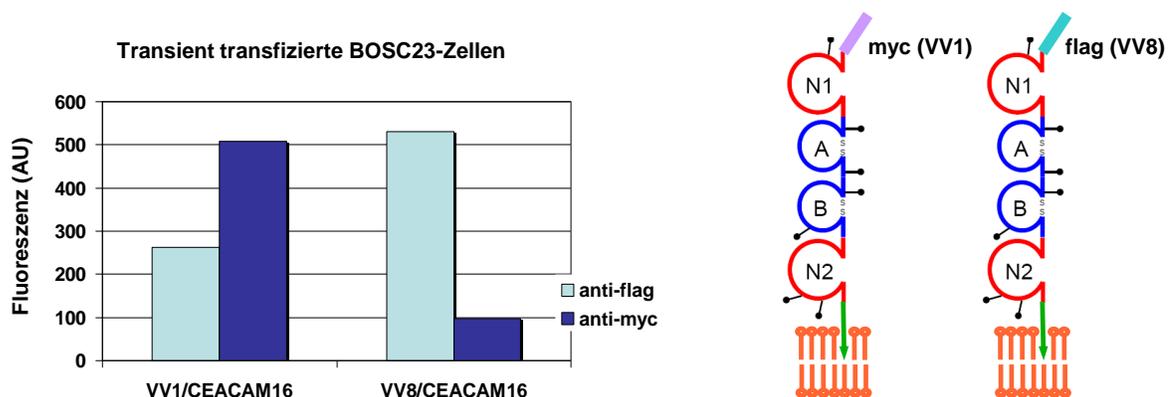


Abbildung 14: Expressionskontrolle des pVV1-CEACAM16- und pVV8-CEACAM16-Plasmids im Cell-ELISA. BOSC23-Zellen wurden entweder mit dem pVV1-CEACAM16- oder pVV8-CEACAM16-Konstrukt mittels Lipofectamin 2000 transient transfiziert, um am nächsten Tag mit Hilfe von Anti-*flag*- (hellblauer Balken), bzw. Anti-*myc*-Antikörper (dunkelblauer Balken) die korrekte Expression der Fusionsproteine im *Cell-ELISA* nachzuweisen. Als Zweitantikörper diente ein HRP-gekoppelter Antikörper, dessen Bindung in einer fluoreszenzbasierten Messung ausgewertet wurde. Als Negativkontrollen wurden sowohl pVV1-CEACAM16 transfizierte Zellen mit Anti-*flag*-Antikörper als Erstantikörper behandelt, als auch pVV8-CEACAM16 transfizierte Zellen mit Anti-*myc*-Antikörper. Schematisch sind die über einen GPI-Anker (grüner Pfeil) an die Zellmembran gebundenen *myc* (fliederfarbener Balken) und *flag* (türkiser Balken) markierten CEACAM16-Fusionsproteine dargestellt.

3.3.2 Spezifitätstestung von anti-CEACAM16-Immunsereum

Die Seren der immunisierten Mäuse wurden 30 (Zwischensereum) und 44 Tage (Endsereum) nach Immunisierungsbeginn auf die Bildung von Anti-CEACAM16-Antikörpern mit Hilfe von FACScan-Analysen untersucht. Da die Mäuse mit dem *flag*-Sequenz kodierenden Expressionsplasmid pVV8-CEACAM16 immunisiert worden waren und die synthetische *flag*-Sequenz in der Maus nicht existiert, können in der Maus Antikörper gegen das *flag*-Epitop oder die Übergangsamino-säuresequenz zu CEACAM16 gebildet werden, was zu falsch positiven Ergebnissen im durchflusszytometrischen Nachweis führen würde. Zum Nachweis der CEACAM16-Antikörper wurden COS7-Zellen mit dem Vektor pVV1-CEACAM16 transient transfiziert und auf die Bindung von Antikörpern der Mausseren durchflusszytometrisch analysiert. Nur die murinen Immunsereen enthielten Antikörper, die an die Transfektanten banden (Abbildung 15C, D). Anti-*myc*-Antikörper diente als positive Kontrolle. Für die Negativkontrolle wurde auf einen Erstantikörper verzichtet (Abbildung 15A, B).

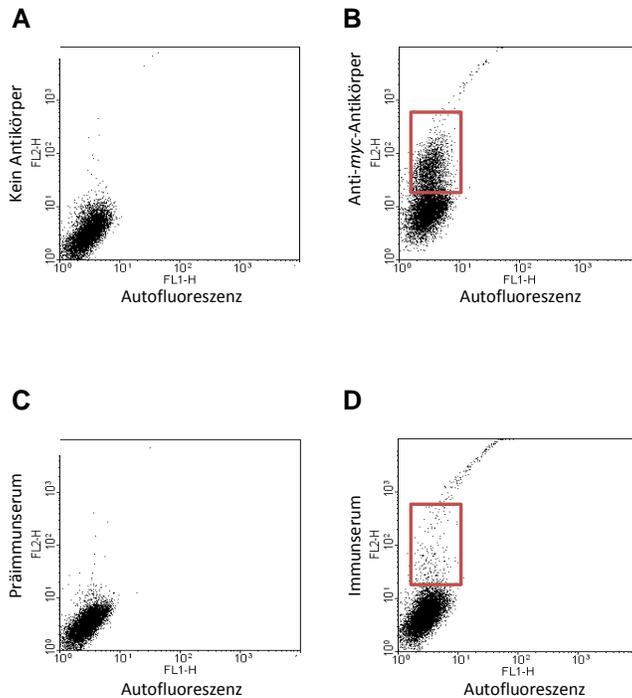


Abbildung 15: Nachweis polyklonaler CEACAM16-Antikörper im Immunserum nach genetischer Immunisierung. $1,5 \times 10^4$ COS7-Zellen pro *well* in einer 96-*well*-Platte wurden transient mit pVV1-CEACAM16 transfiziert und ohne Erstantikörper (A), mit Anti-*myc*-Antikörper (B), mit gepoolten Präimmunseren ($n = 6$; C) oder gepoolten Immunseren ($n = 6$; D) in einer Verdünnung von 1:50 für 30 min inkubiert. Nach Markierung mit einem PE-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Ig-Zweitantikörper konnte die Transfektionseffizienz (B) und das Vorhandensein von polyklonalen Anti-CEACAM16-Antikörpern im Immunserum nachgewiesen werden (roter Kasten, D).

3.2.4.4. Analyse der CEACAM16-Expression im Innenohr der Maus

Zunächst wurden die durch genetische Immunisierung erhaltenen murinen Immunseren auf ihre Eignung zum immunhistologischen Nachweis an CEACAM16-Transfektanten getestet. Dazu wurden mit dem *Screening*-Konstrukt pVV1-CEACAM16 transfizierte BOSC23-Zellen auf Objektträger mittels Zentrifugation aufgebracht (Zytospins). In der Immunzytologie zeigte sich eine spezifische Färbung der Zellmembran und des Zytoplasmas der CEACAM16 exprimierenden Zellen bei Inkubation mit dem CEACAM16-Immunserum (Abbildung 16B). Bei Verwendung des Präimmunserums markierten sich keine Zellen (Abbildung 16A).

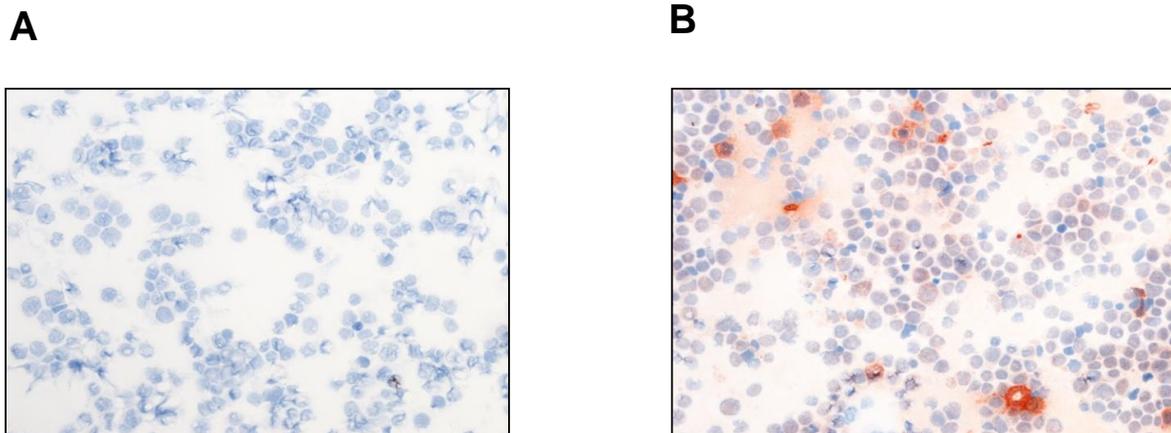


Abbildung 16: Immunhistologische Färbung von Zytospins zur Spezifitätstestung der murinen Immunseren. BOSC23-Zellen wurden mit Hilfe von Lipofectamin 2000 mit pVV1-CEACAM16 transient transfiziert. 24 h später wurden jeweils 4×10^4 Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Für die immunhistologische Färbung wurden die Zellen für zwei Stunden mit Präimmunserum (**A**) oder mit Immunserum (**B**) gepoolt von jeweils 6 Mäusen, in beiden Fällen 1:300 verdünnt, inkubiert und mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Pferd-anti-Maus-Ig-Antikörpers in einer Peroxidasereaktion sichtbar gemacht. Das murine Immunserum erkennt das membrangebundene CEACAM16-Protein.

Aufgrund der hauptsächlich im Innenohr nachgewiesenen CEACAM16-mRNA wurden für die immunhistologischen Färbungen dieser Arbeit in Paraffin eingebettete murine Gehörschnecken verwendet. Diese wurden von Klein, M. (Neurologische Klinik und Poliklinik, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität) zur Verfügung gestellt. Da die polyklonalen Antikörper aus der Maus stammten und für die Immunhistochemie murines Gewebe verwendet wurde, mussten zunächst endogene Immunglobuline mittels der im *Mouse-to-Mouse IHC Detection System* integrierten endogenen Antikörper-Blockierung maskiert werden (s. a. 2.2.6.3). Unter Verwendung von gepooltem Anti-CEACAM16-Immunserum und einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper kam es in der immunhistologischen Färbung zu einer deutlichen Markierung der Tektorialmembran und angrenzenden Haarzellen, sowie zu einer geringen Farbreaktion im Bereich der *Stria vascularis* (Abbildung 17).

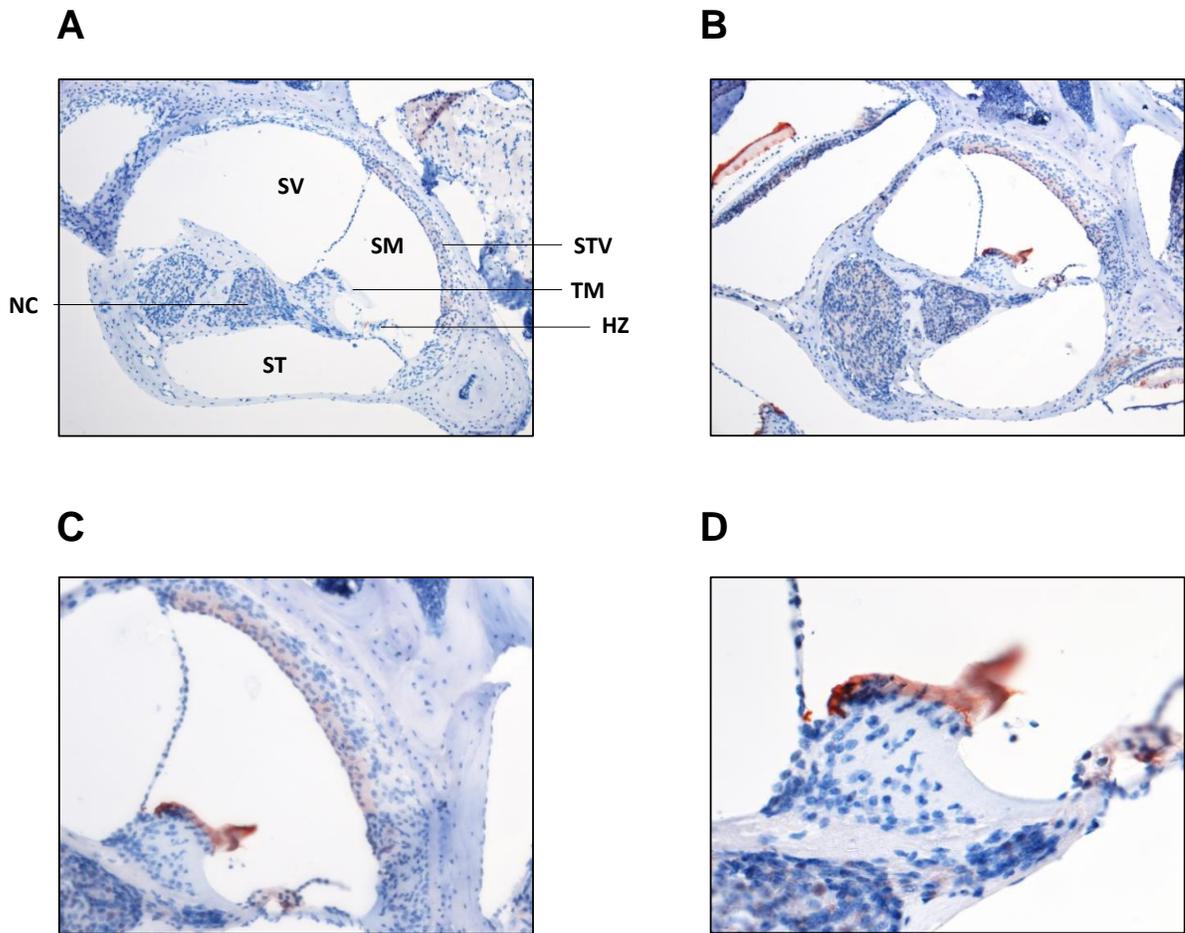


Abbildung 17: Immunhistologischer Nachweis von CEACAM16 in der Cochlea der Maus. (A) Als Negativkontrolle diente gepooltes Präimmunsereum (Verdünnung 1:300). Im Paraffin eingebetteten *Cochlea*-Gewebe bleiben die anatomischen Innenohrbereiche erhalten (HZ: Haarzellen, NC: *Nervus cochleae*, SM: *Scala media*, ST: *Scala tympani*, SV: *Scala vestibuli*, STV: *Stria vascularis*, TM: Tektorialmembran). (B-D) Mit gepooltem Immunsereum gefärbtes *Cochlea* Gewebe führt zu einer deutlichen Farbreaktion an der Tektorialmembran mit Übergang auf die Haarzellen, sowie einer schwächeren Farbreaktion im Bereich der *Stria vascularis*.

4. Diskussion

4.1. CEACAM16-mRNA-Nachweis und Sequenzierung in Maus und Mensch

In dieser Arbeit gelang es zum ersten Mal, CEACAM16-mRNA im Innenohr der Maus nachzuweisen. Auch war es möglich das murine Kleinhirn und das humane Innenohr als Expressionsorte von *CEACAM16* zu bestätigen. Bisher konnten nur wenige Mitglieder der CEACAM-Familie im ZNS lokalisiert werden. Neben dem ubiquitär exprimierten CEACAM1 sind auch RNAs der murinen Proteine CEACAM2 und CEACAM10 im Gehirn vorzufinden (www.brainmapping.org). CEACAM2 ist als Transmembranprotein und nächster Verwandter von CEACAM1 ebenso wie dieses in der Lage MHV zu binden (Nedellec *et al.*, 1994). Allerdings konnte bisher nicht bestätigt werden, dass CEACAM2 als alternativer MHV-Rezeptor an der Ausbreitung neurovirulenter MHV-Stämme im murinen ZNS beteiligt ist (Bender *et al.*, 2010). Auch im ventromedialen Anteil des Hypothalamus, welcher Nahrungsaufnahme und -verteilung kontrolliert, konnte CEACAM2 lokalisiert werden. Aus diesem Grund konstatierten Heinrich *et al.* anhand der Ergebnisse von *Ceacam2-knock-out* Mäusen, welche Übergewicht, Hyperphagie und erhöhte Blutinsulinwerte entwickelten, dass CEACAM2 Einfluss auf die Energiebilanz nimmt (Heinrich *et al.*, 2010). CEACAM10 ist ein sezerniertes Protein der murinen CEACAM-Familie bestehend aus zwei IgV-ähnlichen Domänen. Im Gegensatz zu den beiden oben genannten CEACAM-Familienmitgliedern, deren mRNA noch in einer Reihe weiterer Gewebe, wie Prostata, Plazenta, Leber etc. nachgewiesen werden konnten (Zebhauser *et al.*, 2005), wurde CEACAM16-mRNA bisher nur in Geweben des ZNS lokalisiert. Aufgrund des nicht-syndromalen, auf das Hören beschränkten Phänotyps beim Vorliegen von CEACAM16-Mutationen (siehe unten) ist eine wichtige Funktion von CEACAM16 im Gehirn eher unwahrscheinlich.

Weiterhin war zu Beginn der hier durchgeführten Untersuchungen die exakte mRNA Nukleotidsequenz nicht bekannt. Sowohl für Maus, als auch für Mensch waren unterschiedliche Sequenzen in verschiedenen Datenbanken zu finden. Eine Sequenzierung der in dieser Arbeit erstellten CEACAM16-cDNA konnte die von uns

vorhergesagte CEACAM16-Exonstruktur bestätigen. Die Sequenzierung der humanen CEACAM16-Plasmidklone zeigte weiterhin eine Allelvariante, die bereits in *Ensembl* notiert ist. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass weitere Allelvarianten existieren. Zebhauser *et al.* zeigten anhand des Aminosäuresequenzvergleichs der vier CEACAM16-Domänen zwischen Maus und anderen Säugern, dass N2 die am höchsten konservierte Domäne ist (Zebhauser *et al.*, 2005). Das hauptsächliche Auftreten von SNPs in den in dieser Arbeit bestimmten CEACAM16-Nukleotidsequenzen außerhalb der N2-Domänenregion legt nahe, dass es sich bei diesen Austausch in der Tat um allelische Variationen handelt und unterstreicht die Wichtigkeit der Sequenzkonservierung der N2-Domäne für die Funktion von CEACAM16.

4.2. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen murines CEACAM16 mittels genetischer Immunisierung von Mäusen

Die Herstellung von Antikörpern gegen unterschiedliche Proteine mittels genetischer Immunisierung ist eine etablierte Methode im Labor für Tumorimmunologie. Sie ermöglicht die Gewinnung spezifischer Antikörper ohne den vorherigen Umweg über eine Proteinsynthesierung und -extraktion. Zu Beginn der Antikörperherstellung stand nur die murine CEACAM16-cDNA für eine genetische Immunisierung zur Verfügung. Aufgrund des spezifischen Expressionsmusters von CEACAM16 im ZNS war jedoch die Annahme berechtigt, dass die Immunisierung von Mäusen mit einer murinen Sequenz trotzdem eine Immunantwort hervorrufen würde. Das Innenohr wird mit dem übrigen ZNS, sowie Auge, Placenta und Hoden zu den immunprivilegierten Organen gezählt. Die Blut-Hirn-Schranke, bzw. Blut-Labyrinth-Schranke entkoppelt das ZNS vom regulären Immunsystem und schützt es so vor der zerstörenden Wirkung einer systemischen Entzündung. Reguläre körpereigene Antigene werden während der so genannten negativen Selektion im Thymus T-Lymphozyten präsentiert, um autoreaktive Lymphozyten auszusortieren und somit eine Autoimmunität zu verhindern. Dieser Schritt der T-Zell-Reifung erübrigt sich für ZNS-Antigene, welche hinter der Blut-Hirn-Schranke geschützt und somit nicht im vollem Maße dem systemischen Immunsystem zugänglich sind (Wekerle, 2006).

Zwar ist die Interaktion zwischen ZNS und Immunsystem vielschichtiger, als dass man diese auf eine reine Isolation der beiden Organe voneinander beschränken könnte. Blut-Hirn-, bzw. Blut-Labyrinth-Schranke sind durchaus durchlässig für systemische Immunzellen. So führen zum Beispiel in das ZNS oder Innenohr eingebrachte Fremdartigene zu einer systemischen Immunantwort (Harling-Berg *et al.* 1989; Harris *et al.* 1985). Dennoch ist es sehr wahrscheinlich, dass es im Laufe der T-Zell-Reifung zu keiner ZNS-Antigen-Exposition der reifenden T-Lymphozyten kommt. Unter diesen Umständen kann eine Vakzinierung von Mäusen mit der selektiv im Innenohr exprimierten murinen CEACAM16-Sequenz durchaus zu einer systemischen Immunantwort führen. Auf der anderen Seite wäre es im Falle eines Misserfolges der Immunisierung wahrscheinlich gewesen, dass aufgrund der hohen Übereinstimmung von muriner und humaner CEACAM16-Proteinsequenz auch eine genetische Immunisierung mit der humanen CEACAM16-cDNA-Sequenz nicht zu einer adäquaten Immunantwort im Mausmodell geführt hätte.

Zur Überprüfung des Immunisierungserfolges diene zunächst eine Analyse mittels Durchflusszytometrie. Diese bietet den Vorteil eines sehr sensitiven Nachweises spezifischer Antikörper. Zum einen musste aufgrund der Immunisierung mit einem Selbstantigen (s. a. 4.2) davon ausgegangen werden, dass eine spezifische Immunantwort schwächer ausfallen würde, als bei herkömmlichen Modellen genetischer Immunisierung. Zum anderen könnte es durch immunglobulinreiches, polyklonales Serum der immunisierten Mäuse bei weniger sensitiven Nachweismethoden wie *Cell ELISA* oder *Western Blot* zur Maskierung spezifischer Antigen-Antikörper-Bindungen kommen, erzeugt durch einen hohen Hintergrund von unspezifischen Bindungen. Dementsprechend bestätigte schließlich der FACScan die Präsenz von CEACAM16-Antikörpern, zeigte allerdings auch, dass die Immunantwort deutlich schwächer war, als bei zuvor im Labor für Tumorummunologie durchgeführten genetischen Immunisierungen. Auch die Färbung von Zytospins mit polyklonalem Serum bestätigte dieses Ergebnis und zeigte des Weiteren, dass das gewonnene Serum grundsätzlich zur immunhistochemischen Verwendung geeignet ist.

4.3 CEACAM16-Expressionsmuster im murinen Innenohr

Die immunhistochemische Färbung paraffineingebetteter Innenohrschnitte der Maus mit polyklonalem Anti-CEACAM16-Serum zeigte eine stark positive Farbreaktion der Tektorialmembran, sowie eine deutlich schwächere Reaktion im Bereich der *Stria vascularis*. Kamp bestätigte den immunhistochemischen CEACAM16-Proteinnachweis in der Tektorialmembran mittels eines industriell gefertigten monoklonalen Anti-CEACAM16-Antikörpers (Genovac, Freiburg) (Kamp, A. unveröffentlicht) und an einer nach Abschluss dieser Arbeit in unserem Labor hergestellten *Ceacam16*-Nullmutanten (Kammerer *et al.*, in Revision).

Auch Zheng *et al.* wiesen vor kurzem CEACAM16 auf Proteinebene mittels polyklonaler Anti-Peptidantikörper in der murinen Tektorialmembran nach. Weiterhin gelang es ihnen CEACAM16 in den Spitzen der äußeren Haarzellen zu detektieren, nicht aber in den inneren Haarzellen (Zheng *et al.*, 2011). Somit scheint es gut möglich zu sein, dass CEACAM16 von äußeren Haarzellen sezerniert wird, um eine strukturelle oder auch Linker-Funktion zwischen den äußeren Haarzellen und der Tektorialmembran zu übernehmen. Weiterführende Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass CEACAM16 in jungen Mäusen von den Stützzellen der äußeren Haarzellen den sogenannten Deiterszellen gebildet wird, und über lange Ausläufer zu dem Spalt zwischen Haarzellen und Tektorialmembran transportiert wird. Dies stimmt mit den Befunden in dieser Arbeit überein, die eine immunhistochemische Färbung mit CEACAM16-Antikörpern im Bereich der Haarzellen zeigten (Abbildung 17). Eine weitere Möglichkeit könnte die Sezernierung von CEACAM16 durch Zellen der *Stria vascularis* sein. In diesem Falle würden Striazellen, wahrscheinlich insbesondere im erwachsenem Organismus CEACAM16 exprimieren und sezernieren, welches dann in die Tektorialmembran integriert wird. Diese Annahme wird gestützt vom CEACAM16-mRNA Nachweis in der adulten humanen *Stria vascularis* aber nicht im Corti-Organ durch Sunami (Kammerer *et al.*, in Revision) und die schwache immunhistochemische Farbreaktion im Bereich der *Stria vascularis* von adulten Mäusen. Die immunhistochemische Untersuchung muriner Innenohre unterschiedlicher Entwicklungsstufen könnte weitere Aufschlüsse zu dieser These liefern.

4.4. Mutationen im CEACAM16-Gen führen zu nicht-syndromaler Schwerhörigkeit

Durch das selektive Expressionsmuster im Innenohr wird CEACAM16 zu einem der wahrscheinlichsten Kandidatengene für nicht-syndromale Schwerhörigkeiten. Einziger bisher bekannter nicht-syndromaler Schwerhörigkeitslokus auf dem langen Arm von Chromosom 19, auf welchem sich auch das CEA-Gen-Cluster befindet, ist DFNA4. Chen *et al.* und Yang *et al.* definierten diesen Locus mittels Koppelungsanalyse einer großen nordamerikanischen Familie, in der über mehrere Generationen hinweg ein bisher nicht bekanntes nicht-syndromales Schwerhörigkeits (NSHL)-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 19 vererbt wurde, auf einen 19 Mb großen Bereich zwischen den Markern D19S414 und D19S246 (Chen *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2005). Mirghomizadeh *et al.* analysierten 2002 eine deutsche Familie, die ebenfalls ein NSHL-Gen im Bereich 19q vererbte und konnten hier die Kandidatenregion auf einen 6 Mb großen Bereich zwischen den Markern D19S412 und D19S571 festlegen (Mirghomizadeh *et al.*, 2002). 2004 schließlich stellten Pusch *et al.* eine minimale Konsensusregion aus den bisher vorgeschlagenen DFNA4 Loci zwischen den Markern D19S879 und D19S246 auf (Pusch *et al.*, 2004). In zwei deutschen Familien mit autosomal dominant vererbten NSHL konnten Mutationen des Gens *MYH14* nachgewiesen werden, welches in der von Pusch definierten Kandidatenregion liegt (Van Donaudy *et al.*, 2004). Für die nordamerikanische Familie, die Chen *et al.* zu Beginn zur Lokalisierung von DFNA4 diente, konnte allerdings keine Mutation im *MYH14*-Gen gefunden werden (Yang, T. *et al.*, 2005). Im Nachhinein wurde dies durch eine weitere Eingrenzung des Gendefektlokus auf einen Bereich zwischen den beiden Markern D19S414 und rs648298 klar, wodurch das *MYH14*-Gen ausgeschlossen wurde (Yang *et al.*, 2005). Da CEACAM16 innerhalb der ursprünglich von Chen *et al.* deklarierten DFNA4-Kandidatenregion, zentomerproximal von *MYH14*, sowie in den von Mirghomizadeh *et al.* und Pusch *et al.* definierten Bereichen liegt, könnte eine zu NSHL führende *CEACAM16*-Mutation am ehesten in der von Chen *et al.* analysierten nordamerikanischen Familie gefunden werden (Abbildung 18).

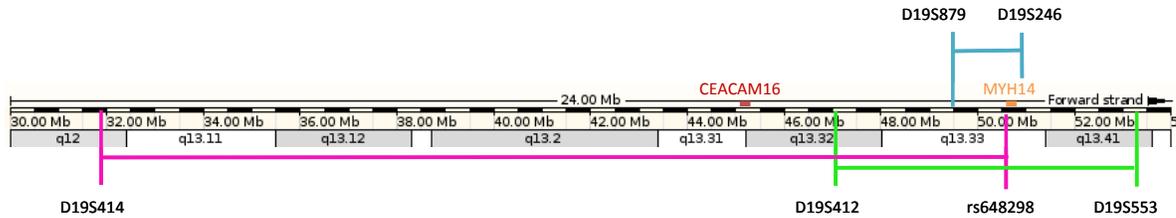


Abbildung 18: Schematische Darstellung von DFNA4. Die von Chen *et al.* (1995) und Yang *et al.* (2005) kartierte DFNA4-Region befindet sich im Bereich der rosafarbenen Balken. Die grünen Balken überspannen den von Mirghomizadeh *et al.* (2002) anhand der Analyse einer deutschen Familie definierten Bereich. Die von Pusch *et al.* (2005) lokalisierte minimale Konsensussequenz liegt zwischen den blauen Balken. Hier befindet sich auch *MYH14*. *CEACAM16* liegt knapp 6 Mb zentromernäher von *MYH14* in der rosa markierten Kandidatenregion.

In der Tat bestätigten Zhengs Befunde diese aufgrund der chromosomalen Lage des nach Ausschluss von *MYH14* verbliebenen DFNA4-Lokus und der spezifischen Expression gemachten Vorhersage. Ein *Screening* der nordamerikanischen Familie erbrachte einen Austausch von Threonin zu Prolin in Position 140 der *CEACAM16*-Aminosäuresequenz im Bereich der IgC-ähnlichen Domäne A. Diese Mutation zerstört ein konserviertes Motiv für eine N-Glykosylierungsstelle (Zheng, J. *et al.*, 2011). Die erkrankten Mitglieder der Familie präsentieren sich mit einer mäßigen sensorineuronalen bilateralen Hörminderung bis ~50 dB mit Beginn in der Pubertät (Chen *et al.*, 1995). Eine Hörminderung im Gegensatz zur vollständigen Schwerhörigkeit passt in diesem Fall zur Lokalisation von *CEACAM16* im Bereich der Tektorialmembran, welche für die Lautverstärkung, nicht aber für die Lautwahrnehmung an sich notwendig ist. Interessant ist hierbei auch die Tatsache, dass von einer Mutation betroffene Familienmitglieder eine Hörminderung erst während der Pubertät entwickeln. Zum weiteren Verständnis wäre hierfür eine Analyse der *CEACAM16*-Expression in Korrelation mit der Entwicklung des Gehörs interessant.

4.5. Bedeutung von *CEACAM16* auf die Innenohr- und Schwerhörigkeitsforschung

Die Entdeckung und Analyse neuer an Schwerhörigkeit beteiligter Gene hat in den letzten zwei Jahrzehnten sicherlich den größten Anteil geleistet, unsere Erkenntnisse über den biochemischen Ablauf des Hörens kontinuierlich auszudehnen. In einigen

Bereichen muss sich die Gehörforschung jedoch noch immer auf anatomische und physikalische Beschreibungen beschränken, ohne die molekulargenetischen Hintergründe erklären zu können. So gab zum Beispiel die Entdeckung der spezifisch im Innenohr exprimierten Glykoproteine α - und β -Tectorin Rückschlüsse auf die Struktur der Tektorialmembran. Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass diese aus radiär angeordneten Kollagenfibrillen, eingelagert in Schichten einer Matrix mit geriffelter Oberfläche, besteht, die sich aus α - und β -Tectorin zusammensetzen (Legan *et al.*, 1997; Hasko *et al.*, 1988). Für α -Tectorin konnten im entsprechenden Gen *TECTA* Mutationen als Auslöser sowohl autosomal-rezessiver, als auch autosomal-dominanter nicht-syndromaler Schwerhörigkeit entdeckt und den Loci DFNB21 bzw DFNA8 und 12 zugeordnet werden (Mustapha *et al.*, 1999; Verhoeven *et al.*, 1998). *Tecta*^{-/-} Mäuse zeigen einen Verlust des nichtkollagenen Anteils der Tektorialmembran sowie eine Ablösung derselbigen von ihrer Verbindung mit dem Corti-Organ über die Stereozilien der äußeren Haarzellen (Legan *et al.*, 2000). Mutationen des β -Tectorin Gens *TECTB* konnten bisher im Menschen noch nicht als Ursache nicht-syndromaler Schwerhörigkeiten nachgewiesen werden (Richardson *et al.*, 2011). Allerdings zeigten Russell *et al.* anhand von *Tectb*^{-/-} Mäusen, dass ein Verlust von β -Tectorin ebenfalls zur Zerstörung der nichtkollagenen Matrixstruktur der Tektorialmembran führt (Russell *et al.*, 2000).

Trotz Kenntnis der beschriebenen Proteine ist der genaue Aufbau der Tektorialmembran bisher nicht entschlüsselt. Auch für den Befestigungsmechanismus der Stereozilienköpfchen der äußeren Haarzellen in der Tektorialmembranmatrix konnte noch keine Lösung gefunden werden. Als ein neues weiteres für die Tektorialmembran spezifisches Protein könnte die funktionelle Analyse von CEACAM16 zur Klärung dieser Fragen beitragen. Mit dem Wissen ob der Fähigkeit bekannter CEACAM-Proteine zu homotypischen und heterotypischen Interaktionen und ihrer Funktion bei Zell-Zell-Adhäsionen erscheint CEACAM16 mit einer IgV-ähnlichen Domäne am aminoterminalen sowie am carboxyterminalen Ende prädestiniert zur Generierung von Protein-Protein-Verbindungen. Eine Möglichkeit ist die von Zheng *et al.* propagierte Theorie, dass CEACAM16 als Linker-Protein zur Befestigung der äußeren Haarzellen in der Tektorialmembran dient (Zheng *et al.*,

2011). So könnte CEACAM16 das bindende Glied zwischen α -Tectorin und den in den Stereozilien der äußeren Haarzellen lokalisierten Proteinen Stereocilin und Otoancorin sein. Für α -Tectorin konnte bereits eine Interaktion mit CEACAM16 gezeigt werden (Zheng et al., 2011). Stereocilin und Otoancorin befinden sich in den Spitzen der Stereozilien der äußeren Haarzellen und scheinen an der Interaktion zwischen Haarzellen und Tektorialmembran beteiligt zu sein. Für beide Proteine sind Mutationen bekannt, die zu autosomal-rezessiv vererbter nichtsyndromaler Schwerhörigkeit führen (Zwaenepoel *et al.*, 2002; Verpy *et al.*, 2001; Verpy *et al.*, 2011). Auf der anderen Seite wäre eine Funktion von CEACAM16 als Linker-Strukturprotein zwischen den bisher bekannten tektorialen Matrixproteinen vorstellbar. Unter diesen Umständen wäre es möglich, dass CEACAM16 essentiell ist, um die nötige Elastizität der Tektorialmembran zu gewährleisten oder aufgrund seines spezifischen Aufbaus als Stossdämpfer bzw. Schwingungsdämpfer zu fungieren.

Aufschluss hierüber könnten in einem weiteren Schritt Analysen der Interaktion zwischen CEACAM16 und den genannten Tektorialmembranproteinen geben sowie deren Verlust in CEACAM16^{-/-} Mäuse (Kammerer *et al.*, in Revision).

Mit der Entdeckung und Lokalisierung von CEACAM16 im Innenohr wurde somit unser Verständnis des Hörprozesses im Innenohr weiter verfeinert. Ein weiteres für das Gehör relevantes Protein des Corti-Organs gibt die Möglichkeit zu vielen neuen Theorien über die Interaktion von Tektorialmembran sowie äußeren und inneren Haarzellen. Gleichzeitig werden zahlreiche weitere Fragen aufgeworfen nicht nur über den molekularbiologischen Ablauf des Hörens im Innenohr, sondern auch über die Entwicklung des Corti-Organs.

5. Zusammenfassung

Schwerhörigkeit hat häufig eine genetische Ursache. Insbesondere ein sensorineuraler Hörverlust kann in vielen Fällen auf eine Mutation in einem für das Gehör relevanten Gen zurückgeführt werden. Hierbei wird zwischen syndromaler und nicht-syndromaler Schwerhörigkeit unterschieden. Für Formen nicht-syndromaler Schwerhörigkeit konnten in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Mutationen in spezifischen Genen des Gehörs nachgewiesen werden. Charakterisierung dieser Gene half wichtige molekulare Abläufe des Hörens im Innenohr zu entschlüsseln. Mit der kürzlichen Entdeckung von *CEACAM16*, dem am höchsten konservierten Mitglied der CEA-Familie, fand sich ein neues Kandidatengen für nicht-syndromale Schwerhörigkeit. EST-Datenbankanalysen legten nahe, dass *CEACAM16* selektiv im ZNS exprimiert wird und hier hochspezifisch im Innenohr. In dieser Arbeit konnte *CEACAM16* mRNA sowohl im humanen als auch im murinen Innenohr nachgewiesen werden. Im erwachsenen Menschen konnte der *CEACAM16*-Hauptexpressionsort im Bereich der *Stria vascularis* lokalisiert werden. Des Weiteren wurde *CEACAM16* mRNA im murinen Kleinhirn und zu einem geringen Maße in der murinen Hypophyse gefunden. Sequenzierung der murinen und humanen cDNA korrigierte in *Ensembl* zum Teil falsch vorhergesagte Exonen und ergab neue Allele mit *single nucleotide polymorphisms* (SNP). Mittels genetischer Immunisierung von Mäusen mit einem murinen *CEACAM16*-Expressionsvektor konnte ein polyklonales Immenserum innerhalb der gleichen Spezies möglicherweise aufgrund der Immunprivilegierung des Innenohrs hergestellt werden. Die spezifische Bindung des generierten Antikörpers an murines *CEACAM16* wurde sowohl durchflusszytometrisch sowie durch immunhistochemische Färbung von Zytospins mittels *CEACAM16*-Transfektanten bestätigt. Zur Lokalisierung von *CEACAM16* im Innenohr wurden murine *Cochlea*-Schnitte mit dem gewonnenen Immenserum gefärbt. Hier zeigte sich eine kräftige Farbreaktion im Bereich der Tektorialmembran neben einer etwas schwächeren Farbmarkierung der *Stria vascularis*. Aufgrund der Lage von *CEACAM16* auf Chromosom 19 im Bereich des DFNA4 Locus postulierten wir, dass Mutationen von *CEACAM16* zu nicht-syndromaler Schwerhörigkeit führen,

was von Zheng *et al.* 2011 bestätigt werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass *CEACAM16* eine wichtige Rolle für das Hören im Bereich des Corti-Organ spielt. Zur Aufklärung der Aufgaben von *CEACAM16* und zum weiteren Verständnis des Hörablaufs im Innenohr auf molekularer Ebene sind im nächsten Schritt Funktionsanalysen u.a. mit Hilfe von *Ceacam16-knock-out*-Mäusen geplant.

6. Literaturverzeichnis

Ahmed, Z. M., Morell, R. J., Riazuddin, S., Gropman, A., Shaukat, S., Ahmad, M. M., Mohiddin, S. A., Fananapazir, L., Caruso, R. C., Husnain, T., Khan, S. N., Riazuddin, S., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Wilcox, E. R. (2003) Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. *Am J Hum Genet*, **72**, 1315–1322.

Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Ahmad, J., Bernstein, S. L., Guo, Y., Sabar, M. F., Sieving, P., Riazuddin, S., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Belyantseva, I. A., Wilcox, E. R. (2003) PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum Mol Genet*, **12**, 3215–3213.

Alagramam, K. N., Goodyear, R. J., Geng, R., Furness, D. N., van Aken, A. F., Marcotti, W., Kros, C. J., Richardson, G. P. (2011) Mutations in protocadherin 15 and cadherin 23 affect tip links and mechanotransduction in mammalian sensory hair cells. *PLoS One*, **6**, e19183.

Bamberger, A. M.; Riethdorf, L.; Nollau, P.; Naumann, M.; Erdmann, I.; Gotze, J. (1998) Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer. *Am J Pathol*, **152**, 1401–1406.

Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K., Stanners, C.P. (1989) Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*, **57**, 327–334.

Bender, S. J.; Phillips, J. M.; Scott, E. P.; Weiss, S. R. (2010) Murine coronavirus receptors are differentially expressed in the central nervous system and play virus strain-dependent roles in neuronal spread. *J Virol*, **84**, 11030–11044.

Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; von Heijne, G.; Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, **340**, 783–795.

Berg, J. S.; Powell, B. C.; Cheney, R. E. (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell*, **12**, 780–794.

Birkenhäger, R., Aschendorff, A., Schipper, J., Laszig, R. (2007) Nicht-syndromale hereditäre Schwerhörigkeiten. *Laryngorhinootologie*, **86**, 310–313.

Bork, J. M., Peters, L. M., Riazuddin, S., Bernstein, S. L., Ahmed, Z. M., Ness, S. L., Polomeno, R., Ramesh, A., Schloss, M., Srisailpathy, C. R., Wayne, S., Bellman, S., Desmukh, D., Ahmed, Z., Khan, S. N., Kaloustian, V. M., Li, X. C., Lalwani, A., Riazuddin, S., Bitner-Glindzicz, M., Nance, W. E., Liu, X. Z., Wistow, G., Smith, R. J., Griffith, A. J., Wilcox, E. R., Friedman, T. B., Morell, R. J. (2001) Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet*, **68**, 26–37.

Bos, M. P.; Kao, D.; Hogan, D. M.; Grant, C. C. R.; Belland, R. J. (2002) Carcinoembryonic antigen family receptor recognition by gonococcal Opa proteins requires distinct combinations of hypervariable Opa protein domains. *Infect Immun*, **70**, 1715–1723.

- Busch, C.; Hanssen, T. A.; Wagener, C.; Obrink, B. (2002) Down-regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition. *Hum Pathol*, **33**, 290–298.
- Chen, C.-J.; Kirshner, J.; Sherman, M. A.; Hu, W.; Nguyen, T.; Shively, J. E. (2007) Mutation analysis of the short cytoplasmic domain of the cell-cell adhesion molecule CEACAM1 identifies residues that orchestrate actin binding and lumen formation. *J Biol Chem*, **282**, 5749–5760.
- Chen, A. H., Ni, L., Fukushima, K., Marietta, J., O'Neill, M., Coucke, P., Willems, P., Smith, R. J. (1995) Linkage of a gene for dominant non-syndromic deafness to chromosome 19. *Hum Mol Gen*, **4**, 1073–1076.
- Chen W, Kahrizi K, Meyer NC, Riazalhosseini Y, Van Camp G, Najmabadi H, Smith RJ (2005) Mutation of COL11A2 causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the DFNB53 locus. *J Med Genet*, **42**, e61.
- Chen, Z., Chen, L., Qiao, S. W., Nagaishi, T., Blumberg, R.S. (2008) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 inhibits proximal TCR signaling by targeting ZAP-70. *J Immun*, **180**, 6085–6093.
- Cruz, P. V., Wakai, T., Shirai, Y., Yokoyama, N., Hatakeyama, K. (2005) Loss of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression is an adverse prognostic factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **104**, 354–360.
- Di Melchionda, S., Ahituv, N., Bisceglia, L., Sobe, T., Glaser, F., Rabionet, R., Arbones, M. L., Notarangelo, A., Iorio, E., Carella, M., Zelante, L., Estivill, X., Avraham, K. B., Gasparini, P. (2001) MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet*, **69**, 635–640.
- Duffy M. J. (2001) Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: Is It clinically useful. *Clin Chem*, **47**, 624–630.
- Dveksler, G. S.; Pensiero, M. N.; Cardellichio, C. B.; Williams, R. K.; Jiang, G. S.; Holmes, K. V.; Dieffenbach, C. W. (1991) Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J Virol*, **65**, 6881–6891.
- Eisenried, A. (2009) Charakterisierung von CEACAM20, einer potenziellen Zielstruktur für die Tumorimmuntherapie. Dissertation, Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Ergün, S., Kilik, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Götze, J., Wurmbach, J. H., Horst, A., Weil, J., Fernando, M., Wagener, C., (2000) CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell*, **5**, 311–320.
- Finkenzeller, D., Fischer, B., Lutz, S., Schrewe, H., Shimizu, T., Zimmermann, W. (2003) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 10 expressed specifically early in pregnancy in the decidua is dispensable for normal murine development. *Mol and Cell Biol*, **23**, 272–279.

- Gold, P., Freedman, S. O. (1965) Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med*, **121**, 439–462.
- Golomb, E., Ma, X.; Jana, S. S.; Preston, Y. A.; Kawamoto, S.; Shoham, N. G., Goldin, E., Conti, M. A., Sellers, J. R., Adelstein, R.S. (2004) Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem*, **279**, 2800–2808.
- Grande, S. M, Katz, E., Crowley, J. E., Bernardini, M. S., Ross, S. R., Monroe, J. G. (2006) Cellular ITAM-containing proteins are oncoproteins in nonhematopoietic cells. *Oncogene*, **25**, 2748–2757
- Gueta, R., Levitt, J., Xia, A., Katz, O., Oghalai, J. S., Rousso, I. (2011) Structural and mechanical analysis of tectorial membrane Tecta mutants. *Biophys J*, **100**, 2530–2538.
- Hammarström, S. (1999) The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Sem Canc Biol*, **9**, 67–81.
- Hance, K. W., Zeytin, H. E., Greiner, J. W. (2005) Mouse models expressing human carcinoembryonic antigen (CEA) as a transgene: Evaluation of CEA-based cancer vaccines. *Mut Res*. **576**, 134–154.
- Harling-Berg, C.; Knopf, P. M.; Merriam, J.; Cserr, H. F. (1989) Role of cervical lymph nodes in the systemic humoral immune response to human serum albumin microinfused into rat cerebrospinal fluid. *J Neuroimm*, **25**, 185–193.
- Harris, J. P.; Woolf, N. K.; Ryan, A. F. (1985) Elaboration of systemic immunity following inner ear immunization. *Am J Otolaryngol*, **6**, 148–152.
- Hasko, J. A., Richardson, G. P. (1988) The ultrastructural organization and properties of the mouse tectorial membrane matrix. *Hear Res*, **35**, 21–38.
- Heinrich, G.; Ghosh, S.; Deangelis, A. M.; Schroeder-Gloeckler, J. M.; Patel, P. R.; Castaneda, Jeffers, S., Lee, A. D., Jung, D. Y., Zhang, Z., Opland, D. M., Myers, M. G. Jr., Kim, J. K., Najjar, S. M. (2010) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 2 controls energy balance and peripheral insulin action in mice. *Gastroenterology*, **139**, 644–52.
- Hemmila, E.; Turbide, C.; Olson, M.; Jothy, S.; Holmes, K. V.; Beauchemin, N. (2004) Ceacam1a-/- mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *J Virol*, **78**, 10156–10165.
- Hill, D. J.; Toleman, M. A.; Evans, D. J.; Villullas, S.; van Alphen, L.; Virji, M. (2001) The variable P5 proteins of typeable and non-typeable Haemophilus influenzae target human CEACAM1. *Mol Microbiol*, **39**, 850–862.
- Hill, D. J.; Virji, M. (2003) A novel cell-binding mechanism of Moraxella catarrhalis ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. *Mol Microbiol*, **48**, 117–129.
- Horst, A. K., Wagner, C. (2004) CEA-Related CAMs. *HEP*, **165**, 283–341.

- Iliantzis, C., DeMarte, L., Screatton, R. A., Stanners, C. P. (2002) Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia*, **4**, 151–163.
- Iliantzis, C., Stanners, C. P. (1997) A colonic tissue architecture assay applied to human colon carcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **33**, 50–61.
- Iliades, T., Eleftheriades, N., Iliadou, V., Pampanos, A., Voyiatzis, N., Economides, J., Leotsakos, P., Neou, P., Tsakanikos, M., Antoniadis, T., Konstantopoulou, I., Yannoukakos, D., Grigoriadou, M., Skevas, A., Petersen, M. B. (2002) Prelingual nonsyndromic hearing loss in Greece. Molecular and clinical findings. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, **64**, 321–323.
- Kalatzis, V., Petit, C., (1998) The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Gen*, **7**, 1589–1597.
- Kammerer, R., Rüttiger, L., Riesenberger, R., Schäuble, C., Krupar, R., Kamp, A., Sunami, K., Eisenried, A., Hennenberg, M., Grunert, F., Breß, A., Battaglia, S., Schrewe, H., Knipper, M., Schneider, MR., Zimmermann, W. Loss of the mammal-specific tectorial membrane component CEA Cell Adhesion Molecule 16 (CEACAM16) leads to hearing impairment at low and high frequencies. *J Biol Chem*, in Revision.
- Kammerer, R., Zimmermann, W. (2010) Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families. *BMC Biol*, **8**:12.
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P. (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, **387**, 80–83.
- Kiang, D. T., Jin, N., Tu, Z. J., Lin, H. H. (1997) Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene*, **199**, 165–171.
- Kikuchi, T., Kimura, R. S., Paul, D.L., Takasaka, T., Adams, J. C. (2000) Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev*, **32**, 163–166.
- Kitajiri, S., Sakamoto, T., Belyantseva, I. A., Goodyear, R. J., Stepanyan, R., Fujiwara, I., Bird, J. E., Riazuddin, S., Riazuddin, S., Ahmed, Z. M., Hinshaw, J. E., Sellers, J., Bartles, J. R., Hammer, J. A. 3rd, Richardson, G. P., Griffith, A. J., Frolenkov, G. I., Friedman, T. B. (2010) Actin-bundling protein TRIOBP forms resilient rootlets of hair cell stereocilia essential for hearing. *Cell*, **28**, 786–798.
- Klinke, R., Pape, H., Silbernagl, S., (2005) Physiologie. 5., komplett überarbeitete Auflage. *Thieme*.
- Kuespert, K., Pils, S., Hauck, C. R. (2006) CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Op Cell Biol*, **18**, 565–571.
- Lalwani, A. K., Goldstein, J. A., Kelley, M. J., Luxford, W., Castelein, C. M., Mhatre, A. N. (2000) Human Nonsyndromic Hereditary Deafness DFNA17 Is Due to a Mutation in Nonmuscle Myosin MYH9. *Am J Hum Genet*, **67**, 1121–1128.
- Leal, A., Endeles, S., Stengel, C., Huehne, K., Loetterle, J., Barrantes, R., Winterpacht A., Rautenstrauss, B. (2003) A novel myosin heavy chain gene in human chromosome 19q13.3. *Gene*, **312**, 165–171.

- Legan, P. K., Lukashkina, V. A., Goodyear, R. J., Kössi, M., Russell, I. J., Richardson, G. P. (2000) A targeted deletion in alpha-tectorin reveals that the tectorial membrane is required for the gain and timing of cochlear feedback. *Neuron*, **28**, 273–285.
- Legan, P. K., Rau, A., Keen, J. N., Richardson, G. P. (1997) The mouse tectorins. Modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. *J Biol Chem*, **272**, 8791–8801.
- Leung, N., Turbide, C., Olson, M., Marcus, V., Jothy, S., Beauchemin, N. (2006): Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis. *Oncogene*, **25**, 5527–5536.
- Leusch, H. G., Drzeniek, Z., Hefta, S. A., Markos-Pusztai, Z., Wagener, C. (1991): The putative role of members of the CEA-gene family (CEA, NCA and BGP) as ligands for the bacterial colonization of different human epithelial tissues. *Zentralbl Bakteriol*, **275**, 118–122.
- Liu, X. Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., Cope, M. J., Steel, K. P., Brown, S. D. (1997) Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genetics*, **16**, 188–190
- Martin, P. E., Coleman, S. L., Casalotti, S. O., Forge, A., Evans, W. H. (1999): Properties of connexin26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness. *Hum Mol Genet*, **8**, 2369–2376
- Martínez, A. D., Acuña, R., Figueroa, V., Maripillan, J., Nicholson, B., (2009): Gap junction channels dysfunction in Deafness and Hearing loss. *Antioxid Redox Signal*, **2**, 309–322.
- Masaki, K., Gu, J. W., Ghaffari, R., Chan, G., Smith, R. J., Freeman, D. M., Aranyosi, A. J. (2009) Col11a2 deletion reveals the molecular basis for tectorial membrane mechanical anisotropy. *Biophys J*, **96**, 4717–4724.
- Mburu, P., Mustapha, M., Varela, A., Weil, D., El-Amraoui, A., Holme, R. H., Rump, A., Hardisty, R. E., Blanchard, S., Coimbra, R. S., Perfettini, I., Parkinson, N., Mallon, A. M., Glenister, P., Rogers, M. J., Paige, A. J., Moir, L., Clay, J., Rosenthal, A., Liu, X. Z., Blanco, G., Steel, K. P., Petit, C., Brown, S. D. (2003) Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat Genet*, **34**, 421–428.
- Mirghomizadeh, F., Bardtke, B., Devoto, M., Pfister, M., Oeken, J., König, E., Vitale, E., Riccio, A., De Rienzo, A., Zenner, H. P., Blin, N. (2002) Second family with hearing impairment linked to 19q13 and refined DFNA4 localisation. *Eur J Hum Genet*, **10**, 95–99.
- Modamio-Hoybjor, S., Mencia, A., Goodyear, R., del Castillo, I., Richardson, G., Moreno, F., Moreno-Pelayo, M. A. (2007) A mutation in CCDC50, a gene encoding an effector of epidermal growth factor-mediated cell signaling, causes progressive hearing loss. *Am J Hum Genet*, **80**, 1076–1089.

- Mogensen, M. M., Rzadzinska, A., Steel, K. P. (2007) The deaf mouse mutant whirler suggests a role for whirlin in actin filament dynamics and stereocilia development. *Cell Motil Cytoskeleton*, **64**, 496–508.
- Mueller, O., Hahnenberger, K., Dittmann, M., Yee, H., Dubrow, R., Nagle, R., Ilsley, D. (2000) A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis*, **21**, 128–134.
- Mustapha, M., Weil, D., Chardenoux, S., Elias, S., El-Zir, E., Beckmann, J. S., Loiselet, J., Petit, C. (1999) An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum Mol Genet*, **8**, 409–412.
- Nadol, J. B. Jr. (1993) Hearing loss. *N Engl J Med*, **329**, 1092–1102.
- Nap, M., Mollgard, K., Burtin, P., Fleuren, G. J. (1988) Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumour Biol.*, **9**, 145–153.
- Nedellec, P., Dveksler, G. S., Daniels, E., Turbide, C., Chow, B., Basile, A. A., Holmes, K. V., Beauchemin, N. (1994) Bgp2, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *J Virol*, **68**, 4525–4537.
- Neumaier, M., Paululat, S., Chan, A., Matthaes, P., Wagener, C., (1993) Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10744–10748.
- Nittka, S., Bohm, C., Zentgraf, H., Neumaier, M. (2008) The CEACAM1-mediated apoptosis pathway is activated by CEA and triggers dual cleavage of CEACAM1. *Oncogene*, **27**, 3721–3728.
- Nittka, S., Gunther, J., Ebisch, C., Erbersdobler, A., Neumaier, M. (2004) The human tumor suppressor CEACAM1 modulates apoptosis and is implicated in early colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, **23**, 9306–9313.
- Nomura, S., Maeda, K., Noda, E., Inoue, T., Fukunaga, S., Nagahara, H., Hirakawa, K. (2010) Clinical significance of the expression of connexin26 in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, **29**, 79.
- Papistella, M. (2009) CEACAM 20, ein potentielles Zielmolekül für die Immuntherapie von Prostatakarzinompatienten. Dissertation, Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Petersen, M. B. (2002) Non-syndromic autosomal-dominant deafness. *Clin Genet*, **62**, 1–13.
- Petersen, M. B., Willems, P. J. (2006) Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet*, **69**, 371–392.
- Pfister, M. (2002) Gene und Schwerhörigkeit. *Laryngo-Rhino-Otol*, **11**, 768–770.
- Probst, R., Grevers, G., Iro, H. (2008) Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. *Thieme*.
- Pusch, C. M., Meyer, B., Kupka, S., Smith, R. J., Lalwani, A. K., Zenner, H. P., Blin, N., Nürnberg, P., Pfister, M. (2004) Refinement of the DFNA4 locus to a 1.44 Mb region in 19q13.33. *J Mol Med (Berl)*, **82**, 398–402.

- Richardson, G. P., de Monvel, J. B., Petit, C. (2011) How the genetics of deafness illuminates auditory physiology. *Annu Rev Physiol*, **73**, 322–334.
- Riethdorf, L., Lisboa, B. W., Henkel, U., Naumann, M., Wagener, C., Loning, T. (1997) Differential expression of CD66a (BGP), a cell adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, in benign, premalignant, and malignant lesions of the human mammary gland. *J Histochem Cytochem*, **45**, 957–963.
- Russell, I. J., Legan, P. K., Lukashkina, V. A., Lukashkin, A. N., Goodyear, R. J., Richardson, G. P. (2007) Sharpened cochlear tuning in a mouse with a genetically modified tectorial membrane. *Nat Neurosci*, **10**, 215–223.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463–5467
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*.
- Shahin, H., Walsh, T., Sobe, T., Abu Sa'ed, J., Abu Rayan, A., Lynch, E. D., Lee, M. K., Avraham, K. B., King, M. C., Kanaan, M. (2006) Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet*, **78**, 144–152.
- Teglund, S., Olsen, A., Khan, W. N., Frångsmyr, L., Hammarström, S., (1994) The Pregnancy-Specific Glycoprotein (PSG) Gene Cluster on Human Chromosome 19: Fine Structure of the 11 PSG Genes and Identification of 6 New Genes Forming a Third Subgroup within the Carcinoembryonic Antigen (CEA) Family. *Genomics*, 669–684.
- Tilki, D., Oliveira-Ferrer, L., Kilic, N., Friedrich, M. G., Stief, C. G., Ergun, S. (2007): One molecule, two faces. Epithelial loss of cell adhesion molecule CEACAM1 activates angiogenesis in bladder and prostate cancer. *Urologe A*, **46**, 1128–1134.
- Van Donaudy, F., Ferrara, A., Esposito, L., Hertzano, R., Ben-David, O., Bell, R. E., Melchionda, S., Zelante, L., Avraham, K. B., Gasparini, P. (2003) Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet*, **72**, 1571–1577.
- Van Donaudy, F., Snoeckx, R., Pfister, M., Zenner, H. P., Blin, N., Stazio, M., Ferrara, A., Lanzara, C., Ficarella, R., Declau, F., Pusch, C. M., Nürnberg, P., Melchionda, S., Zelante, L., Ballana, E., Estivill, X., Camp, G., Gasparini, P., Savoia A. (2004) Nonmuscle myosin heavy-Cchain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet*, **74**, 770–776.
- Van Kremer, H., Wijk, E., Märker, T., Wolfrum, U., Roepman, R. (2006) Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. *Hum Mol Genet*, **15**, 262–270.
- Verhoeven, K., Van Laer, L., Kirschhofer, K., Legan, P. K., Hughes, D. C., Schattelman, I., Verstreken, M., Van Hauwe, P., Coucke, P., Chen, A., Smith, R. J., Somers, T., Offeciers, F. E., Van de Heyning, P., Richardson, G. P., Wachtler, F., Kimberling, W. J., Willems, P.J., Govaerts, P. J., Van Camp, G. (1998) Mutations in

the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet*, **19**, 60–62.

Verpy, E., Leibovici, M., Michalski, N., Goodyear, R. J., Houdon, C., Weil, D., Richardson, G. P., Petit, C. (2011) Stereocilin connects outer hair cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane. *J Comp Neurol*, **519**, 194–210.

Verpy, E., Masmoudi, S., Zwaenepoel, I., Leibovici, M., Hutchin, T. P., Del Castillo, I., Nouaille, S., Blanchard, S., Lainé, S., Popot, J. L., Moreno, F., Mueller, R. F., Petit, C. (2001) Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet*, **29**, 345–349

Virji, M., Watt, S. M., Barker, S., Makepeace, K., Doyonnas, R. (1996) The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol*, **22**, 929–939.

Walsh, T., Walsh, V., Vreugde, S., Hertzano, R., Shahin, H., Haika, S., Lee, M. K., Kanaan, M., King, M. C., Avraham, K. B. (2002) From flies' eyes to our ears: Mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7518–7523.

Wang, A., Liang, Y., Fridell, R. A., Probst, F. J., Wilcox, E. R., Touchman, J. W., Morton, C. C., Morell, R. J., Noben-Trauth, K., Camper, S. A., Friedman T. B. (1998) Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science*, **280**, 1447–1451.

Weil, D., Küssel, P., Blanchard, S., Lévy, G., Levi-Acobas, F., Drira, M., Ayadi, H., Petit, C. (1997) The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet*, **16**, 191–193.

Wekerle, H. (2006) Breaking ignorance: the case of the brain. *Curr Top Microbiol Immunol*, **305**, 25–50.

Yang, T., Pfister, M., Blin, N., Zenner, H. P., Pusch, C. M., Smith, R. J. (2005) Genetic heterogeneity of deafness phenotypes linked to DFNA4. *Am J Med Genet A*, **139**, 9–12.

Zebhauser, R., Kammerer, R., Eisenried, A., McLellan, A., Moore, T., Zimmermann, W. (2005) Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine Cea family. *Genomics*, **86**, 566–580.

Zelante, L., Gasparini, P., Estivill, X., Melchionda, S., D'Agruma, L., Govea, N., Milá, M., Monica, M. D., Lutfi, J., Shohat, M., Mansfield, E., Delgrosso, K., Rappaport, E., Surrey, S., Fortina, P. (1997) Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet*, **6**, 1605–1609.

Zheng, J., Miller, K. K., Yang, T., Hildebrand, M. S., Shearer, A. E., DeLuca, A.P., Scheetz, T. E., Drummond, J., Scherer, S. E., Legan, P. K., Goodyear, R. J., Richardson, G. P., Cheatham, M. A., Smith, R. J., Dallos, P. (2011) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with alpha-tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 4218–4223.

Zhou, C. J., Liu, B., Zhu, K. X., Zhang, Q. H., Zhang, T. G., Xu, W. H., Wang, H. B., Yu, W. H., Qu, Y. D. Wang H. J., Wu, H. L., Sun, S. Z., Guo, J. Q. (2009) The different expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1(CEACAM1) and possible roles in gastric carcinomas. *Pathol Res Pract*, **205**, 483-489.

Zwaenepoel, I., Mustapha, M., Leibovici, M., Verpy, E., Goodyear, R., Liu X. Z., Nouaille, S., Nance, W. E., Kanaan, M., Avraham, K. B., Tekaiia, F., Loiselet, J., Lathrop, M., Richardson, G., Petit, C. (2002) Otoanchorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 6240-6245.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ad	aufgefüllt auf
AS	Aminosäure
BGP	biliary glycoprotein, biliäres Glykoprotein
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CEA	carcinoembryonic antigen, karzinoembryonales Antigen
CEACAM	CEA-related celladhesion molecule, CEA-verwandtes Zelladhäsionsmolekül
Cell ELISA	Cell based enzyme-linked immuno sorbent assay
CMV	Cytomegalievirus
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	et alii (und andere)
FACSan	<i>fluorescence activated cell scan</i> , Durchflusszytometer
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fötale Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
Hsa	<i>Homo sapiens</i> , Mensch
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HZ	Haarzellen
Ig	Immunglobulin
IgC-Domäne	konstante (constant) Immunglobulindomäne
IgV-Domäne	variable Immunglobulindomäne
l	Liter
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
M	Molar
mCEACAM	Murines CEACAM
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NC	<i>Nervus cochleae</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
SM	<i>Scala media</i>
ST	<i>Scala tympani</i>
STV	<i>Stria vascularis</i>
SV	<i>Scala vestibularis</i>
TM	Tektorialmembran
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann, für die sorgfältige und geduldige Betreuung meiner Doktorarbeit, für seine stets motivierenden Worte und die zahlreichen Diskussionen, die mir nicht nur einen tiefen Einblick in die CEA-Forschung gegeben haben, sondern in die wissenschaftliche Tätigkeit im Allgemeinen und meine Begeisterung für die medizinische Forschung geweckt haben.

Des Weiteren geht ein großer Dank an PD Dr. Robert Kammerer für die verständliche Einarbeitung in mein Forschungsthema und die vielen guten Ratschläge zur Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit. Im Zuge dessen möchte ich mich auch ganz herzlich bei Dr. Rainer Riesenberg und Anja Henning bedanken, die mir alle für diese Arbeit notwendigen Methoden der Molekularbiologie, genetischen Immunisierung sowie Immunhistochemie vermittelt haben und mich an ihrem großen Erfahrungsschatz teilhaben ließen. Weiterer Dank geht an Dr. Alexander Buchner für Hilfe bei diversen Computerproblemen.

Bei Dr. Kishiko Sunami (Department of Otolaryngology, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan) möchte ich mich gerne für die Bereitstellung von cDNA der humanen *Stria vascularis* bedanken. Dank geht auch an Dr. Matthias Klein (Neurologische Klinik und Poliklinik, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität), der die Paraffinschnitte der murinen *Cochlea* zur Verfügung gestellt hat.

Bei Prof. Dr. Dr. Juergen Heesemann möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation im Rahmen des Promotionsstudiengangs Molekulare Medizin sowie der damit verbundenen fachlichen und finanziellen Unterstützung.

Am Ende geht mein größter Dank an meine Familie, die mir den Rücken gestärkt und freigehalten, mir immer das richtige Maß an Verständnis und Ansporn entgegengebracht und stets mit großem Interesse den Fortschritt dieser Arbeit begleitet hat. Sehr herzlich möchte ich mich auch für die Korrektur und Hilfe bei der Formatierung bedanken.