

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

# CEACAM16, ein neues Strukturprotein der Tektorialmembran

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Constanze Schäuble  
aus Tübingen

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Martin Canis
	Priv. Doz. Dr. Sandra Bense
	Prof. Dr. Stefan Endres
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	20.10.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Die CEACAM-Familie . . . . .	6
1.1.1	Aufbau, Organisation und Funktionen der CEACAM-Proteine . . . . .	6
1.1.2	Die Gruppe der hochkonservierten CEACAM-Familienmitglieder . . . . .	10
1.2	Anatomie und Funktion des Gehör- und Gleichgewichtorgans . . . . .	11
1.2.1	Aufbau des Ohrs und Schallweiterleitung im Mittelohr . . . . .	11
1.2.2	Das Innenohr und seine Funktionen . . . . .	12
1.3	Genmutationen als Ursache von Hörverlust . . . . .	15
1.3.1	Epidemiologie und Einteilung des sensorineuralen Hörverlustes . . . . .	15
1.3.2	Der nicht-syndromale Hörverlust . . . . .	16
1.3.3	Die Maus als Modellorganismus zur Untersuchung monogener Hördefekte . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Dissertation</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1	Geräte und Material . . . . .	21
3.1.1	Geräte . . . . .	21
3.1.2	Materialien . . . . .	22
3.1.3	Primer . . . . .	25
3.2	Methoden . . . . .	26
3.2.1	Nachweis der <i>Ceacam16</i> <sup>-/-</sup> - und <i>Ceacam16</i> <sup>+/+</sup> -Allele in der Maus . . . . .	26
3.2.1.1	DNA-Extraktion aus Mäuseschwänzen . . . . .	26
3.2.1.2	<i>Touch-Down</i> -PCR zum Nachweis des <i>Ceacam16</i> <sup>-/-</sup> -Allels . . . . .	26
3.2.1.3	<i>Ceacam16</i> -allelspezifische PCR . . . . .	27
3.2.2	Entnahme von Organen aus <i>Ceacam16</i> <sup>-/-</sup> - und <i>Ceacam16</i> <sup>+/+</sup> -Mäusen . . . . .	28
3.2.3	Immunhistologie . . . . .	29

## Inhaltsverzeichnis

3.2.4	RNA-Analyse mittels Endpunkt-PCR und quantitativer PCR . . . . .	30
3.2.4.1	RNA- und Protein-Extraktion . . . . .	30
3.2.4.2	Reverse Transkription . . . . .	31
3.2.4.3	Quantitative PCR . . . . .	32
3.2.4.4	Endpunkt-PCR . . . . .	33
3.2.5	Western-Blot-Analyse . . . . .	34
3.2.5.1	Vorbereitung der Proben . . . . .	34
3.2.5.2	SDS-PAGE und Blotting . . . . .	34
3.2.5.3	Detektion durch Antikörper . . . . .	36
3.2.6	Sequenzierung des humanen <i>CEACAM16</i> -Gens . . . . .	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.1	Selektion der Mäuse mit einem veränderten <i>Ceacam16</i> -Allel . . . . .	39
4.2	Etablierung homozygoter <i>Ceacam16</i> <sup>+/+</sup> - und <i>Ceacam16</i> <sup>-/-</sup> -Linien . . . . .	40
4.3	Expressionsorte von <i>Ceacam16</i> in der Maus . . . . .	41
4.3.1	Identifizierung von Expressionsorten des murinen <i>Ceacam16</i> im Innenohr und Gehirn . . . . .	41
4.3.2	CEACAM16 ist Bestandteil der Tektorialmembran und der Makula-assoziierten Matrix des Gleichgewichtorgans . . . . .	42
4.3.3	CEACAM16-Protein ist in Kleinhirn und Hypophyse nicht detektierbar	44
4.4	Hinweise auf die Funktion von CEACAM16 durch die veränderte Morphologie der Tektorialmembran bei <i>Ceacam16</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen . . . . .	45
4.5	<i>Ceacam16</i> -Expression während der Entwicklung der Maus . . . . .	48
4.6	<i>Tecta</i> -Expression in <i>Ceacam16</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen . . . . .	51
4.7	Mutationssuche im humanen <i>CEACAM16</i> -Gen einer DFNA4-Familie . . . . .	52
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
5.1	CEACAM16 ist Bestandteil der Tektorialmembran . . . . .	55
5.2	Mutationen in <i>CEACAM16</i> können NSHL verursachen . . . . .	57
5.3	Ausblick . . . . .	59
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>72</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Die CEACAM-Familie

### 1.1.1 Aufbau, Organisation und Funktionen der CEACAM-Proteine

Die karzinoembryonale Antigen-Familie (CEACAM-Familie, engl.: carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules) ist eine Untergruppe der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie. Sie besteht aus verschiedenartigen Glykoproteinen, die entweder als zellgebundene Oberflächenproteine oder sezerniert vorliegen. Es werden zwei weitere Gruppen unterschieden, zum einen die CEACAM-Proteine selber, zum anderen die schwangerschaftsspezifischen Glykoproteine (PSG, engl. pregnancy-specific glycoprotein), die eine Untergruppe in der CEACAM-Familie darstellen. Sie werden nur in Zellen der Plazenta gebildet und regulieren die Interaktionen zwischen Mutter und Fetus während der Schwangerschaft in der Plazenta, wie zum Beispiel immunologische Vorgänge und Angiogenese (Ha et al., 2005; Ha et al., 2010; Moore und Dveksler, 2014).

Der humane *CEACAM*-Gen-Locus liegt auf dem langen Arm von Chromosom 19 zwischen den Genen *ERICH4* und *BCL3*. Er ist in drei Bereiche von zusammengekommen 1,1 Mb aufgeteilt. Insgesamt erstreckt er sich über eine Länge von 3,1 Mb. Die *CEACAM*-Gene liegen in Clustern vor, wobei sich die *PSGs* unterhalb der Gruppe der *CEACAMs* in Richtung des Telomers befinden (Olsen et al., 1994, Thompson et al., 1992). Das *Ceacam*-Gen-Cluster der Maus dagegen liegt auf Chromosom 7 und umspannt 8,9 Mb von *Ceacam15* bis *Ceacam2* (siehe *Ensembl database*). Es existieren 23 humane respektive 31 murine CEACAM-Mitglieder (Zebhauser et al. 2005). Gemeinsam haben Maus und Mensch die fünf orthologen Mitglieder CEACAM1, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20 (Kammerer und Zimmermann, 2010).

Der Aufbau der CEACAMs unterscheidet sich, bis auf die oben genannten orthologen Mitglieder, zwischen den Spezies stark, wobei die große Heterogenität vor allem durch Mitglieder hervorgerufen wird, die mit dem jeweiligen CEACAM1 ihrer Spezies nah verwandt

## 1 Einleitung

sind (Abbildung 1.1). So sind in der Maus die CEACAM-Proteine entweder nur aus variablen IgV-ähnlichen (IgV) Domänen oder aus 1-8 IgV-ähnlichen und 0-4 konstanten IgC-ähnlichen (IgC) Domänen aufgebaut (PSG: 3-8 IgV-ähnliche Domänen, 1 IgC-ähnliche Domäne; nicht gezeigt). Im Menschen dagegen bestehen sie, mit Ausnahme von CEACAM16, nur aus einer IgV-ähnlichen und 0-6 IgC-ähnlichen Domänen (Zebhauser et al., 2005).

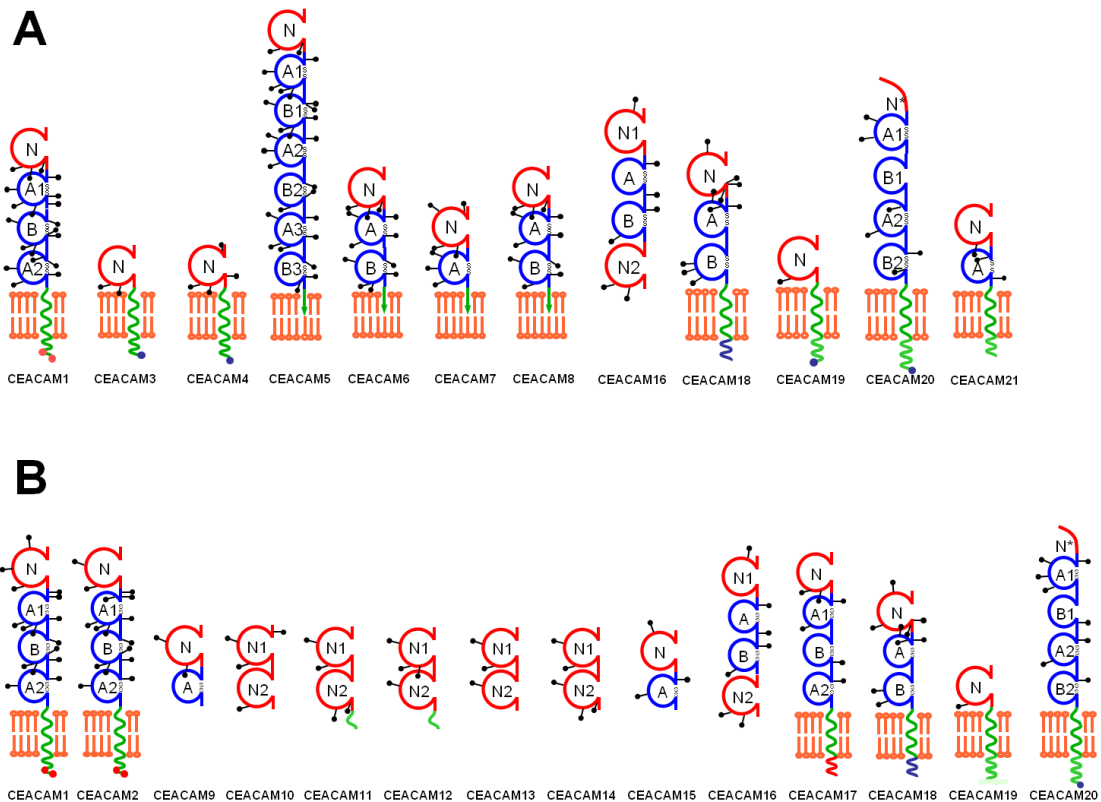


Abbildung 1.1: Domänenaufbau der humanen (A) und murinen CEACAM-Familienmitglieder (B).

IgV-ähnliche Domänen sind in rot (N), IgC-ähnliche Domänen in blau (A, B) dargestellt. Während in der humanen CEACAM-Familie einer IgV-ähnliche Domäne in der Regel eine variable Anzahl IgC-ähnliche Domänen folgen (Ausnahme CEACAM16), gibt es in der murinen CEACAM-Familie mehrere Mitglieder mit zwei IgV-Domänen. Die IgC-ähnlichen Domänen enthalten Cysteinreste, die Disulfidbrücken ausbilden (S-S). Striche mit Punkten an den Domänen zeigen Stellen für eine potentielle N-Glykosylierung an. Grüne Pfeile zeigen einen GPI-Anker an, kurvig grüne Linien eine Transmembrandomäne. Hier entsprechen blaue Punkte *tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) oder ITAM-ähnlichen Domänen und rote Punkte *tyrosine-based inhibition motifs* (ITIMs). CEACAM16 ist das einzige Mitglied, der humanen CEACAM-Familie, welches sezerniert wird und zwei IgV-ähnliche Domänen aufweist (A). Eine liegt am NH<sub>2</sub>-terminalen, die andere am COOH-terminalen Ende. Auch das murine CEACAM16 weist diesen besonderen Aufbau auf (B). (Zimmermann, <http://www.carcinoembryonic-antigen.de>)

## 1 Einleitung

In der Regel folgt einem Signalpeptid, dem sogenannten *leader*, eine N-terminale IgV-ähnliche Domäne, der sich dann eine variable Anzahl von IgC-ähnlichen Domänen (A oder B) anschließt (Kammerer und Zimmermann, 2010). Das Signalpeptid ist im fertigen Protein abgespalten. C-terminal unterscheiden sich die Proteine in der Hinsicht, ob sie sezerniert werden, eine Transmembran-Domäne aufweisen oder über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) an der Zelloberfläche befestigt werden. Die letztgenannte Art der Verankerung konnte bisher nur in Primaten nachgewiesen werden. Weiterhin besitzen die membrangebundenen CEACAMs eine C-terminale Domäne, welche Motive enthält, die zur Signaltransduktion beitragen können (Hammarström, 1999).

Die bekannteste Funktion der extrazellulären Domänen der CEACAM-Proteine ist die homo- und heterotypische Adhäsion (Obrink, 1997). 1989 zeigten Benchimol et al., dass CEACAM5 zur homologen Zell-Zell-Adhäsion von humanen Adenokarzinomzellen beiträgt und eine Sortierung von Zellen in CEACAM5-positive und CEACAM5-negative Zellansammlungen vermittelt. Die Eigenschaft der homo- und heterotypischen Zell-Zell-Adhäsion wird hauptsächlich durch die N-terminale IgV-ähnliche Domäne hervorgerufen, welche fast alle CEACAM-Proteine gemeinsam haben (Taheri et al., 2000). Diese Fähigkeit zu Zell-Zell-Interaktionen gibt Aufschluss darüber, dass die CEACAM-Proteine wichtige Rollen bei der embryonalen Entwicklung und bei der Integration von Einzelzellen in ein Gewebe spielen (Kuespert et al., 2006). Weiterhin dienen einige CEACAM-Mitglieder als Rezeptoren für bakterielle und virale Pathogene, wie zum Beispiel für *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* sowie das Maushepatitisvirus (Chen et al., 1997; Dveksler et al., 1991; Tchoupa et al., 2014; Virji et al., 1996; Virji et al., 2000). Der Versuch der Erkennung durch die Pathogene zu entkommen, ist wahrscheinlich für die Variabilität und niedrige Konservierung zwischen den CEACAMs der unterschiedlichen Spezies verantwortlich (Kammerer und Zimmermann, 2010).

Als erstes CEACAM wurde CEACAM5, auch bekannt unter CEA, 1965 von Gold und Freedman in Kolontumoren und einigen fetalen Geweben gefunden. Es tritt früh in der Embryonalzeit auf (9.-14. Woche) und wird auch im Erwachsenenalter in Kolon, Magen, Zunge, Ösophagus, Zervix, Schweißdrüsen und Prostata weiter exprimiert. Haupt-Expressionsort ist das apikale Drittel der Krypten im Kolon im Bereich der Zylinderepithelzellen (Hammarström, 1999). Bei vielen malignen Prozessen konnte eine Überexpression von CEACAM5 gefunden werden (Hammarström, 1999). Signifikant erhöht war es vor allem bei kolorektalen Tumoren und Magen-Tumoren, weshalb es hier eine wichtige klinische Rolle als Tumormarker in der Prognose und im Monitoring spielt. Ebenfalls gibt ein erhöhter CEACAM5-Serumwert Aufschluss über die Prognose bei Lungen- und Brustkrebs (Ballesta et al., 1995).



## 1 Einleitung

Ein anderes CEACAM, welches als Tumormarker genutzt werden kann, ist CEACAM6. Es ist weiter verbreitet als CEACAM5, so zum Beispiel in vielen epithelialen Geweben, Granulozyten und Monozyten. Sowohl CEACAM5 als auch CEACAM6 werden über einen GPI-Anker an der Zelloberfläche befestigt. Die Überexprimierung von CEACAM6 in hyperplastischen Polypen und frühen Adenomen im Dickdarmgewebe scheint eine der frühesten molekularen Veränderungen in diesen Läsionen zu sein (Scholzel et al., 2000). Laut Beauchemin und Arabzadeh (2013) könnte CEACAM6 einer der spezifischsten Tumormarker der CEACAM-Familie für aggressive Krebsarten werden.

Das am weitesten exprimierte CEACAM ist CEACAM1. Es wurde in Epithel-, Endothel- und einigen Immunzellen gefunden (Prall et al., 1996). Alternatives Splicen führt zu verschiedenen Isoformen, einige davon enthalten in ihrer zytoplasmatischen Domäne speziesabhängig *tyrosine-based inhibition motifs* (ITIM) und/oder *immunoreceptor tyrosine-based switch motifs* (ITSMs), durch welche, nach der Phosphorylierung zweier Tyrosinreste, Signale in die Zelle weitergeleitet werden (Merkt et al., 2015). Inzwischen sind neben der Zelladhäsion viele andere Funktionen von CEACAM1 bekannt. So spielt es eine wichtige Rolle z.B. bei der Immunantwort, der Neovaskularisation, beim Gewebeaufbau sowie im Glucose- und Fettstoffwechsel (Gray-Owen und Blumberg, 2006; Horst et al., 2006; Kammerer et al., 2001; Lee et al., 2008; Li et al., 2009).

Zusätzlich zu den oben vorgestellten CEACAMs erkennen Pathogene aufgrund seiner hohen Sequenzähnlichkeit mit CEACAM1 auch CEACAM3. Dieses wird nur auf humanen Granulozyten exprimiert und geht keine homo- und heterotypischen Verbindungen mit anderen CEACAM-Familienmitgliedern ein (Nagel et al., 1993). An CEACAM3 gebundene Bakterien werden anschließend der Phagozytose zugeführt (Hauck et al., 1998). CEACAM3 hat sich damit vermutlich ausschließlich zur Abwehr von humanspezifischen bakteriellen Pathogenen entwickelt (Kuespert et al., 2006).

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde durch eine große Anzahl von *in vitro* und *in vivo* Studien die Funktionen der CEACAM-Proteine erforscht. So scheinen die mit einem GPI-Anker versehenden humanen CEACAMs vor allem an dem Aufbau der Gewebearchitektur beteiligt zu sein, während CEACAM1 in vielen verschiedenen Zelltypen eine regulierende Funktion einnimmt sowie als Tumorsuppressor fungiert (Kuespert et al., 2006). In den letzten Jahren wurden viele neue CEACAM-Mitglieder entdeckt. Ein Teil davon gehört zu den hochkonservierten CEACAMs, die im anschließenden Kapitel näher erläutert werden.

### 1.1.2 Die Gruppe der hochkonservierten CEACAM-Familienmitglieder

2005 identifizierten Zebhauser et al. einige neue Mitglieder der CEACAM-Familie. Darunter waren die etwas weiter entfernt verwandten CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20. Diese Gruppe zeichnet sich durch eine hohe Konservierung zwischen verschiedenen Säugerspezies aus. Orthologe Gene konnten beim Menschen, bei Nagern und sogar in Beuteltieren sowie zum Teil in eierlegenden Säugetieren nachgewiesen werden (Zebhauser et al., 2005, Kammerer und Zimmermann 2010).

Durch die Analyse der Nukleotidsequenz der für die N-Domäne kodierenden Exons konnte gezeigt werden, dass CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20 mit den jeweiligen Orthologen der verschiedenen Spezies nah verwandt sind, während die Sequenz der N-Domäne der anderen CEACAMs eher eine Ähnlichkeit mit dem jeweiligen CEACAM1 ihrer Spezies aufweisen. Dies könnte bedeuten, dass diese Mitglieder von dem jeweiligen CEACAM1-Gen abstammen und unabhängig voneinander durch Gen-Duplikation entstanden sind. Weiterhin weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die hochkonservierten Mitglieder der CEACAM-Familie CEACAM1, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19, CEACAM20 der ursprünglichen CEACAM-Familie entsprechen (Kammerer und Zimmermann, 2010). Der Urahn dieser CEACAM-Familie scheint dabei ein CEACAM1-ähnliches Protein zu sein, da ITIM-tragende, CEACAM1-verwandte Proteine in Amphibien und Fischen gefunden wurden (Chang et al., 2013).

Der Grad der Konservierung der Nukleotidsequenz der N-Domäne variiert stark zwischen den hochkonservierten CEACAMs. CEACAM16 hat die am höchsten konservierten N-Domänen, CEACAM1 die am niedrigsten (Kammerer und Zimmermann, 2010). CEACAM16 zeichnet sich auch dadurch aus, dass es das einzige sezernierte Mitglied mit zwei IgV-ähnlichen N-Domänen ist. Eine liegt am NH<sub>2</sub>-terminalen, die andere am COOH-terminalen Ende. Dazwischen befinden sich zwei IgC-ähnliche Domänen (A und B). Da die N-Domäne für die homo- und heterotypischen Bindungen zuständig ist, lässt diese Anordnung der Domänen auf eine Bindung mit zwei Bindungspartnern schließen (Zebhauser et al., 2005). Weiterhin weist CEACAM16 ein sehr restriktives Expressionsmuster auf. So konnten nur geringe Mengen im Kleinhirn (Zebhauser et al., 2005) sowie im Innenohr nachgewiesen werden (Krupar, 2012).

## 1.2 Anatomie und Funktion des Gehör- und Gleichgewichtorgans

### 1.2.1 Aufbau des Ohrs und Schallweiterleitung im Mittelohr

Das Ohr enthält zwei Sinnesorgane, die zusammen einen Komplex, das Innenohr, bilden. Es setzt sich aus der Hörschnecke (*Cochlea*), die dem Gehörorgan entspricht, sowie dem *Sacculus*, dem *Utriculus* und den Bogengängen, die das Gleichgewichtsorgan bilden, zusammen. Das Ohr wird in drei Abschnitte, das äußere Ohr, das Mittelohr und das Innenohr aufgeteilt.

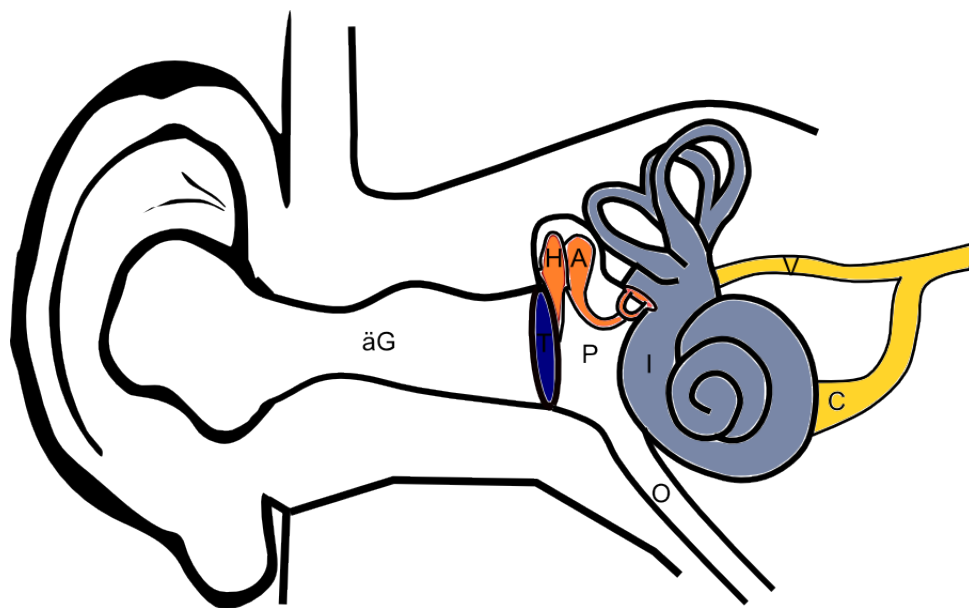


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Mittel- und Innenohrs.

Das Ohr besteht aus drei Abschnitten: dem äußeren Ohr, dem Mittelohr und dem Innenohr (I). Zum äußeren Ohr gehören die Ohrmuschel und der äußere Gehörgang (äG). Es wird durch das Trommelfell (T, blau) vom Mittelohr getrennt. Das Mittelohr besteht aus der Paukenhöhle (P), welche die Gehörknöchelchen enthält und in die Ohrtrompete (O), die *Tuba auditiva*, übergeht. Die drei Gehörknöchelchen setzen sich aus dem Hammer (H), dem Amboss (A) und dem Steigbügel zusammen (orange). Sie bilden zusammen mit dem Trommelfell den Schalleitungsapparat. Schallwellen, die von der Ohrmuschel aufgefangen werden, bringen das Trommelfell zum vibrieren. Diese Vibration durch das Trommelfell wird durch die Kette der Gehörknöchelchen zum Innenohr weitergeleitet. Dabei überträgt der Steigbügelfuß die Schwingungen auf die Flüssigkeit des Innenohrs. Die Reizverarbeitung erfolgt in der Hörschnecke des Innenohrs und wird durch den *Nervus cochlearis* (C) zum Gehirn weitergeleitet. Die Reize, die in den Bogengängen, dem *Sacculus* und *Utriculus* verarbeitet werden, werden über den *Nervus vestibularis* (V) weitergeleitet. A, Amboss; äG, äußerer Gehörgang; C, *Nervus cochlearis*; H, Hammer; I, Innenohr; O, Ohrtrompete; P, Paukenhöhle; T, Trommelfell; V, *Nervus vestibularis*.

## 1 Einleitung

Das äußere Ohr setzt sich aus Ohrmuschel und dem äußeren Gehörgang zusammen und endet am Trommelfell. Dieses ist die laterale Begrenzung der Paukenhöhle, die das Mittelohr bildet. Die Paukenhöhle ist ein schmaler luftgefüllter Raum, der die Gehörknöchelchen enthält und nach ventral über die Ohrtrompete mit dem Rachenraum verbunden ist. Die Ohrtrompete ist in der Regel verschlossen und öffnet sich nur beim Schluckakt. Darüber wird ein Druckausgleich im Mittelohr ermöglicht. Die mediale Wand trennt die Paukenhöhle vom Innenohr (Abbildung 1.2).

Die drei Gehörknöchelchen setzen sich aus Hammer, Amboss und Steigbügel zusammen. Sie bilden zusammen mit dem Trommelfell den Schalleitungsapparat. Der Hammergriff ist am Trommelfell befestigt, während der Hammerkopf über eine Gelenkfläche mit dem Amboss verbunden ist. Der Ambossschenkel wiederum ist über eine Gelenkfläche mit dem Steigbügel verbunden. Der Fuß des Steigbügels bedeckt das ovale Fenster der *Cochlea*. So werden von der Ohrmuschel aufgefangene Schallwellen, die das Trommelfell zum Schwingen bringen, über die Gehörknöchelchenkette auf das ovale Fenster der *Cochlea* übertragen (Abbildung 1.2). Durch die Hebelwirkung der Gehörknöchelchen und den Flächenunterschied Trommelfell - ovales Fenster wird eine Druckverstärkung erreicht, die eine verlustarme Übertragung des Schalls von dem Medium Luft, mit niedrigem Wellenwiderstand, auf das Medium Flüssigkeit, mit hohem Wellenwiderstand, ermöglicht (Impedanzanpassung).

### 1.2.2 Das Innenohr und seine Funktionen

Das Innenohr besteht aus einem knöchernen und einem häutigen Labyrinth. Das knöcherne Labyrinth ist mit Perilymphe gefüllt, in dieser schwimmt das häutige Labyrinth. Dieses enthält ebenfalls Flüssigkeit, die sogenannte Endolymphe.

Das ovale Fenster, welches vom Steigbügel verschlossen wird, führt in den Vorhof, der den Mittelteil des knöchernen Labyrinths bildet. Nach vorne erfolgt der Übergang in die knöcherne *Cochlea*, nach hinten gehen die knöchernen Bogengänge ab, die einen Teil des Gleichgewichtsorgans bilden (Abbildung 1.2). Sie registrieren Dreh-Beschleunigungen des Kopfes um alle Raumachsen. Im Vorhof selbst befinden sich der *Sacculus* und der *Utriculus*, die ebenfalls dem häutigen Labyrinth angehören und den zweiten Teil des Gleichgewichtsorgans ausmachen. Sie enthalten jeweils ein Sinnesepithel, die *Macula sacculi* und die *Macula utriculi*. Ihre Aufgabe ist es, Translationsbeschleunigungen und Abweichungen des Kopfes von der Senkrechten zu registrieren.

Die *Cochlea* windet sich 2,5-mal um eine knöcherne Achse, den *Modiolus*. In ihm verlaufen die Nervenbündel des *Nervus cochlearis*. Weiterhin entspringt aus ihm eine Knochenleiste, die *Lamina spiralis ossea*, die in den Schneckengang hineinragt und mit dem *Limbus spiralis*

## 1 Einleitung

endet. Sie ist hohl und enthält die Nervenfasern, welche zum Corti-Organ ziehen (Abbildung 1.3). Der Schneckengang enthält ebenfalls einen Teil des häutigen Labyrinths, den *Ductus cochlearis*. Dieser beginnt blind und endet in der Schneckenspitze ebenfalls blind. Lediglich ein kleiner häutiger Gang verbindet den *Sacculus* mit dem *Ductus cochlearis*. Oberhalb und unterhalb des *Ductus cochlearis* befindet sich jeweils ein Perilymphraum. Der oberhalb gelegene Raum, die *Scala vestibuli*, beginnt im Vorhof und geht bis zur Schneckenspitze, dem Helicotrema. Hier geht sie in den unterhalb gelegenen Raum, die *Scala tympani*, über. Diese läuft die Spirale abwärts und endet am runden Fenster, welches durch die *Membrana tympani secundaria* verschlossen ist.

Im *Ductus cochlearis* sitzt das Corti-Organ, welches den rezeptorischen Apparat des Gehörorgans darstellt. Es sitzt der Basilarmembran, der unteren Wand des *Ductus cochlearis*, auf. Die Basilarmembran geht seitlich in das Epithel der *Stria vascularis* über. Diese erzeugt gegenüber der Perilymphe das endocochleare Potential von etwa +80 mV bis +110 mV durch aktiven Ionentransport. Die obere Wand wird von einer doppelten Epithelschicht, der Reissner-Membran, gebildet. Abbildung 1.3 zeigt in der Vergrößerung einen Querschnitt durch das Corti-Organ. Es setzt sich aus verschiedenen Sinneszellen und Stützzellen zusammen und geht von der basalen bis zur obersten Windung der Schnecke. Medial liegt der *Limbus spiralis*, der mit den Interdentalzellen bedeckt ist. An diesem angelagert ist die Tektorialmembran, die über den *Sulcus spiralis internus* bis zu den äußeren Haarzellen zieht. Sie ist eine azelluläre Membran, die aus verschiedenen Kollagenen und Glykoproteinen besteht. Auf der Basilarmembran stehen die Deiters-Zellen. Sie stellen die Stützzellen der Sinneszellen dar, die in Stützkörbchen auf den Deiters-Zellen stehen. Die Sinneszellen bestehen aus den inneren und den äußeren Haarzellen. Die inneren Haarzellen bilden eine Reihe, während die äußeren Haarzellen in drei Reihen angeordnet sind. Zwischen den äußeren Haarzellen ragen Fortsätze der Deiters-Zellen herauf, die eine oberflächliche Membran, die *Lamina reticularis*, bilden, welche durch die Haarzellen unterbrochen wird. Auf ihrer oberen Fläche haben die Haarzellen Stereozilien, die bei den inneren Haarzellen in die Endolymphe ragen bzw. bei den äußeren Haarzellen fest mit der Tektorialmembran verbunden sind.

Wenn der Steigbügel eine Schwingung auf das ovale Fenster überträgt, wird die Perilymphe in der *Cochlea* in Bewegung gesetzt und dadurch auch der Endolymphschlauch. Die Reissner- und die Basilarmembran schwingen wellenförmig einmal gegen die *Scala vestibuli* und einmal gegen die *Scala tympani*. Dabei nimmt die Amplitude bis zu einem Maximum zu, anschließend verebbt sie schnell. Der Ort der maximalen Auslenkung ist für die jeweilige Frequenz des gehörten Tones charakteristisch und führt zur Erregung der Haarzellen (Frequenz-Ort-Abbildung). Dabei werden hohe Tonfrequenzen in den basalen und tiefe Frequenzen in den

## 1 Einleitung

apikalen Windungen abgebildet.

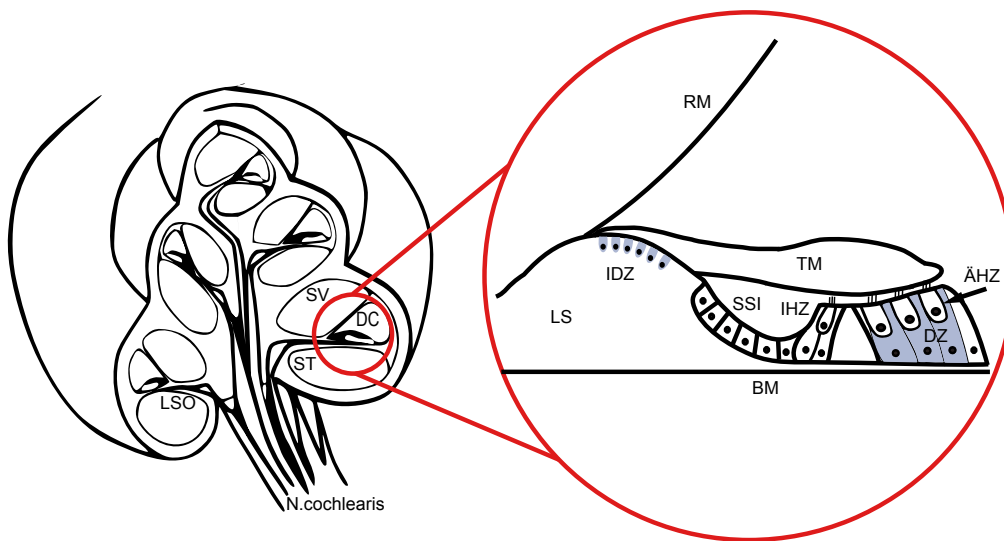


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der *Cochlea* und des Corti-Organs.

Die Hörschnecke (*Cochlea*) ist aufgeschnitten und zeigt mehrere Windungen im Querschnitt. Man sieht die Aufteilung in die zwei Perilymphräume, die *Scala vestibuli* (SV) und die *Scala tympani* (ST). Dazwischen liegt der Endolymphschlauch, der *Ductus cochlearis* (DC). In der Mitte steht die knöcherne Achse, der *Modiolus*, in welchem der *Nervus (N.) cochlearis* verläuft und aus dem mehrere schmale Knochenleisten, die *Lamina spiralis ossea* (LSO) entspringen. Diese führen Fasern des *N. cochlearis* zum Corti-Organ, welches an der Spitze der LSO auf der Basalmembran (BM) sitzt. Rechts ist das Corti-Organ vergrößert dargestellt. Hier stellt sich linksseitig das verdickte Ende der LSO, der sogenannte *Limbus spiralis* (LS), dar. In ihm sitzen die Interdentalzellen (IDZ). Ihm aufgelagert ist die Tektorialmembran (TM), die über den *Sulcus spiralis internus* (SSI) zu den äußeren Haarzellen (ÄHZ) zieht. ÄHZ sitzen auf Stützzellen, den Deiters-Zellen (DZ, blau) und ragen mit ihren Stereozilien in die TM. Die DZ ragen bis nach oben und bilden an der Oberfläche eine Membran, die *Lamina reticularis*, welche durch die Stereozilien der ÄHZ durchbrochen wird. Medial der ÄHZ, welche in drei Reihen angeordnet sind, liegen die inneren Haarzellen (IHZ) in einer Reihe. Sie sitzen ebenfalls auf Stützzellen, ragen mit ihren Stereozilien aber nicht in die TM. ÄHZ, äußere Haarzellen; BM, Basilarmembran; DC, *Ductus cochlearis*; DZ, Deiters-Zellen; IDZ, Interdentalzellen; IHZ, innere Haarzellen; LS, *Limbus spiralis*; LSO, *Lamina spiralis ossea*; N, *Nervus*; RM, Reissner-Membran; SSI, *Sulcus spiralis internus*; ST, *Scala tympani*; SV, *Scala vestibuli*; TM, Tektorialmembran.

Durch die Schwingungen des Endolymphschlauches wird die Tektorialmembran um etwa 0,3 nm gegen die Basilarmembran verschoben, wodurch die Stereozilien der äußeren Haarzellen abgeknickt werden. Hierbei öffnen sich mechanosensitive Kationenkanäle in den Stereozilien. Da das Zellpotential in den äußeren Haarzellen -70 mV beträgt, entsteht eine Potentialdifferenz zur Endolymphe von 150-180 mV. Daher strömen beim Öffnen der Kationenkanäle v.a. Kalium-Ionen in die äußeren Haarzellen ein und führen zu einer Depolarisation der Zelle. Dies wird als mechanoelektrische Transduktion bezeichnet und führt zu einer Verkürzung der äußeren Haarzelle. Die Repolarisation erfolgt durch Öffnung spannungsabhängiger Kalium-Kanäle

## 1 Einleitung

(KCNQ4) auf der Perilymphseite der Haarzelle. Die wieder abgegebenen Kalium-Ionen werden über die Stützzellen zur *Stria vascularis* zurück transportiert. Das anschließende Knicken der Stereozilien in die Gegenrichtung führt zum Schließen der mechanosensitiven Kationenkanäle und damit zur Hyperpolarisation und Streckung der äußeren Haarzellen. Diese Bewegung der äußeren Haarzellen verstärkt die Schwingung der Basilarmembran und bewirkt am Ort der maximalen Auslenkung eine Bewegung der Endolymphe im Subtektorialraum, durch welche auch die Stereozilien der inneren Haarzellen abknicken. Dies führt zur Depolarisation der inneren Haarzellen. Es erfolgt eine zytosolische Calcium-Ionen-Erhöhung und dadurch eine Ausschüttung des Transmitters Glutamat, der die Reizweiterleitung zum Gehirn auslöst. Die Bewegung der äußeren Haarzellen bewirkt eine Reizverstärkung um das 100-fache, was etwa 40 dB entspricht. Sie werden deshalb auch als cochleaerer Verstärker bezeichnet.

## 1.3 Genmutationen als Ursache von Hörverlust

### 1.3.1 Epidemiologie und Einteilung des sensorineuralen Hörverlustes

Mit über 360 Millionen Betroffenen weltweit ist der sensorineurale Hörverlust (SNHL, engl.: sensorineural hearing loss) die häufigste sensorische Störung des Menschen (WHO Media centre, 2015). Mit dem Begriff „sensorineural“ werden zwei unterschiedliche Probleme zusammengefasst: Zum einen der Verlust des sensorischen Hörsinns im Innenohr, zum anderen der Verlust des neuralen Hörsinns am Hörnerven. In den meisten Fällen ist das Innenohr betroffen. Dennoch werden die Fälle zusammengefasst, da Innenohr und Hörnerv eng miteinander verbunden sind.

Die WHO definiert einen behindernden Hörverlust beim Erwachsenen als einen Verlust von mindestens 40 dB am besser hörenden Ohr und bei Kindern mindestens 30 dB. Die Inzidenz des SNHL in der Bevölkerung beträgt 1:1000 Neugeborene, dabei liegt in wahrscheinlich 50-70% der Fälle ein einzelner Gendefekt zu Grunde (Smith et al., 2005). Bei den über 65-jährigen leiden etwa 10% unter einem SNHL, der die sprachliche Kommunikation einschränkt (Willems, 2000). Hier herrschen multifaktorielle Ursachen vor, d.h. der Hörverlust wird sowohl durch genetische als auch durch umweltbedingte Risikofaktoren verursacht.

Es wird angenommen, dass etwa 60% aller Schwerhörigkeiten erblich bedingt sind (Morton, 1991). Diese hereditären Schwerhörigkeiten können monogen, d.h. durch einen einzelnen Gendefekt, verursacht werden oder polygenetischen Ursprungs sein. Bei den erblichen Schwerhörigkeiten wird zwischen nicht-syndromalen und syndromalen Formen unterschieden,

## 1 Einleitung

wobei die nicht-syndromalen Schwerhörigkeiten etwa 70% der Fälle ausmachen (Matsunaga, 2009). Während die syndromalen Schwerhörigkeiten mit weiteren klinischen Symptomen einhergehen und ein Syndrom ausbilden, ist bei den nicht-syndromalen Schwerhörigkeiten die Hörbehinderung die einzige Auffälligkeit.

Weitere Einteilungen erblicher Schwerhörigkeiten können nach den klinischen Kriterien erfolgen, die von der *European Work Group on Genetics of Hearing Impairment* definiert wurden. Diese sind insbesondere: Schweregrad der Hörminderung, kongenitaler oder postlingualer Beginn, sensorineuraler oder kombinierter Typ, betroffener Frequenzbereich, unilaterale oder bilaterale Lokalisation sowie der progressive oder stabile Verlauf.

### 1.3.2 Der nicht-syndromale Hörverlust

Der nicht-syndromale Hörverlust (NSHL, engl.: non-syndromic hearing loss) wird nach dem Vererbungsmodus noch weiter aufgeteilt in autosomal-rezessive Schwerhörigkeiten mit einem Anteil von etwa 75%, autosomal-dominante Schwerhörigkeiten mit einem Anteil von 20% sowie in X-chromosomale (2-5%) und mitochondriale Schwerhörigkeiten (1%) (Smith et al., 2005). Zum heutigen Zeitpunkt sind etwa 141 Loci bekannt, die mit einem NSHL assoziiert werden (Vona et al., 2015). Um eine Kategorisierung zu ermöglichen, wurden die Gen-Loci in der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert und gemäß ihrer Vererbung mit Großbuchstaben benannt. DFNA entspricht somit einem autosomal-dominanten Gen-Locus, DFNB einem autosomal-rezessiven sowie DFNX einem X-chromosomalen Gen-Locus. Inzwischen wurde sogar ein Y-chromosomaler Gen-Locus entdeckt, abgekürzt DFNY1 (Van Camp und Smith, 2015). Auf einem Gen-Locus können mehrere Gene liegen, die einen NSHL verursachen und ein und dasselbe Gen kann je nach Mutation einer autosomal-dominanten oder einer autosomal-rezessiven Vererbung folgen (Vona et al., 2015). Es sind inzwischen viele der Gene mit ihren Mutationen bekannt. Sie kodieren für Transkriptionsfaktoren, Motormoleküle des Innenohrs, *Gap-Junction*-Proteine sowie Komponenten der extrazellulären Matrix, des Zytoskeletts und der Ionenkanäle (Bitner-Glindzicz, 2002).

Autosomal-dominante Schwerhörigkeiten beginnen meist erst in der zweiten bis dritten Lebensdekade, d.h. postlingual, und nehmen im weiteren Verlauf zu (Petersen, 2002). Der autosomal-rezessive NSHL tritt meist schon prälingual, d.h. kongenital oder vor dem Spracherwerb in der frühen Kindheit, auf und führt zu einer mittel- bis hochgradigen Schwerhörigkeit (Bitner-Glindzicz, 2002). Er wird unter anderem durch das Gen *GJB2* verursacht, eines der bekanntesten Schwerhörigkeits-Gene, welches in Europa für etwa 28-63% der NSHL verantwortlich ist (Mahdih und Rabbani, 2009). Es liegt auf dem DFNB1-Locus und kodiert für ein *Gap-Junction*-Protein, das Connexin 26, welches im Innenohr Ionenkanäle ausbildet. Es



## 1 Einleitung

wurden inzwischen über 90 rezessive und 9 dominante Mutationen beschrieben, deren Häufigkeiten in den verschiedenen Ethnien unterschiedlich verteilt sind (Ballana et al., 2015).

Eine weitere Proteinfamilie, in der Mutationen bei Familienmitgliedern zu Hörverlust führen, ist die Myosinsuperfamilie. Die Mutationen können sowohl zu syndromaler als auch zur nicht-syndromalen Schwerhörigkeit führen und autosomal-dominant oder -rezessiv vererbt werden. Es konnte bisher in sieben Myosin-Genen Mutationen nachgewiesen werden (Ahmed et al., 2003; Di Melchionda. et al., 2001; Lalwani et al., 2000; Liu et al., 1997A; Liu et al. 1997B; Van Donaudy et al., 2003; Van Donaudy. et al., 2004; Walsh et al., 2002; Wang et al., 1998). Dabei liegt zum Beispiel *MYO7A* sowohl auf dem autosomal-dominanten Locus DFNA11 als auch auf dem autosomal-rezessiven DFNB3 (Liu et al. 1997A; Liu et al., 1997B). Ein weiteres Myosin-Gen liegt auf dem DFNA4-Locus, das *MYH14*. Es kodiert für das Nicht-Muskel-Myosin 14, allerdings ist seine Funktion im Innenohr bisher nicht bekannt (Van Donaudy et al., 2004).

Auch die Tektorialmembran ist häufig von Mutationen betroffen. Sie besteht aus einer azellulären Matrix, welche aus den Kollagenen II, IX sowie XI (Thalmann et al., 1986) und weiteren Glykoproteinen besteht. Die Glykoproteinmatrix setzt sich aus den Proteinen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tektorin (Legan et al., 1997), Otogelin (Cohen-Salmon et al., 1997), Otogelin-like (Yariz et al., 2012) sowie Otolin (Deans et al., 2010) zusammen. Inzwischen wurden einige Mutationen in Tektorialmembranproteine-kodierenden Genen in verschiedenen Familien gefunden. So zeigten zum Beispiel McGuirt et al. 1999, dass eine Mutation im Kollagen-Gen *COL11A2* zu autosomal-dominantem Hörverlust führt; Chen et al. konnten 2005 das gleiche Gen einem autosomal-rezessiven Gen-Locus zuordnen. Die Kollagene sind in die Glykoproteinmatrix eingebettet, deren größter Anteil aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tektorin besteht. Inzwischen sind zahlreiche Mutationen in *TECTA* ( $\alpha$ -Tektorin) bekannt. Diese sind für etwa 4% aller Fälle von autosomal-dominantem NSHL verantwortlich und Mutationen im DFNA8/12 Locus sind damit wahrscheinlich einer der häufigsten Ursachen für autosomal-dominanten NSHL (Hildebrand et al., 2011).

Mitochondriale und X-chromosomale Vererbungen führen meist zu syndromalen Formen des Hörverlustes. Die mitochondrialen Mutationen werden immer von der Mutter auf alle Kinder übertragen, während die X-chromosomalen hauptsächlich an die männlichen Nachkommen vererbt werden (Burke et al., 2013).

Eine Auflistung aller Gen-Loci und der bisher bekannten Gene kann der *Hereditary Hearing Loss Homepage* entnommen werden.

### 1.3.3 Die Maus als Modellorganismus zur Untersuchung monogener Hördefekte

Die Erforschung der Auswirkung genetischer Mutationen anhand von Tiermodellen ist schon seit langem ein wichtiges Hilfsmittel, um Vorgänge im Organismus zu verstehen. Die Labormaus, *Mus musculus*, ist wegen ihrer hohen Fruchtbarkeit und schnellen Reproduktion ein geeigneter Modellorganismus unter den Säugetieren. Die erste gezielte Manipulation des Erbgutes bei einer Maus gelang 1981 Gordon und Ruddle, die den Begriff der transgenen Maus einführten (Gordon und Ruddle, 1981). Jetzt konnte untersucht werden, wie sich eine gezielte Mutation in einem Gen auf den Organismus auswirkt und dadurch Rückschlüsse auf die Funktion des Gens geschlossen werden (sogenannte reverse Genetik).

Die erste Methode zur Herstellung transgener Mäuse war die Mikroinjektion. Dabei werden einer Maus frisch befruchtete Eizellen entnommen, bevor die Vorkerne, die jeweils das väterliche und das mütterliche Erbgut enthalten, miteinander verschmolzen sind. Mit einer Mikronadel wird die veränderte DNA in einen der Vorkerne injiziert. In der anschließenden Verschmelzung wird das mütterliche und väterliche Erbgut kombiniert und dabei auch die fremde DNA mit eingebaut. Die befruchtete Eizelle wird anschließend als Embryo in ein Leihmuttertier eingeführt. Da die Erfolgsrate dieser Methode sehr gering ist, wurden weitere Methoden entwickelt, um transgene Tiere herzustellen.

Eine weitere Methode ist die embryonale Stammzelltechnik. Dabei werden aus frühen Embryonalstadien etablierte embryonale Stammzellen verwendet und in diese die fremde DNA eingeführt. Diese transgene Zelle wird in einen neuen Embryo eingebracht, der sich anschließend in einer Leihmutter weiter entwickelt.

Das Einführen eines Transgens kann unterschiedliche Ziele haben. Bei einem *Knock-out* wird ein spezifischer Gen-Locus durch zum Beispiel homologe Rekombination so verändert, dass das durch das Gen kodierte Protein nicht mehr exprimiert wird. Man erhält eine Nullmutation. Beim *Knock-in* wird ein Transgen gezielt an einem bestimmten chromosomalen Ort eingeführt. Es resultiert eine Über- oder Unterexpression eines Gens. Diese Technologie erlaubt unter anderem die Expressionsmaschinerie (z.B. den Promotor) eines Gens zu studieren. Im Unterschied zur Transgentechnologie erfolgt in beiden erwähnten Technologien die Insertion der Fremd-DNA gezielt und nicht zufällig.

Der Hörvorgang gehört zu einem der komplexesten Vorgänge im Körper und die genetischen Ursachen für NSHL sind vielfältig. Transgene Mäuse haben grundlegend geholfen, die Entwicklung, Funktionen und Mechanismen im Innenohr genauer zu verstehen (Friedman et al., 2007). Am Modellorganismus können durch die invasive Untersuchung der Expressionsort

## 1 Einleitung

der Gene festgestellt sowie die Proteininteraktionen und ihre biologische Funktion im Innenohr aufgezeigt werden. Wird ein Gen entdeckt, dessen Mutation möglicherweise einen SNHL im Menschen hervorruft, kann diese Hypothese durch die Entwicklung einer genetisch manipulierten Maus überprüft werden. Gleichzeitig kann herausgefunden werden, welche Rolle das Genprodukt spielt, indem man die genetisch manipulierte Maus mit einer Wildtyp-Maus vergleicht. Auf diese Weise ließen sich in den letzten Jahren viele Funktionen der einzelnen Komponenten des Hörorgans erklären.

So konnte zum Beispiel durch Mausmodelle der Mechanismus des Kalium-Ionen-Kreislaufs im Innenohr verstanden werden. Verschiedene Gene, die im Kalium-Ionen-Kreislauf eine Rolle spielen, führen zu NSHL im Menschen. Das Gen, welches am häufigsten betroffen ist, ist *GJB2*, welches für Connexin 26 codiert. Connexin 26 bildet zusammen mit Connexin 30 heteromere *Gap junctions* aus, d.h. sie bilden Kanäle, die zwei Zellen miteinander verbinden und durchlässig für Ionen und kleine Moleküle sind (Ahmad et al., 2003; Forge et al., 2003). Mausmodelle für Connexin 26 zeigten aber auch noch andere Funktionen dieses Proteins auf. So zeigten Wang et al. (2009), dass Connexin 26 nicht nur für den Erhalt des endocochleaeren Potentials zuständig ist, sondern auch eine Rolle bei der Differenzierung anderer Zellen im Corti-Organ spielt. Auch bei der Connexin 30-null-Maus funktionieren die Reparaturmechanismen im Innenohr nicht mehr, was zu einem Haarzellverlust führt (Forge et al., 2013). Ein weiteres Beispiel ist eine *Prestin-knock-out*-Maus, die ein genaueres Verständnis der Elektromotilität der äußeren Haarzellen ermöglichte (Lieberman et al., 2002; Dallos et al. 2008).

Ein Mausmodell, das zum besseren Verständnis der Funktion der Tektorialmembran führte, ist die *Tecta* <sup>$\Delta ENT/\Delta ENT$</sup> -Maus, in der *Tecta* ausgeschaltet wurde. Die Tektorialmembran in diesen Mäusen enthielt keine Glykoproteinmatrix und war komplett vom *Limbus spiralis* abgelöst. Bei der Untersuchung der *Tecta* <sup>$\Delta ENT/\Delta ENT$</sup> -Maus zeigte sich, dass die Mäuse weniger empfindlich auf eine Geräuschstimulation waren, was die Hypothese der Verstärkerfunktion der Tektorialmembran aufwarf und half das Zusammenspiel von Tektorial- und Basalmembran besser zu verstehen (Legan et al., 2000, Lukashkin et al., 2004).

Das Wissen, das aus der morphologischen und physiologischen Untersuchung von Mausmodellen gewonnen wird, führt somit dazu, den Hörvorgang besser zu verstehen und kann dabei helfen Therapiemöglichkeiten für den NSHL zu entwickeln.

## 2 Zielsetzung der Dissertation

CEACAM16 ist eines von vier hochkonservierten CEACAM-Familienmitgliedern. Es wird als einziges humanes CEACAM-Familienmitglied sezerniert und zeigt ein hochspezifisches Expressionsmuster. EST-Datenbanken haben gezeigt, dass *CEACAM16* vor allem im Innenohr sowie eventuell im Kleinhirn und in der Hypophyse exprimiert wird. Eine Funktion von CEACAM16 war bisher jedoch unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, den genauen Expressionsort von *CEACAM16* im Innenohr zu bestimmen und darüber Rückschlüsse auf dessen Funktion ziehen zu können. Die hauptsächliche Expression im Innenohr legte nahe, dass CEACAM16 eine Rolle beim Hörvorgang spielt. In der Hörphysiologie sind trotz vieler Entdeckungen in den letzten Jahrzehnten noch viele Vorgänge und Pathomechanismen ungeklärt. Auch gibt es noch einige Familien mit genetischen Hördefekten, bei denen das mutierte Gen unbekannt ist. Diese Arbeit soll einen Teil dazu beitragen, die Funktion des Innenohrs besser zu verstehen und in Zukunft Therapiemöglichkeiten für Patienten mit hereditärem NSHL zu finden.

Um dies zu erreichen, wurden mit Hilfe einer *Ceacam16-knock-out*-Maus und Immunhistochemie Expressionsorte von *CEACAM16* aufgezeigt. Um einen genaueren Einblick in die Funktion von CEACAM16 zu erhalten, wurden die immunhistochemischen Ergebnisse von den Wildtyp- und *Knock-out*-Mäusen verglichen sowie die *Cochleae* von junge Mäusen (Lebentag 5-18) mit einem anti-CEACAM16-Antikörper angefärbt. Zum Abschluss der Arbeit wurde noch eine Mutationssuche im *CEACAM16*-Gen einer deutschen Familie mit einem im DFNA4-Locus kartiertem NSHL durchgeführt. Die weiteren vermuteten Expressionsorte in Hypophyse und Kleinhirn sollten durch quantitative PCR und Immunhistochemie überprüft werden.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Geräte und Material

### 3.1.1 Geräte

Tabelle 3.1: Geräte

Geräte	Hersteller
Agilent Bioanalyzer 2100, RNA 6000 Pico Chip	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Analysewaage MC1	Sartorius AG, Göttingen
Cawomat 2000 IR	Cawo, Schrobenhausen
Entwässerungsautomat Shandon Hypercenter XP	Thermo Scientific, Waltham, USA
Elektrophoresekammer	Gibco BRL, Karlsruhe
Fluoreszenzbildsystem: Fluor-S Multimager	Bio-Rad, München
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Light Cycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler Centrifuge Adapters und Kühlblock	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Mikropipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems GmbH, Mannheim
Mikroskop Olympus CH	Olympus, Shinjuku, Japan
Mikrowelle Micromat	AEG, Nürnberg
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Paraffinausgiesstation: EG1160	Leica Microsystems GmbH, Mannheim
Photokamera Nikon Eclipse E800	Nikon, Düsseldorf
Pipettierassistent Pipetboy accu	Hirschmann, Neckartenzlingen
Präparierbesteck	Aesculap, Tuttlingen

### 3 Material und Methoden

Präzisionswaage BP2100	Sartorius AG, Göttingen
Rotationsmikrotom Biocut 2035	Leica Microsystems GmbH, Mannheim
Sterilbank HERA safe HS12	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau
Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC200	MJ Research Inc., Watertown, USA
Ultraturrax	Ika Werke, Staufen
Vortex VF2	Ika Werke, Staufen
Zentrifuge DNA Speed Vac DNA110	Savant Instruments, New York
Zentrifuge MIKRO 20	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau
Zubehör Western Blot: Casting Module, 10-well, 0.75 mm; Spacer plates mit 0.75 mm spacers; Short plates; Mini-Protean Tetra Cell, 10-well, 0.75 mm, 4 Gel System	Biorad München

#### 3.1.2 Materialien

Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
BA85 Nitrozellulose-Membran	Whatman, Dassel
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
ECL-Hyperfilm	GE-Healthcare, Uppsala, Schweden
Einmalhandschuhe Sempercure	Semperit Technische Produkte, Wien
Filter	Whatman, Dassel
Light Cycler Capillaries (20 µl)	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim
Objektträger SuperFrost Ultra Plus	Menzel, Braunschweig
PCR Tubes	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße (1,5/2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Skalpelle	Feather, Osaka, Japan
Sterile Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Falcon, Heidelberg

### 3 Material und Methoden

Tabelle 3.3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
6x DNA Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
5 % Milchpulver (Blotting grade)	Roth, Karlsruhe
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid 4K-Lösung (30%)-Mix	Applichem, Darmstadt
Agarose Electrophoresis Grade	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Aminoethylcarbazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua dest	Apotheke LMU, Innenstadt
Aquatex	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dako Target Retrieval Solution pH 9	Dako, Glostrup, Dänemark
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNA-Taq-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA-4Na 20% Citronensäure pH 7,1	Apotheke LMU, Innenstadt
Ethanol	Apotheke LMU, Innenstadt
Ethidiumbromid	Bio-Rad, München
Formalin 4%, neutral, gepuffert mit PBS	Apotheke LMU, Innenstadt
Forene (Isofluran)	Abbott Laboratories, Chicago, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Isopropanol	Apotheke LMU, Innenstadt
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> (10 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraffin	Roth, Karlsruhe
PCR-Puffer ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ): 750 mM Tris-HCl (pH 8.8 bei 25°C) + 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 0.1% (v/v) Tween 20	Fermentas, St. Leon-Rot
Pferdeserum 2,5%	Vector Laboratories, Biozol, Eching
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Apotheke LMU, Innenstadt

### 3 Material und Methoden

Platinum Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Precision Plus Protein All blue Standards	Bio-Rad, München
Rotihistol (Xylolersatz)	Roth, Karlsruhe
SDS-Proben-Puffer	Bio-Rad, München
TAE-Puffer, 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptavidin-Peroxidase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid 30%	VWR International GmbH, Darmstadt

Tabelle 3.4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-CEACAM16-Antikörper, 9D5, un- bzw. biotinkonjugiert	Aldevron/Genovac, Freiburg
anti- $\alpha$ -Tectorin (H300)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Maus-Antikörper, Peroxidase-gekoppelt	Calbiochem, Darmstadt

Tabelle 3.5: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
ImPRESS Anti-Rabbit Ig Peroxidase Polymer Detection Kit	Vector Laboratories, Biozol, Eching
LightCycler FastStart DNA Master <sup>Plus</sup> Sybr Green I	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim
nexttec Genomic DNA Isolation Kit, Tissue & Cells	nexttec Biotechnologie GmbH, Hilgertshausen
QIAquick Purification Kit	Qiagen, Langen
Reverse Transcription System	Promega GmbH, Mannheim
RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Langen
Streptavidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Biozol, Eching
Expand Long Template PCR-System	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim



### 3.1.3 Primer

Die Primersequenz ist in 5'-3'-Richtung angegeben. Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon in Ebersberg synthetisiert.

Tabelle 3.6: Verwendete Primer

Primernamen	Sequenz (5'-3')	Größe (bp)	Verwendung
C16upscr neo3sense	CCTTCTGACATTCTGAGCATCCTTG GGGCTCGATCGAGATCCGAAG	2559	Touch-Down PCR
neo-CH-f mC16-CH-r4	GGGAGGATTGGGAAGACAAT CAGCTTCCTGAGTGTGACCA	336	<i>Ceacam16</i> - KO-Allel
mC16N1-f mC16N1-r	TGTTCTTCTCAGCCTGGAT GGCTCACCATAGACCTGCAT	365	<i>Ceacam16</i> - Wildtyp-Allel
mTecta-f mTecta-r	CCGTCTTCAAGTTCATCGGA GTTGTCTTCACACCAGTCCA	200	RT-PCR
Mmu-b-actin-f Mmu-b-actin-r	ATGGATGACGATATCGCT ATGAGGTAGTCTGTCAGGT	569	RT-PCR
mC16N1-f mC16A-r	TCCTGGTGGCCAGTTACATT GCTGCTACAGACGAGACGAA	278	RT-PCR
mStrc-f mStrc-r	CAATGCCACAGGTCTTGATG CGTCCCAAGAAAGGTTGTTC	302	RT-PCR
C16-Exon1-f2 C16-Exon1-r	TGCTCACACCTTCCCTCTCT CTCGATCCCTCCAAATTCAG	286	PCR
C16-Exon2-f2 C16-Exon2-r	TTGAGAAGGAGATGGGAAGG TTGCAGGTTCAAATCCTGGT	553	PCR
C16-Exon3-f1 C16-Exon3-r	TCCATGAGGTTTGGACACTG AGACCTGCCTCCTAAAACCA	478	PCR
C16-Exon4-f2 C16-Exon4-r	ATTCTCTGTTGGGCAAATGG AAACCAGGGGTACCAACCTC	439	PCR
C16-Exon5-f1 C16-Exon5-r2	AGACAAGGCTGCTTCCTTCA CTCAGTCTCCTTCCCAGCAC	599	PCR
C16-Exon6-f1 C16-Exon6-r	AGGACCAACGCTACCTTCCT GTGCACACCCAGACTGAGAA	500	PCR

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Nachweis der *Ceacam16*<sup>-/-</sup>- und *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Allele in der Maus

#### 3.2.1.1 DNA-Extraktion aus Mäuseschwänzen

Um den Genotyp der Mäuse zu bestimmen, wurde DNA aus Mäuseschwänzen mit dem *nexttec Genomic DNA Isolation Kit* extrahiert. Es wurde der Anleitung des Herstellers für Mäuseschwanz-DNA gefolgt. Dabei wurde aus mehreren Komponenten aus dem Kit ein Lysepuffer für den Proteaseverdau zusammen pipettiert und dieser dann zusammen mit den Mäuseschwänzen über Nacht bei 60°C und 1200 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Lysat kurz zentrifugiert und 120 µl des klaren Überstandes auf die mitgelieferten Säulen gegeben. Diese wurden dann 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 2600 rpm für 1 min zentrifugiert. Die DNA im Durchfluss wurde dann mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: *polymerase chain reaction*) analysiert.

#### 3.2.1.2 *Touch-Down-PCR* zum Nachweis des *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Allels

Damit die ersten Mäuse, die ein *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Allel besitzen, sicher bestimmt werden konnten, wurde eine sogenannte *Touch-Down-PCR* durchgeführt. Verwendet wurde dafür das *Expand Long Template PCR System* von Roche. Die verwendeten Primer waren C16upscr und neo3sense. Die Anlagerungstemperatur begann bei 70°C und wurde mit jedem Zyklus um 1°C geringer. Die folgenden Tabellen zeigen die Herstellung des PCR-Ansatzes sowie das Programm für die PCR.

Tabelle 3.7: *Touch-Down-PCR*

Komponenten	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
DNA-Template			1,0 µl
C16upscr	10 µM	0,8 µM	1,2 µl
neo3sense	10 µM	0,8 µM	1,2 µl
Puffer II (Kit)	10x	1x mit 2,75 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,25 mM (total 4 mM)	0,75 µl
dNTP	jedes 2 mM	jedes 0,5 mM	3,75 µl
Polymerase	5,0 U/µl	0,5 U/15 µl	0,1 µl
D(+)-Trehalose	1 M	66,7 mM	1,0 µl
DMSO	100 %	1 %	0,15 µl
Vol. pro Ansatz (H <sub>2</sub> O-Zugabe ad)			15,0 µl

### 3 Material und Methoden

Tabelle 3.8: PCR-Programm für *Touch-Down-PCR*

Versuchsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min:s)
Denaturierung	94	3:00
1. zyklische Amplifikation (10x)		
Denaturierung	93	0:15
Primeranlagerung	70 (-1°C/Zyklus)	0:30
Extension	68	6
2. zyklische Amplifikation (30x)		
Denaturierung	93	0:15
Primeranlagerung	60	0:30
Extension	68	6:00 (+20 sek./Zyklus)
Extension	68	7:00

#### 3.2.1.3 *Ceacam16*-allelspezifische PCR

Zur Genotypisierung mittels PCR wurde eine herkömmliche Taq-Polymerase mit Rinderserumalbumin und der zugehörige Puffer mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  von Fermentas verwendet. Als Primer wurden C16N1-f und C16N1-r für das *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Allel sowie neo-CH-f und C16-CH-r4 für das *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Allel eingesetzt. Die Primer-Anlagerungstemperatur wurde jeweils an die Primer angepasst. In den Tabellen 3.9 und 3.10 ist die Zusammensetzung des jeweiligen PCR-Ansatzes dargestellt. Das Programm für die PCR wurde entsprechend der Darstellung in Tabelle 3.11 programmiert.

Tabelle 3.9: PCR zur Genotypisierung des *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Allels

Komponenten	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
DNA-Template			2,0 µl
C16N1-f	10 µM	0,5 µM	1,0 µl
C16N1-r	10 µM	0,5 µM	1,0 µl
PCR-Puffer mit $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$	10x	1x	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,75 mM	2,2 µl
dNTP-Mix	jedes 2 mM	0,2 mM	2,0 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,75 U/20 µl	0,15 µl
Vol. pro Ansatz (H <sub>2</sub> O-Zugabe ad)			20,0 µl

Tabelle 3.10: PCR zur Genotypisierung des *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Allels

Komponenten	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
DNA-Template			1,5 µl
neo-CH-f	10 µM	0,4 µM	0,8 µl
C16-CH-r4	10 µM	0,4 µM	0,8 µl
PCR-Puffer mit ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	10x	1x	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,75 mM	2,2 µl
dNTP-Mix	jedes 2 mM	0,2 mM	2,0 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,75 U/20 µl	0,15 µl
Vol. pro Ansatz (H <sub>2</sub> O-Zugabe ad)			20,0 µl

Tabelle 3.11: Ablauf des PCR-Programms für die Genotypisierung

Versuchsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min:s)
Denaturierung	94	2:00
Zyklische Amplifikation (30x)		
Denaturierung	94	0:30
Primeranlagerung	57	0:30
Extension	72	2:00
Extension	72	10:00

Die PCR-Produkte wurden zur Größenanalyse einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Dazu wurde ein 2 % Agarosegel hergestellt. Zuerst wurde die Agarose mit 1x TAE Elektrophoresepuffer erhitzt. Nach abkühlen auf ca. 60°C wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Das PCR-Produkt wurde mit 4 µl 6x *Loading Dye* versetzt und dann in die einzelnen Geltaschen eingefüllt. Parallel wurde 100-bp-DNA-Marker zur späteren Größenbestimmung aufgetragen. Die Elektrophorese fand in einem 1x TAE-Laufpuffer bei 100 V Gleichspannung statt. Danach wurden die Banden durch UV-Transillumination sichtbar gemacht und digital fotografiert.

### 3.2.2 Entnahme von Organen aus *Ceacam16*<sup>-/-</sup>- und *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen

Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Danach erfolgte nach Entfernung der Kopfhaut die Eröffnung der Schädeldecke von okzipital nach

frontal und das Gehirn wurde vorsichtig entnommen, um die Hypophyse in der Schädelbasis nicht zu beschädigen.

Das Kleinhirn wurde vorsichtig vom Großhirn getrennt und für Paraffineinbettung für 90 min in 4 % PBS-gepuffertes Formaldehyd gelegt. Danach wurde es zweimal 15 min in PBS gespült und bis zur Entwässerung in 70 % Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Für die RNA-Isolierung erfolgte die Zerkleinerung eines halben Kleinhirns direkt in 600 µl RLT-Puffer (im Kit enthalten) mit 1% (v/v) β-Mercaptoethanol mittels Ultraturrax.

Da die Hypophyse intakt nur schwer aus dem Knochenbett herauszunehmen war, wurde sie mit Knochenbett aus der Schädelbasis geschnitten und für 45 min in 4 % PBS-gepuffertem Formaldehyd fixiert. Danach erfolgte zweimal eine Spülung mit PBS und die Entkalkifizierung des Knochenbetts durch 0.18 M Zitronensäure mit 0.44 M EDTA pH 7.1 für 24 h bei 4°C. Die Hypophyse wurde bis zur Entwässerung ebenfalls in 70 % Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Zur RNA-Isolierung wurden vier Hypophysen gepoolt und in 350 µl RLT-Puffer mit 1% (v/v) β-Mercaptoethanol mit einer Pinzette zerkleinert.

Als letztes wurden die Innenohren aus dem Felsenbein entnommen. Die Vorbereitung für die Paraffineinbettung entspricht der Vorbereitung der Hypophyse. Für die RNA-Isolierung wurde die *Cochlea* in gekühltem PBS vom Gleichgewichtsorgan abgetrennt. Es wurden vier *Cochleae* von zwei Mäusen gepoolt und in 600 µl RLT-Puffer + 1% (v/v) β-Mercaptoethanol mit einer Pinzette zerkleinert, da die Homogenisierung mit dem Ultraturrax zu einer starken DNA-Kontamination und Verlust der RNA führte. Das jeweilige Homogenat wurde bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert.

#### 3.2.3 Immunhistologie

Die in 70 % Ethanol gelagerten Kleinhirn, Hypophyse und Innenohren wurden mittels des *Shandon Hypercenter XP Enclosed Tissue Processor* in Paraffin eingebettet. Danach wurden sie in 3 µm dicke Scheiben geschnitten, auf der Oberfläche eines 40°C Wasserbad geglättet, auf einen *SuperFrost Ultra Plus* Objektträger gezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Paraffinschnitte mit einem biotinkonjugierten Antikörper gegen humanes und murines CEACAM16 gefärbt. Dazu wurden die Schnitte zuerst zweimal für jeweils 5 min in Roti Histol und danach einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Es folgte ein fünfminütiger Waschgang mit Aqua destillata (Aqua dest.).

Im nächsten Schritt fand eine Antigendemaskierung mit *Dako Target Retrieval Solution* pH 9 verdünnt mit Aqua dest. im Mischungsverhältnis 1:9 statt. Dazu wurden die Schnitte für 30 min bei ca. 95°C erhitzt und anschließend 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Danach erfolgte ein dreimaliger Waschgang mit PBS. Als nächstes folgte die Peroxidase-Blockierung

### 3 Material und Methoden

mit 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/100% Methanol/PBS im Verhältnis 1:1:8 für 5 min und anschließend erneutes dreimaliges waschen in PBS. Daraufhin wurden die Schnitte jeweils für 15 min mit 2,5% Pferdeserum und mit dem *Streptavidin/Biotin Blocking Kit* nach Vorschrift des Herstellers behandelt. Danach wurde dreimal mit PBS gespült.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem biotinkonjugierten murinen monoklonalen anti-CEACAM16-Antikörper 9D5 (4 µg/ml) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurde erneut dreimal mit PBS gespült, dann folgte die Inkubation mit in PBS verdünnter Streptavidin-Peroxidase (1:500) für 60 min. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol. Dazu wurden 32 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol mit 8 ml Dimethylformamid sowie 92 ml Acetat-Puffer mit 120 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jeweils getrennt gemischt und die Schnitte in eine Küvette gestellt. Anschließend wurden die beiden Lösungen zusammen gemischt, über einen Filter in die Küvette gegossen und die Schnitte für 15 min inkubiert. Danach erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalun. Dazu wurden die Schnitte mit Hämalun beträufelt, 30 s abgewartet, die Schnitte zuerst vorsichtig unter Leitungswasser und dann in einer Küvette unter Wasserfluss für weitere 5 min gespült. Anschließend wurden die Schnitte mit *Aquatex* eingedeckelt.

Bei der Färbung mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen  $\alpha$ -Tectorin wurde das *anti-Rabbit Impress Kit* von Vector nach Herstellerangaben genutzt. Zur Auswertung wurden die Schnitte unter dem Mikroskop begutachtet und fotografiert.

#### 3.2.4 RNA-Analyse mittels Endpunkt-PCR und quantitativer PCR

Zur RNA-Analyse wurden die *Cochleae*, Kleinhirn und Hypophysen entnommen, die RNA extrahiert und anschließend diese mittels RNA-Elektrophorese kontrolliert. Die Analyse fand anschließend mittels PCR und genspezifischer Primer statt.

##### 3.2.4.1 RNA- und Protein-Extraktion

Nach Entnahme der Organe und Vorbereitung im RLT-Buffer (siehe Kapitel 3.2.2) erfolgte die Extraktion der RNA und des Proteins mit dem *RNeasy Plus Mini Kit* von Qiagen nach den Herstellerangaben. Für Innenohren und Hypophysen wurde zusätzlich ein *QiaShredder* verwendet. Alle Proben wurden zuerst über eine DNA-Elimination-Säule gegeben. Dann folgte die RNA-Bindung an die mitgelieferten Säulen, welche anschließend in mehreren Schritten gewaschen wurde. Am Ende wurde die RNA-Konzentration mit dem Nano-Drop gemessen und bei -80°C gelagert.

### 3 Material und Methoden

Das Protein wurde nach der RNA-Extraktion, wie vom Hersteller beschrieben, durch Protein-Präzipitation gewonnen. Dazu wurde der Überstand aus dem ersten Schritt des *RNeasy Plus Mini Kits* nicht verworfen, sondern auf Eis gekühlt und 4 Volumen auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühltes Aceton dazugegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und anschließend wurde für 10 min bei  $0^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und ebenfalls bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Die Qualität der RNA wurde durch RNA-Elektrophorese mit dem *Agilent Bioanalyzer 2100 System* überprüft. Benutzt wurde dazu das *RNA 6000 Pico Kit* nach den Herstellerangaben. Die Auswertung wurde mit der Software *2100 Expert im Eukaryote Total RNA Pico Assay Modus* durchgeführt. Dabei wird die Qualität in Form der *RNA integrity number* (RIN) ausgedrückt. Diese war bei den RNA-Proben der unterschiedlichen Gewebe gleich gut ( $\text{RIN} > 9$ ). Das extrahierte Protein wurde direkt für den Western-Blot verwendet.

#### 3.2.4.2 Reverse Transkription

Zur Umwandlung der RNA in cDNA wurde das *Promega Reverse Transcription System* verwendet. Dazu wurde die RNA so verdünnt, dass 20  $\mu\text{l}$  PCR-Ansatz 1  $\mu\text{g}$  RNA enthalten. RNA und Aqua dest. wurden zuerst für 10 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt und dann schnell auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der Reverse-Transkription-Ansatz, wie in Tabelle 3.12 dargestellt, zusammen pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Als nächstes folgte die Inkubation bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 60 min, dann Erhitzen auf  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 min und zuletzt Abkühlen auf  $0^{\circ}\text{C}$  für 5 min.

Zu den 20  $\mu\text{l}$  cDNA aus dem Ansatz wurden 80  $\mu\text{l}$  Aqua dest. hinzugefügt, um eine cDNA-Konzentration von 10  $\text{ng}/\mu\text{l}$  zu erhalten. Diese wurden dann für weitere PCR-Ansätze verwendet.

Tabelle 3.12: Reverse-Transkription-Ansatz

Komponenten	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
RNA-Template (RNA+Aqua dest.)		1 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$	9,82 $\mu\text{l}$
Random Primers	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	10 $\mu\text{M}$	1,0 $\mu\text{l}$
RT Puffer	10x	1x	2,0 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5 mM	4,0 $\mu\text{l}$
dNTP	10 mM	1 mM	2,0 $\mu\text{l}$
Rnasin Inhibitor	40 U/ $\mu\text{l}$	1 U/ $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$
AMV Reverse Transkriptase	22 U/ $\mu\text{l}$	15 U/20 $\mu\text{l}$	0,68 $\mu\text{l}$
Vol. pro Ansatz (H <sub>2</sub> O-Zugabe ad)			20,0 $\mu\text{l}$

### 3.2.4.3 Quantitative PCR

Für die quantitative PCR wurde das LightCycler-System von Roche mit dem *FastStart DNA Master<sup>Plus</sup> Sybr Green I Kit* und spezifische Primer für die Gene *Ceacam16*, *Tecta* ( $\alpha$ -Tectorin), *Strc* (Stereocilin) und *Actb* ( $\beta$ -Aktin) verwendet. Der PCR-Ansatz wurde gemäß der Tabelle 3.13 hergestellt. Dabei wurde zuerst für den 1a+1b Mix 0,3  $\mu$ l aus dem Röhrchen 1a und 2,7  $\mu$ l aus dem Röhrchen 1b je Probe zusammen pipettiert. Anschließend wurde der PCR-Ansatz hergestellt und in auf 4°C vorgekühlte LightCycler Glaskapillaren (20  $\mu$ l) pipettiert. Danach wurde 1  $\mu$ l cDNA dazugegeben. Die Programmierung des LightCycler erfolgte gemäß Tabelle 3.14.

Tabelle 3.13: Herstellung des Master Mix für die quantitative PCR

Komponenten	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
Primer (2x)	je 10 $\mu$ M	je 0,5 $\mu$ M	je 1,0 $\mu$ l
1a+1b Mix	5x	0,75x	3,0 $\mu$ l
1a: hot start Taq-Polymerase			
1b: PCR-Puffer (5x), dNTPs, Mg <sup>2+</sup> , Farbstoff SYBR Green			
Vol. pro Ansatz (H <sub>2</sub> O-Zugabe ad)			14,0 $\mu$ l

Tabelle 3.14: Programmierung des LightCycler

Versuchsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min:s)
Denaturierung	95	10:00
Zyklische Amplifikation (40x)		
Denaturierung	95	0:10
Primeranlagerung	59	0:10
Extension	72	0:16
Messung der Fluoreszenz		



### 3.2.4.4 Endpunkt-PCR

Es wurde ebenso wie in Kapitel 3.2.1.3 eine Taq-Polymerase mit Rinderserumalbumin und der zugehörige Puffer mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  von Fermentas verwendet. Als Primer wurden für die Amplifikation der *Ceacam16*-cDNA mC16N1-f und mC16A-r verwendet. Zur Kontrolle der Qualität der cDNA wurden in einem zweiten Ansatz die *Actb* Primer Mmu-b-actin-f und Mmu-b-actin-r eingesetzt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die cDNA grundsätzlich intakt ist. Der PCR-Ansatz wurde, wie in Tabelle 3.15 dargestellt, zusammen pipettiert und das Programm folgte Tabelle 3.16. Die anschließende Agarosegel-Elektrophorese wurde entsprechend Kapitel 3.2.1.3 durchgeführt.

Tabelle 3.15: PCR-Ansatz für cDNA-Endpunkt-PCR

Komponenten	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
cDNA-Template			5,0 $\mu\text{l}$
mC16N1-f/Mmu-b-actin-f	10 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	1,0 $\mu\text{l}$
mC16A-r/Mmu-b-actin-r	10 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	1,0 $\mu\text{l}$
PCR-Puffer $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$	10x	1x	2,0 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	2,0 $\mu\text{l}$
dNTP-Mix	2 mM jedes	0,2 mM	2,0 $\mu\text{l}$
Taq-Polymerase	5 U/ $\mu\text{l}$	0,5 U/20 $\mu\text{l}$	0,13 $\mu\text{l}$
Vol. pro Ansatz (H <sub>2</sub> O-Zugabe ad)			20,0 $\mu\text{l}$

Tabelle 3.16: Ablauf des Programms für die Endpunkt-PCR

Versuchsschritt	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Dauer (min:s)
Denaturierung	94	0:30
Zyklische Amplifikation (30x)		
Denaturierung	94	0:30
Primeranlagerung	59	1:10
Extension	72	1:30
Extension	72	10:00

### 3.2.5 Western-Blot-Analyse

Da sich die Protein-Extraktion aus Innenohren mittels Lysieren oder Homogenisieren schwierig gestaltete, wurde auf die Protein-Präzipitation nach RNA-Extraktion zurück gegriffen (siehe auch Kapitel 3.2.4.1). Auf die anschließende Bestimmung der Proteinmenge wurde verzichtet, da nur gezeigt werden sollte, dass bei *Ceacam16<sup>+/+</sup>*-Mäusen das Protein vorhanden ist, bei *Ceacam16<sup>-/-</sup>*-Mäusen jedoch nicht. Als nächstes folgte die Elektrophorese (SDS-PAGE, engl.: sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis), bei der die in den Proben enthaltenen Proteine nach Größe aufgetrennt wurden. Durch so genanntes Blotting wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht.

#### 3.2.5.1 Vorbereitung der Proben

Um das Protein-Präzipitat zu lösen, wurden 100 µl 2x SDS-Proben-Puffer auf das Präzipitat gegeben und die Probe bei 95°C für 10 min gekocht. Die Lösung wurde anschließend in unterschiedlichen Mengen direkt auf die Gele aufgetragen.

#### 3.2.5.2 SDS-PAGE und Blotting

Die verwendeten Gele für die SDS-PAGE wurden mit Hilfe des Zubehörs von Bio-Rad gegossen. Für das Trenngel wurde folgende Mischung verwendet (Kalkulation für 5-6 Gele):

- 8,4 ml Acrylamid 4K-Lösung (30%)-Mix (Mischung Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1)
- 8,4 ml Aqua dest.
- 5,6 ml 4x Tris-Trenngelpuffer (4 M Tris-Base und 0,4% SDS)

Als Acrylamid-Mix wurde die oben genannte gebrauchsfertige Mischung verwendet. Um die Polymerisation einzuleiten, wurden 75 µl einer 10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 15 µl des Katalysators Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugegeben. Dieser Ansatz wurde anschließend zügig in die vorbereitete Platten-Halterung (bis ca. 1 cm unter das obere Ende der kürzeren der beiden Glasplatten) eingefüllt. Der Rest wurde dann mit Aqua dest. aufgefüllt, um später eine klare Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel zu schaffen. Nach vollzogener Polymerisation konnte das Wasser wieder abgegossen, und mit den Sammelgelen fortgefahren werden. Für die Sammelgele wurde folgende Mischung verwendet (Kalkulation für 5 – 6 Gele):

- 1,62 ml Acrylamid 4K-Lösung (30%)-Mix (Mischung Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1)

### 3 Material und Methoden

- 3,96 ml Aqua dest.
- 1,875 ml 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl und 0,4% SDS)

Polymerisiert wurde hier durch Zugabe von 37,5  $\mu$ l einer 10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 7,5  $\mu$ l TEMED.

Die Elektrophorese wurde mit einem Laufpuffer, in der unten angegebenen Zusammensetzung, in Kammern der Firma Bio-Rad durchgeführt. Pro Geltasche wurden 10  $\mu$ l der gekochten Lysate aufgetragen. Außerdem wurde eine zusätzliche Geltasche mit einem Marker beladen (5  $\mu$ l *Precision Plus Protein All Blue Standards* von Bio-Rad), um die Zuordnung der Western-Blot-Banden zu den entsprechenden Molekulargewichten zu ermöglichen. Die Elektrophorese dauerte circa 110 min bei 200 V. Bei diesen Bedingungen erfolgte eine optimale Auflösung zwischen 37 kDa und 150 kDa.

Im Anschluss daran folgte der Schritt des Blottens, also dem Transfer der aufgetrennten Proteine aus den Gelen auf eine Nitrozellulose-Membran. Das Blotting erfolgte nach dem Semi-Dry Verfahren mit einer *Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* von Bio-Rad bei 19 V für 90 min. Das Blotting-Sandwich bestand neben den Gelen und Nitrozellulose-Membranen aus Blotting-Papieren, die mit einer speziellen Lösung durchtränkt waren. Die Zusammensetzung dieser Lösung folgt unten. Vor dem Zusammensetzen dieser Bestandteile wurden die Gele von den Platten gelöst und noch für einige Sekunden in Gefäße mit Gel-Lösung gelegt. Die Zusammensetzung der Lösung folgt ebenfalls unten.

Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen (alle Angaben für 1 l):

10x Laufpuffer für SDS-PAGE:

- 30,28 g Tris-Base
- 142,6 g Glycin
- Die gebrauchsfertige Lösung wurde durch 1:10 Verdünnung dieser 10x Stammlösung angesetzt und enthielt darüber hinaus 1% SDS (zugefügt als Stammlösung).

Lösung für die Nitrozellulose-Membranen:

- 100 ml Methanol
- 650 ml Aqua dest.
- 250 ml 4x Western-Blot-Puffer (Zusammensetzung siehe unten)

Gel-Lösung:

- 750 ml Aqua dest.
- 250 ml 4x Western-Blot-Puffer
- 1% SDS (SDS-Zugabe als Stammlösung)

4x WB-Puffer:

- 12,1 g Tris-Base
- 57,6 g Glycin

#### 3.2.5.3 Detektion durch Antikörper

Im Anschluss an das Blotten fand über Nacht die Blockierung der Membranen mit 5% Milchpulver in PBS-T (Zusammensetzung siehe unten) bei 4°C statt. Durch diese Blockierung wurde die unspezifische Bindung der später applizierten Antikörper an die proteinbindende Nitrozellulose-Membran verhindert. Anschließend wurden die Membranen unter ständigem Schütteln 2 x 5 min mit Aqua dest. gewaschen und danach ebenfalls unter ständigem Schütteln mit dem anti-CEACAM16-Antikörper 9D5 inkubiert. Dieser wurden in einer Konzentration von 2,5 µg/ml in PBS-T mit 5 % Milchpulver angesetzt. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte für 2 h. Ein mehrfaches Verwenden der so angesetzten primären Antikörper konnte ohne Qualitätseinbußen durchgeführt werden.

Nach Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte ein 4 x fünfminütiges Waschen der Membranen mit PBS-T und anschließend die Inkubation für 40 min mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Ig-Antikörper. Beide Schritte wurden unter ständigem Schütteln durchgeführt. Die sekundären Antikörper wurden in PBS-T mit 5% Milchpulver angesetzt und in einer Konzentration von 1:5000 verwendet. Im Anschluss daran wurden die Membranen erneut 4 x 5 min mit PBS-T gewaschen, um sie dann einer Detektion mit *enhanced chemiluminescence* (ECL) zu unterziehen. Hierzu wurden die Membranen nach dem letzten Waschgang vollständig mit einem Peroxidase-Substrat benetzt, das sich aus 10 ml SA-Lösung, 1 ml SB-Lösung und 3 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zusammensetzte. Nach einer Inkubation von 4 min wurden die Membranen zwischen zwei Overhead-Projektor-Folien gelegt und so in einer Röntgen-Kassette in einer Dunkelkammer für 2-15 min mit ECL-Hyperfilm belichtet. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit einem *Cawomat 2000 IR*.

Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen:

PBS-T:

- 20x PBS 50 ml
- Aqua dest. 950 ml
- Tween 20 1 ml

SA-Lösung:

- Tris-HCl 0,1 M
- Luminol 250 mg/l
- Tris-HCl auf pH 8,6 einstellen, dann Luminol zufügen und auflösen.

SB-Lösung:

- 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO lösen.

### 3.2.6 Sequenzierung des humanen *CEACAM16*-Gens

Zur Suche einer möglichen *CEACAM16*-Mutation bei einer Familie mit genetisch bedingtem Hördefekt wurde eine Sequenzierung von *CEACAM16* bei drei betroffenen und drei nicht betroffenen Familienmitglieder durchgeführt. Dazu wurden zuerst passende Primer für die Exone 1-6 von *CEACAM16* entworfen, um diese mittels PCR zu amplifizieren. Diese wurden bei unterschiedlichen Bedingungen getestet, um einen optimalen Ansatz zu finden, der in Tabelle 3.17 dargestellt ist.

Tabelle 3.17: PCR-Ansatz für die Sequenzierung

Komponenten	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
DNA-Template			2,0 µl
Primer 1	10 µM	0,2 µM	0,5 µl
Primer 2	10 µM	0,2 µM	0,5 µl
PCR-Puffer	10x	1x	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 µM	2 mM	1,0 µl
dNTP Mix	10 µM	0,2 mM	0,5 µl
Platinum Taq Polymerase	5 U/µl	1 U/25 µl	0,2 µl
Vol. pro Ansatz (H <sub>2</sub> O-Zugabe ad)			25,0 µl

### 3 Material und Methoden

Tabelle 3.18: Ablauf des Programms für die Sequenzierungs-PCR

Versuchsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min:s)
Denaturierung	94	2:00
Zyklische Amplifikation (30x)		
Denaturierung	94	0:30
Primeranlagerung	60	0:30
Extension	72	1:30
Extension	72	10:00

In einem nächsten Schritt wurde das PCR-Produkt mit dem *QIAquick Purification Kit* aufgereinigt, um eine höhere DNA-Konzentration zu erreichen. Es wurde dabei nach Herstellerangaben verfahren. Die DNA wurde zur Sequenzierung zu *Eurofins MWG Operon* nach Ebersberg geschickt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Selektion der Mäuse mit einem veränderten *Ceacam16*-Allel

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits mit der Herstellung einer *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Maus begonnen worden. Embryonale Stammzellen von albino-BALB/c-Mäusen (Fellfarbe weiß) mit einem durch eine Neo-Insertion und Deletion von Exon 2-4 veränderten *Ceacam16*-Gen (Zellklon C3) wurden per Mikroinjektion in eine Blastozyste von C57BL/6-Mäusen (Fellfarbe schwarz) eingeführt. Es entstand die chimäre F0-Maus C3 (Abbildung 4.1).

Diese F0-Maus wurde in einem nächsten Schritt mit einer weiblichen BALB/c-Maus verpaart. Der Nachwuchs bestand aus agoutifarbenen (braunen) und Albinomäusen, wobei nur die Albinomäuse ein verändertes *Ceacam16*-Allel tragen konnten, da nur diese von Spermien aus den injizierten gentechnisch veränderten embryonalen Stammzellen durch Befruchtung von BALB/c-Eizellen entstanden waren. Durch eine *Touch-Down*-PCR, bei welcher ein großer Abschnitt von *Ceacam16* amplifiziert wurde, sollte sicher gestellt werden, dass sich der neu eingefügte Neo-Abschnitt korrekt in das Gen eingebaut hatte und die *Ceacam16*-Deletion korrekt erfolgt war. Die so selektierten Mäuse, die ein *Ceacam16*-knock-out-Allel besaßen, konnten nun miteinander verpaart werden, um eine reine *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Linie zu erzeugen. Im gleichen Zug wurden auch die Geschwistermäuse ohne das veränderte *Ceacam16* verpaart, um geeignete Wildtyp-Kontrollen zu erhalten (Abbildung 4.1).

## 4 Ergebnisse

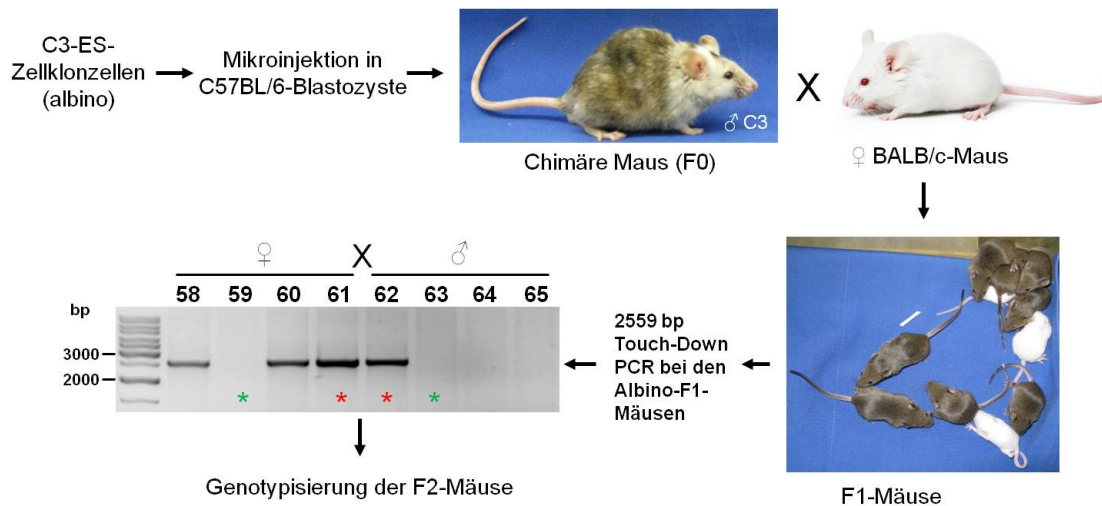


Abbildung 4.1: Herstellung von *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen.

In einem ersten Schritt erfolgte die Herstellung von C3-Zellklonzellen embryonaler Stammstellen (ES) einer Albino-Maus, die anschließend mittels Mikroinjektion in eine C57BL/6-Blastozyste eingeführt wurden. Sie enthielten das durch eine Neo-Insertion sowie durch eine Deletion von Exon 2-4 nicht mehr funktionsfähige *Ceacam16*. Aus der Blastozyste entwickelte sich die chimäre, männliche F0-Maus C3, die von den embryonalen Stammzellen abstammende Spermien mit *Ceacam16*-Wildtyp- bzw. -*knock-out*-Allelen trug. Diese wurde in einem nächsten Schritt mit einer BALB/c-Maus verpaart. Der Wurf enthielt agouti- und albinofarbene F1-Mäuse, wobei nur die Albinomäuse ein *Ceacam16*-*knock-out*-Allel enthalten konnten und somit auch nur diese mit einer Touch-Down-PCR getestet wurden. Ein Männchen und drei Weibchen enthielten ein *Ceacam16*-*knock-out*-Allel. Die Verpaarung der F1-Mäuse führte zur Etablierung homozygoter *Ceacam16*<sup>+/+</sup>- (grüne Sterne) und *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Linien (rote Sterne). PCR-Abbildung von Rainer Riesenberg, Fotos der Mäuse von Wolfgang Zimmermann.

## 4.2 Etablierung homozygoter *Ceacam16*<sup>+/+</sup>- und *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Linien

Um homozygote *Ceacam16*<sup>+/+</sup>- und *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Linien zu etablieren, wurden heterozygote Mäuse so lange verpaart und die Nachkommen anschließend getestet, bis genügend *Ceacam16*<sup>+/+</sup>- und *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäuse vorhanden waren, um diese ausschließlich untereinander zu verpaaren. Zur Testung wurden zwei PCR-Ansätze entwickelt, wie in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben. Bei *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen zeigte sich ein 365 bp großes Amplifikationsprodukt spezifisch für das Wildtyp-Allel, bei reinen *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen ein 336 bp großes Amplifikationsprodukt aus dem Neo-*knock-out*-Allel. Bei heterozygoten Mäusen erschienen beide Amplifikationsprodukte in getrennt durchgeführten PCR-Reaktionen (Abbildung 4.2). Nachdem genügend *Ceacam16*<sup>+/+</sup>- und *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäuse vorhanden waren, wurden diese nur noch untereinander verpaart.



## 4 Ergebnisse

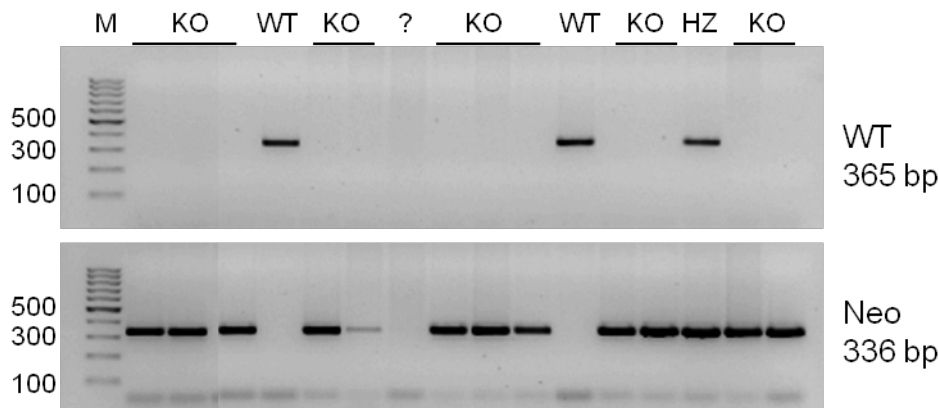


Abbildung 4.2: Nachweis von *Ceacam16*<sup>+/+</sup>- und *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen durch allelspezifische PCR.

PCR zur Bestimmung des Genotyps der *Ceacam16*-Mäuse. Das Amplifikationsprodukt Neo mit 336 bp zeigt das Vorkommen von mindestens einem *Ceacam16*-KO-Allel, das mit 365 bp das von mindestens einem Wildtyp-Allel (WT). Sind beide Amplifikationsprodukte vorhanden, stammt die DNA von einer heterozygoten Maus (HZ). Das mit ? bezeichnete Ergebnis konnte nicht eindeutig zugeordnet werden und wurde erneut untersucht. HZ, heterozygote Maus; KO, *Knock-out*-Maus; M, Marker; WT, Wildtyp-Maus.

### 4.3 Expressionsorte von *Ceacam16* in der Maus

#### 4.3.1 Identifizierung von Expressionsorten des murinen *Ceacam16* im Innenohr und Gehirn

Aus mRNA-Datenbanken (*expressed sequence tags*, EST) und voran gegangenen Arbeiten war bekannt, dass *Ceacam16* vor allem im Innenohr sowie möglicherweise auch im Kleinhirn und in der Hypophyse, nicht aber in einer Vielzahl anderer Gewebe exprimiert wird (Krupar, 2012; Zebhauser et al., 2005). Die Endpunkt-PCR mit *Cochlea*-cDNA zeigte anhand des Auftretens eines 278-bp-DNA-Amplifikationsprodukts ein Vorkommen von *Ceacam16*-mRNA bei *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen, während bei einer *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Maus als Kontrolle keine Bande sichtbar war (Abbildung 4.3 A). CEACAM16-Protein konnte mittels Western-Blot ebenfalls nur im Innenohr von Wildtyp-Mäusen als breite Bande mit einer Größe von 50-70 kDa detektiert werden (Abbildung 4.3 C). Bei der quantitativen RT-PCR wurden auch im Kleinhirn geringe Mengen von *Ceacam16*-mRNA gefunden, allerdings nur  $\frac{1}{100}$  der Menge, die in der *Cochlea* vorkommt (Abbildung 4.3 B).

Um Zellen und Strukturen in der *Cochlea*, im Kleinhirn und in der Hypophyse zu identifizieren, die CEACAM16 enthalten, wurden die Gewebe von *Ceacam16*<sup>-/-</sup>- und *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen immunhistochemisch untersucht.

## 4 Ergebnisse

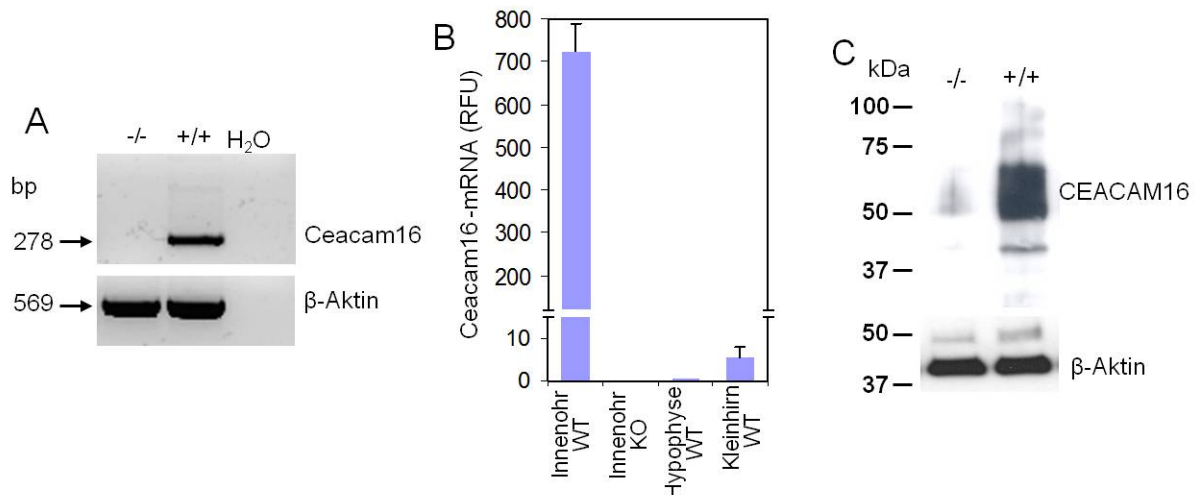


Abbildung 4.3: *Ceacam16* ist selektiv in der *Cochlea* exprimiert.

*Ceacam16*-mRNA wurde mittels Endpunkt (A) bzw. quantitativer RT-PCR (B) und CEACAM16-Protein durch Western-Blot-Analysen mit Hilfe des CEACAM16-Antikörpers 9D5 (C) nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten mRNA bzw. Protein-Extrakte aus *Cochleae* von *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen. In der *Cochlea* von Wildtyp-Mäusen konnte sowohl *Ceacam16*-mRNA als auch im Western-Blot CEACAM16-Protein nachgewiesen werden, während die Proben der *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Maus negativ blieben (A,C). Als Kontrolle für die Intaktheit der RNA-Proben diente der Nachweis von  $\beta$ -Aktin-mRNA. In der quantitativen PCR wurde zusätzlich noch das Vorkommen von *Ceacam16*-mRNA in der Hypophyse und im Kleinhirn untersucht (B). Dabei konnten nur sehr geringe Mengen (100 mal weniger) im Kleinhirn nachgewiesen werden. KO, Knock-out-Maus; RFU, relative Fluoreszenzeinheiten (engl.: relative fluorescence units), WT, Wildtyp-Maus.

### 4.3.2 CEACAM16 ist Bestandteil der Tektorialmembran und der Makula-assoziierten Matrix des Gleichgewichtorgans

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an Paraffinschnitten der *Cochlea* von adulten *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen (Alter von 7 bis 54 Wochen) mit dem biotinylierten murinen monoklonalen Ceacam16-Antikörper 9D5 durchgeführt. Dieser Antikörper wurde gegen humanes CEACAM16 hergestellt, kreuzreagiert jedoch mit dem murinen CEACAM16. Zur Kontrolle der Spezifität der Färbungen wurden *Cochleae* von *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht. Es zeigte sich eine deutliche, durchgehende Färbung der Tektorialmembran sowie der extrazellulären Matrix der *Macula sacculi* bei *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen im Innenohr (Abbildung 4.4 A, B, D). Eine Färbung der extrazellulären Matrix des *Utriculus*, dem zweiten vestibulären *Macula*-Organ, war nicht nachweisbar (Abbildung 4.4 A).

## 4 Ergebnisse

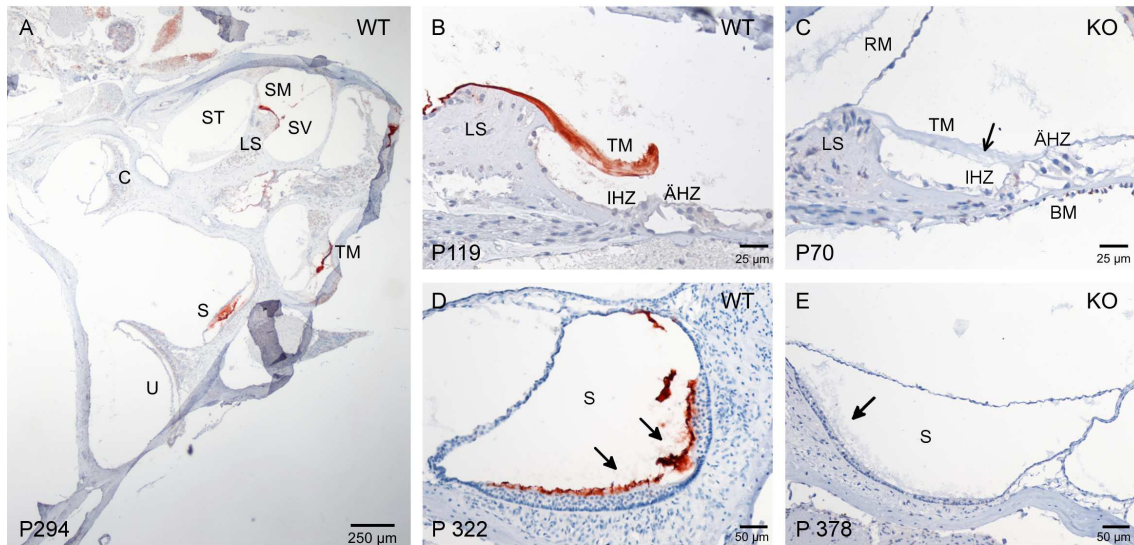


Abbildung 4.4: Expression von CEACAM16 in der *Cochlea* und im Vestibularorgan.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung an Paraffinschnitten des Innenohrs mit dem biotinylierten monoklonalen CEACAM16-Antikörper 9D5 zeigte sich eine deutliche, durchgehende Färbung der Tektorialmembran (TM; A, B) sowie der extrazellulären Matrix der *Macula sacculi* (S; A, D, Pfeile) bei *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen. Abbildung A zeigt einen sagittalen Schnitt durch das Innenohr einer *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Maus. Rechts oben sind zwei Windungen der Cochlea angeschnitten, man sieht zweimal die angefärbte TM. In der linken Bildhälfte sind Teile des Vestibularorgans sichtbar. Dabei ist eine Färbung nur in S erkennbar. Die *Macula utriculi* (U) sowie die *Crista ampullaris* (C) sind nicht angefärbt. Bei *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte sowohl in der TM als auch in S (C, E, Pfeile) keine Färbung gezeigt werden. Die TM der *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten vermehrt Löcher in ihrer Matrix (C, Pfeil). Untersucht wurden 12 *Cochleae* von 6 adulten *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen und 12 *Cochleae* von 6 adulten *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Alter 7-54 Wochen). Repräsentative Ergebnisse sind gezeigt. ÄHZ, äußere Haarzellen; BM, Basilarmembran, C, *Christa ampullaris*; IHZ, innere Haarzellen; KO, *Knock-out*-Maus; LS, *Limbus spiralis*; S, *Macula sacculi*; P, *post partum* (Alter in Tagen); SM, *Scala media*; ST, *Scala tympani*; SV, *Scala ventriculi*; RM, Reissner-Membran; TM, Tektorialmembran; U, *Macula utriculi*; WT, Wildtyp-Maus.

Die Tektorialmembran besteht aus einer azellulären Matrix, aufgebaut aus mehreren Glykoproteinen und Kollagenen. Sie ist am *Limbus spiralis* befestigt und zieht über den *Sulcus spiralis* bis zu den äußeren Haarzellen, deren Stereozilien in sie eingebettet sind. Bei den zur Kontrolle gefärbten Schnitten von *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte keine Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 4.4 C).

Die *Macula sacculi* ist Teil des Gleichgewichtorgans und registriert vertikale Beschleunigungen. Da die *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäuse keinerlei Auffälligkeiten bezüglich ihres Gleichgewichtssinns zeigten, wurde die Färbung in der *Macula sacculi* nicht weitergehend untersucht.

### 4.3.3 CEACAM16-Protein ist in Kleinhirn und Hypophyse nicht detektierbar

Nach den Ergebnissen der quantitativen PCR (Abbildung 4.3 B) konnte davon ausgegangen werden, dass die CEACAM16-Protein-Mengen, wenn überhaupt nachweisbar, in beiden Organen sehr gering sind. Um eventuell kleine CEACAM16-exprimierende Areale im Kleinhirn und in der Hypophyse zu identifizieren, wurden Paraffinschnitte immunhistologisch untersucht (Abbildung 4.5)

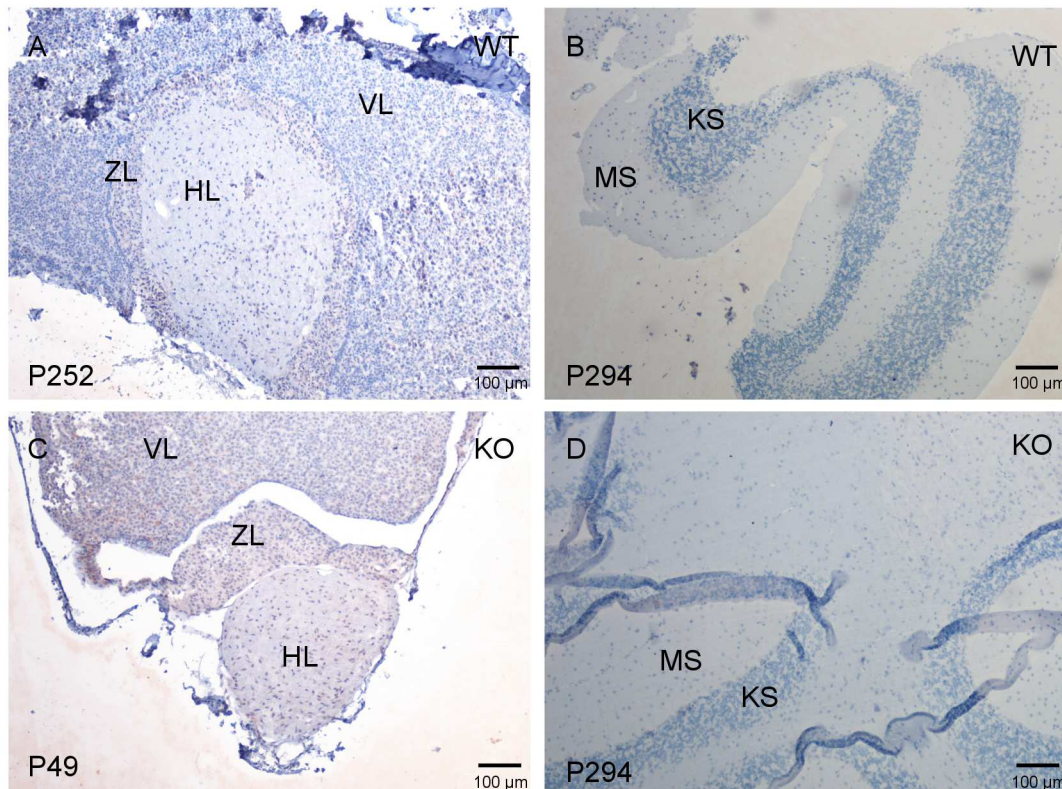


Abbildung 4.5: Immunhistochemische Untersuchung der CEACAM16-Expression in der Hypophyse und im Kleinhirn der Maus.

Hypophysen- (A, C) und Kleinhirn-Schnitte (B, D) von adulten *Ceacam16<sup>+/+</sup>*- (A, B) und *Ceacam16<sup>-/-</sup>*-Mäusen (C, D) wurden mit dem CEACAM16-Antikörper 9D5 immunhistologisch gefärbt. A und C zeigen je einen Schnitt aus der Hypophyse mit allen Lappenanteilen. B und D zeigen exemplarisch eine Windung aus dem Kleinhirn mit Rinden- und Markanteilen. Nach einem Vergleich mit Schnitten von *Ceacam16<sup>-/-</sup>*-Mäusen (C, D) konnte eine spezifische Färbung bei *Ceacam16<sup>+/+</sup>*-Mäusen (A, B) ausgeschlossen werden. Untersucht wurden jeweils fünf Hypophysen von fünf Wildtyp- (WT) und fünf *Knock-out*-Mäusen (KO) sowie jeweils drei Kleinhirne von drei Wildtyp- und drei *Knock-out*-Mäusen. HL, Hinterlappen; KS, Körnerschicht; KO, *Knock-out*-Maus; MS, Molekularschicht; P, *post partum* (Alter in Tagen); VL, Vorderlappen; WT, Wildtyp-Maus; ZL, Zwischenlappen.

## 4 Ergebnisse

Das Kleinhirn liegt in der hinteren Schädelgrube und wird nach vorne durch das Kleinhirnzelt, eine Duplikatur der *Dura mater*, vom Großhirn abgetrennt. Makroskopisch lässt sich das Kleinhirn in den Wurm (*Vermis*) und die beiden Hemisphären seitlich des Wurms einteilen. Mikroskopisch gibt es ähnlich wie beim Großhirn außen eine nervenzellhaltige Schicht, die Rinde, innen, das Mark, besteht nur aus Nervenfaserverbindungen. Innerhalb der Rinde lassen sich drei Schichten unterscheiden, die fünf unterschiedliche Zelltypen enthalten. Ganz außen die Molekularschicht mit Korb- und Sternzellen, anschließend die dünne Purkinjezellschicht und ganz innen die Körnerschicht mit Körner- und Golgizellen.

Die Hypophyse ist bei der Maus aus drei Schichten aufgebaut. Der Hinterlappen entspricht der Neurohypophyse und besteht hauptsächlich aus Nervenfasern, während der Vorder- und der Zwischenlappen der Adenohypophyse zugeordnet wird.

Weder im Kleinhirn noch in der Hypophyse konnte eine eindeutige Färbung mit Hilfe des CEACAM16-Antikörpers nachgewiesen werden. Da keine CEACAM16-positiven Zellen in beiden Organen identifiziert werden konnten, wurden hierzu keine weiteren Untersuchungen gemacht und ausschließlich das Innenohr weiter betrachtet.

### 4.4 Hinweise auf die Funktion von CEACAM16 durch die veränderte Morphologie der Tektorialmembran bei *Ceacam16<sup>-/-</sup>*-Mäusen

Bei der Betrachtung der histologischen Schnitte von *Ceacam16<sup>+/+</sup>*-Mäusen fiel auf, dass sich die Tektorialmembran während der Präparation wahrscheinlich aufgrund ihrer Elastizität häufig von den äußeren Haarzellen ablöste (Abbildung 4.6 A, C, F). Dieses Phänomen war allerdings nicht durchgehend zu beobachten (Abbildung 4.6 B). Bei *CEACAM16<sup>-/-</sup>*-Mäusen blieb diese Ablösung dagegen meist aus (Abbildung 4.6 E). Gelegentlich wurde auch bei diesen Mäusen eine Ablösung der Tektorialmembran beobachtet (Abbildung 4.6 D).



## 4 Ergebnisse

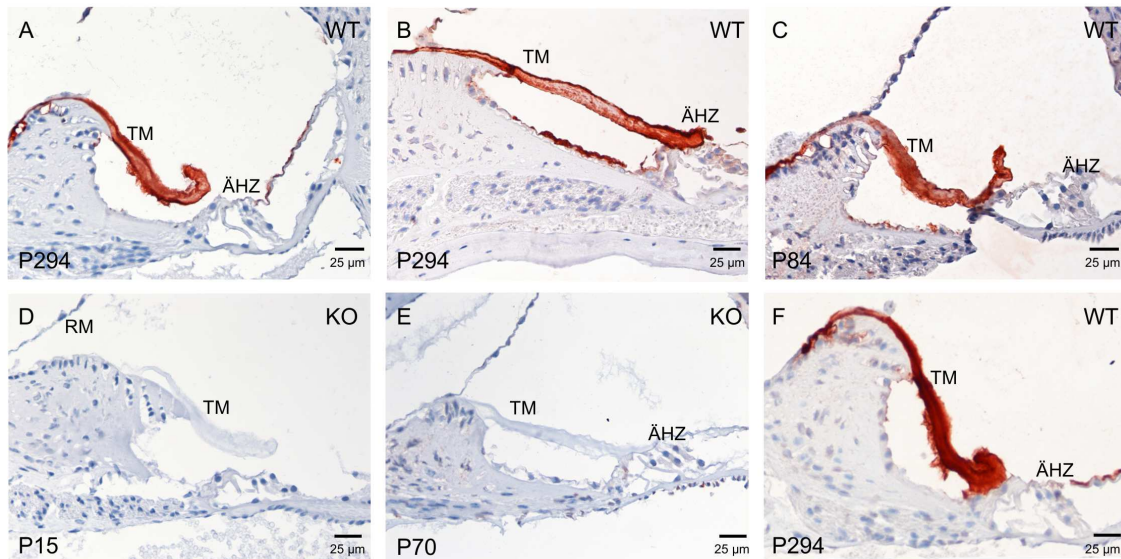


Abbildung 4.6: Unterschiedliche räumliche Lage der Tektorialmembran in histologischen Schnitten in *Ceacam16*<sup>+/+</sup>- und *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Die Präparation der *Cochleae*, Fixierung in gepuffertem Formaldehyd und anschließende Dekalzifizierung sowie die immunhistologische CEACAM16-Färbung erfolgten wie in *Material und Methoden* beschrieben. In den meisten Fällen erschien die Tektorialmembran (TM) des Wildtyps (WT) zusammengezogen und von den äußeren Haarzellen losgelöst (A, C, F), gelegentlich bestand der Kontakt mit den äußeren Haarzellen weiter (B). In *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen berührte die Tektorialmembran die äußeren Haarzellen (E), jedoch fanden sich auch Präparate, bei denen sich die Tektorialmembran von den äußeren Haarzellen abgelöst hatte (D). Nach Ablösung der Tektorialmembran von den äußeren Haarzellen erfolgte manchmal nach dem Zusammenziehen eine Anlagerung an andere Strukturen (C, F). Diese Fälle wurden in der statistischen Auswertung „berührt ÄHZ nicht“ zugeordnet. ÄHZ, äußere Haarzellen; KO, *Knock-out*-Maus; P, *post partum* (Alter in Tagen); TM, Tektorialmembran; WT, Wildtyp-Maus.

Die Position der Tektorialmembran in den histologischen Schnitten wurde in zwei Gruppen eingeteilt (Tabelle 4.1). Die erste Gruppe zeigte eine kontrahierte Tektorialmembran ohne Kontakt zu den äußeren Haarzellen (TM berührt ÄHZ, nein), die zweite Gruppe eine ausgestreckte Tektorialmembran mit direktem Kontakt zu den Haarzellen (TM berührt ÄHZ, ja). Erstere Kategorie beinhaltet auch Proben, bei denen die Tektorialmembran sich an andere Strukturen anlagerte (siehe Abbildung 4.6 C, F). Eine Auswertung von acht Wildtyp- (von insgesamt fünf Mäusen) und sieben *Knock-out-Cochleae* (von insgesamt vier Mäusen) zeigte eine statistisch signifikante Korrelation ( $p=0,0003$ , Chi-Quadrat-Test) des kontrahierten/abgelösten Phänotyps der Tektorialmembran mit dem Wildtyp-Genotyp (Tabelle 4.1).

## 4 Ergebnisse

Tabelle 4.1: Korrelation des kontrahierten Tektorialmembran-Phänotyps mit dem *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Genotyp

	Tektorialmembran berührt äußere Haarzellen	
	Ja	Nein
<i>Ceacam16</i> <sup>-/-</sup>	11	5
<i>Ceacam16</i> <sup>+/+</sup>	2	19

Anzahl der Tektorialmembranen bei *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen und *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen, welche die äußeren Haarzellen berühren bzw. nicht berühren. Es wurden acht *Cochleae* von fünf Wildtyp- und sieben *Cochleae* von vier *Knock-out*-Mäusen untersucht. Es zeigte sich, dass bei den *Knock-out*-Mäusen 11-mal die äußeren Haarzellen berührt wurden und 5-mal nicht. Bei den Wildtyp-Mäusen war die Tektorialmembran 19-mal abgelöst und nur 2-mal berührte die Tektorialmembran die äußeren Haarzellen. Exakt-Test nach Fisher (Chi-Quadrat-Test),  $p=0,0003$ .

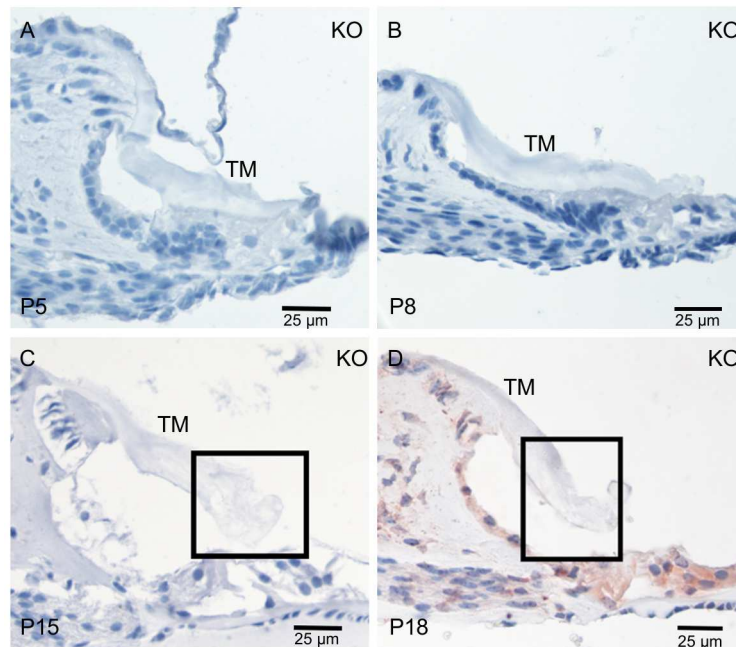


Abbildung 4.7: Löcher in der Tektorialmembran bei jungen *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen

Darstellung der Tektorialmembran bei jungen *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen unterschiedlichen Alters. Bei 5 und 8 Tage alten Mäusen stellt sich die Tektorialmembran unverändert dar (A, B). Ab einem Alter von 15 Tagen konnten vermehrt Löcher im mittleren Teil der Tektorialmembran beobachtet werden (C, D, eingerahmte Bereiche). Bei *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen zeigten sich keine Löcher (Abbildung 4.4, 4.10). KO, Knock-out; P, *post partum*; TM, Tektorialmembran.

Weiterhin fiel auf, dass die Tektorialmembran bei *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen vermehrt Löcher aufwies (Abbildung 4.4). Dies konnte an mehreren Schnitten bei vier von sechs erwachsenen

## 4 Ergebnisse

*Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen und bei einer 15 Tage alten sowie einer 18 Tage alten *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Maus beobachtet werden. Die Löcher befanden sich vor allem im mittleren Bereich der Tektorialmembran (Abbildung 4.7 C, D Kasten). Bei den 5, 8, 10 und 12 Tage alten Mäusen konnten keine Löcher in der Tektorialmembran gefunden werden (Abbildung 4.7 A, B und nicht gezeigt). Sie stellte sich ähnlich dar wie bei den *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Struktur der Tektorialmembran durch den Verlust von CEACAM16 verändert.

### 4.5 *Ceacam16*-Expression während der Entwicklung der Maus

Da sich die Tektorialmembran der Maus vor allem während der Embryonalzeit etwa ab Tag 15 und der ersten Lebensstage bildet (Maeda et al., 2001), wurden *Cochleae* von jungen Mäusen im Alter von 5, 8, 10, 12, 15 und 18 Tagen entnommen und sowohl mittels Endpunkt- und quantitativer PCR als auch immunhistochemisch untersucht. Um den frühesten Zeitpunkt der *Ceacam16*-Expression einzugrenzen, wurden zunächst *Cochleae* von 5, 8 und 15 Tage (P5, P8, P15; P: *post partum*) alten Wildtyp-Mäusen mittels Endpunkt PCR analysiert.

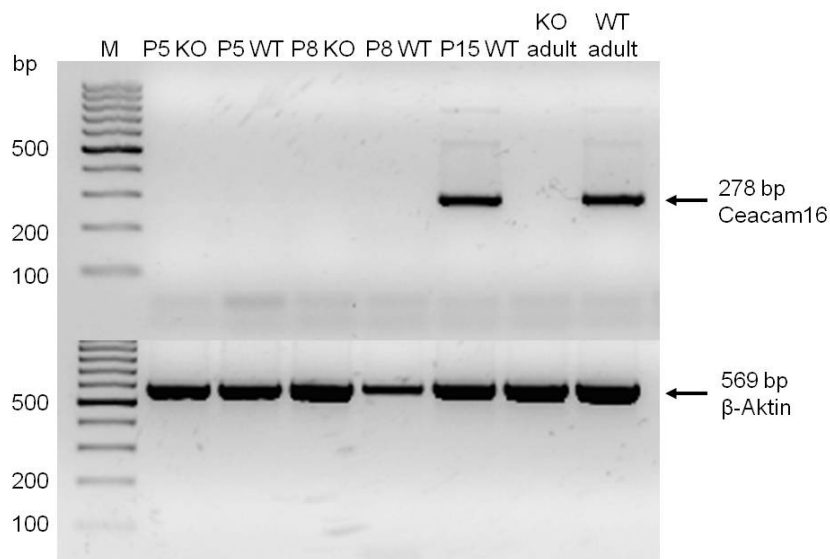


Abbildung 4.8: Eingrenzung des Zeitpunkts der *Ceacam16*-Gen-Anschaltung in jungen Mäusen.

Mittels Endpunkt-PCR konnte die *Ceacam16*-mRNA nur bei 15-Tage alten (P15) und erwachsenen *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen in *Cochlea*-RNA nachgewiesen werden. Jüngere sowie *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen keine *Ceacam16*-mRNA auf. Die  $\beta$ -Aktin-cDNA-Amplifikation erfolgte zur Kontrolle der Intaktheit der RNA. KO, *Knock-out*-Maus; M, Marker; P, *post partum*; WT, Wildtyp-Maus.



## 4 Ergebnisse

*Ceacam16*-RNA konnte zuerst in *Cochleae* 15 Tage alter *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäuse nachgewiesen werden. Bei jüngeren Mäusen (5 und 8 Tage alt) zeigte sich kein Amplifikationsprodukt (Abbildung 4.8).

Um Hinweise auf eine mögliche Interaktion von CEACAM16 mit anderen Proteinen der *Cochlea* oder mit den Stereozilien der äußeren Haarzellen zu erhalten, wurde mit Hilfe von quantitativer PCR zusätzlich zu *Ceacam16*-RNA auch die RNA von *Tecta* ( $\alpha$ -Tectorin) und *Strc* (Stereocilin) untersucht (Abbildung 4.9). Die Expression von *Ceacam16* startete um Tag 10 nach Geburt und erreichte ihr Maximum etwa um Tag 13. Auffällig war hier, dass die mRNA-Produktion auf ungefähr halbmaximalen Niveau bis ins Erwachsenenalter weiter anhielt. Im Gegensatz dazu hatte *Tecta* sein Expressionsmaximum vor oder am Tag 5 nach Geburt und fiel anschließend bis zu Tag 18 deutlich ab. Bei erwachsenen Mäusen waren nur noch geringe Mengen nachweisbar. *Strc* wurde während dem analysierten Zeitrahmen nur marginal exprimiert.

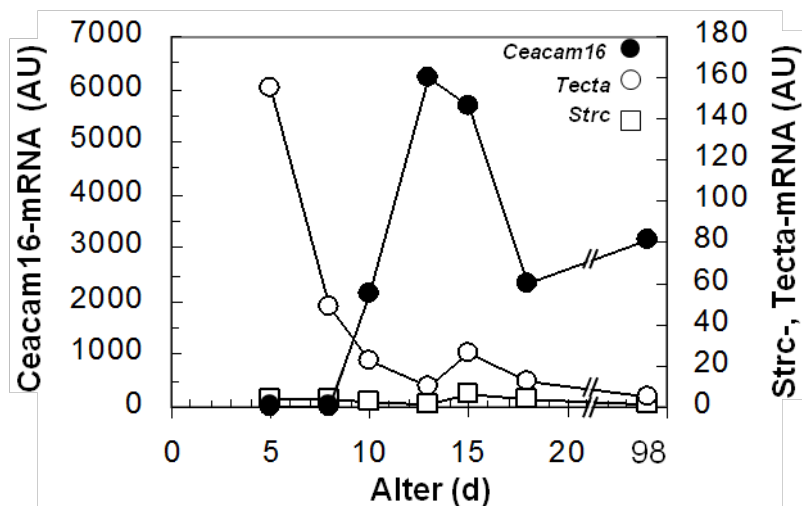


Abbildung 4.9: Expression von *Ceacam16*,  $\alpha$ -Tectorin (*Tecta*) und Stereocilin (*Strc*) in jungen Mäusen.

Die Expression der drei cochlearen Gene wurde mittels quantitativer RT-PCR in *Cochlea*-RNA bestimmt. *Ceacam16*-cDNA kann das erste Mal in cDNA von 10 Tage alten Mäusen nachgewiesen werden. Ihr Maximum erreicht sie um Tag 13. Zu diesem Zeitpunkt können nur noch minimale Mengen von *Tecta*- und *Strc*-mRNA nachgewiesen werden. Man beachte, dass *Ceacam16* im Gegensatz zu *Tecta* und *Strc* auch im Erwachsenenalter noch exprimiert wird. Es wurden die relativen mRNA-Mengen nach Normierung mit  $\beta$ -*Aktin*-mRNA auf zwei unterschiedlichen Y-Achsen gegen das Alter in Tagen abgetragen. Es wurde für jede Alterstufe je eine Maus untersucht.

## 4 Ergebnisse

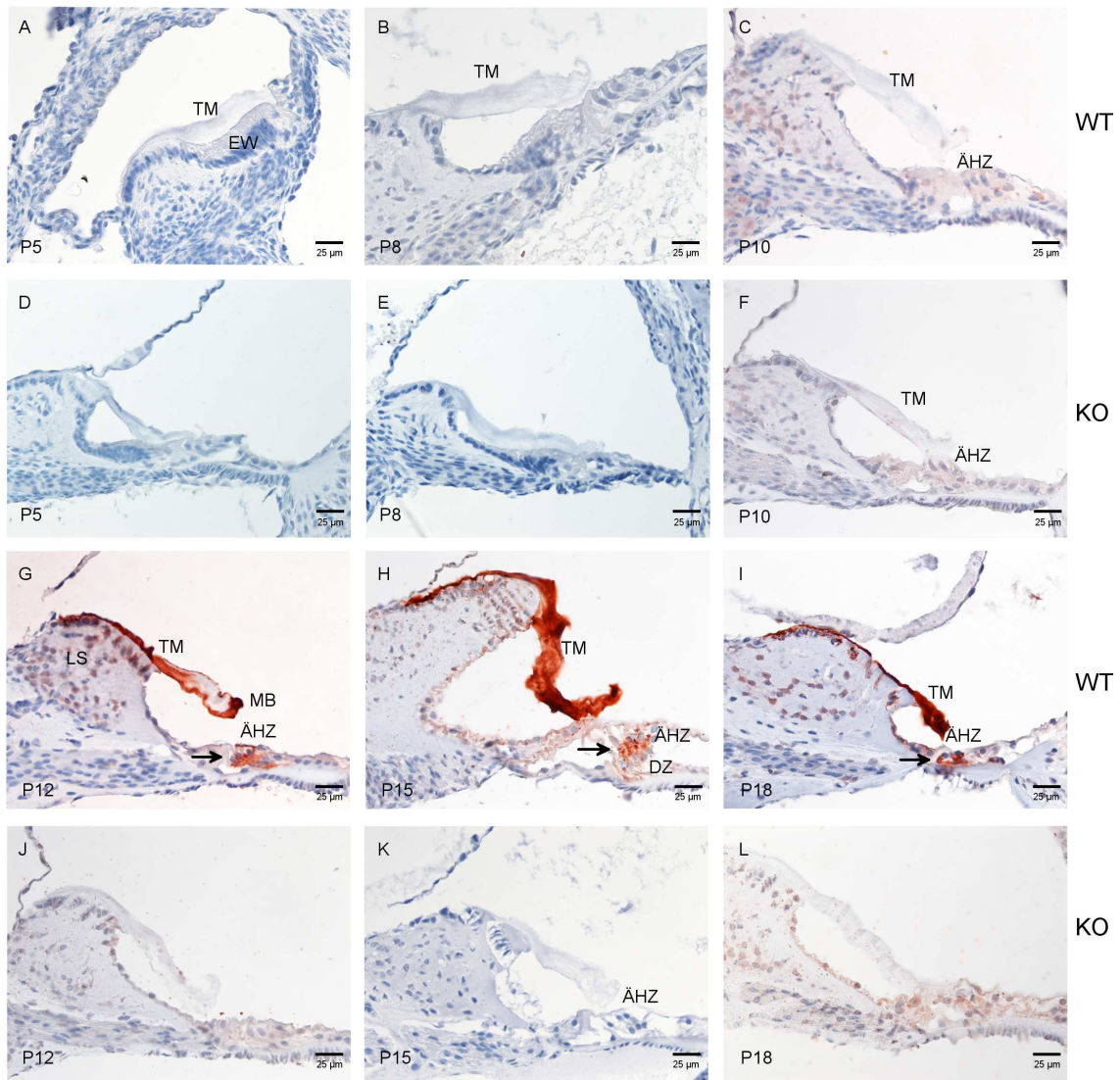


Abbildung 4.10: Postnatale Expression von CEACAM16 im Corti-Organ.

Die Expression von CEACAM16 wurde bei 5-18 Tage alten (P5-P18) *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen mittels Immunhistochemie mit dem monoklonalen humanen CEACAM16-Antikörper 9D5 untersucht (A-C, G-I). Als Negativ-Kontrolle wurden die passenden Schnitte von *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen gleichen Alters gefärbt (D-F, J-L). Eine Färbung wurde zuerst bei 12 Tage alten Mäusen gesehen. Hier färbte sich die Tektorialmembran (TM) einerseits an ihrem Ansatz vom *Limbus spiralis* (LS) her und andererseits vom marginalen Band (MB) her an. Der mittlere Teil der TM blieb frei (G). Zusätzlich sah man Färbungen in einigen Zellen des LS, in den äußeren Haarzellen (ÄHZ) bzw. den Deiters-Zellen (DZ, Pfeile), welche die Stützzellen der ÄHZ darstellen (G-I). In *Cochleae* von 15 und 18 Tage alten Mäusen zeigte sich eine durchgängige Färbung der TM, ähnlich der Färbung bei erwachsenen Mäusen. ÄHZ, äußere Haarzellen; DZ, Deiters-Zellen; EW, Epithelwall; KO, *Knock-out*-Maus; LS, *Limbus spiralis*; MB, marginales Band; P, *post partum*; TM, Tektorialmembran; WT, Wildtyp-Maus.

## 4 Ergebnisse

Immunhistologische Untersuchungen zeigten, dass CEACAM16 in Cochleae von P5-, P8- und P10-Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte. Erst in Cochleae von P12-Mäusen wurde CEACAM16 an der Ansatzstelle der Tektorialmembran am *Limbus spiralis* und an der Unterseite sowie an der Spitze der Tektorialmembran gefunden (Abbildung 4.10). Der mittlere Teil der Tektorialmembran war noch ungefärbt. In P15- und P18-Cochleae zeigte sich die Tektorialmembran dann einheitlich gefärbt. Zusätzlich zeigte sich eine Färbung an den Interdentalzellen des *Limbus spiralis*, in den Deiters-Zellen und möglicherweise auch in den äußeren Haarzellen (Abbildung 4.10 G-I, Pfeile). Es wäre möglich, dass CEACAM16 von beiden Seiten aus in die Tektorialmembran einwandert. Dies würde den freien Mittelteil in der analysierten P12-Cochlea erklären.

Zur Kontrolle und zum Ausschluss von Hintergrundfärbung wurden jeweils die Schnitte von gleichaltrigen *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen analysiert.

### 4.6 Tecta-Expression in *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen

Um zu untersuchen, ob der Verlust des *Ceacam16*-Gens einen Einfluss auf den Einbau oder die Verteilung des  $\alpha$ -Tectorin-Proteins, eines der Hauptkomponenten der Nicht-Kollagenproteine der Tektorialmembran (Legan et al., 2000), hat, wurden Schnitte von Cochleae von *Ceacam16*<sup>+/+</sup>- und *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen murines  $\alpha$ -Tectorin gefärbt. Sowohl die Tektorialmembran der *Ceacam16*<sup>+/+</sup>- als auch der *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäuse färbte sich homogen für  $\alpha$ -Tectorin an. Es zeigte sich keinerlei Unterschied.

Wieder sichtbar ist die vermehrt löchrige Struktur der Tektorialmembran der *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Maus im Vergleich zur *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Maus (Abbildung 4.11 A, Pfeil).

## 4 Ergebnisse

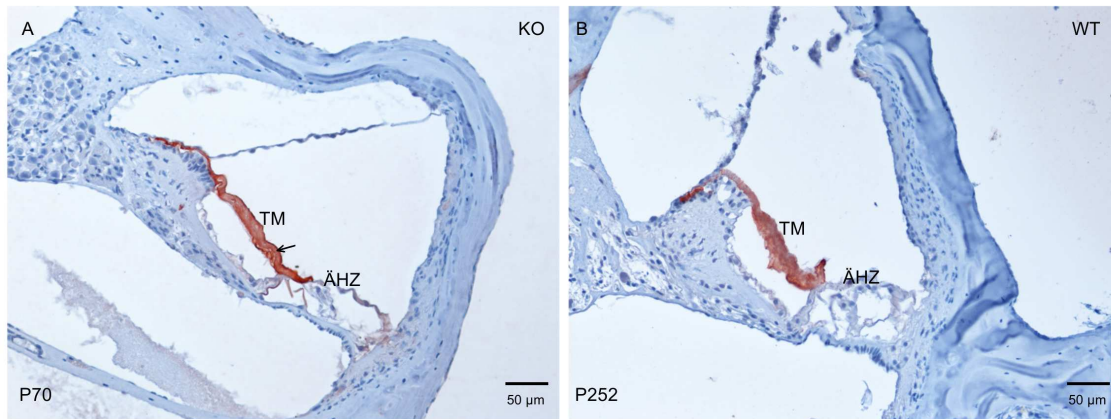


Abbildung 4.11: Der Verlust der *Ceacam16*-Expression verändert nicht die Einlagerung von  $\alpha$ -Tectorin in die Tektorialmembran.

Bei der Färbung der Tektorialmembran (TM) mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen murines  $\alpha$ -Tectorin zeigten sich keine Unterschiede zwischen *Ceacam16*<sup>+/+</sup>- und *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die TM färbte sich beides Mal durchgehend an. Auch hier wirkt die Matrix der TM der *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Maus vermehrt durchlöchert (A, Pfeil). Ein Wegfall von CEACAM16 führt somit zu keinerlei Beeinträchtigung des Einbaus von  $\alpha$ -Tectorin in die TM. Untersucht wurden jeweils zwei *Cochleae* von zwei Mäusen. ÄHZ, äußere Haarzellen; KO, *Knock-out*; P, *post partum* (Alter in Tagen); TM, Tektorialmembran; WT, Wildtyp.

### 4.7 Mutationssuche im humanen *CEACAM16*-Gen einer DFNA4-Familie

*CEACAM16* liegt im Bereich des DFNA4-Locus auf Chromosom 19q13. Diesem Locus wurden bisher Mutationen in *MYH14* zugeordnet (Familie Tü-N; Van Donaudy et al., 2004). In den letzten Jahren konnte bei zwei Familien mit bisher unbekannter Mutation, die dem DFNA4-Locus zugeordnet wurde, eine Mutation in *CEACAM16* gefunden werden (Zheng et al., 2011; Wang et al., 2015). Abbildung 4.12 zeigt den aktuellen Stand der bekannten Familien mit Genmutationen im DFNA4-Locus.

## 4 Ergebnisse

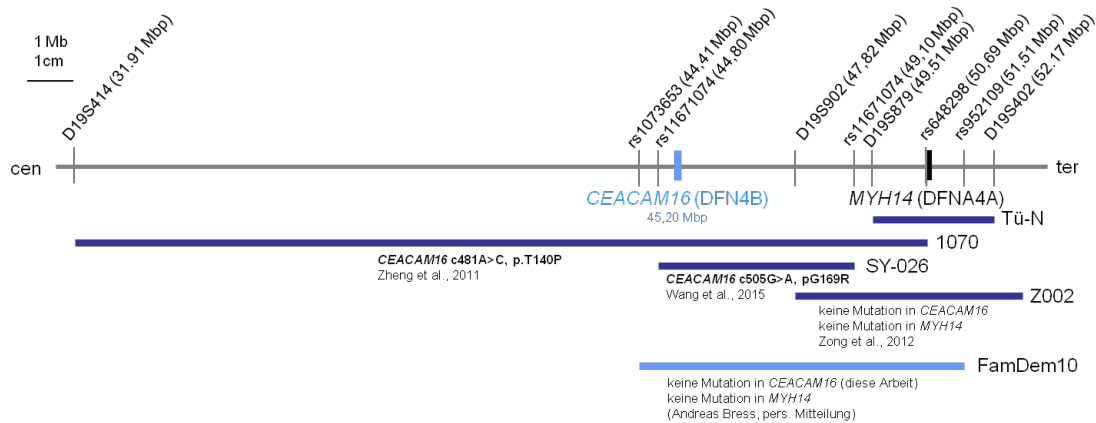


Abbildung 4.12: Darstellung des DFNA4-Locus.

Gezeigt ist eine Kartierung der bisher untersuchten Mutationen am DFNA4-Locus gezeigt. *CEACAM16* und *MYH14* liegen auf dem DFNA4-Locus, wobei eine Mutation in *MYH14* mit DFNA4A und in *CEACAM16* mit DFNA4B bezeichnet wird. Aufgeführt werden fünf Familien mit Genmutation im DFNA4-Locus, bei denen ein NSHL festgestellt wurde. Tü-N war die erste Familie, bei der eine Mutation im *MYH14*-Gen nachgewiesen werden konnte. Bei der amerikanischen Familie 1070 sowie bei der chinesischen Familie SY-026 konnte eine Mutation in *CEACAM16* gefunden werden. Sowohl bei der chinesischen Familie Z002 als auch bei der hier untersuchten deutschen Familie FamDem10 konnte keine Mutation in *CEACAM16* sowie in *MYH14* festgestellt werden. Die *single nucleotide polymorphisms* (oberhalb der Gen-Loci angegeben) begrenzen die durch genetische Kopplungsanalyse bestimmten Bereiche (blaue Balken), in denen das betroffene Gen liegen muss.

Um zu untersuchen, ob der Hördefekt der deutschen Familie FamDem10 auf einer Mutation in *CEACAM16* beruht, wurden die Exonsequenzen des *CEACAM16*-Gens von drei Familienmitgliedern, die eine Einschränkung des Hörvermögens hatten, bestimmt (Abbildung 4.12). Zusätzlich wurde auch die DNA gesunder Familienmitglieder als Kontrolle untersucht. Der Hördefekt der Familie wurde zuvor dem DFNA4-Locus zugeordnet. Es wurden, wie in Abbildung 4.13 dargestellt, sechs Abschnitte sequenziert. Diese umfassten Exon 1-6 mit den flankierenden Intronsequenzen. Es wurden vier SNPs gefunden, die allerdings keine Veränderungen im *CEACAM16* hervorrufen. Eine Mutation von *CEACAM16* als Ursache für den NSHL konnte somit ausgeschlossen werden. Leider konnte trotz mehrmaligem Nachfragen nicht mehr herausgefunden werden, wie sich der Phänotyp des NSHL in der Familie FamDem10 darstellt und ob *MYH14* tatsächlich als Kandidatengen ausgeschlossen worden war.

## 4 Ergebnisse

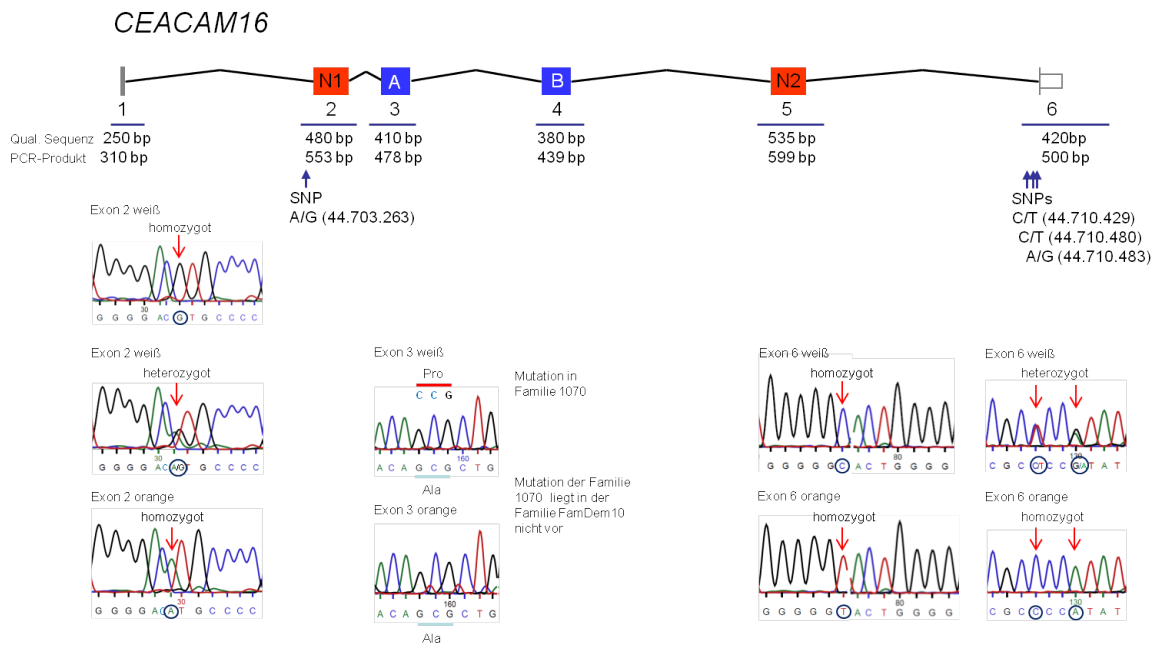


Abbildung 4.13: Mutationssuche in *CEACAM16*

Darstellung von *CEACAM16* und der jeweils mittels PCR bestimmten Sequenzen. Es wurden Proben von drei erkrankten (orange) und drei gesunden Familienmitgliedern (weiß) untersucht. Dargestellt sind hier Sequenzen mit Auffälligkeiten aus Exon 2 und 6 sowie eine Sequenz aus Exon 3, in welcher die Mutation der amerikanischen Familie 1070 vorliegt. Es wurden vier SNPs gefunden, die jedoch weder mit dem Hördefekt segregierten, noch eine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz hatten, da sie alle außerhalb von Exonsequenzen lagen. SNP, *single nucleotide polymorphism*.

# 5 Diskussion

## 5.1 CEACAM16 ist Bestandteil der Tektorialmembran

Durch die immunhistochemische Untersuchung von *Cochleae* mit einem CEACAM16-Antikörper von *Ceacam16*<sup>+/+</sup>- und *Cacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte gezeigt werden, dass *Ceacam16* hochselektiv im Innenohr exprimiert wird. CEACAM16 konnte hier in der Tektorialmembran sowie in den Stützzellen der äußeren Haarzellen, den Deiters-Zellen, und den Interdentalzellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.4 und 4.10). Kammerer et al. (2012) bestätigten dies durch in situ Hybridisierungsexperimente an Rattencochleae und Immunfluoreszenzanalysen mit spezifischen Antikörpern für Deiters- sowie äußere Haarzellen. Ebenso zeigte sich eine Färbung der *Macula sacculi*.

Die Tektorialmembran bildet zusammen mit den äußeren Haarzellen und der Basilarmembran den Verstärker des Hörorgans. Bei Störungen des Verstärkers erhöht sich die Hörschwelle in Säugetieren um etwa 50-60 dB (Ryan und Dallos, 1975). Dass CEACAM16 ein Bestandteil des Verstärkerorgans ist, bestätigten auch spezielle Höruntersuchungen an *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Diese wiesen eine erhöhte Hörschwelle für hohe und tiefe Frequenzen auf (Kammerer et al., 2012). Neben dem Hörverlust konnte bei *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen kein anderer Phänotyp festgestellt werden. Das Fehlen von CEACAM16 im Gleichgewichtsorgan sowie im Kleinhirn und in der Hypophyse scheint somit keine größeren Auswirkungen zu haben.

Zheng et al. (2011) vertraten die Hypothese, dass CEACAM16 das Bindeglied zwischen den Stereozilien der äußeren Haarzellen und  $\alpha$ -Tectorin in der Spitze der Tektorialmembran ist und von den äußeren Haarzellen sezerniert wird. Kammerer et al. (2012) wiesen CEACAM16 jedoch mit Immunfluoreszenz in den Deiters-Zellen nach. In den äußeren Haarzellen selbst fanden sie kein Nachweis von CEACAM16. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Tektorialmembran der erwachsenen *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäuse homogen und durchgängig mit dem *Ceacam16*-Antikörper angefärbt wird, während sich keine Färbung in *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte. Die durchgängige Färbung der Tektorialmembran deutet darauf hin, dass CEACAM16 eine Aufgabe in der gesamten Tektorialmembran, nicht nur an der

## 5 Diskussion

Spitze hat. Auch konnte gezeigt werden, dass die Tektorialmembran bei der Präparation und Fixierung von *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäusen häufiger an den äußeren Haarzellen angeheftet blieb als bei *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäusen (Abbildung 4.6; Tabelle 4.1). Es wäre möglich, dass CEACAM16 die Elastizität der Tektorialmembran beeinflusst, möglicherweise durch Vernetzung der großen Proteine der Tektorialmembran, wie z.B.  $\alpha$ -Tectorin. Somit könnte CEACAM16 ein Bestandteil der Struktur sein, die in der englischen Literatur *striated sheet matrix* genannt wird. Die Tektorialmembran besteht zum einen aus Kollagenfibrillen, die in eine Matrix eingebettet sind, welche im Elektronenmikroskop gestreift erscheint. Sie besteht aus etwa 7 nm breiten, abwechselnd dunkel und hell scheinenden Fibrillen (Hasko und Richardson, 1988).  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tectorin sind die Hauptkomponenten der *striated sheet matrix*. Fehlt einer dieser beiden Komponenten, kann sich diese Struktur nicht ausbilden (Legan et al., 2000; Russell et al., 2007). CEACAM16 könnte ein Bestandteil dieser *striated sheet matrix* sein, da es sowohl mit  $\alpha$ -Tectorin (Zheng et al., 2011) und mit  $\beta$ -Tectorin (Cheatham et al., 2014) als auch mit sich selbst interagieren kann und möglicherweise Oligomere ausbildet, welche über Disulfidbrücken stabilisiert werden (Kammerer et al., 2012). Dafür spricht auch, dass die Tektorialmembran der *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäuse sich mikroskopisch löchriger darstellt als die der *Ceacam16*<sup>+/+</sup>-Mäuse (diese Arbeit und Cheatham et al., 2014). Vorstellbar wäre, dass CEACAM16 die dunklere der Fibrillen ausbildet bzw. die Verbindung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tectorin darstellt und damit zur Stabilisierung der *striated sheet matrix* beiträgt. Allerdings führt das Fehlen von CEACAM16 nicht zu einem verminderten Einbau oder Fehlen von  $\alpha$ -Tectorin (Abbildung 4.11).

Passend zu diesen Ergebnissen zeigten Cheatham et al. 2014, dass bei Mäusen mit einer *Ceacam16*-Nullmutation die *striated sheet matrix* nicht ausgebildet wird und die Menge von  $\beta$ -Tectorin reduziert ist, während die Menge von  $\alpha$ -Tectorin normal bleibt. Auch wird der Hensen-Streifen, eine Verdickung im vorderen Drittel der Tektorialmembran, nicht ausgebildet (Cheatham et al., 2014). Dies und die fehlende *striated sheet matrix* könnten die erhöhte Hörschwelle der *Ceacam16*<sup>-/-</sup>-Mäuse erklären.

CEACAM16 wird im Vergleich zu  $\alpha$ -Tectorin relativ spät in die Tektorialmembran eingebaut. Der mRNA-Spiegel von *Tecta* fällt nach der Geburt schnell ab (Abbildung 4.9) bis um P22 keine mRNA mehr nachweisbar ist (Rau et al., 1999). Dagegen beginnt die *Ceacam16*-mRNA-Expression um P10 und erreicht um P15 ihren Hochpunkt (Abbildung 4.9). Die erste Anfärbung der Tektorialmembran für CEACAM16 konnte um P12 beobachtet werden, eine Durchfärbung wurde jedoch erst um P15-18 beobachtet (Abbildung 4.10). Der Einbau von CEACAM16 in die Tektorialmembran erfolgt somit von der proximalen und distalen Seite der Tektorialmembran aus. Hier besteht der Kontakt mit den C16-positiven Zellen: den Interden-



talzellen sowie den Deiters-Zellen. Möglich wäre auch eine Diffusion von CEACAM16 über den *Sulcus spiralis internus*. Dies würde die zuerst auftretende basale Färbung der Tektorialmembran erklären.

Weiterhin zeigten sich Unterschiede in der Anfärbung zwischen den basalen und den apikalen Abschnitten der *Cochlea*. Es ist anzunehmen, dass CEACAM16 zuerst in den basalen Abschnitten in die Tektorialmembran eingebaut wird und erst später in den apikalen Abschnitten. So gab es zum Zeitpunkt P15 in histologischen Schnitten noch nicht homogen mit dem anti-CEACAM16-Antikörper gefärbte Tektorialmembranen. Während im apikalen Bereich der *Cochlea* nur wenig CEACAM16 nachweisbar war, war die Durchfärbung in den basalen Abschnitten bereits deutlich zu erkennen. Es ist davon auszugehen, dass der Einbau von CEACAM16 in die Tektorialmembran in den basalen Windungen beginnt und anschließend bis in die apikalen Abschnitte voranschreitet.

Eine strukturelle Analyse der Tektorialmembran bei jungen *Ceacam16<sup>+/+</sup>*-Mäusen zeigt, dass vor P12 die Matrix aus einem ungeordneten Netzwerk aus Filamenten besteht, in welchem die Kollagenfibrillen parallel angeordnet sind (Cheatham et al., 2014). Um P14 beginnt sich die Matrix zu ordnen bis etwa um P16 die charakteristische *striated sheet matrix* erkennbar wird, etwa gleichzeitig mit dem Beginn des Hörens (Cheatham et al., 2014). Dazu passt auch, dass die Löcher in der Tektorialmembran bei *Ceacam16<sup>-/-</sup>*-Mäusen erst ab einem Alter von 15 Tagen auftreten. Davor ähnelt sich die mikroskopische Struktur von *Ceacam16<sup>-/-</sup>*- und *Ceacam16<sup>+/+</sup>*-Mäusen (Abbildung 4.7).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass CEACAM16 wichtig für die endgültige Reifung der Tektorialmembran ist und wahrscheinlich durch seine lebenslange Expression die Stabilität der Matrix aufrecht erhält.

## 5.2 Mutationen in *CEACAM16* können NSHL verursachen

2011 wurde die erste *CEACAM16*-Mutation bei einer amerikanischen Familie mit sensorineuralem, postlingualen, bilateralen und moderatem NSHL entdeckt (Zheng et al., 2011). Die Beschreibung des Phänotyps der Familie und die Zuordnung zum DFNA4-Locus erfolgte bereits 1995 durch Chen et al. Der Hörverlust beginnt im jugendlichen Alter mit einem Hörverlust von bis zu 50 dB bei den erwachsenen Familienmitgliedern ohne Einschränkungen des Gleichgewichtorgans. Da bei dieser Familie eine Beteiligung des DFNA4-Gens *MYH14* aufgrund der Lage der Bruchpunkte bei betroffenen Familienangehörigen ausgeschlossen werden

## 5 Diskussion

konnte, wurde von uns *CEACAM16* als Kandidatengen favorisiert. Leider war es uns nicht möglich trotz mehrerer Versuche die DNA betroffener Personen zuerst zu erhalten. In dieser Arbeit wurde daher die DNA einer deutschen Familie (FamDem10) untersucht. Auch hier leiden mehrere Familienmitglieder unterschiedlicher Generationen an einem NSHL und haben eine Mutation, die dem DFNA4-Locus zugeordnet werden konnte (Abbildung 4.13). Laut mündlicher Aussage eines Mitarbeiters des bereitstellenden Instituts, war zuvor eine Mutation in *MYH14* ausgeschlossen worden.

Nach Durchführung der Sequenzierung und eingehenden Untersuchung der Ergebnisse mussten wir eine Mutation im *CEACAM16*-Gen ausschließen. Leider konnte die mündliche Aussage zum Ausschluss von *MYH14* beim Abschluss der Arbeit nicht mehr bestätigt werden, da der entsprechende Mitarbeiter inzwischen das Institut verlassen hatte. Daher kann keine endgültige Aussage dazu getroffen werden, ob hier von einem dritten unbekanntem Hördefekt-Gen im DFNA4-Locus (DFNA4C) ausgegangen werden muss.

Dafür sprechen könnte, dass 2012 bei einer chinesischen Familie eine Mutation im DFNA4-Locus identifiziert werden konnte, die ebenfalls weder *CEACAM16* (DFNA4B) noch *MYH14* (DFNA4A) zugeordnet werden konnte (Zong et al., 2012). Der Phänotyp der Familie ähnelt dem, der amerikanischen Familie mit einem postlingualen, bilateralen sensorineuralen Hörverlust. Allerdings war hier der Hörverlust stärker ausgeprägt, betraf alle Frequenzen und führte zu einer starken Einschränkung der Sprachdiskrimination (Zong et al., 2012). Auch das könnte auf ein weiteres unbekanntes Hördefekt-Gen auf dem DFNA4-Locus hinweisen.

In diesem Jahr wurden zwei weitere Mutationen in *CEACAM16* gefunden. Bei der chinesischen Familie (SY-026) entspricht der Phänotyp wieder weitgehend den vorherig beschriebenen: Ein bilateraler, postlingualer sensorineuraler NSHL, der mit dem Alter zunimmt, zuerst hohe Frequenzen betrifft und sich dann auf alle Frequenzen ausweitet (Wang et al., 2015). Auffällig war hier, dass die betroffenen Familienmitglieder zu Beginn an einem hochfrequenten Tinnitus litten (Wang et al., 2015). Die Mutation führte zu einer verminderten Sekretion von *CEACAM16* und verhinderte die Vernetzung von *CEACAM16* untereinander (Wang et al., 2015).

Zum Zweiten wurde erst kürzlich über eine De-novo-Mutation in *CEACAM16* bei einem 11-jährigen Jungen berichtet. In seiner Familie sind keinerlei genetischen Hördefekte bekannt. Es wurde erneut ein moderater, bilateraler, sensorineuraler Hörverlust über alle Frequenzen diagnostiziert (Hofrichter et al., 2015). Ob dieser Hörverlust mit dem Alter zunimmt, muss erst beobachtet werden. Auffällig war hier, dass der Junge in den Jahren zuvor über vermehrte Lautstärkeempfindlichkeit und Kopfschmerzen berichtete (Hofrichter et al., 2015). Bei der Mutation handelt es sich um eine Leucin-Arginin-Substitution in der hochkonser-

vierten N2-Domäne von CEACAM16 (Hofrichter et al., 2015). Da die N2-Domäne mit sich selbst interagieren kann und möglicherweise die Bindung an  $\alpha$ - und/oder  $\beta$ -Tectorin vermittelt (Kammerer et al., 2012), könnte diese Mutation diese Interaktionen und damit die Ausbildung der *striated sheet matrix* verhindern.

### 5.3 Ausblick

Die Tektorialmembran nimmt als Teil des Verstärkersystems eine wichtige Rolle im Corti-Organ ein. Der Dynamikbereich des von uns wahrnehmbaren Schalls umfasst etwa 130 dB. Damit die mikromechanischen Strukturen der *Cochlea* bei den höheren Schallpegeln nicht geschädigt werden, erfolgt am Trommelfell eine Dynamikkompression: So werden die 130 dB nur etwa mit einem Schalldruck von maximal 60 dB auf die *Cochlea* übertragen (Janssen, 2005). Damit das funktioniert, muss das Verstärkersystem bei kleinen Schallpegeln mehr verstärken als bei höheren (Nichtlinearität der Verstärkung). So spielt diese Verstärkung bei Schallpegeln bis zu 40 dB eine große Rolle. Zwischen 40-80 dB erfolgt eine sogenannte Sättigung und ab 80 dB wird die Verstärkung nicht mehr benötigt (Preyer, 1996).

In den letzten Jahren wurde viel über die Funktion der Tektorialmembran herausgefunden (Richardson et al., 2008, Richter et al., 2007, Lukashkin et al., 2010). Während sie ursprünglich nur für eine unbewegliche, passive Platte gehalten wurde, gegen welche sich die Haarzellen bewegen können (Davis, 1965), weiß man heute, dass sie eine aktive Rolle in der Verstärkung spielt (Lukashkin et al., 2010). So verstärkt die Tektorialmembran zusammen mit den äußeren Haarzellen die Schwingung der Basalmembran aktiv vor allem bei niedrigen Schallpegeln in der Nähe der charakteristischen Frequenz (Kössl und Russell, 1992).

Schon länger bekannt ist, dass die Flüssigkeitsbewegung im subtektorialen Raum eine wichtige Rolle bei der Erregung der inneren Haarzellen spielt (Sellik und Russell, 1980). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Tektorialmembran auch hier eine wichtige Rolle spielt. Bei transgenen Mäusen mit einer *Missense*-Mutation in *Tecta* wurde eine verminderte neurale Antwort der inneren Haarzellen festgestellt (Legan et al., 2005). Bei diesen Mäusen beobachtet man einen vergrößerten subtektorialen Raum und einen verkleinerten Hensen-Streifen. Es besteht die Vermutung, dass dieser eine wichtige Rolle bei der Verstärkung der Flüssigkeitsbewegungen im subtektorialen Raum spielt (Steele und Pruria, 2005). Bisher wurde angenommen, dass diese Flüssigkeitsbewegungen hauptsächlich durch Scherbewegungen zwischen der *Lamina reticularis* und der Tektorialmembran entstehen (Freeman und Weiss, 1990). Neuere Erkenntnisse zeigten, dass auch die Elektromotilität der äußeren Haarzellen einen Einfluss auf die Flüssigkeitsbewegungen hat (Nowotny und Gummer, 2006).

## 5 Diskussion

Die Verkürzung der äußeren Haarzellen bewirkt eine entgegengesetzte Bewegung der Tektorialmembran und der *Lamina reticularis*, die zu einer Flüssigkeitsbewegung im subtektorialen Raum und somit zu einer Abknickung der Stereozilien der inneren Haarzellen führt (Chiaradia et al., 2009).

Die Erkenntnisse der letzten Jahre zeigen, dass die Tektorialmembran für die feine Frequenzauflösung in der *Cochlea* sorgt. Sie erhöht die Sensitivität bei niedrigen Schallpegeln und reguliert die Antwort der *Cochlea* bei hohen Schallpegeln. Dadurch wird ein hoher Dynamikbereich in der *Cochlea* ermöglicht. Trotzdem sind noch viele Mechanismen, die dieses Gleichgewicht ermöglichen unbekannt. Auch die Rolle des subtektorialen Raums ist noch weitgehend unverstanden. Weitere Forschung wird benötigt, um hier genauere Einblicke zu gewinnen und dadurch in der Zukunft weitere Therapiemöglichkeiten zu erhalten.

Eine Möglichkeit zur Behandlung einer monogenetischen Erkrankung wie ein Hörverlust durch eine Mutation in *CEACAM16* wäre die Gentherapie. Hier könnte am Mausmodell versucht werden, ein intaktes *CEACAM16* in die Zellen des Corti-Organs einzuführen. *CEACAM16* ist dabei im Gegensatz zu den anderen Proteinen der Tektorialmembran besonders geeignet, da es im Erwachsenenalter noch exprimiert und in die Tektorialmembran eingebaut wird. Auch beginnt der Hörverlust erst im jungen Erwachsenenalter. Hier wäre es möglich dem Funktionsverlust der Tektorialmembran entgegenzuwirken.

## 6 Zusammenfassung

CEACAM16 ist ein neu entdecktes hochkonserviertes Mitglied der CEACAM-Familie. Es hat ein sehr restriktives Expressionsmuster und wird hauptsächlich im Innenohr exprimiert. Zusätzlich konnten kleine Mengen in Kleinhirn und Hypophyse nachgewiesen werden. Die Funktion von CEACAM16 war bisher unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war, den genauen Expressionsort von *CEACAM16* im Innenohr zu bestimmen. Daraus sollten Rückschlüsse auf seine Funktion gezogen werden. Dazu wurden *Ceacam16-knock-out*-Mäuse entwickelt. Diesen und passenden Wildtyp-Mäusen wurden Innenohren entnommen, welche mit einem CEACAM16-Antikörper angefärbt und anschließend verglichen wurden. Zusätzlich wurde RNA aus der *Cochlea*, aus der Hypophyse und dem Kleinhirn extrahiert, deren *Ceacam16*-mRNA-Gehalt quantifiziert wurde. Zusätzlich wurden junge 5-18 Tage alte Mäuse (P5-P18) im Hinblick auf das erste Auftreten von CEACAM16 sowohl mittels Immunhistochemie als auch mittels quantitativer PCR untersucht.

Es zeigte sich, dass CEACAM16 ein Bestandteil der Glykoproteinmatrix der Tektorialmembran ist und von den Deiters-Zellen sowie den Interdentalzellen sezerniert wird. *Ceacam16*-mRNA konnte ab Lebenstag 10, CEACAM16-Protein erst ab Lebenstag 12, beobachtet werden. Die Expression von *CEACAM16* setzt sich im Gegensatz zu den anderen bekannten Proteinen der Tektorialmembran bis ins Erwachsenenalter fort. Somit dient CEACAM16 wahrscheinlich der lebenslangen Aufrechterhaltung der Stabilität der Tektorialmembran.

Die genaue Funktion von CEACAM16 ist noch nicht ausreichend geklärt. Dazu müssen in Zukunft weitere Untersuchungen zur Struktur und Interaktion mit den anderen Proteinen folgen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahmad, S., Chen, S., Sun, J., Lin, X. (2003): Connexins 26 and 30 are coassembled to form gap junctions in the cochlea of mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 307, 362-368.
- 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.
- Ballana, E., Ventayol, M., Rabionet, R., Gasparini, P., Estivill, X. (2015): Connexins and deafness Homepage. World wide web URL: <http://www.crg.es/deafness> (letzter Zugriff: 21.08.2015).
- Ballesta, A. M., Molina, R., Filella, X., Jo, J., Giménez, N. (1995): Carcinoembryonic antigen in staging and follow-up of patients with solid tumors. *Tumor Biol*, 16, 32-41.
- Beauchemin, N., Arabzadeh, A. (2013): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 32, 643-671.
- Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shiota, K., Stanners, C.P. (1989): Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*, 57, 327–334.
- Bitner-Glindzicz, M. (2002): Hereditary deafness and phenotyping in humans. *British Medical Bulletin*, 63, 73-94.
- Burke, W.F., Lenarz, T., Maier, H. (2013): Hereditäre Schwerhörigkeit. *HNO*, 61, 353-363.
- Chang, C. L., Semyonov, J., Cheng, P. J., Huang, S. Y., Park, J. I., Tsai, H. J., Lin, C. Y., Grützner, F., Soong, Y. K., Cai, J. J., Hsu, S. Y. (2013): Widespread divergence of the CEACAM/PSG genes in vertebrates and humans suggests sensitivity to selection. *PLoS One*, 16, 8(4), e61701.

- Cheatham, M. A., Goodyear, R. J., Homma, K., Legan, P. K., Korchagina, J., Naskar, S., Siegel, J. H., Dallos, P., Zheng, J., Richardson, G. P. (2014): Loss of the tectorial membrane protein CEACAM16 enhances spontaneous, stimulus-frequency, and transiently evoked otoacoustic emissions. *J Neurosci*, 34(31), 10325-10338.
- 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 Genet*, 4, 1073-1076.
- Chen, T., Grunert, F., Medina-Marino, A., Gotschlich, E. C. (1997): Several carcinoembryonic antigens (CD66) serve as receptors for gonococcal opacity proteins. *JExpMed*, 185, 1557-1564.
- Chen, W., Kahrizi, K., Meyer, N. C., Riazalhosseini, Y., Van Camp, G., Najmabadi, H., Smith, R. J. (2005): Mutation of COL11A2 causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the DFNB53 locus. *J Med Genet*, 42(10), e61.
- Chiaradia, C., Nowotny, M., Gummer, A. W. (2009): Deflection of IHC stereocilia in response to somatic OHC motility. In: Cooper, N. P., Kemp, D. T. (Hrsg.): Concepts and Challenges in the Biophysics of Hearing. *World Scientific Publishing Company*, New Jersey, London, Singapore, 283-287.
- Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Leibovici, M., Petit, C. (1997): Otogelin: a glycoprotein specific to the acellular membranes of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 14450-14455.
- Dallos, P., Wu, X., Cheatham, M. A., Gao, J., Zheng, J., Anderson, C. T., Jia, S., Wang, X., Cheng, W. H., Sengupta, S., He, D. Z., Zuo, J. (2008): Prestin-based outer hair cell motility is necessary for mammalian cochlear amplification. *Neuron*, 8, 58(3), 333-339.
- Davis, H. (1965): A model for transduction action in the cochlea. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 30, 181-190.
- Deans, M. R., Peterson, J. M., Wong, G. W. (2010): Mammalian Otolin: a multimeric glycoprotein specific to the inner ear that interacts with otoconial matrix protein Otoconin-90 and Cerebellin-1. *PLoS One*, 15, 5(9), e12765.
- 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.,

## 7 Literaturverzeichnis

- 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.
- Dveksler, G. S., Pensiero, M. N., Cardellicchio, C. C., 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(12), 6881-6891.
- Forge, A., Marziano, N. K., Casalotti, S. O., Becker, D. L., Jagger, D. (2003): The inner ear contains heteromeric channels composed of cx26 and cx30 and deafness-related mutations in cx26 have a dominant negative effect on cx30. *Cell Commun Adhes*, 10, 341-346.
- Forge, A., Jagger, D. J., Kelly, J. J., Taylor, R. R. (2013): Connexin30-mediated intercellular communication plays an essential role in epithelial repair in the cochlea. *J Cell Sci*, 126, 1703-1712.
- Freeman, D. M., Weiss, T. F. (1990): Hydrodynamic force on hair bundles at low frequencies. *Hear Res*, 48, 17-30.
- Friedman, L. M., Dror, A. A., Avraham, K. B. (2007): Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss. *Int J Dev Biol*, 51, 609–631.
- 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.
- Gordon, J. W., Ruddle, F. H. (1981): Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 11, 214(4526), 1244-1246.
- Gray-Owen, S. D., Blumberg, R. S. (2006): CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol*, 6, 433-446.
- Ha, C. T., Waterhouse, R., Wessells, J., Wu, J. A., Dveksler, G. S. (2005). Binding of pregnancy-specific glycoprotein 17 to CD9 on macrophages induces secretion of IL-10, IL-6, PGE2, and TGF-beta1. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(6), 948-957.
- Ha, C. T., Wu, J. A., Irmak, S., Lisboa, F. A., Dizon, A. M., Warren, J. W., Ergun, S., Dveksler, G. S. (2010): Human pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1 (PSG1) has a potential role in placental vascular morphogenesis. *Biol Reprod*, 83, 27-35.



## 7 Literaturverzeichnis

- Hammarström, S. (1999): The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Sem Canc Biol*, 9, 67-81.
- Hasko, J. A., Richardson, G. P. (1988): The ultrastructural organization and properties of the mouse tectorial membrand matrix. *Hear Res*, 35, 21-38.
- Hauck, C. R., Meyer, T. F., Lang, F., Gulbins, E. (1998): CD66-mediated phagocytosis of Opa<sub>52</sub> *Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway. *EMBO J*, 17, 443-454.
- Hildebrand, M. S., Morin, M., Meyer, N. C., Mayo, F., Modamio-Hoybjor, S., Mencia, A., Olavarrieta, L., Morales-Angulo, C., Nishimura, C. J., Workman, H. (2011): DFNA 8/12 caused by TECTA mutations is the most identified subtype of nonsyndromic autosomal dominant hearing loss. *Hum Mutat*, 32, 825-834.
- Hofrichter, M. A. H., Nanda, I., Gräf, J., Schröder, J., Shehata-Dieler, W., Vona, B., Haaf, T. (2015): A Novel de novo Mutation in *CEACAM16* Associated with Postlingual Hearing Impairment. *Mol Syndromol*, 6, 156-163.
- Horst, A. K., Ito, W. D., Dabelstein, J., Schumacher, U., Sander, H., Turbide, C., Brummer, J., Meinertz, T., Beauchemin, N., Wagener, C. (2006): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo . *J Clin Invest*, 116, 1596-1605.
- Jannssen, T. (2005): Diagnostik des kochleären Verstärkers mit DPOAE-Wachstumsfunktionen. *HNO*, 53:12, 121-133.
- Kammerer, R., Stober, D., Singer, B. B., Obrink, B., Reimann, J. (2001): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation. *J Immunol*, 166, 6537-6544.
- Kammerer, R., Zimmermann, W. (2010) Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families. *BMC Biol*, 8, 12.
- Kammerer, R., Rüttiger, L., Riesenberger, R., Schäuble, C., Krupar, R., Kamp, A., Sunami, K., Eisenried, A., Hennenberg, M., Gruner, F., Bress, A., Battaglia, S., Schrewe, H., Knipper, M., Schneider, M. R., Zimmermann, W. (2012): Loss of Mammal-specific Tectorial Membrane Component Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 16 (CEACAM16) Leads to Hearing Impairment at Low and High Frequencies. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 26, 21584-21598.

## 7 Literaturverzeichnis

- Kössl, M., Russell, I. J. (1992): The phase and magnitude of hair cell receptor potentials and frequency tuning in the guinea pig cochlea. *J Neurosci*, 12, 1575-1586.
- Krupar, R. (2012): Expressionsanalyse von *CEACAM16*, einem neu entdeckten Hörgen des Innenohrs. *Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München*.
- 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.
- Lee, S. J., Heinrich, G., Fedorova, L., Al-Share, Q. Y., Ledford, K. J., Fernstrom M. A., McInerney, M. F., Erickson, S. K., Gatto-Weis, C., Najjar, S. M. (2008): Development of nonalcoholic steatohepatitis in insulin-resistant liver-specific S503A carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 mutant mice. *Gastroenterology*, 135, 2084-2095.
- 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.
- Legan, P. K., Lukashkina, V. A., Goodyear, R. J., Kossi, 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. L., Lukashkina, V. A., goodyear, R. J., Lukashkin, A. N., Verhoeven, K., Camp, G. V., Russell, I. J., Richardson, G. P. (2005): A deafness mutation isolates a second role for the tectorial membrane in hearing. *Nat Neurosci*, 8, 1035-1042.
- Li, C., Chen, C. J., Shively, J. E. (2009): Mutational analysis of the cytoplasmic domain of CEACAM1-4L in humanized mammary glands reveals key residues involved in lumen formation: stimulation by Thr-457 and inhibition by Ser-461. *Exp Cell Res*, 315, 1225-1233.
- Liberman, M. C., Gao, J., He, D. Z., Wu, X., Jia, S., Zuo, J. (2002): Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature*, 419(6904), 300-304.

- Liu, X. Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., Cope, M. J., Steel, K. P., Brown, S. D. (1997A): Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genetics*, 16, 188-190.
- Liu, X. Z., Walsh, J., Tamagawa, Y., Kitamura, K., Nishizawa, M., Steel, K. P., Brown, S. D. (1997B): Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet.*, 7(3), 268-269.
- Lukashkin, A. N., Lukashkina, V. A., Legan, P. K., Richardson, G. P., Russell, I. J. (2004): Role of the tectorial membrane revealed by otoacoustic emissions recorded from wild-type and transgenic *Tecta* <sup>$\Delta$ ENT/ $\Delta$ ENT</sup> mice. *J Neurophysiol*, 91, 163-171.
- Lukashkin, A. N., Richardson, G. P., Russell, I. J. (2010): Multiple roles for the tectorial membrane in the active cochlea. *Hear Res*, 266, 26-35.
- Maeda, Y., Fukushima, K., Kasai, N., Meata, M., Nishizaki, K. (2001): Quantification of TECTA and DFNA5 expression in the developing mouse cochlea. *Neuroreport*, 12(15), 3223-3226.
- Mahdieh, N., Rabbani, B. (2009): Statistical study of 35delG mutation of GJB2 gene: a meta-analysis of carrier frequency. *Int J Audiol*, 48, 363-370.
- Matsunaga, T. (2009): Value of genetic testing in the otological approach for sensorineural hearing loss. *Keio J Med*, 58, 216-222.
- McGuirt, W. T., Prasad, S. D., Griffith, A. J., Kunst, H. P., Green, G. E., Shpargel, K. B., Runge, C., Huybrechts, C., Mueller, R. F., Lynch, E., King, M. C., Brunner, H. G., Cremers, C. W., Takanosu, M., Li, S. W., Arita, M., Mayne, R., Prockop, D. J., Van Camp, G., Smith, R. J (1999): Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nat Genet*, 23(4), 413-419.
- Merkt, W., Urlaub, D., Meinke, S., Kammerer, R., Watzl, C. (2015): Inhibition of NKp30- and 2B4-mediated NK cell activation by evolutionary different human and bovine CEACAM1 receptors. *Eur J Immunol*, 45, 2134-2142.
- Moore, T., Dveksler G. S. (2014): Pregnancy-specific glycoproteins: complex gene families regulating maternal-fetal interactions. *Int J Dev Biol*, 58(2-4), 273-280.
- Morton, N. E. (1991): Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci*, 630, 16-31.

## 7 Literaturverzeichnis

- Nagel, G., Grunert, F., Kuijpers, T. W., Watt, S. M., Thompson, J., Zimmermann, W. (1993): Genomic organization, splice variants and expression of CGM1, a CD66-related member of the carcinoembryonic antigen gene family. *Europ J Biochem*, 214, 27-35.
- Nowotny, M., Gummer, A. W. (2006): Nanomechanics of the subretinal space caused by electromechanics of cochlear outer hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 2120-2125.
- Obrink, B. (1997): CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signalregulatory properties. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 616 - 626.
- Olsen, A., Teglund, S., Nelson, D., Gordon, L., Copeland, A., Georgescu, A., Carrano, A., Hammarström, S. (1994). Gene organization of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome 19: Assembly and analysis of a 700-kb cosmid contig spanning the region. *Genomics*, 23, 659-668.
- Petersen, M. B. (2002): Non-syndromic autosomal deafness. *Clin Genet*, 62,1-13.
- Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H. D., Drzeniek, Z., Helmchen, U., Loning, T., Wagener, C. (1996): CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 44, 35-41.
- Preyer, S. (1996): Sprachdiskrimination: Steuerung der Verstärkung im Innenohr. *HNO*, 44, 658-660.
- Rau, A., Legan, P. K., Richardson, G. P. (1999): Tectorin mRNA expression is spatially and temporally restricted during mouse inner ear development. *J Comp Neurol*, 405, 271-280.
- Richardson, G. P., Andrei, N., Lukashkin, A. N., Russell, I. J. (2008): The tectorial membrane: one slice of a complex cochlear sandwich. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 16, 458-464.
- Richter, C. P., Emadi, G., Getnick G., Quesnel, A., Dallos, P. (2007): Tectorial membrane stiffness gradients. *Biophys J*, 93, 2265-2276.
- 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.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ryan, A., Dallos, P. (1975): Effect of absence of cochlear outer hair cells on behavioural auditory threshold. *Nature*, 253, 44-46.
- Scholzel, S., Zimmermann, W., Schwarzkopf, G., Grunert, F., Rogaczewski, B., Thompson, J. (2000): Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *American Journal of Pathology*, 156(2), 595-605.
- Sellick, P. M., Russell, I. J. (1980): The response of inner hair cells to basilar membrane velocity during low frequency auditory stimulation in the guinea pig cochlea. *Hear Res*, 2, 439-446.
- Smith, R. J., Bale, J. F. Jr., White, K. R. (2005): Sensorineural hearing loss in children. *Lancet*, 365, 879-890.
- Steele, C. R., Pruria, S. (2005): Force on inner hair cell cilia. *Int J Solids Struct*, 42, 5887-5904.
- Taheri, M., Saragovi, U., Fuks, A., Makkerh, J., Mort, J., Stanners, C. P. (2000): Self recognition in the Ig superfamily. Identification of precise subdomains in carcinoembryonic antigen required for intercellular adhesion. *J Biol Chem*, 1, 275(35), 26935-26943.
- Tchoupa, A. K., Schuhmacher, T., Hauck, C. R. (2014): Signaling by epithelial members of the CEACAM family - mucosal docking sites for pathogenic bacteria. *Cell Communication and Signaling*. 15, 12, 27.
- Thalmann I., Thallinger G., Comegys T. H., Thalmann R. (1986): Collagen – the predominant protein of the tectorial membrane. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 48, 107-115.
- Thompson, J., Zimmermann, W., Osthus-Bugat, P., Schleussner, C., Eades-Perner, A. M., Barnert, S., von Kleist, S., Willcocks, T., Craig, I., Tynan, K., Olsen, A., Mohrenweiser, H. (1992): Long-Range Chromosomal Mapping of the Carcinoembryonic Antigen (CEA) Gene Family Cluster. *Genomics*, 12, 761-772.
- Van Camp, G., Smith, R. J. H. (2015): Hereditary hearing loss homepage. <http://www.hereditaryhearingloss.org> (letzter Zugriff: 08.08.2015).
- 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-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet*, 74, 770-776.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D. J. P., Watt, S. M. (1996): Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic *Neisseriae*. *Mol Microbiol*, 22, 941-950.
- Virji, M., Evans, D., Griffith, J., Hill, D., Serino, L., Hadfield, A., Watt, S. M. (2000): Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol*, 36(4), 784-795.
- Vona, V., Indrajit, N., Hofrichter, M. A. H., Shehata-Dieler, W., Haaf, T. (2015): Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future. *Molecular and Cellular Probes*, 1-11.
- 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 USA*, 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.
- Wang, H., Wang, X., He, C., Li, H., Qing, J., Grati, M., Hu, Z., Li, J., Hu, Y., Xia, K., Mei, L., Wang, X., Yu, J., Chen, H., Jiang, L., Liu, Y., Men, M., Zhang, H., Guan, L., Xiao, J., Zhang, J., Liu, X., Feng, Y. (2015): Exome sequencing identifies a novel CEACAM16 mutation associated with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss DFNA4B in a Chinese family. *J Hum Genet*, 60(3), 119-126.

## 7 Literaturverzeichnis

- Wang, Y., Chang, Q., Tang, W., Sun, Y., Zhou, B., Li, H., Lin, X. (2009): Targeted connexin26 ablation arrests postnatal development of the organ of Corti. *Biochem Biophys Res Commun*, 385, 33-37.
- WHO Media centre, Deafness and hearing loss, Update März 2015, Fact sheet N°300, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/> (letzter Zugriff 31.03.2015)
- Willems, P. J. (2000): Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med*, 342, 1101-1109.
- Yariz, K. O., Duman, D., Seco, C. Z., Dallman, J., Huang, M., Peters, T. A., Sirmaci, A., Lu, N., Schraders, M., Skromne, I., Oostrik, J., Diaz-Horta, O., Young, J. I., Tokgoz-Yilmaz, S., Konukseven, O., Shahin, H., Hetterschijt, L., Kanaan, M., Oonk, A. M., Edwards, Y. J. (2012): Mutations in OTOGL, encoding the inner ear protein otogelin-like, cause moderate sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet*, 91, 872-882.
- 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.
- Zeng, J., Miller, K. K., Yang, T., Hildebrand, M. S., Shearer, E. A., DeLuca, A. P., Scheetz, T. E., Drummond, J., Scherer, S. T., 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). *PNAS*, 108, 10, 4218-4223.
- Zimmermann, W., CEA Homepage, <http://www.carcinoembryonic-antigen.de> (letzter Zugriff 29.07.2015)
- Zong, L., Lu, C., Zhao, Y., Li, Q., Han, D., Yang, W., Shen, Y., Zheng, Q., Wang, Q. (2012): Clue to a New Deafness Gene: A Large Chinese Nonsyndromic Hearing Loss Family Linked to DFNA4. *J Genet Genomics*, 39(12), 653-657.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CEACAM	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules, karzinoembryonales Antigen-verwandtes Zelladhäsionsmolekül
DFNA	autosomal-dominanter nicht-syndromaler Hörverlust
DFNB	autosomal-rezessiver nicht-syndromaler Hörverlust
DFNX	X-chromosomaler nicht-syndromaler Hörverlust
DFNY	Y-chromosomaler nicht-syndromaler Hörverlust
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
Ig	Immunglobulin
IgC	konstante (constant) Immunglobulindomäne
IgV	variable (variable) Immunglobulindomäne



## 8 Abkürzungsverzeichnis

l	Liter
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
ITSM	immunoreceptor tyrosin-based switch motif
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
N.	Nervus
NSHL	nicht-syndromaler Hörverlust
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PSG	pregnancy-specific glycoprotein, schwangerschaftsspezifische Glykoproteine
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonukleinsäure
SDS-Page	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
s	Sekunde
SNHL	sensorineuraler Hörverlust

## *8 Abkürzungsverzeichnis*

TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Tektorialmembran
Vol.	Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann für die hervorragende Betreuung, seine Geduld beim Beantworten aller Fragen und für sein immer offenes Ohr. Seine motivierenden Worte haben mir geholfen auch in schwierigen Zeiten weiter zu machen und daran zu glauben, dass auch diese PCR irgendwann funktionieren wird.

Auch möchte ich Dr. Rainer Riesenberg herzlich danken, der mir das nötige Wissen für den experimentellen Teil dieser Arbeit vermittelt hat und mir immer mit gutem Rat zur Seite stand, falls etwas nicht so funktionierte wie es sollte. Danke auch an Dr. Alexander Buchner, der bei Problemen mit dem Computer stets eine Lösung wusste.

Des Weiteren danke ich Kathrin Siegrist für die Anleitung zur Herstellung von Paraffinschnitten und Dr. Martin Hennenberg sowie Beata Rutz für die Hilfe beim Western-Blot.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden des Forschungspavillions bedanken für eine angenehme Zeit in familiärer Atmosphäre, anregende Diskussionen und Hilfe, wann immer sie benötigt wurde.

Bei Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann und allen Mitarbeitern des Promotionsstudiengangs „FöFoLe“ möchte ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme bedanken, welche mir tiefe Einblicke in die Forschung und nicht zuletzt auch finanzielle Unterstützung gab.

Meiner Familie und insbesondere meinem Mann gilt mein Dank für die immerwährende Unterstützung und Motivation auch in den schwierigen Zeiten. Vielen Dank fürs Zuhören, Anspornen und Korrektur lesen.

# Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„CEACAM16, ein neues Strukturprotein der Tektorialmembran“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Constanze Schäuble

# Tabellenverzeichnis

3.1	Geräte . . . . .	21
3.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	22
3.3	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	23
3.4	Verwendete Antikörper . . . . .	24
3.5	Verwendete Kits . . . . .	24
3.6	Verwendete Primer . . . . .	25
3.7	<i>Touch-Down</i> -PCR . . . . .	26
3.8	PCR-Programm für <i>Touch-Down</i> -PCR . . . . .	27
3.9	PCR zur Genotypisierung des <i>Ceacam16</i> <sup>+/+</sup> -Allels . . . . .	27
3.10	PCR zur Genotypisierung des <i>Ceacam16</i> <sup>-/-</sup> -Allels . . . . .	28
3.11	Ablauf des PCR-Programms für die Genotypisierung . . . . .	28
3.12	Reverse-Transkription-Ansatz . . . . .	31
3.13	Herstellung des Master Mix für die quantitative PCR . . . . .	32
3.14	Programmierung des LightCycler . . . . .	32
3.15	PCR-Ansatz für cDNA-Endpunkt-PCR . . . . .	33
3.16	Ablauf des Programms für die Endpunkt-PCR . . . . .	33
3.17	PCR-Ansatz für die Sequenzierung . . . . .	37
3.18	Ablauf des Programms für die Sequenzierungs-PCR . . . . .	38
4.1	Korrelation des kontrahierten Tektorialmembran-Phänotyps mit dem <i>Ceacam16</i> <sup>+/+</sup> -Genotyp . . . . .	47

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Domänenaufbau der humanen (A) und murinen CEACAM-Familienmitglieder (B).	7
1.2	Schematische Darstellung des Mittel- und Innenohrs.	11
1.3	Schematische Darstellung der <i>Cochlea</i> und des Corti-Organ.	14
4.1	Herstellung von <i>Ceacam16</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.	40
4.2	Nachweis von <i>Ceacam16</i> <sup>+/+</sup> - und <i>Ceacam16</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen durch allelspezifische PCR.	41
4.3	<i>Ceacam16</i> ist selektiv in der <i>Cochlea</i> exprimiert.	42
4.4	Expression von CEACAM16 in der <i>Cochlea</i> und im Vestibularorgan.	43
4.5	Immunhistochemische Untersuchung der CEACAM16-Expression in der Hypophyse und im Kleinhirn der Maus.	44
4.6	Unterschiedliche räumliche Lage der Tektorialmembran in histologischen Schnitten in <i>Ceacam16</i> <sup>+/+</sup> - und <i>Ceacam16</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.	46
4.7	Löcher in der Tektorialmembran bei jungen <i>Ceacam16</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen	47
4.8	Eingrenzung des Zeitpunkts der <i>Ceacam16</i> -Gen-Anschaltung in jungen Mäusen.	48
4.9	Expression von <i>Ceacam16</i> , $\alpha$ - <i>Tectorin</i> ( <i>Tecta</i> ) und <i>Stereocilin</i> ( <i>Strc</i> ) in jungen Mäusen.	49
4.10	Postnatale Expression von CEACAM16 im Corti-Organ.	50
4.11	Der Verlust der <i>Ceacam16</i> -Expression verändert nicht die Einlagerung von $\alpha$ -Tectorin in die Tektorialmembran.	52
4.12	Darstellung des DFNA4-Locus.	53
4.13	Mutationssuche in <i>CEACAM16</i>	54