

**Analyse des Einflusses von MTSS1
auf Entwicklung, Organisation und Funktion
ependymaler Zilien der Maus**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Barbara Kalthoff, geb. Wieners

aus Stolberg

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Karl Schilling
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2026

Aus dem Anatomischen Institut – Anatomie und Zellbiologie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Einleitung	8
1.1	Das Ventrikelsystem des Hirns	8
1.2	Ependym	10
1.3	Hydrozephalus	13
1.4	Das Protein MTSS1	16
1.5	Fragestellung	17
2.	Material und Methoden	18
2.1	Versuchstiere und Tierhaltung	18
2.2	Genotypisierung der Versuchstiere	18
2.3	Anfertigung von Kryostat-Gewebedünnschnitten	20
2.4	Primäre Ependymzellkultur	21
2.4.1	Vorbereitung der Kulturflaschen und Deckgläser	21
2.4.2	Isolation von primären Ependymzellen	22
2.4.3	Fixierung der Zellen	25
2.5	<i>LacZ</i> -Färbung (Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität)	25
2.5.1	Färbung von Kryostat-Gewebedünnschnitten	26
2.5.2	Färbung von primären Ependymzellen	27
2.6	Immunhistochemische Färbung	27
2.7	Immunfluoreszenzfärbung	28
2.8	Anfertigung von Lateralventrikel-Präparaten	29
2.9	Rasterelektronenmikroskopie	30
2.10	Analyse des Flüssigkeitstransports im Lateralventrikel	31

2.10.1	Vorbereitung der Applikation	31
2.10.2	Vorbereitung der Präparate	31
2.10.3	Durchführung	32
2.11	Mäusegehirn MRT	33
2.12	Visualisierung und Auswertung	34
2.12.1	Visualisierung	34
2.12.2	Auswertung der Ziliendichte	34
2.12.3	Auswertung der Zellgrößen	35
2.12.4	Auswertung des Flüssigkeitstransportes	35
2.12.5	Auswertung der Geschwindigkeit des Flüssigkeitstransports	39
2.12.6	Auswertung der MRT-Daten	39
3.	Ergebnisse	40
3.1	<i>Mtss1</i> wird in ependymalen Zellen in situ exprimiert	40
3.2	<i>Mtss1</i> hat einen Einfluss auf die Zilien- und Zellentwicklung in primären Ependymzellkulturen	41
3.2.1	<i>Mtss1</i> wird in primären Ependymzellkulturen exprimiert	41
3.2.2	Die Deletion von <i>Mtss1</i> führt zu einer verminderten Ziliendichte	42
3.2.3	Die Deletion von <i>Mtss1</i> führt zu einer veränderten Zellgrößenverteilung	45
3.3	Morphologische Veränderungen der ependymalen Auskleidung der Ventrikel	47
3.4	<i>Mtss1</i> -Defizienz ändert die Zilienmotilität in den Lateralventrikeln	49
3.5	<i>Mtss1</i> -Defizienz führt zu vergrößerten Lateralventrikeln	52
4.	Diskussion	54
4.1	Methodische Aspekte des Nachweises von <i>Mtss1</i> in ependymalen Zellen	54
4.2	Die Deletion von <i>Mtss1</i> beeinflusst die Morphologie und Differenzierung von Ependymzellen	56

4.3	Eine <i>Mtss1</i> -Defizienz führt zu einem weniger gerichteten Flüssigkeitstransport in den Lateralventrikeln	59
4.4	MTSS1 beeinflusst die Größe der Lateralventrikel	62
4.5	Ausblick	64
5.	Zusammenfassung	66
6.	Abbildungsverzeichnis	68
7.	Tabellenverzeichnis	69
8.	Literaturverzeichnis	70
9.	Erklärung zum Eigenanteil	77
10.	Danksagung	79

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
CPD	Kritischer Punkt-Trockner (<i>critical point dryer</i>)
CSF	Liquor cerebrospinalis (<i>cerebrospinal fluid</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DIV	Tage in Kultur (<i>days in vitro</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
eCSF	embryonaler Liquor cerebrospinalis (<i>embryonic cerebrospinal fluid</i>)
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)
FBS	Fetales bovines Serum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
I-BAR	Inverse Bin-Amphyphysin-Rvs167
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (<i>Insulin-like Growth Factor</i>)
KO	Knockout
MRT	Magnetresonanztomographie

<i>Mtss1</i>	Metastasis Suppressor 1 (Gen)
MTSS1	Metastasis Suppressor 1 (Protein)
PCP	Planare Zellpolarität (<i>planar cell polarity</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PLL	Poly-L-Lysin
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RGP	Radialgliazellen (<i>radial glial progenitor cells</i>)
ROI	Interessensbereich (<i>region of interest</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
SHH	Sonic Hedgehog
si-RNA	kurze interferierende RNA (<i>small interfering RNA</i>)
SVZ	Subventrikuläre Zone
v/v	Volumen/Volumen
WH2	Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2
WT	Wildtyp
w/v	Masse/Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

In der Forschung an *Mtss1*-Knockout-Mäusen in der Arbeitsgruppe unter der Leitung von Dr. Britta Eiberger des Anatomischen Instituts – Anatomie und Zellbiologie der Universität Bonn ist aufgefallen, dass die Mäuse Veränderungen im Ventrikelsystem des Hirns zeigten. In der folgenden Arbeit möchte ich meine Untersuchungen zu diesen Veränderungen sowie möglichen Ursachen darlegen. Einleitend möchte ich zunächst einen Überblick über die für die Experimente relevante makroskopische und mikroskopische Anatomie, die häufigste pathologische Veränderung der Ventrikelanatomie sowie über das Protein MTSS1 geben.

1.1 Das Ventrikelsystem des Hirns

Bereits in der frühen embryonalen Entwicklung des zentralen Nervensystems entsteht zum Zeitpunkt der Neurulation mit der Ausbildung des Neuralrohres ein Hohlraum, der auch im adulten Organismus noch von großer Bedeutung ist: Das Ventrikelsystem ist eine komplexe Anordnung von hintereinandergeschalteten Hohlraumssystemen, die mit Liquor cerebrospinalis (Cerebrospinal Fluid, CSF) gefüllt sind und gemeinsam mit dem Canalis centralis des Rückenmarks den inneren Liquorraum bilden. Es besteht aus vier Ventrikeln und deren Verbindungen zueinander. Die paarig angelegten Seitenventrikel (erster und zweiter Ventrikel) ziehen sich schlauchförmig vom Frontallappen durch den Parietallappen, laufen im Okzipitallappen aus und wenden sich im Temporallappen nach kaudal. Sie münden jeweils über das Foramen interventriculare (Foramen Monroi) in den unpaaren dritten Ventrikel, der sich im Diencephalon befindet. Über den Aquaeductus mesencephali cerebri besteht eine Verbindung zum vierten Ventrikel, der unmittelbar ventral des Kleinhirns liegt. Neben dem Übergang zum Canalis centralis besteht von hier aus unter anderem über die Apertura mediana ventriculi quarti eine Verbindung zum Subarachnoidalraum und somit zum äußeren Liquorraum.

In der Embryonalentwicklung formt das Neuralrohr nach der Neurulation und dem Verschluss der Neuropori cranialis und caudalis die drei Primärvesikel, aus denen sich Vorder-, Mittel- und Hinterhirn bilden. Anschließend beginnt eine Phase der extremen

Zellvermehrung der neuronalen Stammzellen. Auch das Hohlraumsystem nimmt in dieser Phase stark an Größe zu und wird mit embryonalem Liquor (eCSF) gefüllt. Dieser wird durch das Neuroepithel gebildet und in die Ventrikel sezerniert. Neben der Ventrikelinflation spielt der eCSF eine Rolle in der physiologischen Zellproliferation und -determination. In experimentellen Studien an Hühnerembryonen führte eine Drainage des eCSF nicht nur zu kollabierten Ventrikeln, sondern auch zu einer reduzierten Zellproliferation und einer erhöhten Apoptoserate (Desmond und Jacobsen, 1977). Im Gegensatz zu adulten CSF ist eCSF reich an Proteinen wie Signal- und Wachstumsfaktoren, Transportproteinen, Enzymen und Proteasen (Zappaterra et al., 2007). Im weiteren Verlauf der Entwicklung teilt sich der Vorderhirnventrikel und entwickelt sich zu den Seitenventrikeln und dem dritten Ventrikel. Der Mittelhirnventrikel formt den Aquaeductus und der Hinterhirnventrikel wird zum vierten Ventrikel (Lowery und Sive, 2009) (vgl. Abb. 1).

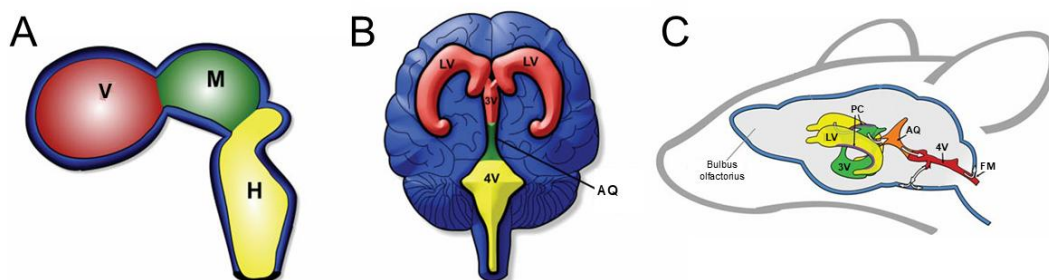


Abb. 1: Das Ventrikelsystem des Hirns

A: In der Embryonalentwicklung des Hirns bilden sich die drei Primärvesikel mit dem Vorder- (V), Mittel- (M) und Hinterhirnventrikel (H). B: Im adulten Hirn haben sich aus dem Vorderhirnventrikel die Lateralventrikel (LV) und der dritte Ventrikel (3V) gebildet. Aus dem Mittelhirnventrikel geht das Aquaeduct (AQ) hervor und verbindet den dritten mit dem vierten Ventrikel (4V), der aus dem Hinterhirnventrikel entsteht. C: Das Ventrikelsystem im Maushirn ist äquivalent angelegt. PC: Plexus choroideus, FM: Foramen magnum. Modifizierte Abbildungen von (Lowery und Sive, 2009) (A, B) und (Lee, 2013) (C)

Im adulten Hirn erfolgt die Liquorproduktion durch die Plexus choroidei, Adergeflechte, die sich in den vier Ventrikeln befinden. Die Plexus der ersten drei Ventrikel stehen miteinander in Verbindung, während der Plexus choroideus des vierten Ventrikels

isoliert ist. Die Gesamtproduktion von Liquor im menschlichen adulten Gehirn beträgt ca. 500 mL pro Tag. Bei einer Liquormenge von ungefähr 140 mL im inneren und äußeren Liquorraum bedeutet das täglich eine drei- bis viermalige Erneuerung. Der Liquor folgt dabei einer Flussrichtung: Beginnend im ersten und zweiten Ventrikel fließt der Liquor zum dritten Ventrikel. Über den Aquaeductus gelangt er in den vierten Ventrikel und findet von dort, entweder direkt oder über den Canalis centralis spinalis und die Abgänge der Spinalnerven, Übergang zum äußeren Liquorraum, wo der Großteil der Resorption stattfindet. Dieser Fluss wird hauptsächlich passiv durch arterielle Pulsation und die Druckunterschiede, die sich aus der ständigen Produktion und Resorption ergeben, erzeugt. Durch eine gerichtete Zilienbewegung an der Ventrikelwand wird zudem ein aktiver, oberflächennaher Liquortransport generiert (Del Bigio, 1995). Der Liquor cerebrospinalis und das Ventrikelsystem erfüllen neben ihren Funktionen in der physiologischen Gehirnentwicklung auch im adulten Organismus verschiedenen Aufgaben in der Aufrechterhaltung der Hirnfunktion. Die hydromechanische Schutzfunktion des Liquors und der Liquorräume verhindert Schäden am zentralen Nervensystem durch physiologische oder traumatische Bewegungen. Der Liquor fungiert zudem als Transportmedium für Nährstoffe, Stoffwechselprodukte, Wachstumsfaktoren und weitere Botenstoffe. Auch im adulten Hirn ist ein gerichteter, durch schlagende Zilien generierter Liquorfluss essentiell für die Zellmigration von Neuronen (Sawamoto et al., 2006).

1.2 Ependym

Das Ependym ist ein einschichtiges, kubisches Epithel, welches die inneren Liquorräume des ZNS und den Spinalkanal auskleidet. Es besteht zum Großteil aus Ependymzellen, die zu den Neurogliazellen gehören. Embryologisch entwickeln sich aus dem Neuroektoderm in der Ventrikulärzone zunächst polypotente neurale Stammzellen, aus denen Radialgliazellen (radial glial progenitor cells, RGP) hervorgehen, die sich dann wiederum zu Ependymzellen entwickeln können (Spassky et al., 2005). Neben der Auskleidung der Ventrikel übernehmen hochspezialisierte Ependymzellen die Bildung des Plexus choroideus, der maßgeblich zur Liquorproduktion beiträgt (Cserr, 1971). Spezialisierte Ependymzellen, die Tanyzyten, sind hauptsächlich in der Seitenwand des dritten Ventrikels lokalisiert und spielen eine wichtige Rolle in der Blut-Hirn-Schranke

(Langlet, 2020). Das Ependym ist entscheidend in der Aufrechterhaltung der Hirn-Liquor-Schranke und bewahrt dadurch die Liquorhomöostase. Eine Störung der Hirn-Liquor-Schranke durch Veränderungen des Ependyms kann eine Disbalance der Mikroumgebung im Gehirn verursachen und im Zusammenhang mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen stehen (Deng et al., 2023; Ma et al., 2023).

In der Zellschicht, die das Ventrikellumen auskleidet, finden sich verschiedene Zelltypen: Neurale Stammzellen mit einer kleinen Oberfläche, einem primären Zilium und langen basalen Fortsätzen, die in die subventrikuläre Zone (SVZ) reichen (B1), und mindestens zwei Arten von Ependymzellen (E1 und E2). Dabei sind die Ependymzellen kreisförmig um kleine Gruppen von B1-Zellen angeordnet (Mirzadeh et al., 2008) (vgl. Abb. 2). E1 Zellen machen den größten Anteil dieser Zellen aus. Adulte E1 Zellen sind an ihrer Oberfläche dicht mit Mikrovilli besetzt und miteinander durch Zonulae adherentes verbunden. Sie tragen motile Zilien, die durch aktives und synchronisiertes Schlagen einen oberflächennahen Liquorfluss generieren (Worthington und Cathcart, 1963). E2 Zellen tragen lediglich zwei Zilien und machen nur einen geringen Anteil der Zellen aus (ca. 7 %, (Mirzadeh et al., 2008)).

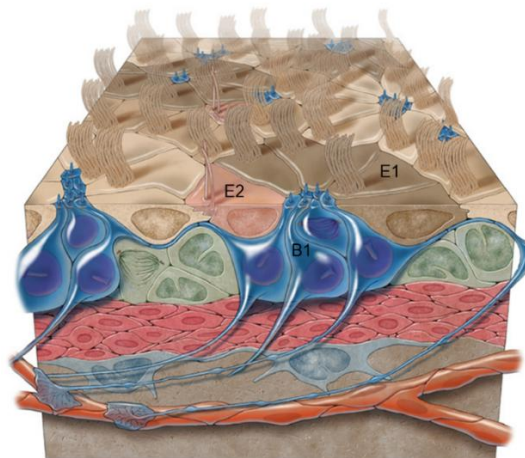


Abb. 2: Aufbau des Ependyms

Die Ventrikelauskleidung ist aus neuralen Stammzellen mit einem primären Zilium und langen basalen Fortsätzen (B1) sowie kreisförmig um diese angeordneten Ependymzellen mit mehreren motilen Zilien (E1) und Ependymzellen mit zwei Zilien (E2) aufgebaut. Modifizierte Abbildung von Mirzadeh et al, 2008

Motile Zilien besitzen eine charakteristische Binnenstruktur, dem Axonem aus 9 kreisförmig angeordneten Mikrotubulidubetts und zwei mittelständigen einzelnen Zentraltubuli. Umgeben sind sie von einer spezialisierten Zellmembran, die zilienspezifische Rezeptoren und Ionenkanäle enthält (Fliegeauf et al., 2007). Die Ziliogenese beginnt am Basalkörperchen, das aus einem modifiziertem Zentriol hervorgeht, wenn die Zelle den Zellzyklus verlässt (Bettencourt-Dias und Glover, 2007).

Um einen gerichteten Flüssigkeitstransport zu erzeugen, ist eine gleiche Orientierung der Zilien im ependymalen Zellverband notwendig. Diese wird als planare Zellpolarität (PCP) bezeichnet. Man unterscheidet dabei die translationale Polarität, die die Position der Zilien auf der Zelloberfläche beschreibt und die rotationale Polarität, die die Ausrichtung der Zilien und ihrer Schlagrichtung beschreibt (Mirzadeh et al., 2010) (vgl. Abb. 3). Beide werden durch die Positionierung der Basalkörperchen bestimmt. Dabei wird die translationale Polarität bereits durch die RGP-Mutterzelle, die ein primäres Zilium trägt, etabliert. Die rotationale Polarität hingegen etabliert sich in der sich differenzierenden Ependymzelle nachdem bereits motile Zilien entwickelt sind (Guirao et al., 2010). Hierbei könnte ein positiver Feedbackmechanismus relevant sein: Primärer CSF-Fluss beeinflusst die Orientierung der Basalkörperchen, daraus ergibt sich wiederum ein gerichteter CSF-Fluss, der die Orientierung der Basalkörperchen weiter verfeinert (Guirao et al., 2010; Marshall und Kintner, 2008; Mitchell et al., 2007). Dieses Modell eines von der Flussdynamik abhängigen, selbstorganisierenden Systems setzt eine mechanosensorische Funktion der Zilien voraus, die für nicht-motile Zilien über den PCP-pathway ausreichend beschrieben ist (Fliegeauf et al., 2007).

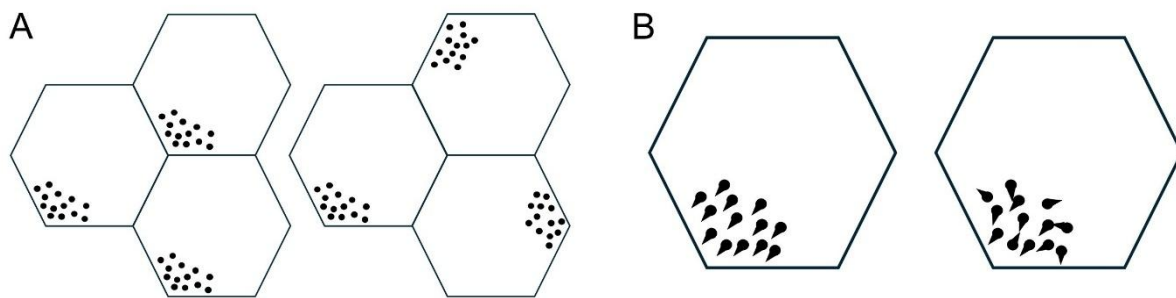


Abb. 3: Translationale und rotationale Polarität

Die translationale Polarität beschreibt die Position der Zilienbündel auf der Zelloberfläche (A, links: intakte Polarität, rechts: gestörte Polarität), die rotationale Polarität beschreibt die Ausrichtung der einzelnen Zilien und damit des Zilienschlags (B, links: intakte Polarität, rechts: gestörte Polarität). Als Punkte bzw. Punkte mit Pfeilspitze sind die Basalkörperchen dargestellt

Die Funktion des durch das Ependym erzeugten Flüssigkeitstransportes ist weiterhin ein viel untersuchtes Thema. Historisch wurde angenommen, dass der Zilienschlag der Ependymzellen maßgeblich zum gesamten Liquortransport durch das Ventrikelsystem beiträgt (Worthington und Cathcart, 1963). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die arterielle Pulsation hauptverantwortlich für die Erzeugung des Liquorflusses ist (vgl. 1.1). Die Erzeugung eines gerichteten oberflächennahen Flüssigkeitstransports spielt eine entscheidende Rolle in der Reinigung der Ventrikeloberfläche und sichert den Liquortransport an Engstellen im Ventrikelsystem (Faubel et al., 2016; Ibañez-Tallon et al., 2004). Zudem erfolgt die Verteilung von Signalmolekülen und Wachstumsfaktoren durch das Ventrikelsystem ziliengeneriert (Del Bigio, 2010; Zappaterra und Lehtinen, 2012).

1.3 Hydrozephalus

Mit einer Prävalenz von 1:1000 Lebendgeburten ist der angeborene Hydrozephalus eine relevante Erkrankung, die aufgrund ihrer Komplexität von großem wissenschaftlichen Interesse ist (Munch et al., 2012; Perez-Figares et al., 2001). Eine internationale Arbeitsgruppe von Experten der Hydrozephalusforschung hat sich auf die Definition der Erkrankung als „eine aktive Distension des Ventrikelsystems des Gehirns [...] als Ergebnis von unzureichender Passage des Liquor cerebrospinalis von seinem

Produktionsort innerhalb des ventrikulären Systems bis zu seiner Absorption in den systemischen Kreislauf“ geeinigt (Rekate, 2018). Bei der Kodierung des angeborenen Hydrozephalus nach dem ICD-10 kann zwischen Formen unterschieden werden, in denen eine Fehlbildung des Aquaeductus cerebri (Q03.0) oder eine Atresie der Apertura mediana oder der Aperturales laterales des vierten Ventrikels (Q03.1) vorliegt. Weitere zugrundeliegende Pathologien werden unter Q03.8 (Sonstiger angeborener Hydrozephalus) zusammengefasst (Tab. 1).

Tab. 1: Kodierung des angeborenen Hydrozephalus nach ICD-10-GM Version 2024

ICD Code

ICD Code	Angeborener Hydrozephalus
Q03.-	Angeborener Hydrozephalus
Q03.0	Fehlbildungen des Aquaeductus cerebri
Q03.1	Atresie der Apertura mediana (Foramen Magendii) oder der Aperturales laterales (Foramina Luschkae) des vierten Ventrikels
Q03.8	Sonstiger angeborener Hydrozephalus
Q03.9	Angeborener Hydrozephalus, nicht näher bezeichnet

Die Vielseitigkeit des Krankheitsbildes lässt jedoch Einteilungen unter verschiedenen Gesichtspunkten zu:

Tab. 2: Einteilung des Hydrozephalus (Kammler, 2018)

Einteilung des Hydrozephalus

1. Nach der zugrunde liegenden Pathophysiologie
 - Kommunizierender (malresorptiver) Hydrozephalus
 - Obstruktiver (nicht kommunizierender) Hydrozephalus
 - Interner oder externer Hydrozephalus
 - Hydrozephalus mit isolierten Kompartimenten (Zysten, isolierter 4. Ventrikel)
2. Nach dem Beginn der Erkrankung
 - Angeborene oder erworbene Störung
 - In der fetalen Periode
 - Als perinatale Komplikation
 - Im Kindes- oder Erwachsenenalter
3. Nach der Zeitdauer der Erkrankung
 - Akute Verlaufsformen
 - Chronische Verlaufsformen
4. Nach der Ursache der Erkrankung
 - Primärer Hydrozephalus
 - Sekundärer Hydrozephalus
5. In Abhängigkeit der intrakraniellen Druckverhältnisse

Beim primären oder ideopathischen Hydrozephalus ist die Ursache der Ventrikelerweiterung unklar. Eine Stenose oder andere strukturelle Hindernisse liegen nicht vor. Pathophysiologisch handelt es sich demnach um die kommunizierende Form, bei der eine Störung des hochkomplexen hydrodynamischen Systems zu einer Ansammlung von Flüssigkeit in den Liquorräumen führt. Hierfür kommen unterschiedliche Mechanismen in Frage: Eine gesteigerte Liquorproduktion kann, abgesehen vom Plexus-Papillom, einem gutartigen Tumor des Plexus choroideus, durch eine vermehrte Sekretion durch Ionenpumpen oder eine Aquaporin-Fehlregulation im Plexus choroideus entstehen (Kahle et al., 2016). Defizite in der Resorption können zum Beispiel durch eine Druckerhöhung in den venösen Sinus oder einer Erhöhung des Liquorproteingehalts, der den onkotischen Rückresorptionsgradienten mindert, bedingt sein (Schuhmann, 2018). In verschiedenen Studien konnte zudem in Tiermodellen gezeigt werden, dass eine fehlende oder gestörte Zilienfunktion mit einem angeborenen Hydrozephalus einher geht (Banizs et al., 2005; Ibañez-Tallon et al., 2004; Lee, 2013; Tissir et al., 2010). Auch in Menschen konnte ein Zusammenhang zwischen Mutationen in Genen, die mit motilen Zilien im Zusammenhang stehen, wie *FoxJ1*, *CCNO* und *MCIDAS*, und der Entwicklung eines angeborenen Hydrozephalus nachgewiesen werden (Duy et al., 2022). Da motile Zilien auf ependymalen Zellen am Liquortransport beteiligt sind, wurde ein gestörter Liquorfluss als Erklärung für die Liquoransammlung im Ventrikelsystem als Erklärung herangezogen. Der Kausalzusammenhang ist jedoch nicht hinreichend belegt. So ist zum Beispiel im *Tg737^{orpk}* Mausmodell von Banzis et al. 2005 bereits eine pathologische Erweiterung der Ventrikel festzustellen, bevor die Ependymzellen Zilien ausbilden. Desweiteren ist der Einfluss des ependymalen Zilienschlags auf die gesamte Flussdynamik des Liquors gering, eine kritische Rolle kann am ehesten an Engstellen wie dem Aquaedukt vermutet werden (Duy et al., 2022). Insbesondere im Menschen ist die Entstehung eines Hydrozephalus allein auf Grund eines gestörten Liquorflusses unwahrscheinlich. Die genaue Bedeutung von Ziliendefekten in der Pathogenese des Hydrozephalus bleibt daher von Interesse für weitere wissenschaftliche Untersuchungen.

Die Therapie des angeborenen Hydrozephalus erfolgt nahezu ausschließlich chirurgisch und zielt in den meisten Fällen auf eine Ermöglichung der Liquorresorption oder des Liquorabtransports ab. In Akutsituationen kann eine externe Ventrikeldrainage

durchgeführt werden, die durch Einlage eines Katheters in einen der Seitenventrikel eine direkte Ableitung von Liquor ermöglicht. Intermittierende Punktionen sind durch Einlage eines Rickham- oder Ommaya-Reservoirs möglich und kommen häufig bei Neugeborenen mit posthämorrhagischem Hydrozephalus zum Einsatz. Eine längerfristige Therapie wird zumeist durch Anlage eines Liquorshunts angestrebt. Dabei wird der Liquor über ein Katheter- und Ventilsystem in andere Körperhöhlen abgeleitet, meistens ins Peritoneum (Wagner, 2018). Durch die kontrollierbare Ableitung des Liquors ist diese Form der Therapie sehr erfolgreich, allerdings birgt sie ein hohes Komplikationsrisiko. Bereits innerhalb des ersten Jahres nach Anlage eines Shunts kommt es bei 25-40 % der Patienten zu einer relevanten Komplikation, die einen Revisionseingriff notwendig macht (Tuli et al., 2000).

Medikamentöse Therapien spielen im klinischen Setting bisher kaum eine Rolle. In Tiermodellen und teilweise auch in Medikamentenstudien an Menschen wurde der Einfluss von Diuretika, Ionenkanalblockern, Glukokortikoiden und anderen Medikamenten auf die Wirksamkeit als Therapeutikum des Hydrozephalus untersucht. Keine der untersuchten Präparate konnte sich bisher als wirksame Therapie durchsetzen (Del Bigio und Di Curzio, 2016). Genauere Kenntnisse über die Ursachen des Hydrozephalus können jedoch den Weg für zukünftige Therapiemöglichkeiten ebnen.

1.4 Das Protein MTSS1

Das Protein MTSS1 (Metastasis Suppressor 1) wird durch das gleichnamige Gen *Mtss1* kodiert und nahezu ubiquitär exprimiert. Die Erstbeschreibung des Proteins erfolgte im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren der Harnblase bei Fehlen von MTSS1 (Lee et al., 2002). Auch in der Entstehung von Tumoren der Brust, der Prostata und der Nieren wurde ein Einfluss von MTSS1 beschrieben (Dawson et al., 2012; Lei et al., 2014; Mertz et al., 2014). Das Protein bildet mit den Proteinen ABBA/MTSS2, IRSp53/BAIAP2, IRTKS/BAIAP2L1 und Pinkbar/BAIAP2L2 die Familie der I-BAR Proteine (Inverse Bin-Amphyphysin-Rvs167). Die I-BAR Domäne von MTSS1 befindet sich am N-terminalen Ende des Proteins und befähigt es zur Bildung von Homodimeren sowie zur elektrostatischen Interaktion mit Lipiddoppelschichten. Durch diese Interaktion

kann MTSS1 negative Krümmungen von Zellmembranen generieren (Mattila et al., 2007; Zhao et al., 2011). Das C-terminale Ende des Proteins bildet die WH2 Domäne (Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2), die eine Interaktion mit ATP-Aktinmonomeren ermöglicht (Lee et al., 2002; Mattila et al., 2003). Durch diese beiden funktionellen Domänen trägt MTSS1 zur Zellmotilität und Zellmigration bei. So ist MTSS1 an der Bildung von Stressfasern (kontraktilen Bündeln aus Aktinfilamenten) und microspikes sowie membrane ruffling beteiligt (Woodings et al., 2003; Zhao et al., 2011). Auch im zentralen Nervensystem (ZNS) spielt MTSS1 eine wichtige Rolle und wird dort maßgeblich in Purkinjezellen exprimiert. Die regelrechte Ausbildung von Axonen und Dendriten dieser Zellen erfolgt MTSS1-abhängig (Sistig et al., 2017). In murinen Hautzellen wurde eine Kollokalisierung von MTSS1 mit Basalkörpern, den im Zytoplasma verorteten Verankerungsstellen von Zilien, beschrieben. Durch einen si-RNA vermittelten Knockdown von *Mtss1* konnte gezeigt werden, dass MTSS1 für die Ausbildung primärer Zilien in dermalen Zellen notwendig ist (Bershteyn et al., 2010). Neben zellulären Effekten konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von MTSS1 zu funktionellen Veränderungen der motorischen Koordination und des Lernverhaltens sowie zu einer Vergrößerung der Lateralventrikelvolumina führen kann (Minkeviciene et al., 2019).

1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss einer *Mtss1*-Defizienz auf Ependymzellen zu untersuchen, wobei der Fokus zunächst auf der Entwicklung der ependymalen Zilien liegt. Im Anschluss wird untersucht, inwiefern das Fehlen von MTSS1 den gerichteten oberflächennahen Liquortransport beeinflusst. Abschließend erfolgt eine MRT-gestützte Analyse des Ventrikelvolumens.

2. Material und Methoden

Die hier beschriebenen Experimente wurden in der Zeit vom 16.11.2015 bis zum 29.04.2017 durchgeführt.

2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die *Mtss1*-Knockout-Mäuse (*Mtss1*^{-/-}, KO), die bereits in früheren Publikationen (Sistig et al., 2017; Xia et al., 2010) beschrieben wurden, wurden von Dr. Rong Li, The Stowers Institute for Medical Research, Kansas City, MO, USA, erworben. Die Tiere wurden in die im Anatomischen Institut – Anatomie und Zellbiologie der Universität Bonn vorhandene, 2001 etablierte Zucht von C57BL/6JRj Mäusen gekreuzt. Die Mäuse wurden in temperatur-, licht- und feuchtigkeitskontrollierten Räumen mit einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus und freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Der gesamte Umgang mit den Tieren erfolgte unter strikter Einhaltung der behördlichen und institutionellen Tierhaltungsvorschriften (Direktive 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010, Tierversuchsantrag Aktenzeichen 84-02.04.2017.A120). Für alle Versuche wurden Tiere beiderlei Geschlechts verwendet. Wann immer möglich, wurden Tiere aus dem gleichen Wurf als Wildtyp-Kontrollen (*Mtss1*^{+/+}, WT) verwendet. Die Tötung der Versuchstiere sowie die Gewebegewinnung zur Genotypisierung erfolgte durch Dr. Britta Eiberger oder andere ausgebildete Labor- und Tierstallmitarbeiter*innen. Die weitere Verarbeitung des Gewebes erfolgte durch mich selbst.

2.2 Genotypisierung der Versuchstiere

Die Tiere wurden mit Hilfe einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) genotypisiert. Hierfür wurden Gewebe der zu genotypisierenden Mäuse zunächst in Lysis-Puffer (Tab. 3) bei 55 °C über Nacht verdaut, anschließend wurde die Proteinase durch 30-minütige Inkubation bei 97 °C inaktiviert. Die Lysate wurden bei 11.000 Umdrehungen pro Minute zwei Minuten lang zentrifugiert. 2 µL der Oberphase des Lysats, welches die verfügbar gemachte Desoxyribonukleinsäure (DNA) enthielt, wurden in die PCR-Ansatzlösung

(Tab. 4) gegeben, die die Primer 50, 51 und 52 enthielt (Tab. 5). Im Thermozykler (Mastercycle ep, Eppendorf) wurde die DNA in 40 Zyklen amplifiziert (Tab. 6). Da der Primer 52 im inserierten DNA-Abschnitt der Knockout-Tiere bindet, entstanden in der Amplifikation unterschiedlich lange Amplifikationsprodukte (ca. 300 Basenpaare bei Wildtyp-DNA, ca. 500 Basenpaare bei Knockout-DNA) (vgl. Abb. 4). Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde die PCR-Lösung anschließend mit 2 µL Ladepuffer (Tab. 7) versehen und auf 1 %-iges Agarosegel (Biozym, 520841), welches mit Ethidiumbromid (10 mg/mL, Sigma) versehen war, geladen. Nach Gelelektrophorese bei 150 V für 40 Minuten wurde das entstandene Bandenmuster durch Anregung des Ethidiumbromids durch UV-Licht in einem GelDoc 2000 Transilluminator Dokumentierungssystem (Biorad) abgelesen.

Tab. 3: Zusammensetzung des Lysis Puffers

Die angegebenen Mengen werden je Gewebeprobe benötigt.

Menge	Substanz
20 µL	Dream Taq PCR Puffer (ThermoFisher, EP0704)
5 µL	Proteinase K (10 mg/mL, Roth, 7528.2)
175 µL	Ampuwa (Fresenius Kabi, 30200555)

Tab. 4: Zusammensetzung der PCR-Ansatzlösung

Menge	Substanz
12,1 µL	Ampuwa
2 µL	Dream Taq PCR Puffer
0,5 µL	Primer 50 (5 µM, Invitrogen)
0,5 µL	Primer 51 (5 µM, Invitrogen)
0,5 µL	Primer 52 (5 µM, Invitrogen)
1,6 µL	DMSO (Thermo Scientific)
0,5 µL	dNTP (Sigma, 10297018)
0,3 µL	Dream Taq Polymerase (ThermoFisher, EP0704)

Tab. 5: Primersequenzen

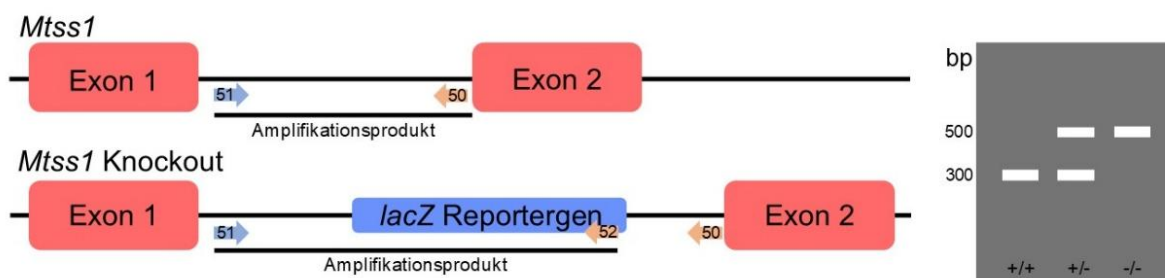
Primer	Basensequenz
50	AAA GTG CAG TCG AGC GCA TCT GTG TCA TCA
51	GGT GCT TAA CCA GGG ATG ATT TGG CCT
52	CGC AGT GTT ATC ACT CAT GGT TAT GGC AGC ACT

Tab. 6: Protokoll des verwendeten PCR-Amplifikationsprogramms

Temperatur	Zeit	
94 °C	3 Minuten	} x 40
94 °C	1 Minute	
55 °C	30 Sekunden	
72 °C	1 Minute	
72 °C	2 Minuten	
4 °C	∞	

Tab. 7: Zusammensetzung des Ladepuffers (Stammlösung)
Je Probe werden 2 µL der Lösung zugegeben.

Menge	Substanz
0,25 g	Bromphenolblau
0,25 g	Xylencyanol
40 g	Saccharose
100 mL	Ampuwa

**Abb. 4:** Funktionsweise der Genotypisierungs-PCR für *Mtss1*

Der Primer 51 bindet sowohl bei Wildtyp-DNA als auch bei Knockout-DNA hinter dem ersten Exon des *Mtss1*-Gens. Bei Wildtyp-DNA definiert der Primer 50 kurz vor dem zweiten Exon den Endpunkt des replizierten DNA-Abschnittes. Bei Knockout-DNA wird der Endpunkt des replizierten DNA-Abschnittes durch den Primer 52 definiert, der im inserierten DNA-Bereich zwischen Exon 1 und Exon 2 liegt. Dadurch entstehen unterschiedlich lange Amplifikationsprodukte, die durch unterschiedliche Bandenmuster nach Gelelektrophorese eine Differenzierung zwischen Wildtyp-Mäusen (+/+), heterozygoten Mäusen (+/-) und Knockout-Mäusen (-/-) zulassen. bp: Basenpaare

2.3 Anfertigung von Kryostat-Gewebedünnschnitten

Für die Herstellung von Kryostat-Gewebedünnschnitten aus Gehirngewebe wurden zunächst adulte Tiere beider Genotypen von Dr. Britta Eiberger nach gängiger Technik perfundiert und das Gehirn entnommen. Nach 30-minütiger Nachfixierung des Gewebes in Paraformaldehyd-Lösung (Tab. 8) wurde das Gehirn über Nacht bei 4 °C in 30 %-ige

Saccharoselösung gelegt, bis das Gewebe gesättigt war und absank. Anschließend wurde das Gehirn in das Einbettmedium Tissue-TEK O.C.T. (Sakura Finetek) überführt und für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen, um daraufhin über Isopentan in Trockeneis eingefroren zu werden. Nach Trimmen des überschüssigen Einbettmediums wurde das Gehirn auf einen tellerförmigen Metallträger aufgefroren. Der Träger wurde in eine spezielle Spannvorrichtung des Kryostaten (HM560, Microm, Thermo Fisher Scientific) eingesetzt, die stufenlos vor- und zurückbewegt werden kann. Auf diese Weise wurde das Präparat einem feststehenden Messer angenähert. Nachdem die Schneidetemperatur von -17 °C erreicht war, wurde das Präparat mit einer vorher festgelegten Geschwindigkeit am Messer vorbeigeführt und Schnitte von $10\text{ }\mu\text{m}$ Dicke erzeugt. Die so entstandenen Schnitte wurden mit SuperFrost Plus Objektträgern (Thermo Scientific) aufgenommen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte bei -20 °C gelagert.

Tab. 8: Zusammensetzung der Paraformaldehydlösung, v/v: Volumen/Volumen.

Konzentration	Substanz
0,1 M	NaH_2PO_4
0,1 M	Na_2HPO_4
4 % (v/v)	Paraformaldehyd (Serva, 31628.01)
in	Ampuwa

pH = 7,2

2.4 Primäre Ependymzellkultur

Primäre Ependymzellkulturen wurden nach dem Protokoll von Guirao et al. (2010) wie folgt angefertigt.

2.4.1 Vorbereitung der Kulturflaschen und Deckgläser

Um optimale Wachstums- und Adhäsionsbedingungen für die Ependymzellen zu schaffen, wurden sowohl die Kulturflaschen (TPP Techno Plastic Products, CH-8219 Trasadingen, Schweiz, Produktnr.: 90025) als auch runde Deckgläser (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, D-97922 Lauda-Königshofen) vorbehandelt. Die Deckgläser wurden zunächst für 20 Minuten in Aceton und danach zweimal für 20 Minuten in 70 %-igem

Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte eine Sterilisation bei 200 °C über 6 Stunden. Kulturflaschen und Deckgläser wurden zudem mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Hierfür wurde eine PLL-Lösung (Tab. 9) hergestellt. Die Deckgläser wurden in 24-Well-Platten (TPP, Produktnummer: 92424) platziert und mit 500 µL der Lösung bedeckt, Kulturflaschen wurden mit 5 mL der Lösung befüllt. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgezogen und die Deckgläser beziehungsweise die Flaschen zweimalig mit destilliertem Wasser gewaschen. Es folgte eine vollständige Trocknung der Oberflächen unter sterilen Bedingungen.

Tab. 9: Zusammensetzung der PLL-Lösung

Menge	Substanz
20 µg	Poly-L-Lysin Hydrobromid (Sigma-Aldrich, P1274-100MG)
25 mL	Ampuwa

2.4.2 Isolation von primären Ependymzellen

Nach Dekapitation von vier bzw. fünf Tage alten Mäusen (P4, P5) wurde das Gehirn unter einem Binokular (Leica MZ FLIII) entnommen und in kalter Hank's Plus Lösung (Tab. 10) präpariert. Es erfolgte zunächst eine sagittale Durchtrennung der Hirnhälften. Daraufhin wurde der kaudale Teil des Gehirns mitsamt Cerebellum und Mesencephalon, sowie zusätzlich das Diencephalon, der Hippocampus und der Bulbus olfactorius entfernt, um so den Lateralventrikel freizulegen. Die noch vorhandenen Meningen wurden möglichst vollständig abgelöst, um eine Verunreinigung der Kulturen mit Fibroblasten zu vermeiden. Das verbliebene Gewebe wurde zunächst mit Hilfe eines ophthalmischen Skalpells mechanisch zerkleinert. Nach Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit (2 Minuten bei 110 g) wurde das Gewebe mit einer Papain und DNase enthaltenden Enzymlösung (Tab. 11) suspendiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um eine enzymatische Dissoziation des Gewebes zu erreichen. Der Vorgang wurde durch Zugabe von 5 mL einer Trypsin Inhibitor-haltigen Stopplösung (Tab. 12), erneute Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes gestoppt. Daraufhin wurde das Material mit 10 mL L-15 Medium (Gibco, 31415-029) gewaschen, zentrifugiert und durch mehrfache Resuspension in 1 mL L-15 Medium zu einer möglichst homogenen, trüben Lösung verarbeitet. Die so erzeugte Zellsuspension wurde für 7 Minuten bei 110 g

zentrifugiert, nachfolgend mit 3 mL des Kulturmediums I (Tab. 13) resuspendiert und in die vorbehandelten Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden im Heracell 150 Incubator (Heraeus) bei 37 °C, unter 5 % CO₂ und bei regelmäßigem Mediumwechsel bis zur Konfluenz kultiviert. Wenn diese nach 4 bis 5 Tagen erreicht war, wurden die Kulturflaschen dicht verschlossen und bei Raumtemperatur über Nacht bei 250 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Dieser Schritt sorgte für ein Ablösen von unerwünschten Zellen wie Oligodendrozyten oder Neuronen. Die abgelösten Zellen wurde abgezogen und verworfen, die anhaftenden Ependymzellen nach Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Tab. 14) mit 1 mL Trypsin/EDTA (Gibco, 15400-054) bei 37 °C trypsinisiert. Durch Zugabe von 1 mL fetalem bovinem Serum (FBS, Sigma) wurde die Enzymreaktion nach 5 Minuten gestoppt. Nach Anfärben der toten Zellen mit Trypanblau (Chroma Gesellschaft Schmid & Co) wurden die intakten Zellen in einer Zählkammer (Neubauer improved, Braun) gezählt. Die durch 7-minütige Zentrifugation entstandenen Pellets wurden mit einer Konzentration von 10⁵ Zellen je 20 µL mit dem Kulturmedium I resuspendiert und in Tropfen von je 20 µL auf die vorbehandelten Deckgläser gegeben. Um eine ausreichende Adhäsion zu ermöglichen, wurden die Zellen nun für eine Stunde unter Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde je Well 1 mL Kulturmedium I hinzugefügt. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch das serumfreie Kulturmedium II (Tab. 15) ersetzt. Dieser Schritt definierte den Anfang der Differenzierung der Ependymzellen und wurde als DIV 0 (Tage in vitro) festgelegt. Das Medium wurde jeden zweiten Tag erneuert, um stets optimale Bedingungen für die Differenzierung der Zellen zu gewährleisten.

Tab. 10: Zusammensetzung der Hank's Plus Lösung

Der pH wurde auf 7,2 angepasst und die Lösung steril filtriert. v/v: Volumen/Volumen.

Konzentration	Substanz
137 mM	NaCl
5 mM	KCl
0,7 mM	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O
5 mM	Glucose H ₂ O
2,5 mM	CaCl ₂ 2H ₂ O
1,2 mM	MgSO ₄ 7H ₂ O
4,17 mM	NaHCO ₃
in	Ampuwa
pH = 7,2	
+	
10 mM	Hepes (Gibco)
0,075 % (v/v)	NaHCO ₃
1 %	Penicillin/Streptomycin (10.000 Einheiten/10.000 µg/mL; Gibco, 15140-122)

Tab. 11: Zusammensetzung der Enzymlösung

Menge	Substanz
30 µL	Papain (Worthington, LS002140)
15 µL	DNase I (Worthington, LS002139)
24 µL	L-Cystein Hydrochloride (Sigma-Aldrich, C7477)
1 mL	Kulturmedium II (Tab. 12)

Tab. 12: Zusammensetzung der Stopplösung

Menge	Substanz
1 mL	Trypsininhibitor (10 mg/mL, Gibco, 17075-029)
200 µL	DNase I
500 µL	Bovines Serum Albumin (Applichem Panreac, A6588,0100)
8,05 mL	L15 Medium

Tab. 13: Zusammensetzung des Kulturmediums I, v/v: Volumen/Volumen.

Konzentration	Substanz
1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin (10.000 Einheiten/10.000 µg/mL)
10 % (v/v)	Fetales Bovines Serum (Gibco, 10500-064)
in	DMEM/GlutaMax (Gibco, 31966-021)

Tab. 14: Zusammensetzung der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS)

Der pH wurde auf 7,2 angepasst. Zur Verwendung in Zellkultur wurde die Lösung steril filtriert. w/v: Masse/Volumen.

Konzentration	Substanz
1 % (w/v)	NaCl
0,25 % (w/v)	KCl
0,5 % (w/v)	KH ₂ PO ₄
1,775 % (w/v)	Na ₂ HPO ₄
in	Ampuwa

pH = 7,2

Tab. 15: Zusammensetzung des Kulturmediums II, v/v: Volumen/Volumen.

Konzentration	Substanz
1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin (10.000 Einheiten/10.000 µg/mL)
in	DMEM/GlutaMax

2.4.3 Fixierung der Zellen

Zur Untersuchung der Morphologie der Ependymzellen in verschiedenen Entwicklungsstadien wurden die Zellen nach 2, 6, 9 oder 10 Tagen in vitro fixiert. Hierfür wurden die Zellen in 37 °C warmem PBS gewaschen. Je Well wurden 500 µL 37 °C warme Paraformaldehyd-Lösung hinzugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen zweimalig in PBS gewaschen und konnten mit PBS bedeckt bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt werden.

2.5 *LacZ*-Färbung (Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität)

Die hier benutzten *Mtss1*-Knockout-Mäuse wurden durch die Insertion der *lacZ*-Sequenz zwischen den ersten beiden Exons des *Mtss1*-Gens generiert. *Mtss1*-heterozygote und Knockout-Mäuse exprimieren deshalb ein Fusionsprotein aus den Aminosäuren des ersten Exons von *Mtss1* und dem Enzym β -Galaktosidase. β -Galaktosidase wandelt 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-galactosidase (X-Gal) durch hydrolytische Spaltung in einen blauen, wasserunlöslichen Indigofarbstoff um. Dieser Mechanismus ermöglicht durch Inkubation von Gewebe in X-Gal-haltiger Lösung ein Sichtbarmachen jener Zellen, in denen eine Promotoraktivität vorliegt. Ein blaues Signal in Knockout- oder

heterozygoten Mäusen spiegelt eine Aktivität des *Mtss1*-Promotors in Wildtypmäusen wider.

2.5.1 Färbung von Kryostat-Gewebedünnschnitten

Die Gewebedünnschnitte wurden zunächst fixiert. Hierfür wurden 50 mL der *lacZ*-Fixierlösung (Tab. 16) in eine Glasküvette gefüllt, die Schnitte darin für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin zweimal in *lacZ*-Waschlösung (Tab. 17) gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 37 °C in *lacZ*-Färbelösung (Tab. 18) inkubiert. Die Färbung wurde durch Waschen in *lacZ*-Waschlösung und zweimaliges Waschen in PBS abgestoppt. Zur Mikroskopie und Fotografie der Ergebnisse wurden die Schnitte mit Kaysers Glyceringelatine (Merck) überschichtet und mit einem Deckglas versehen.

Tab. 16: Zusammensetzung der *lacZ*-Fixierlösung, v/v: Volumen/Volumen.

Konzentration	Substanz
0,1 M	NaH ₂ PO ₄
0,1 M	Na ₂ HPO ₄
2 M	MgCl ₂
5 mM	EGTA
0,2 % (v/v)	Glutaraldehyd
in	Ampuwa

Tab. 17: Zusammensetzung der *lacZ*-Waschlösung, v/v: Volumen/Volumen.

Konzentration	Substanz
0,1 M	NaH ₂ PO ₄
0,1 M	Na ₂ HPO ₄
2 M	MgCl ₂
5 mM	EGTA
0.01 % (v/v)	Na-Deoxycholat
0.02 % (v/v)	NP40
in	Ampuwa

Tab. 18: Zusammensetzung der *lacZ*-Färbelösung, w/v: Masse/Volumen.

Konzentration	Substanz
0,1 % (w/v)	X-Gal (Labomedic, 2004488)
5 mM	K ₄ Fe(CN) ₆ (Merck)
5 mM	K ₃ Fe(CN) ₆ (Merck)
in	<i>LacZ</i> -Waschlösung (Tab. 14)

2.5.2 Färbung von primären Ependymzellen

Fixierte primäre Ependymzellen wurden ebenfalls in PBS und anschließend in *lacZ*-Waschlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die *lacZ*-Färbelösung hinzugegeben, die Wells mit Parafilm (Merck) luftdicht verschlossen und die Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Waschen in *lacZ*-Waschlösung und PBS wurden die Zellen in PBS bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.6 Immunhistochemische Färbung

Die X-Gal-gefärbten Ependymzellen wurden im Anschluss immunhistochemisch angefärbt. Die Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurde durch eine 5-minütige Inkubation der Zellen in PBS mit 1 % (Volumen/Volumen (v/v)) H₂O₂ und 10 % (v/v) Methanol erreicht. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 %-igem Triton-X 100 (Sigma, X100) für 10 Minuten permeabilisiert. Nach Waschen in PBS wurden die Zellen in der Blockierlösung I (Tab. 19) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abermaligem Waschen folgte die Inkubation im primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Hierfür wurde entweder Kaninchen-anti-FoxJ1 (polyklonal, Sigma-Aldrich, SAB4500928) in einer Konzentration von 1 : 100 zur Anfärbung von Ependymzellen oder Maus-anti-acetyliertes Tubulin (monoklonal, Sigma-Aldrich, T7451) in einer Konzentration von 1 : 500 zur Anfärbung von Zilien in der Blockierlösung I verwendet. Das Produkt der Immunreaktion wurde durch biotinylierte sekundäre Antikörper sichtbar gemacht: Die Zellen wurden in Ziege-anti-Kaninchen (Vector, BA-9200) bzw. Ziege-anti-Maus (Vector, BA-1000) Antikörpern in einer Konzentration von 1 : 200 in Blockierlösung I für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte anschließend die Inkubation im Vactastain Avidin-Biotin-Komplex (Vector, VEC-PK-4000) für 30 Minuten gefolgt von zweimaligem Waschen in PBS. Als Farbgeber wurde 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid-Hydrat (DAB, Sigma, D5637-5g) verwendet. Dazu wurden die Zellen für etwa 5 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle mit DAB-Färbelösung inkubiert. Die Reaktion wurde durch gründliches Waschen mit PBS gestoppt und die Zellen anschließend in Kaysers Glyceringelatine (Merck) versiegelt.

Tab. 19: Zusammensetzung der Blockierlösung I, v/v: Volumen/Volumen.

Konzentration	Substanz
10 % (v/v)	Normales Ziegen Serum (Sigma)
in	PBS (Tab. 11)

2.7 Immunfluoreszenzfärbung

Die Untersuchung und Darstellung der Zilien in primären Ependymzellkulturen erfolgte durch immunfluoreszente Färbung. Die fixierten Zellen wurden dafür zunächst mit 0,5 %-igem Triton X-100 für 10 Minuten permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 2 Stunden bei Raumtemperatur in Blockierlösung II (Tab. 20) inkubiert. Es folgte sodann die Zugabe des primären Antikörpers, Maus-anti-acetyliertes Tubulin, in einer Konzentration von 1 : 500 in Blockierlösung II in der die Zellen bei 4 °C über Nacht inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation im sekundären Antikörper Alexa 488 Ziege-anti-Maus (Invitrogen, A11029) in einer Konzentration von 1 : 1000 in Blockierlösung II abgedunkelt für 2 Stunden bei Raumtemperatur, gefolgt von zwei weiteren Waschschritten in PBS. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit Phalloidin-TRITC (Sigma, P1951) in einer Konzentration von 1 : 500 in PBS durch Inkubation im Dunkeln für 40 Minuten angefärbt. Nach erneutem Waschen in PBS folgte die Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 (Sigma, B2261) in einer Konzentration von 1 : 5000, ebenfalls durch Inkubation im Dunkeln für 20 Minuten. Anschließend wurden die Zellen zweimalig in PBS und einmal in Ampuwa gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Tropfen DAKO fluorescence mounting medium (S302380-2) auf Objektträgern fixiert.

Tab. 20: Zusammensetzung der Blockierlösung II, v/v: Volumen/Volumen

Konzentration	Substanz
5 % (v/v)	Bovines Serum Albumin
5 % (v/v)	Normales Ziegen Serum
in	PBS (Tab. 11)

2.8 Anfertigung von Lateralventrikel-Präparaten

Für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen und für die Analyse des Flüssigkeitstransportes in den Lateralventrikeln wurden Wholemoundpräparate wie im Folgenden beschrieben hergestellt (vgl. Abb. 5).

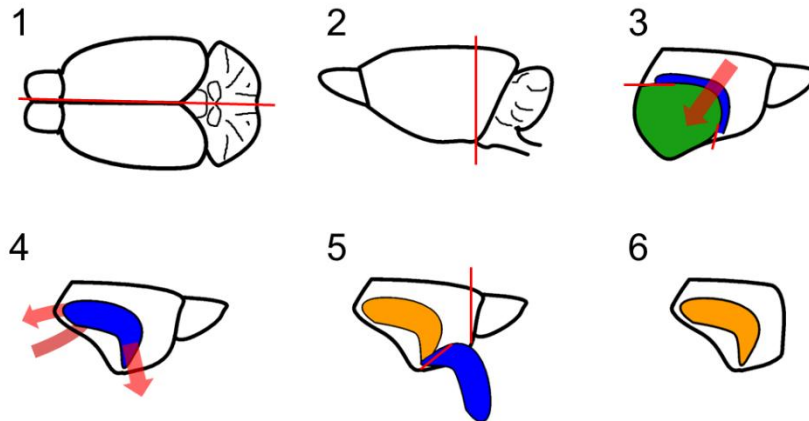


Abb. 5: Präparation der Lateralventrikel

1: Das Gehirn wurde entlang der interhemisphärischen Spalte durchtrennt. 2: Der okzipitale Anteil des Gehirns wurde durch einen koronaren Schnitt abgetrennt. 3: Das Diencephalon (grün) wurde durch Lösen der Anhaftungsstellen mit der Feinpipette entnommen. 4: Der Hippocampus (blau) wurde mobilisiert und 5: mit einem Schnitt an der frontalen Anhaftungsstelle entfernt. 6: Sicht auf die laterale Wand des Lateralventrikels (orange)

Die Präparation erfolgte auf Agarosegel unter einem Binokular mit einem ophthalmologischen Skalpell, einer gebogenen Feinpipette und Insektennadeln. Die Hirnhälften adulter Mäuse wurden hierfür zunächst mit dem Skalpell entlang der interhemisphärischen Spalte durchtrennt. Mit der Schnittfläche nach unten liegend wurde anschließend ein koronar verlaufender Schnitt im hinteren Drittel des Telencephalons gesetzt, der neben dem Cerebellum das Mesencephalon und den okzipitalen Teil des Telencephalons abtrennte. Nach Drehung der Hirnhälften wurde das Gewebe mit Insektennadeln auf dem Agarosegel fixiert und mit der Feinpipette vorsichtig das Diencephalon entnommen. Der Hippocampus konnte nun von okzipital mobilisiert und aus dem Lateralventrikel herausgelöst werden. Mit einem weiteren Schnitt an der frontalen Anheftungsstelle des Hippocampus konnte dieser entfernt

werden. Abschließend wurde ein longitudinaler Schnitt kurz hinter dem Bulbus olfactorius gesetzt, um diesen abzutrennen. Das Präparat ließ nun eine freie Sicht auf die laterale Wand des Lateralventrikels zu.

2.9 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden Tiere beider Genotypen von Dr. Britta Eiberger nach gängiger Technik perfundiert und das Gehirn entnommen. Es erfolgte anschließend die Präparation wie in 2.8 beschrieben in PBS in einer mit 5 % Agarose beschichteten Petrischale. Anschließend wurden die Präparate in 2 % Glutaraldehyd in Natriumcacodylat (0,1 M, Serva) eine Stunde lang bei Raumtemperatur fixiert. Nach Spülen in Natriumcacodylat wurden die Präparate auf ein Metallsieb übertragen und zum Wasserentzug durch eine Alkoholreihe von 30 %, 50 %, 80 % und 100 % Ethanol für je 10 Minuten geführt. Anschließend erfolgte die überkritische Trocknung. Bei diesem Verfahren wird durch Schaffung überkritischer Temperatur- und Druckbedingungen ein Phasenwechsel des Lösungsmittels vom flüssigen in den gasförmigen Zustand erreicht, ohne dass Trocknungsartefakte durch Verdampfen des Lösungsmittels entstehen. Damit kann ein Gewebe in einen vollständig trockenen Zustand gebracht werden, der zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung notwendig ist. Die Präparate wurden hierfür im Critical Point Dryer (CPD 030, Baltec) behandelt, in dem bei 4 °C in mehreren Schritten zunächst der Alkohol gegen flüssiges CO₂ ausgetauscht und dieses anschließend durch eine Erhitzung auf 40 °C in den gasförmigen Zustand überführt wurde. Nachdem das gasförmige CO₂ aus der Präparatekammer abgelassen wurde, wurden die Ventrikelpräparate auf mit Leitsilber beschichtete Metallnieten übertragen und bis zum vollständigen Abdampfen des Leitsilbers in einen Exsikkator gegeben. Die Präparate wurden anschließend im Sputter (Cressington Sputter Coater 208 HR) mit Platin/Palladium beschichtet. Die so vorbereiteten Präparate wurden im Rasterelektronenmikroskop (Philips 030 SFEG, Philips, Eindhoven, Niederlande) untersucht.

2.10 Analyse des Flüssigkeitstransports im Lateralventrikel

Um den Flüssigkeitstransport in den Lateralventrikeln durch den Zilienschlag des Ependyms zu visualisieren, wurden fluoreszente Mikrobeads mit 2,5 µm Durchmesser auf vitale Präparate von Lateralventrikeln appliziert und die Bewegung der Mikrobeads über die Oberfläche analysiert. Hierfür wurde nach einem Protokoll von Mirzadeh et al. (2010) wie folgt vorgegangen. Es wurden 4 Wildtyp-Tiere und 3 *Mtss1*-defiziente Mäuse im Alter von 65-75 Tagen untersucht.

2.10.1 Vorbereitung der Applikation

Die Injektion fluoreszenter Mikrobeads erfolgte durch einen hydraulischen Mikromanipulator (Leitz), der feinste Platzierungen einer Glaspipette ermöglicht. Zur Herstellung der Glaspipetten wurden Glaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,69 mm (Science Products, GB120F-10) in einem Puller (Narishige PC-10) gezogen. Mithilfe einer Mikroschmiede (Bachofer) wurde eine Pipettenöffnung von etwa 20 µm generiert. Die Pipettenöffnung wurde mit einem Permanentmarker schwarz markiert, um eine klare visuelle Abgrenzung über dem Präparat zu ermöglichen. Die Pipette wurde anschließend durch Kapillarkräfte mit Mineralöl gefüllt und in den Pipettenhalter des Mikromanipulators eingespannt. Anschließend wurde Mikrobeadlösung (Tab. 21) in die Pipette aufgezogen, bis sie zu etwa einem Viertel gefüllt war.

Tab. 21: Zusammensetzung der Mikrobeadlösung, v/v: Volumen/Volumen.

Konzentration	Substanz
50 % (v/v)	InSpeck Green Microscope Image Intensity Calibration Kit (2,5 µm) Stammlösung (Molecular Probes, 5871-2)
10 % (v/v)	Glycerol
40 % (v/v)	Ampuwa

2.10.2 Vorbereitung der Präparate

Für die Präparation der Lateralventrikel wurden Petrischalen mit 2 % Agarose in DMEM/GlutaMax beschichtet und mit DMEM/GlutaMax gefüllt. Im Brutschrank wurden sie auf 37 °C erwärmt und mit 5 % CO₂ gesättigt, um optimale Temperatur- und pH-Bedingungen zu schaffen. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und die

Schwanzspitze wurde zur erneuten Überprüfung des Genotyps verwendet. Das Gehirn wurde entnommen und in das warme Medium überführt. Anschließend wurde die Präparation des linken Lateralventrikels wie in 2.8 beschrieben zügig durchgeführt, um eine höchstmögliche Vitalität des Gewebes zu erhalten. Das fertige Präparat wurde besonders vorsichtig mit Insektennadeln fixiert, um die physiologische Form bestmöglich zu erhalten. Die rechte Hemisphäre wurde ohne vollständige Präparation in Fixierlösung überführt und über Nacht bei 4 °C fixiert. Nach Waschen in PBS wurde das Gewebe bei 4 °C in PBS zur anderweitigen Verwendung gelagert.

2.10.3 Durchführung

Das Präparat wurde unter einem Binokular mit integrierter Fluoreszenzlampe (LEICA MZFLIII) platziert. Hierbei wurde die Petrischale so positioniert, dass das Ventrikelvorderhorn mittig im oberen Bildausschnitt sichtbar war und das Ventrikelhinterhorn in Richtung der rechten unteren Bildecke wies. Mithilfe des Mikromanipulators wurde die Pipettenspitze unmittelbar über der Ventrikeloberfläche mittig auf einer gedachten Linie zwischen dem okzipitalen und medialen Drittel des Ventrikels positioniert. Anschließend wurde eine geringe Menge der Mikrobeadlösung (ca. 20-40 Mikrobeads) appliziert und die Bewegung der Mikrobeads über die Ventrikeloberfläche beobachtet (vgl. Abb. 6). Die videographischen Aufnahmen erfolgten mit einer Okularkamera (DinoEye Eyepiece camera, Dino Lite) mit einer Auflösung von 720 × 576 Pixel und einer Bildrate von 20 pro Sekunde sowie der dazugehörigen Videosoftware DinoCapture 2.0.

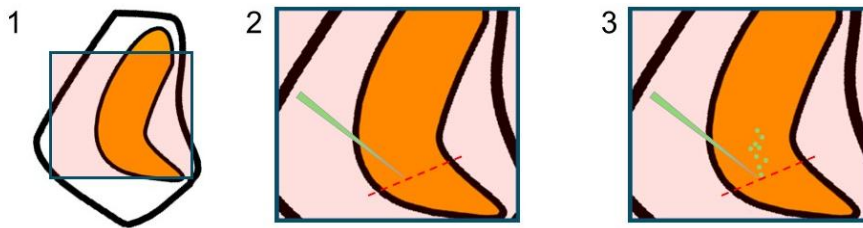


Abb. 6: Ablauf der Mikrobeadapplikation

1: Das Lateralventrikelpräparat wurde so unter dem Binokular platziert, dass das Ventrikelvorderhorn mittig im oberen Bildausschnitt und das Ventrikelhinterhorn in Richtung der rechten unteren Bildecke zu liegen kamen. 2: Die Pipette (grün) wurde mit Hilfe des Mikromanipulators unmittelbar über der Ventrikeloberfläche (orange) mittig auf einer gedachten Linie zwischen dem okzipitalen und medialen Drittel des Ventrikels positioniert. 3: Eine geringe Menge der Mikrobeadlösung (grüne Punkte) wurde appliziert und der Mikrobeadverlauf beobachtet

2.11 Mäusegehirn MRT

Das Ventrikelvolumen *Mtss1*-defizienter Mäuse und von Kontrollmäusen wurde durch eine MRT-Untersuchung ermittelt. Hierfür wurden 10 *Mtss1*-defiziente Mäuse und 12 Wildtyp-Mäuse untersucht. Die Tiere wurden mit einer Überdosis von Ketamin (MEDISTAR Arzneimittelvertrieb GmbH, 58387 Ascheberg, Deutschland) und Xylazin (Ceva Tiergesundheit GmbH, 40472 Düsseldorf, Deutschland) im Verhältnis 20 : 1 getötet und in einer Mauskopfspule (RAPID Biomedical GmbH, 97222 Rimpar, Deutschland) platziert. Es wurden sagittal orientierte, T2-gewichtete Aufnahmen in einem 3 Tesla MRT (Philips Ingenia 3.0T, Philips Healthcare, Best, Niederlande) durchgeführt. Die Scanparameter waren wie folgt: Akquisitionszeit: 8 Minuten und 24 Sekunden, Echozeit: 97 ms, Repititionszeit: 3 s, Matrix: 124 × 117 mm, örtliche Auflösung: 0,2 × 0,2 × 0,5 mm. Das Volumen der Lateralventrikel und des vierten Ventrikels wurde manuell mit einem Voxel-Brightness-Threshold-Tool (Philips IntelliSpace Portal 5.0) bestimmt.

2.12 Visualisierung und Auswertung

2.12.1 Visualisierung

Die Bilder von Kryostatgewebedünnschnitten und immunhistochemisch gefärbten Zellen wurden am Nikon Mikroskop (ECLIPSE Ni, Nikon, Tokyo) und dazugehöriger Kamera (DS-Fi2, 2560 × 1920 Pixel) sowie Software (NIS-Elements D) angefertigt. Immunfluoreszent gefärbte Zellen wurden unter dem Axioskop 2 (Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht. Sie wurden mit der Photometrics Coolsnap EZ Kamera (Visitron systems, Puchheim, Deutschland, Auflösung 1392 × 1040 Pixel) und der zugehörigen Software Axiovision (Zeiss, Jena, Deutschland, Release 4.82) dokumentiert. Kontrast und Helligkeit wurden zum Teil nachträglich mit ImageJ (Fiji, ImageJ 1.51c) angepasst.

2.12.2 Auswertung der Ziliendichte

Zur Berechnung der Ziliendichte wurden primäre Ependymzellen von 3 Tieren je Genotyp nach 2, 6 und 10 Tagen *in vitro* fixiert und immunfluoreszent gefärbt, um die Zellgrenzen und Zilien sichtbar zu machen (siehe 2.7). Pro Entwicklungsstadium und Individuum wurden 2 bis 4 Bilder im Randbereich der Zelltropfen angefertigt und diese ausgewertet. Zunächst wurden alle Zellen je Bild in ImageJ mithilfe des Tools „ROI Manager“ gezählt. Anschließend wurden die Anzahl der Zellen mit einem einzelnen sichtbaren (primären) Zilium und die Anzahl der Zellen mit mehreren sichtbaren Zilien je Bild bestimmt. An DIV 2 wurden je Präparat durchschnittlich 227 und insgesamt 2499 Zellen ausgewertet (*Mtss1+/+* = 1215, *Mtss1-/-* = 1284) an DIV 6 durchschnittlich 204 und insgesamt 4698 Zellen (*Mtss1+/+* = 2550, *Mtss1-/-* = 2148) und an DIV 10 durchschnittlich 197 und insgesamt 5899 Zellen (*Mtss1+/+* = 3029, *Mtss1-/-* = 2870).

Der Anteil monoziliärer und der mehrerer Zilien tragender Zellen wurde berechnet und diese Werte in Abhängigkeit vom Genotyp und Kulturalter mit Hilfe eines zweiseitigen t-Tests nach Welch verglichen. Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 wurden als signifikant gewertet. Die graphische Darstellung als Boxplots wurde in R und RStudio (R

Core Team, 2013; RStudio Team, 2015) mit Unterstützung durch Clemens Wagner angefertigt.

2.12.3 Auswertung der Zellgrößen

Primäre Ependymzellen von 3 Tieren je Genotyp wurden nach 10 Tagen *in vitro* fixiert und die Zellgrenzen und Zilien immunfluoreszent gefärbt. Je Individuum wurden 4 Bilder im Randbereich der Zelltropfen angefertigt und ausgewertet. Anhand des Phalloidinsignals wurden die Zellgrenzen aller vollständig sichtbaren Zellen je Bild durch die „polygon selection“ Funktion in ImageJ manuell nachgezogen, im ROI Manager gesammelt und vermessen. Die Daten wurden mit den Daten aus 2.12.2 kombiniert, sodass auch hier eine Unterscheidung zwischen Zellen ohne Zilien, mit einem einzelnen Zilium oder mit mehreren Zilien möglich war. Insgesamt wurden 5899 Zellen vermessen (*Mtss1+/+* = 3029, *Mtss1-/-* = 2870). Die Messdaten wurden anschließend in R/RStudio mit Unterstützung durch Clemens Wagner in einem Densityplot dargestellt, der die relative Häufigkeit der Zellgrößen unterschieden nach Genotyp und dem Vorhandensein eines einzelnen oder mehrerer Zilien abbildet.

2.12.4 Auswertung des Flüssigkeitstransportes

Die wie in Abschnitt 2.10 beschrieben angefertigten Videos des Flüssigkeitstransportes wurden als Bildstapel in ImageJ importiert. In den Videos war zu Anfang der Aufnahme die endgültige Platzierung der Pipette über dem Ventrikel zu sehen. Nach der Applikation der Mikrobeads war zunächst ein schneller Transport in eine mehr oder weniger deutlich definierte Hautbewegungsrichtung zu beobachten, bevor sich deren Bewegung stark verlangsamte. Der Bereich des Bildstapels, in dem der Transport von ca. 20 Mikrobeads über die Ventrikeloberfläche vollständig nachverfolgt werden konnte, wurde isoliert, und jedes fünfte Einzelbild dieses Bereichs wurde zu einem neuen Bildstapel zusammengefasst mit einer Bildrate von 5 Bildern pro Sekunde. Mithilfe des Plugins MTrackJ (Meijering et al., 2012) wurden anschließend die einzelnen Mikrobeads manuell getrackt. Dabei wurde möglichst der Verlauf ab dem Austreten aus der Pipette bis deutlich nach dem Verlangsamten des Mikrobeads verfolgt. Pro Individuum wurden

mindestens 18 und maximal 21 Mikrobeads getrackt. Im Anschluss wurde mit der Funktion „Measure“ in ImageJ eine Tabelle erstellt, die unter anderem die x - und y -Koordinaten jedes getrackten Punktes und die zugehörige Zeit in Sekunden sowie die Geschwindigkeit des Mikrobeads zwischen zwei getrackten Punkten enthielt. Zusätzlich wurden die x - und y -Koordinaten für die Position der Pipettenspitze je Individuum ermittelt. Die Tabelle wurde in Microsoft Excel für Microsoft 365 übertragen und eine Legende hinzugefügt, die die Koordinaten der Pipettenposition, die Bildrate und den Umrechnungswert $UW = 149$ Pixel/mm enthielt. Letzterer wurde durch Skalierung des Binokulars mithilfe eines Objektmikrometers ermittelt. Die Tabelle wurde um die Spalte $distance[mm]$ ergänzt. Diese beschreibt den Abstand d jedes getrackten Punktes von der Pipettenspitze und wurde mithilfe des Satz des Pythagoras berechnet:

$$d_{bead} = \sqrt{(x_{bead} - x_{Pipette})^2 + (y_{bead} - y_{Pipette})^2} / UW$$

Anschließend wurde eine weitere Spalte ($v[mm/s]$) hinzugefügt, die die Geschwindigkeit in Millimetern pro Sekunde durch Division des vorhandenen Geschwindigkeitwertes durch den Umrechnungswert ausdrückt.

Um eine interindividuelle Vergleichbarkeit der Mikrobeadverläufe zu schaffen, mussten die Koordinaten neu definiert werden: Die x - und y -Koordinaten orientierten sich an dem Videobildausschnitt und hatten ihren Nullpunkt in der oberen linken Bildecke. Da die Präparate und die Pipettenspitze in jedem Video minimal unterschiedlich platziert waren, ließen die Mikrobeadverläufe sich in diesem Koordinatensystem nicht miteinander vergleichen. Für jedes Individuum wurde deswegen ein neues Koordinatensystem erstellt, dessen Nullpunkt durch die Pipettenspitze definiert und dessen Abszisse an der Hauptbewegungsrichtung der Mikrobeads orientiert wurde. Um diese Hauptbewegungsrichtung zu definieren, wurde je Individuum der Bereich betrachtet, in dem der gerichtete Transport der Mikrobeads endete. Da die Mikrobeads nach dem gerichteten Transport meistens stark an Geschwindigkeit verloren, wurde dieser Geschwindigkeitsabfall zur Endpunktdefinition herangezogen. Für die Festlegung der Hauptbewegungsrichtung wurden die Distanzwerte verwendet, die als Polarkoordinaten um die Pipettenspitze verstanden werden konnten. Die Maximalgeschwindigkeit v_{max} wurde je Mikrobeadverlauf mit der entsprechenden Excelfunktion „MAX(...)“ bestimmt.

Anschließend wurde im letzten Drittel der Gesamtstrecke der tracks der Punkt gesucht, in dem $v_{max}/2$ erreicht oder unterschritten wurde und nach dem keine substantiell höheren Geschwindigkeiten mehr erreicht wurden. Dieser wurde als Endpunkt des tracks definiert und die folgenden Werte in der weiteren Auswertung vernachlässigt. Von allen in einem Tier gemessenen tracks wurde der Endpunkt des kürzesten tracks als Referenzwert gewählt. Anschließend wurde für jeden weiteren track der Punkt gesucht, dessen Distanz von der Pipettenspitze größer oder gleich der Distanz des Referenzwertes war. Die x - und y -Koordinaten dieser Punkte wurden anschließend gemittelt. Daraus ergab sich ein durchschnittlicher Endpunkt, der in Verbindung mit dem Nullpunkt (der Position der Pipettenspitze) den Vektor der Hauptbewegungsachse der Mikrobeads und damit die neue Abszisse definierte.

Um die bestehenden x - und y -Koordinaten in das neue Koordinatensystem zu transformieren, wurde der Einheitsvektor in der Hauptbewegungsrichtung berechnet. Zunächst wurde die Position des Endpunktes in Relation zum Nullpunkt ausgedrückt:

$$x_{End_rel} = x_{End} - x_{Pipette}$$

sowie

$$y_{End_rel} = y_{End} - y_{Pipette}$$

Anschließend wurde der Einheitsvektor der Abszisse u wie folgt ausgedrückt:

$$\vec{e}_u = \frac{1}{\sqrt{x_{End_rel}^2 + y_{End_rel}^2}} \begin{pmatrix} x_{End_rel} \\ y_{End_rel} \end{pmatrix}$$

Zur Definition der Ordinate w wurde der Einheitsvektor um 90° gedreht:

$$\vec{e}_w = \frac{1}{\sqrt{x_{End_rel}^2 + y_{End_rel}^2}} \begin{pmatrix} -y_{End_rel} \\ x_{End_rel} \end{pmatrix}$$

Die beiden Vektoren wurden der Legende hinzugefügt, um die Koordinatentransformation für jeden getrackten Punkt tp umzusetzen. Gleichzeitig erfolgte eine Umrechnung der Koordinatenpunkte von Pixel in mm. Dafür wurden der Tabelle zwei neue Spalten hinzugefügt: $u[mm]$ und $w[mm]$.

Die u -Koordinate wurde folgendermaßen ausgedrückt:

$$u_{tp} = \frac{(x_{tp} - x_{Pipette}) * \vec{e}_{u_x} + (y_{tp} - y_{Pipette}) * \vec{e}_{u_y}}{UW}$$

Die w-Koordinate wurde dementsprechend folgendermaßen ausgedrückt:

$$w_{tp} = \frac{(x_{tp} - x_{Pipette}) * \vec{e}_{w_x} + (y_{tp} - y_{Pipette}) * \vec{e}_{w_y}}{UW}$$

Anschließend wurden w -Koordinaten in äquidistanten u -Abständen für jeden Mikrobeadverlauf benötigt. Die entsprechenden w -Werte wurden mittels Interpolation berechnet. Nach Festlegen der gewünschten u -Koordinate u_i wurden die nächstniedrigere (u_0) und die nächsthöhere (u_1) vorhandene u -Koordinate und die entsprechenden w -Koordinaten w_0 und w_1 aufgesucht. Aus diesen wurde ein Steigungsdreieck berechnet, welches mit der Differenz der gewünschten u -Koordinate und der nächstniedrigeren u -Koordinate multipliziert und mit der nächstniedrigeren w -Koordinate addiert wurde:

$$w_i = w_0 + (u_i - u_0) * \frac{w_1 - w_0}{u_1 - u_0}$$

Mithilfe dieses Verfahrens konnte für jedes Individuum eine neue Tabelle erstellt werden, die in der ersten Spalte äquidistante u -Werte beginnend bei 0 in Schritten von 0,05 mm enthielt und in den folgenden Spalten die entsprechenden, durch Interpolation berechneten w -Werte für die einzelnen Mikrobeadverläufe. Je u -Wert konnte so ein gemittelter w -Wert über alle Mikrobeadverläufe bestimmt werden. Die Gesamtheit dieser Mittelwerte bildete einen neuen Referenzverlauf. Die Abweichung jedes einzelnen Mikrobeadverlaufs von diesem Referenzverlauf konnte durch einfache Differenzbildung der w -Werte ausgedrückt werden. Insbesondere konnte nun aber eine Standardabweichung je u -Wert berechnet werden als Maß der Streuung der Mikrobeadverläufe unabhängig von der Ausrichtung des Referenzverlaufs. Je Individuum wurden Standardabweichungen für alle u -Werte bestimmt, für die Daten von allen Mikrobeadverläufen vorlagen und die unterhalb des vorher festgelegten Endpunktes waren. Daraus ergaben sich durchschnittlich 28 Werte, aus denen ein Mittelwert gezogen werden konnte. Hiermit lag nun ein Wert je Individuum vor, der die Streuung aller Mikrobeadverläufe über den Bereich des gerichteten Transports abbildet.

Die gemittelten Standardabweichungen wurden anschließend auf einen statistisch relevanten Unterschied zwischen den Genotypen mittels einseitigem t-Test nach Welch überprüft, als Signifikanzgrenze wurde $p < 0,05$ gewählt. Die graphische Darstellung als Liniendiagramm und als Boxplot wurde in R/RStudio mit Unterstützung durch Clemens Wagner angefertigt.

2.12.5 Auswertung der Geschwindigkeit des Flüssigkeitstransports

Die Geschwindigkeit der Mikrobeads wurde aus der Länge der Strecke des gerichteten Transportes und der verstrichenen Zeit berechnet. Je Individuum wurde der Mittelwert der Geschwindigkeiten berechnet. Die Unterschiede zwischen den Genotypen wurden mittels zweiseitigem t-Test nach Welch überprüft, die Signifikanzgrenze wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die graphische Darstellung als Boxplot wurde in R/RStudio mit Unterstützung durch Clemens Wagner angefertigt.

2.12.6 Auswertung der MRT-Daten

Die mit Philips IntelliSpace Portal erzeugten Daten wurden in Microsoft Excel für Microsoft 365 weiterbearbeitet. Es wurden Mittelwerte über die Volumina der Lateralventrikel und des vierten Ventrikels gebildet. Unterschiede zwischen den Genotypen wurden mittels einseitigem t-Test nach Welch auf statistische Signifikanz getestet, die Signifikanzgrenze wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die graphische Darstellung als Boxplots wurde in R/RStudio mit Unterstützung durch Clemens Wagner angefertigt.

3. Ergebnisse

Um den Einfluss von *Mtss1* auf die Entwicklung und Motilität ependymaler Zilien zu analysieren, wurde eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, die die Morphologie und Funktionalität der Zilien beleuchten sollten.

3.1 *Mtss1* wird in ependymalen Zellen in situ exprimiert

Da in *Mtss1*-defizienten Mäusen die Expression von *Mtss1* durch die des *lacZ*-Reportergens ersetzt wird, kann die zellspezifische Aktivität des *Mtss1*-Promoters und damit die Ausprägung des Reporterproteins durch X-Gal-Färbung nachgewiesen werden. In X-Gal-gefärbten Gehirnschnitten homozygot defizienter *Mtss1*-Mäuse konnte ein Signal in den Wandstrukturen der Ventrikel festgestellt werden (vgl. Abb. 7). Da Ependymzellen den Großteil des Epithels der Ventrikelwände bilden, wies die Analyse demnach auf die Expression von *Mtss1* in Ependymzellen hin.

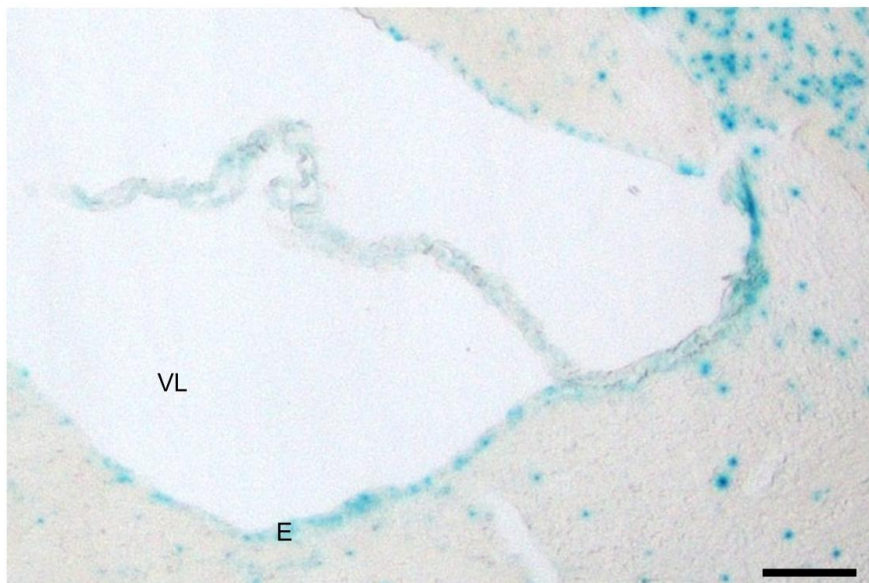


Abb. 7: *Mtss1* wird in der Ventrikelwand exprimiert

Nachweis der Aktivität des *Mtss1*-Promotors anhand der Aktivität der β -Galaktosidase in einem Kryostat-Gewebedünnschnitt des Lateralventrikels eines adulten *Mtss1*-heterozygoten Tieres. VL: Ventrikellumen, E: Ependym, Größenstandard: 250 μ m.

3.2 *Mtss1* hat einen Einfluss auf die Zilien- und Zellentwicklung in primären Ependymzellkulturen

Die ins Ventrikellumen ragende Zellschicht setzt sich hauptsächlich aus drei verschiedenen Zellarten zusammen: B1 Zellen (neuronale Stammzellen), E1 Zellen (Ependymzellen mit mehreren Zilien) und E2 Zellen (Ependymzellen mit zwei Zilien) (Mirzadeh et al., 2008). Da eine Vergesellschaftung von MTSS1 mit Basalkörpern von primären Zilien beschrieben wurde (Bershteyn et al., 2010) konzentrierte sich die weitere Arbeit auf die Untersuchung der zilientragenden Ependymzellen.

Um Wechselwirkungen anderer Strukturen und Einflussfaktoren auf die Morphologie und Funktionalität der Ependymzellen auszuschließen, wurden im Folgenden die Ependymzellen *in vitro* untersucht. Hierfür wurden primäre Ependymzellkulturen angelegt.

3.2.1 *Mtss1* wird in primären Ependymzellkulturen exprimiert

Die primären Ependymzellkulturen wurden zunächst auf die Expression von *Mtss1* untersucht. Hierfür wurde in Zellkulturen 5 Tage alter, *Mtss1*-heterozygoter Mäuse nach 9 Tagen *in vitro* die Aktivität der β -Galaktosidase als Indikator für die *Mtss1*-Expression untersucht und die Zellen immunhistochemisch mit Antikörpern gegen FoxJ1 als kernständigen Marker für zilientragende Ependymzellen gefärbt (vgl. Abb. 8 A). Es ließ sich eine Koexpression von β -Galaktosidase und FoxJ1 erkennen, was auf eine Expression von *Mtss1* in Wildtyp-Mäusen hinweist.

Da unser Interessenfokus insbesondere auf den mehrfach zilientragenden Ependymzellen (E1) lag, wurde in einer weiteren Untersuchung ein Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität in Kombination mit einer Antikörperfärbung gegen acetyliertes Tubulin durchgeführt (vgl. Abb. 8 B). Hier zeigte sich eine Aktivität der β -Galaktosidase in Zellen, die Zilienbüschel ausgebildet hatten.

In den untersuchten Ependymzellkulturen gab es zudem vereinzelt Zellen, die β -Galaktosidase positiv und FoxJ1 und acetyliertes Tubulin negativ waren, was auf eine *Mtss1*-Expression auch in anderen in der Kultur vereinzelt vorhandenen Zellarten hinweist.

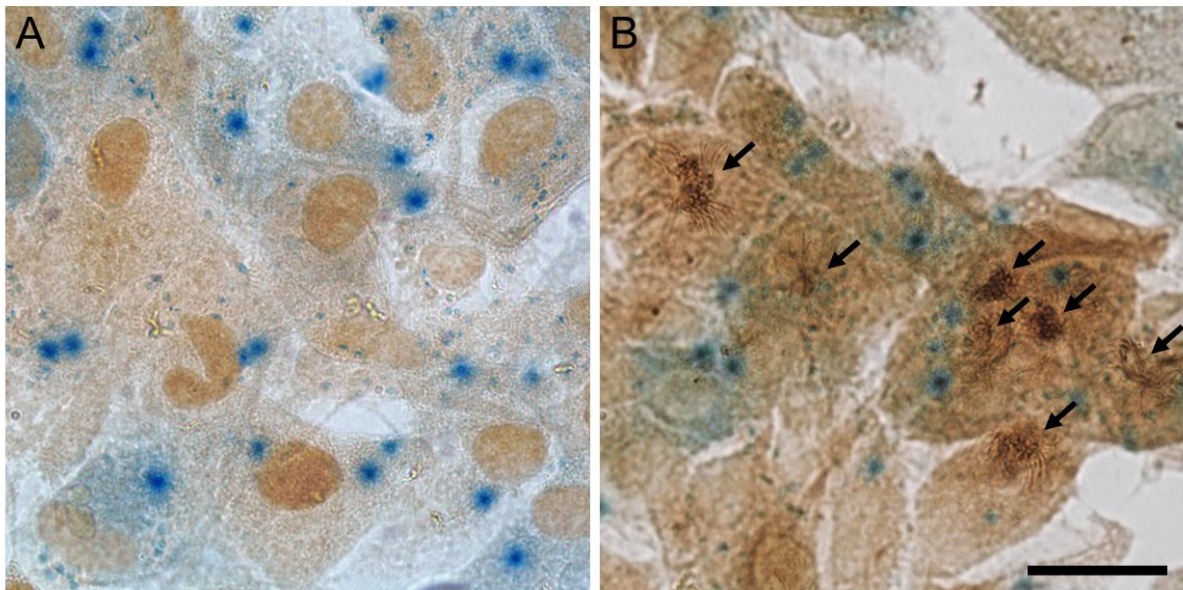


Abb. 8: *Mtss1* wird in primärkultivierten Ependymzellen exprimiert. Primäre Ependymzellkultur eines *Mtss1*-heterozygoten P5 Tiers an DIV 9 mit Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität (blau) und Färbung gegen FoxJ1 (braun, A) als Marker für Ependymzellen bzw. acetyliertes Tubulin (braun, B) als Marker für Zilien (mit Pfeilen hervorgehoben). Größenstandard: 20 μ m

3.2.2 Die Deletion von *Mtss1* führt zu einer verminderten Ziliendichte

Da MTSS1 die Entwicklung primärer Zilien beeinflussen kann, wurden im nächsten Schritt die Ausbildung motiler ependymaler Zilien mithilfe von Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Der Anteil an Zellen mit einem primären und mit mehreren Zilien wurde bestimmt. Es wurden primäre Zellkulturen von drei Tieren je Genotyp (*Mtss1*-defizient und Wildtyp) angelegt. Die Zellen jeder Kultur wurden nach 2, 6 und 10 Tagen in vitro fixiert und gefärbt.

An DIV 2 hatten $58,6 \pm 7,3$ % (Mittelwert und Standardabweichung) der Wildtypzellen und $52,8 \pm 3,9$ % der *Mtss1*-defizienten Zellen ein einzelnes Zilium ausgebildet. Auf $3,4 \pm 2,1$ % der Wildtypzellen und $4,1 \pm 2,2$ % der *Mtss1*-defizienten Zellen konnten mehrere Zilien nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden (einzelnes Zilium: $p = 0,2$; mehrere Zilien: $p = 0,61$) (vgl. Abb. 9 A, D, G und H).

An DIV 6 hatten $39,6 \pm 5,8$ % der Wildtypzellen und $41,3 \pm 7,7$ % der *Mtss1*-defizienten Zellen ein einzelnes Zilium gebildet. Ein signifikanter Unterschied ließ sich auch hier nicht feststellen ($p = 0,58$). Im Gegensatz dazu konnten in Wildtypkulturen ($30,4 \pm 4,8$ %) signifikant mehr Zellen mit mehreren Zilien nachgewiesen werden als in Kulturen aus *Mtss1*-defizienten Tieren ($23,9 \pm 7,5$ %, $p < 0,05$) (vgl. Abb. 9 B, E, G und H).

An DIV 10 hatten $21,1 \pm 5,5$ % der Wildtypzellen und $24,9 \pm 5,6$ % der *Mtss1*-defizienten Zellen ein einzelnes Zilium gebildet. Ein signifikanter Unterschied ließ sich hier nicht feststellen ($p = 0,09$). Es konnte jedoch wiederum ein signifikanter Unterschied in der Zahl der Zellen mit mehreren Zilien festgestellt werden: $60,6 \pm 6,4$ % der Wildtypzellen und $50,0 \pm 13,1$ % der *Mtss1*-defizienten Zellen bildeten mehrere Zilien aus ($p < 0,05$) (vgl. Abb. 9 C, F, G und H).

Es zeigte sich somit eine in beiden Genotypen vergleichbare Entwicklung: Der Anteil an Zellen mit einem Zilium nahm kontinuierlich ab, während der Anteil der Zellen mit mehreren Zilien zunahm. Die Zunahme fiel in *Mtss1*-defizienten Tieren jedoch schwächer aus, sodass zum letzten Untersuchungszeitpunkt (DIV 10) ein Unterschied von 10,6 % zwischen beiden Gruppen bestand.

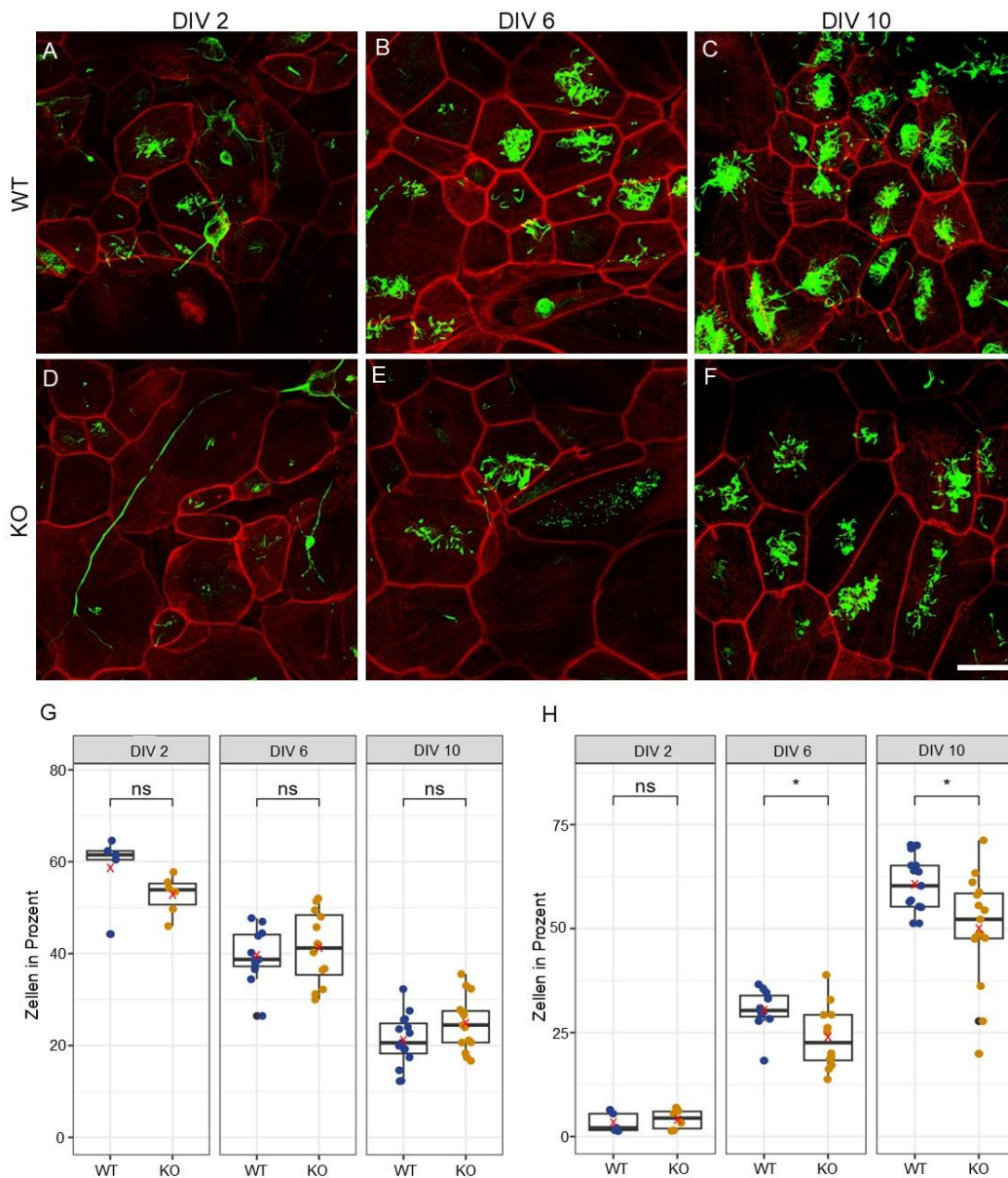


Abb. 9: *Mtss1*-Defizienz beeinflusst die Zilienausbildung

Der Anteil an Zellen mit mehreren Zilien nimmt im Laufe der *in vitro*-Entwicklung zu und ist bei *Mtss1*-defizienten Ependymzellen geringer als bei Kontrollzellen.

Primäre Ependymzellkulturen von P4 Wildtyp-Mäusen (A, B und C) und P4 *Mtss1*-defizienten Tieren (D, E und F) an DIV 2 (A und D), DIV 6 (B und E) und DIV 10 (C und F). Immunfluoreszenzfärbung mit Phalloidin (rot) als Marker für die Zellgrenzen und acetyliertem Tubulin (grün) als Marker für die Zilien. WT: Wildtyp, KO: Knockout, Größenstandard: 20 μ m.

Prozentualer Anteil der Zellen mit einem einzelnen Zilium (G) bzw. mehreren Zilien (H) an DIV 2, DIV 6 und DIV 10. Wildtypzellen (WT): blau, *Mtss1*-defiziente Zellen (KO): orange, Mittelwerte in rot, ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, ausgewertete Zellen: DIV 2: $N(Mtss1^{+/+}) = 3$, $n(Mtss1^{+/+}) = 1215$, $N(Mtss1^{-/-}) = 3$, $n(Mtss1^{-/-}) = 1284$, DIV 6: $N(Mtss1^{+/+}) = 3$, $n(Mtss1^{+/+}) = 2550$, $N(Mtss1^{-/-}) = 3$, $n(Mtss1^{-/-}) = 2148$, DIV 10: $N(Mtss1^{+/+}) = 3$, $n(Mtss1^{+/+}) = 3029$, $N(Mtss1^{-/-}) = 3$, $n(Mtss1^{-/-}) = 2870$.

3.2.3 Die Deletion von *Mtss1* führt zu einer veränderten Zellgrößenverteilung

Bei den oben genannten Analysen erschienen die zilientragenden Zellen in Kulturen *Mtss1*-defizienter Mäuse häufig größer als zilientragende Zellen in Kulturen von Wildtyp-Mäusen.

Um diesen Eindruck zu quantifizieren, wurden die Zellgrößen von Zellen mit einem einzelnen Zilium und die Zellgrößen von Zellen mit mehreren Zilien an DIV 10 miteinander verglichen. Zur Bestimmung der Zellgröße wurden die durch Phalloidin gefärbten Zellgrenzen vermessen und die Flächen der einzelnen Zellen berechnet (vgl. Abb. 10).

In beiden Gruppen zeigten sich deutlich rechtsschiefe Verteilungen. Dabei waren sowohl der Mittelwert als auch der Median der Zellgrößen bei Wildtypzellen in beiden Gruppen kleiner als bei Knockoutzellen (einzelnes Zilium: Mittelwert $\bar{x}_{+/+} = 504,48 \mu\text{m}^2$, Median $m_{+/+} = 280,37 \mu\text{m}^2$, und $\bar{x}_{-/-} = 576,69 \mu\text{m}^2$, $m_{-/-} = 362,32 \mu\text{m}^2$; mehrere Zilien: $\bar{x}_{+/+} = 618,86 \mu\text{m}^2$, $m_{+/+} = 440,5 \mu\text{m}^2$ und $\bar{x}_{-/-} = 744,42 \mu\text{m}^2$, $m_{-/-} = 523,76 \mu\text{m}^2$). Das bedeutet, dass zilientragende Wildtypzellen mit einer höheren Häufigkeit kleiner waren als zilientragende Knockoutzellen.

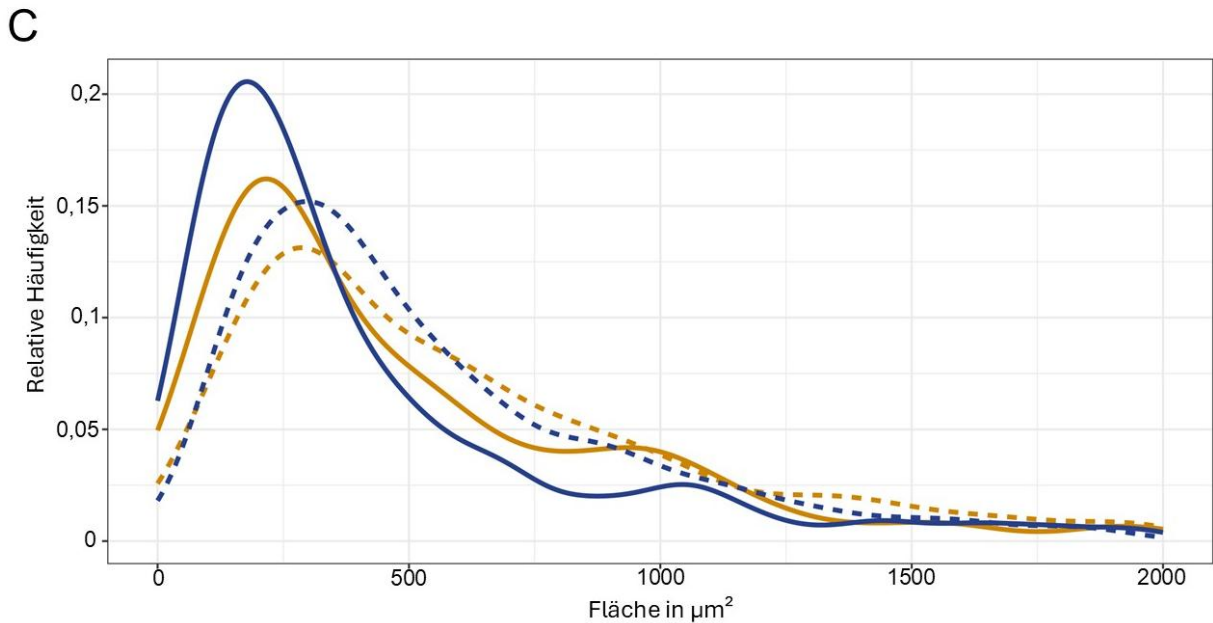
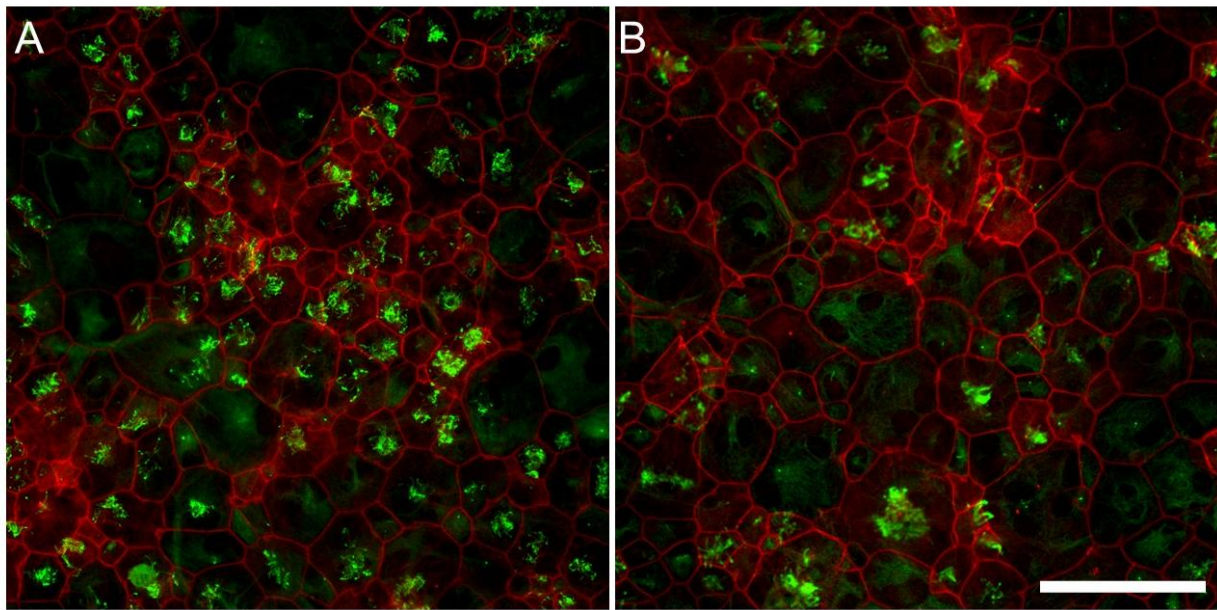


Abb. 10: *Mtss1*-Defizienz beeinflusst die Ependymzellgröße

Zilientragende Zellen *Mtss1*-defizienter Tiere sind größer als die von Wildtyp-Mäusen.

Primäre Ependymzellkulturen von P4 Wildtypmäusen (A) und P4 *Mtss1*-defizienten Tieren (B) an DIV 10. Immunfluoreszenzfärbung mit Phalloidin (rot) als Marker für die Zellgrenzen und acetyliertem Tubulin (grün) als Marker für die Zilien. Größenstandard: 100 μm . C: Densityplot der Zellgrößen von Zellen mit einem einzelnen Zilium (durchgezogene Linie) und von Zellen mit mehreren Zilien (gestrichelte Linie). Wildtypzellen: blau, *Mtss1*-defiziente Zellen: orange, ausgewertete Zellen: $N(Mtss1^{+/+}) = 3$, $n(Mtss1^{+/+}) = 3029$, $N(Mtss1^{-/-}) = 3$, $n(Mtss1^{-/-}) = 2870$.

3.3 Morphologische Veränderungen der ependymalen Auskleidung der Ventrikel

Zur Beurteilung der ependymalen Zilienausprägung *in vivo* wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Lateralventrikeln *Mtss1*-defizienter Mäuse und von Wildtyp-Mäusen angefertigt. Es wurden junge Tiere an P8 (*Mtss1*^{+/+} = 3, *Mtss1*^{-/-} = 2) und adulte Tiere (*Mtss1*^{+/+} = 1, *Mtss1*^{-/-} = 1) untersucht.

In einem Großteil der angefertigten Aufnahmen der P8-Wildtyp-Tiere zeigte sich eine flächendeckend gleichbleibende Richtungsorientierung der Zilienbüschel sowie eine ähnliche Ausrichtung der einzelnen Zilien innerhalb eines Zilienbüschels. Bei den *Mtss1*-defizienten Tieren fand sich eine solche Ordnung eher selten. Die Zilienbüschel ließen keine eindeutige Ausrichtung erkennen. Innerhalb der einzelnen Zilienbüschel war zudem keine eindeutige Orientierung erkennbar (vgl. Abb. 11).

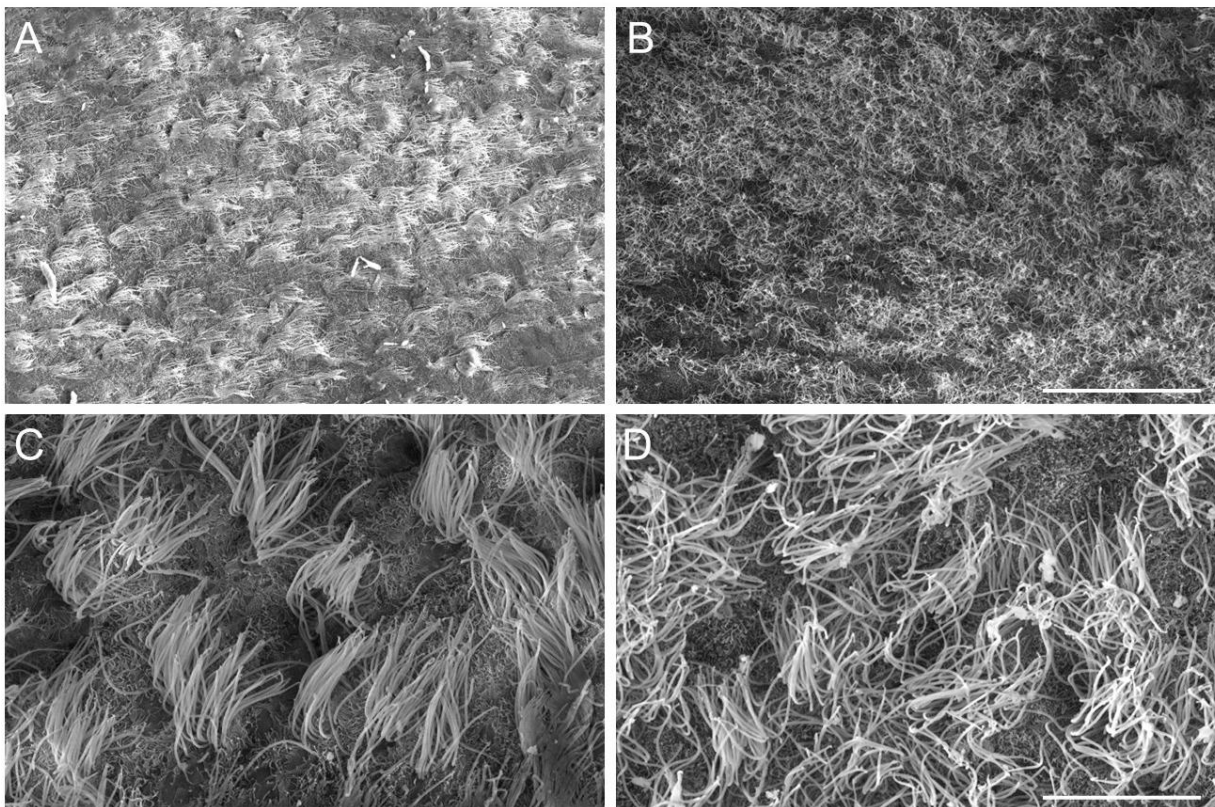


Abb. 11: *Mtss1*-Defizienz beeinflusst die Zilienorientierung

Die Zilien und Zilienbüschel *Mtss1*-defizienter Tiere zeigten teilweise keine eindeutige Orientierung.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Lateralventrikeln von P8 Wildtytieren (A und C) und P8 *Mtss1*-defizienten Tieren (B und D). Größenstandard A und B: 50 μm , Größenstandard C und D: 10 μm

Im Vergleich der beiden adulten Tiere zeigte sich in dem Lateralventrikel des *Mtss1*-defizienten Individuums eine niedrigere Ziliendichte in mehreren Abschnitten des Ventrikels. Die Zilienbüschel in den Lateralventrikeln des Wildtyp-Tieres waren insgesamt dichter angeordnet (vgl. Abb. 12).

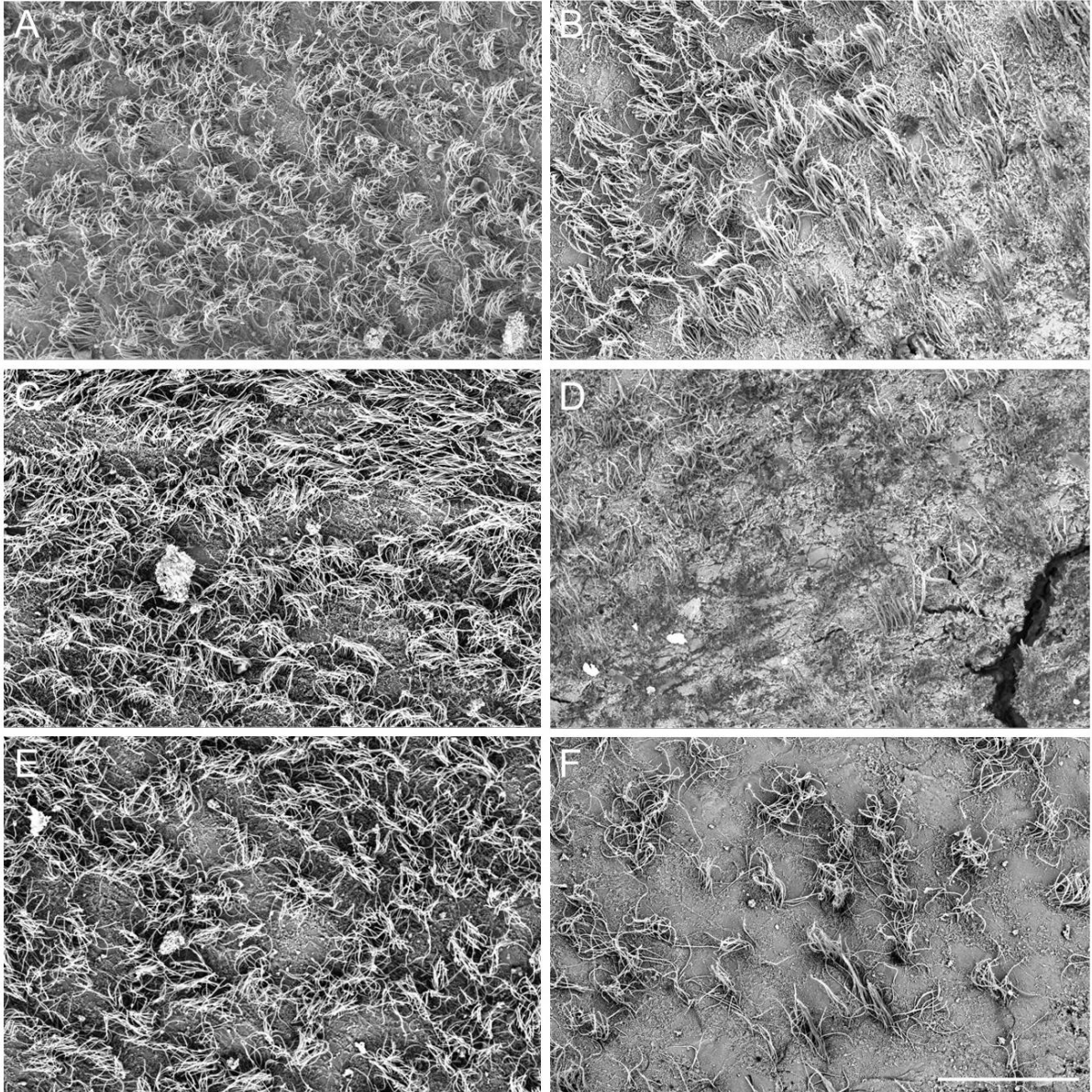


Abb. 12: *Mtss1*-Defizienz beeinflusst die Ziliendichte

Die Ziliendichte in den Lateralventrikeln adulter Tiere war bei *Mtss1*-defizienten Tieren vermindert.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Lateralventrikeln von einem adulten Wildtyp-Tier (A, C und E) und einem adulten *Mtss1*-defizienten Tier (B, D und F). Die Aufnahmen stammen aus verschiedenen Abschnitten der Lateralventrikel (A und B anterior, B und C medial, D und E posterior). Größenstandard: 30 μ m

3.4 *Mtss1*-Defizienz ändert die Zilienmotilität in den Lateralventrikeln

Der gerichtete Liquortransport durch das Ventrikelsystem ist essenziell, um eine Liquorhomöostase aufrecht zu erhalten (Ibañez-Tallon et al., 2004). Da der oberflächennahe Transport maßgeblich durch die gerichtete Zilienmotilität der Ependymzellen generiert wird, wurde diese in einem nächsten Schritt untersucht. Dazu wurde der durch Zilienschlag erzeugte Transport fluoreszenter Mikrobeads auf Lebendpräparaten von Lateralventrikelaußenwänden von vier adulten Wildtyp-Tieren und drei adulten *Mtss1*-defizienten Tieren (P65 bis P75) untersucht.

Nach der Applikation der Mikrobeads auf die Ventrikeloberfläche von Wildtyp-Mäusen ließ sich eine zügige Beschleunigung der Mikrobeads in den anterioren Teil des Ventrikels erkennen. Die Mikrobeads folgten dabei einem nahezu gleichen Pfad. Der zügige, gerichtete Transport endete im anterior-medialen Bereich des Ventrikels, in dem sich das Foramen Monroi befindet. Das Ende des gerichteten Transportes ließ sich neben der Lokalisation durch eine deutliche Abnahme der Bewegungsgeschwindigkeit der Mikrobeads erkennen (vgl. Abb. 13 A).

Auch in *Mtss1*-defizienten Lateralventrikeln wurden die Mikrobeads nach der Applikation in Richtung des Foramen Monroi beschleunigt, dabei folgten die Mikrobeads jedoch einem weniger definierten Pfad. Zudem konnte beobachtet werden, dass sich einige Mikrobeads zunächst in andere Richtungen bewegten, bevor sie in Richtung des Foramen Monroi beschleunigt wurden (vgl. Abb. 13 B).

Um den Effekt der breiter gestreuten Mikrobeadverläufe *Mtss1*-defizienter Mäuse zu quantifizieren, wurden die Daten je Individuum einer Koordinatentransformation unterzogen. Dadurch ließen sich die Mikrobeadverläufe interindividuell vergleichen. Für jedes Individuum wurde ein gemittelter Referenzverlauf berechnet und die Abweichungen der einzelnen Mikrobeadverläufe von diesem analysiert. Durch Bildung der Standardabweichung für kleinschrittig gewählte Abschnitte des Mikrobeadverlaufs konnte je Genotyp ein Abweichungsverlauf erstellt werden. Durch Mittelwertbildung aller berechneten Abweichungen ergab sich eine signifikant unterschiedliche mittlere Abweichung von 0,159 mm für *Mtss1*-defiziente Mäuse und von 0,495 mm für Wildtyp-Mäuse ($p < 0,05$) (vgl. Abb. 13 C und D).

Zudem wurde die mittlere Geschwindigkeit der Mikrobeadbewegung je Individuum bestimmt und zwischen den Genotypen verglichen. Die Mikrobeads bewegten sich bei *Mtss1*-defizienten Mäusen mit $0,178 \pm 0,054$ mm/s, bei Wildtyp-Mäusen mit $0,237 \pm 0,024$ mm/s ($p = 0,19$) (vgl. Abb. 13 E).

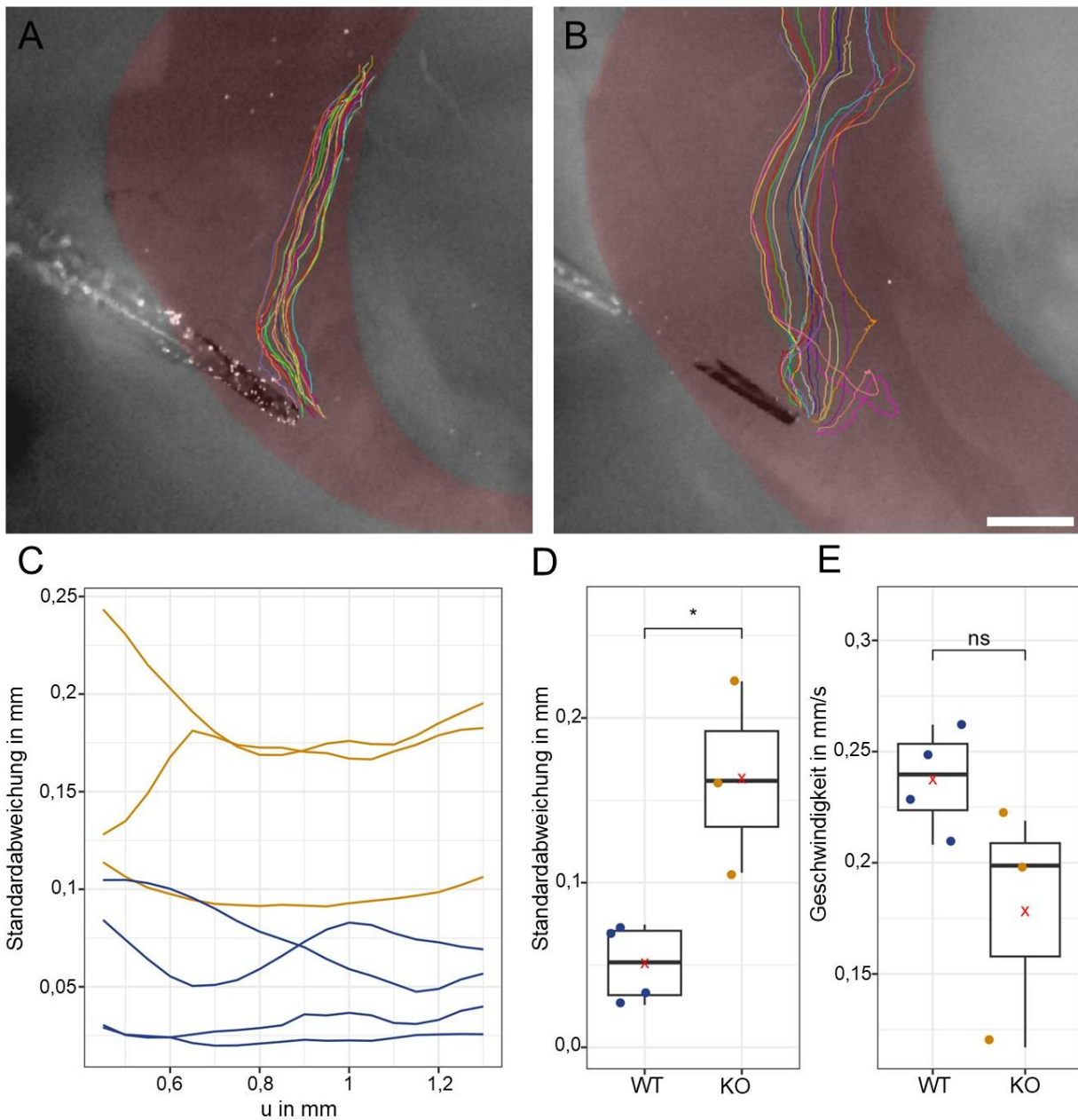


Abb. 13: *Mtss1*-Defizienz beeinflusst den oberflächennahen Flüssigkeitstransport

Für die Untersuchung wurden fluoreszente Mikrobeads auf die laterale Wand von Lateralventrikeln appliziert (*Mtss1*^{+/+}: A, *Mtss1*^{-/-}: B, Ventrikel rot hinterlegt) und ihre Bewegung über den Ventrikel verfolgt (bunte Linien). Größenstandard: 500 μm . C: Je Individuum gemittelte Standardabweichungen der einzelnen Mikrobeadverläufe vom Referenzverlauf in Bezug auf die u-Achse (siehe 2.12.4, für die graphische Darstellung ist hier lediglich der Wertebereich von „u“ dargestellt, für den für alle Individuen gültige Werte vorlagen). D: Mittlere Standardabweichung vom Referenzverlauf. E: Mittlere Geschwindigkeit der Mikrobeads. WT: Wildtyp, KO: Knockout, *Mtss1*^{+/+}: blau, *Mtss1*^{-/-}: orange, Mittelwerte in rot, ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$

3.5 *Mtss1*-Defizienz führt zu vergrößerten Lateralventrikeln

Um die Auswirkung der beobachteten Aberrationen zu analysieren, wurden MRT-Aufnahmen der Gehirne von adulten Mäusen (P65 bis P75) angefertigt. Es wurden 12 Wildtyp-Tiere und 10 *Mtss1*-defiziente Mäuse untersucht. Anschließend wurden die Volumina der Lateralventrikel sowie des vierten Ventrikels vermessen und verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Volumina der Lateralventrikel ($6,6 \pm 0,3 \text{ mm}^3$ bei Wildtyp-Tieren, $21,2 \pm 1,9 \text{ mm}^3$ bei *Mtss1*-defizienten Tieren ($p < 0,001$)). Die Vermessung des vierten Ventrikels ergab keine signifikanten Veränderungen des Volumens von Wildtyp-Mäusen ($1,6 \pm 0,1 \text{ mm}^3$) und *Mtss1*-defizienten Mäusen ($1,5 \pm 0,2 \text{ mm}^3$, $p = 0,42$) (vgl. Abb. 14).

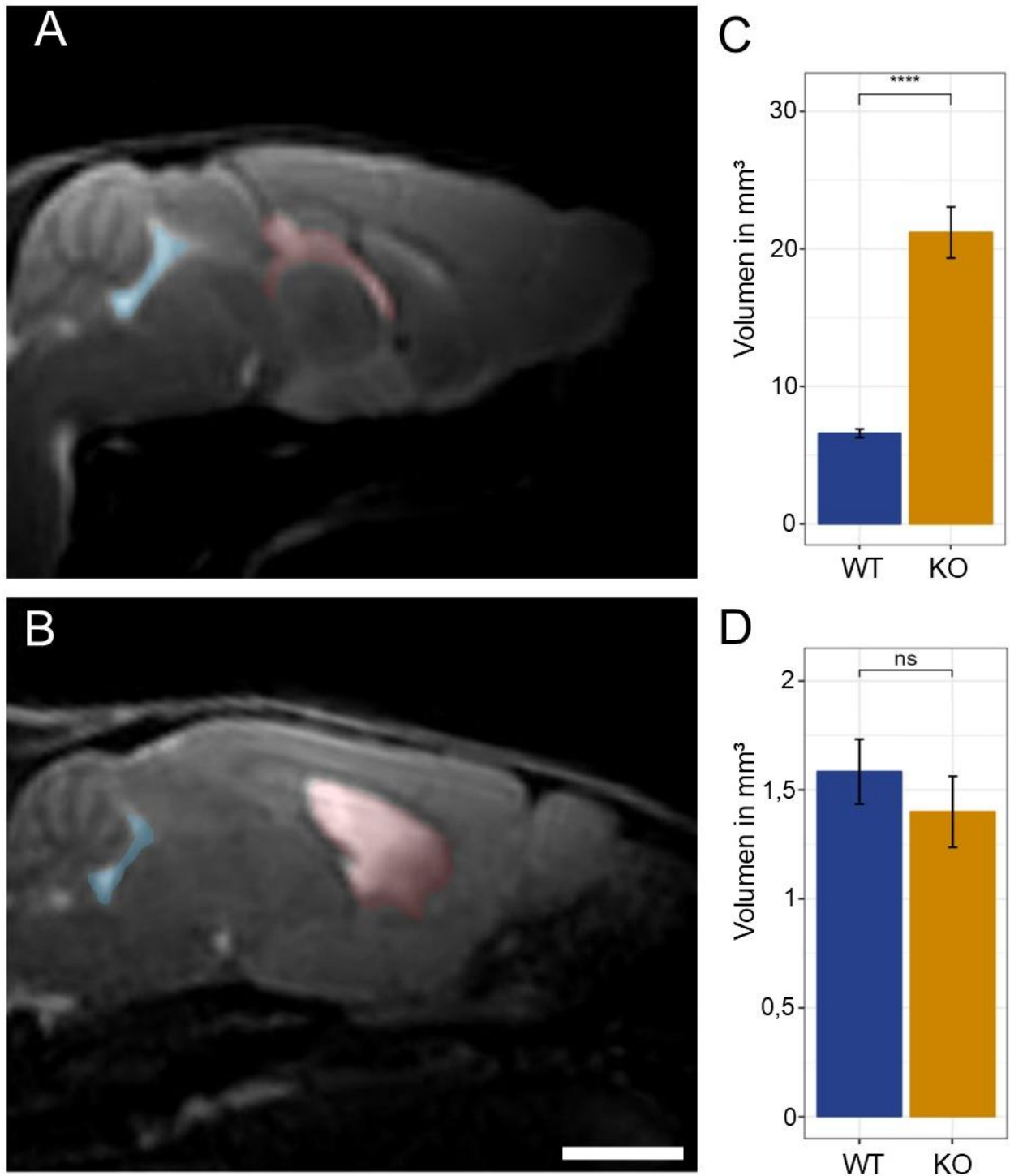


Abb. 14: *Mtss1*-Defizienz führt zu vergrößerten Lateralventrikeln
 Sagittale Ebene der MRT-Aufnahmen einer Wildtyp-Maus (A) und einer *Mtss1*-defizienten Maus (B) in T2-Wichtung. Die Lateralventrikel sind rot hinterlegt, der vierte Ventrikel blau. C: Volumen der Lateralventrikel. D: Volumen des vierten Ventrikels. WT: Wildtyp, KO: Knockout, *Mtss1*^{+/+}: blau, *Mtss1*^{-/-}: orange, ns: nicht signifikant, ****: $p > 0,001$, Größenstandard: 200 μ m.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von MTSS1 auf die Entwicklung, Organisation und Funktion ependymaler Zilien untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse dokumentieren die Expression von *Mtss1* in ependymalen Zellen und belegen die Bedeutung des Gens für die Morphologie und Ziliogenese dieser Zellart. Gleichzeitig weisen sie darauf hin, dass die funktionellen Eigenschaften des Ependyms in entscheidender Weise von der Expression von *Mtss1* abhängen.

4.1 Methodische Aspekte des Nachweises von *Mtss1* in ependymalen Zellen

Da es keinen geeigneten Antikörper für den immunhistochemischen Nachweis von MTSS1 in den von mir untersuchten Geweben gibt, nutzten wir für die Identifikation *Mtss1*-exprimierender Zellen die Tatsache, dass in *Mtss1*-defizienten Tieren statt *Mtss1* *lacZ* exprimiert wird. Heterozygote Tiere exprimieren somit gleichzeitig MTSS1 und β -Galaktosidase. Eine offensichtliche Limitation dieses Vorgehens ist, dass damit keine Aussagen über die intrazelluläre Lokalisation von MTSS1 in Ependymzellen getroffen werden können.

Es wurden sowohl Gewebeschnitte als auch primäre Zellkulturen *Mtss1*-heterozygoter Tiere untersucht. In Gewebeschnitten ließ sich eine β -Galaktosidaseaktivität unmittelbar an das Ventrikellumen angrenzenden Epithel nachweisen. Diese Zellschicht setzt sich hauptsächlich aus den neuralen Stammzellen (B1 Zellen) und den ependymalen Zellen (E1 und E2 Zellen) zusammen (Mirzadeh et al., 2008). Um zu bestätigen, dass die β -Galaktosidase-positiven Zellen tatsächlich zilientragende Ependymzellen (E1) waren, wurden primäre Ependymzellkulturen angelegt und auf eine Aktivität der β -Galaktosidase geprüft. Durch Kofärbungen mit FoxJ1 als Marker für Ependymzellen vom Typ E1 und acetyliertem Tubulin als Marker für Zilien konnte gezeigt werden, dass der *Mtss1*-Promoter in diesem Zelltyp aktiv ist. Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)-Analysen der Primärzellkulturen zeigten zudem, dass *Mtss1*-mRNA in Wildtypzellen, nicht aber in Kulturen *Mtss1*-defizienter Tiere nachzuweisen waren (Dr. Britta Eiberger, persönliche Kommunikation). Zusätzlich

bestätigten die Färbungen mit FoxJ1 und acetyliertem Tubulin, dass ein großer Anteil der differenzierten Zellen in der Kultur zilienträgende Ependymzellen waren, sodass die Methode geeignet war, um eben diese weitergehend zu untersuchen.

Die Expression des β -Galaktosidase-Reportergens ohne gleichzeitigen Nachweis von FoxJ1 oder acetyliertem Tubulin (vgl. 3.2.1) könnte durch die Aktivität des *Mtss1*-Promoters in anderen in der Kultur vorhandenen Zelltypen verursacht sein. Da die primären Kulturen aus Gewebepräparaten gewonnen wurden, die noch Reste von Meningen und Gefäßen enthalten können, kommen hierfür insbesondere Fibroblasten und Endothelzellen in Frage, die *Mtss1* exprimieren (Podieh et al., 2024). Um dies zu überprüfen, wäre eine Wholemoutfärbung der Lateralventrikel geeignet, die eine Einordnung der verschiedenen Zelltypen durch die anatomische Integrität erleichtern würde. Alternativ wäre eine Aufreinigung der möglichen Zelltypen beispielsweise mittels FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) möglich, um diese individuell auf eine *Mtss1*-Promoter-Aktivität zu überprüfen.

Für dermale Zellen konnte eine Anreicherung von GFP-MTSS1-Fusionsproteinen mit intakter C-terminaler Domäne an Basalkörperchen der primären Zilien gezeigt werden (Bershteyn et al., 2010). Da die Basalkörperchen primärer und motiler Zilien strukturell sehr ähnlich sind, ist eine Interaktion von MTSS1 auch mit den Basalkörperchen in Ependymzellen denkbar. In der Ziliogenese nimmt die Positionierung der Basalkörperchen an der Zellmembran und deren Umwandlung zur Zilienmembran eine entscheidende Rolle ein. Störungen in diesem frühen Abschnitt der Ziliogenese sind für viele Ziliopathien sowohl primärer als auch motiler Zilien verantwortlich (Reiter und Leroux, 2017).

Bershteyn et al. (2010) konnten in der gleichen Studie zeigen, dass eine Störung der Balance von MTSS1, das positiv auf die Zilienbildung wirkt, und Cortactin (CCTN), welches den Zilienabbau steigert, zu ziliären Defekten führen kann. Die C-terminale WH2-Domäne von MTSS1 bindet unter anderem CTTN, welches die Verzweigung und Polymerisation von Aktinfilamenten fördert. Bershteyn et al. (2010) konnten zudem durch Immunpräzipitation zeigen, dass MTSS1 direkt mit γ -Tubulin interagiert. Ein Einfluss von MTSS1 auf die Ausbildung von Mikrotubuli ist somit als wahrscheinlich anzusehen.

Ein antikörpergestützter Nachweis könnte zeigen, ob MTSS1 ebenfalls an Basalkörperchen ependymaler Zilien vorkommt und so genauere Hinweise auf die Funktion von MTSS1 in dieser Zellart geben. In der Arbeitsgruppe von Dr. Britta Eiberger wurden zu diesem Zweck verschiedene MTSS1-Antikörper getestet, die jedoch kein spezifisches Signal ergaben.

4.2 Die Deletion von *Mtss1* beeinflusst die Morphologie und Differenzierung von Ependymzellen

In primären Ependymzellkulturen zeigten *Mtss1*-Knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen weniger zilientragende Zellen. Zudem waren die Zellflächen ziliierter Zellen im Knockout an späteren Entwicklungstagen signifikant vergrößert (vgl. 3.2.2, 3.2.3). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Lateralventrikel *Mtss1*-defizienter Tiere zeigten eine aufgelockerte und weniger organisierte Zilienverteilung (vgl. 3.3). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die morphologische Entwicklung der Zilien beim Fehlen von MTSS1 gestört ist, insbesondere die Differenzierung zu mehrfach zilientragenden E1 Zellen.

Beide beobachteten Effekte sprechen für eine Störung des Aktinzytoskeletts. MTSS1 interagiert mit seiner C-terminalen WH2-Domäne mit ATP-Aktinmonomeren (Lee et al., 2002; Mattila et al., 2003). In der Differenzierung zu zilientragenden Ependymzellen ist Aktin mehrfach und entscheidend beteiligt: Die apikobasale Zellpolarität wird durch Aktinfasern vermittelt und die apikale Zelloberfläche durch ein dichtes Aktinnetzwerk stabilisiert, welches über ERM-Proteine mit der Zellmembran in Verbindung steht (Pelaseyed und Bretscher, 2018). Auch MTSS1 interagiert mit Aktin und der Zellmembran und unterstützt dabei insbesondere die strukturelle Organisation der Zelloberfläche während dynamischer Prozesse wie der Ausbildung von Membrankurvaturen (Mattila et al., 2007; Zhao et al., 2011). Da Membranprotusionen eine Voraussetzung für die Ausbildung von Mikrovilli und Zilien sind, könnte eine Störung der stabilisierenden Funktion durch MTSS1 die Ziliogenese negativ beeinflussen. Aktin vermittelt zudem die Positionierung und Ausrichtung von Basalkörperchen an der apikalen Zellmembran. Dabei erfolgt sowohl die Migration der Basalkörperchen vom perinukleären Zentrum in Richtung der apikalen Zellemembran

als auch die laterale Verteilung und planare Orientierung der Basalkörperchen aktinvermittelt (Hoffman und Prekeris, 2022). In Zellen, die mehrere Zilien tragen, werden die zahlreichen Basalkörperchen zudem durch Aktinfasern unterhalb des apikalen Aktinnetzwerkes miteinander verbunden, was die einheitliche Ausrichtung und damit die abgestimmte Zilienbewegung ermöglicht (Antoniades et al., 2014). Die direkte Beteiligung von MTSS1 an diesen Prozessen ist bislang nicht abschließend geklärt und bedarf weiterführender experimenteller Untersuchungen.

In *Mtss1*-defizienten Ependymzellen wurde eine Zunahme der Zellgrößen beobachtet, wobei mit dem Begriff „Zellgröße“ hier spezifisch die Ausdehnung der Zelle bei der Aufsicht in einer Monolayer-Kultur gemeint ist. Zum Zellvolumen kann hier keine Aussage gemacht werden. Beide Veränderungen gingen jedoch mit einer Reorganistaion des Aktinzytoskeletts einher. MTSS1 ist über seine I-BAR-Domäne sowie durch die Rekrutierung von N-WASP und dem Arp2/3-Komplex maßgeblich an der Regulation der Aktinpolymerisation beteiligt (Matskova et al., 2024). Eine Depolymerisation von F-Aktin, etwa durch Cytochalasin D, führt zu einem Abbau des kortikalen Aktinnetzwerks und kann infolgedessen zu einer Volumenzunahme der Zellen oder einer Zellverformung führen (Charras et al., 2006; Salbreux et al., 2012). Dabei reduziert sich die mechanische Spannung an der Zellmembran, was eine Zunahme der Zelloberfläche und die Veränderung der Zellform begünstigt (Nobusue et al., 2014).

Für das MTSS1-verwandte, ebenfalls aktinassoziierte Protein MTSS2 (ABBA), konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung des Proteins in radialen Gliazellen zu einer Akkumulation der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus führt (Carabalona et al., 2025). Da Zellen vor dem Eintritt in die S-Phase relevant an Größe zunehmen, könnte eine solche Akkumulation auch die Rechtsverschiebung der Zellgrößenverteilung *Mtss1*-defizienter Zellen erklären.

Darüber hinaus sind auch kompensatorische Prozesse, also zelluläre Anpassungsmechanismen, die strukturelle oder funktionelle Defizite durch den Verlust von MTSS1, ausgleichen sollen, als Ursache für die veränderten Zellgrößen oder Zellformen denkbar. Dazu könnten veränderte Zell-Zell-Interaktionen gehören, wie sie unter anderem im Zusammenhang mit MTSS1 in epithelialen Geweben beschrieben wurden (Dawson et al., 2012; Saarikangas et al., 2011).

Die rechtsschiefen Verteilungen der Zellgrößen in beiden Gruppen deuten zudem auf eine ausgeprägte Heterogenität der Zellgrößen hin. Solche asymmetrischen Verteilungen sind in primären Zellkulturen nicht ungewöhnlich und können durch natürliche Variabilität in Zellform, Zellzyklusphase oder Adhärenzverhalten entstehen (Grondona et al., 2013).

Die hier gewählte Methode der primären Zellkultur zur Untersuchung der Zellgrößen und Häufigkeit zilientragender Zellen birgt den Vorteil der Objektivierung entscheidender Bedingungen, die die Zilienbildung in vivo beeinflussen können. Dazu gehören das Nährstoffangebot oder Wechselwirkungen mit anderen Zellarten. Doch auch in der Zellkultur werden nicht ausschließlich Ependymzellen kultiviert. So zeigten sich insbesondere in den ersten Tagen nach dem Serumentzug regelmäßig noch vereinzelte Fibroblasten und GFAP-positive Astrozyten in den Kulturen.

Von den kultivierten Ependymzellen der Wildtyp-Tiere hatten nach 10 Tagen in vitro $60,6 \pm 6,4$ % der Zellen mehrere Zilien gebildet und $24,9 \pm 5,6$ % ein einzelnes Zilium. Die Zellen mit mehreren Zilien setzen sich aus E1- und E2-Zellen zusammen (Mirzadeh et al., 2008). Eine Unterscheidung beider Zelltypen wurde in der Auswertung nicht vorgenommen. Die Zellen mit einem einzelnen Zilium oder keinem Zilium können unterschiedlichen Zellarten angehören, auch Fibroblasten und Astrozyten entwickeln einzelne, primäre Zilien (Bear und Caspary, 2024). Grundsätzlich entspricht der Anteil zilientragender Zellen dieser Studie jedoch dem bereits publizierten Untersuchungen: In vivo machen Ependymzellen (E1 und E2) im Lateralventrikel abhängig von der Lokalisation innerhalb des Ventrikels 60-84 % der Zellen aus (Mirzadeh et al., 2008). In Zellkultur wird der Anteil zilientragender Zellen je nach Studie mit $57,8 \pm 4,4$ % an DIV 7 (Jiang et al., 2020), 80 ± 6 % an DIV 15 (Guirao et al., 2010) und 60 ± 14 % an DIV 28 (Hirao et al., 2023) beschrieben. Die Eignung des hier verwendeten Zellkulturmodells zeigt sich zudem in der Konkordanz der Untersuchungsergebnisse mit den rasterelektronischen Untersuchungen, die ähnliche Auflockerungen der Ziliendichte zeigten und mit den beobachteten Veränderungen im oberflächennahen Flüssigkeitstransport, die als Konsequenz einer weniger dichten Zilienstruktur gedeutet werden können.

In der Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich, dass die Anteile zilienträger Zellen bei Knockout-Mäusen deutlicher schwankten als bei Wildtyp-Mäusen – es zeigte sich also eine höhere Variabilität des Phänotyps. Dies ist ein bei transgen veränderten Mäusen oft beobachteter Effekt, der sich aus einer höheren Variabilität der allgemeinen Genexpression bei Knockout-Mäusen ergibt (Eraly, 2014).

In rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden beispielhafte Ausschnitte des Lateralventrikels sehr weniger Versuchstiere miteinander verglichen. Diese Analyse lässt daher keine allgemeingültige Aussage auf einen Unterschied *in vivo* zu und sollte nur als erstes Indiz für eine Abweichung verstanden werden, das weitergehende Analysen, beispielsweise in Wholamountpräparaten, erforderlich macht. Allerdings spricht die Konkordanz dieser wenigen *in vivo* Beobachtungen mit den hier vorgelegten *in vitro* Befunden dafür, dass die bisherigen *in vivo* Befunde verifiziert werden können.

Untersuchungen zu Größenveränderungen der Ependymzellen in intakten Ventrikelgewebe von *Mtss1*-defizienten Mäusen wurden bisher noch nicht durchgeführt oder publiziert. Veränderungen der Ependymzellmorphologie im Zusammenhang mit Erkrankungen des humanen zentralen Nervensystems sind jedoch vorbeschrieben: Nach Schlaganfällen kann es im Rahmen der Narbenbildung zu einem Verlust der kuboiden Form, einer Abflachung und einer Vergrößerung der Zelloberfläche von Ependymzellen kommen (Deng et al., 2023).

Zusammenfassend weisen die hier gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass der Verlust von MTSS1 zentrale, aktinvermittelte Prozesse wie die Basalkörperchenanordnung und Zellform beeinflussen könnte. Mögliche Begleiteffekte wie veränderte Zellzyklusverläufe oder kompensatorische Anpassungen können auf eine breitere funktionelle Rolle von MTSS1 in der Entwicklung ependymaler Zellen hinweisen.

4.3 Eine *Mtss1*-Defizienz führt zu einem weniger gerichteten Flüssigkeitstransport in den Lateralventrikeln

Zur Untersuchung der Zilienmotilität wurden fluoreszente Mikrobeads auf die Oberfläche vitaler Lateralventrikelpräparate gegeben. Während die Mikrobeads in Wildtyp-Mäusen leicht gebogenen, aber insgesamt geradlinigen und fast „parallelen“ Pfaden in Richtung

des Foramen Monroi folgten, zeigten die Pfade in *Mtss1*-defizienten Tieren unregelmäßige Verläufe mit erhöhter Streuung. Die Richtungsstabilität war signifikant vermindert, die Transportgeschwindigkeit tendenziell reduziert (vgl. 3.4).

Die erhöhte Streuung der Mikrobeadverläufe bei *Mtss1*-defizienten Tieren weist darauf hin, dass zwar grundsätzlich eine Strömung in Richtung des Foramen Monroi generiert wird, diese allerdings weniger effektiv verläuft. Als Ursache dafür wäre eine gestörte Koordination zwischen benachbarten zilientragenden Zellen oder Zilien innerhalb einer Zelle möglich. Dies kann zu lokal veränderten Strömungsmustern führen, in denen sich die Effekte einzelner Zilienschläge teilweise aufheben oder uneinheitlich summieren, was zum Verlust eines effektiven und orchestrierten Flüssigkeitstransportes führen kann. Eine gestörte Direktionalität des ependymalen Flüssigkeitstransportes wurde auch bei *Kif6*^{-/-} Mäusen beobachtet und mit der gestörten planaren Zellpolarität der Ependymzellen dieser KO-Tiere in Zusammenhang gebracht (Fang et al., 2024). Eine weitere mögliche Ursache könnte die hier beobachtete, gestörte Zilienverteilung sein, die zu veränderten Strömungsmustern auf der Ventrikeloberfläche führt. Für Mäuse mit einer heterozygoten *FoxJ1* Mutation, bei denen es zu einer verminderten Ziliendichte auf der Ventrikeloberfläche kommt, konnte ebenfalls ein gestörter Oberflächentransport gezeigt werden (Hou et al., 2023). Die Ergebnisse aus den primären Ependymzellkulturen belegen, dass der Verlust von MTSS1 zu einer Störung der Zilienbildung und -ausrichtung führt. Insbesondere die Positionierung von Basalkörperchen scheint hier eine entscheidende Rolle zu spielen (vgl. 4.1 und 4.2). Die Positionierung und Ausrichtung der Basalkörperchen ist entscheidend für den abgestimmten Zilienschlag und damit für einen gerichteten, oberflächennahen Transport entlang der Ventrikeloberfläche (Mirzadeh et al., 2010). Die Ergebnisse weisen somit auf eine zentrale Rolle von MTSS1 bei der strukturellen Organisation und Funktion der Zilien hin.

Bei der qualitativen Betrachtung der Videoaufnahmen fiel auf, dass sich die Mikrobeads auf der Oberfläche der Lateralventrikel in *Mtss1*-defizienten Mäusen tendenziell langsamer bewegten als in Wildtyp-Tieren. Zudem waren bei Knockout-Mäusen häufig Bewegungsmuster zu beobachten, bei denen die Mikrobeads zunächst in seitliche oder sogar entgegengesetzte Richtungen beschleunigt wurden, bevor sie sich schließlich in

Richtung des Foramen Monroi bewegten. Teilweise zeigten sich auch kreisförmige oder pendelartige Bewegungen einzelner Mikrobeads. Diese Umwege führten zu einem insgesamt weniger gerichteten Transport.

Diese Beobachtungen spiegeln sich nicht vollständig in der berechneten Abweichung vom Referenzpfad wider, da diese Analyse primär die laterale Streuung und nicht die komplexen Richtungswechsel oder Verzögerungen der Bewegung abbildet. Die Geschwindigkeit der Mikrobeads, die zusätzlich erfasst wurde, sollte jedoch auch solche indirekten Effekte, etwa durch Umwege oder kurzzeitige Richtungsumkehr, einbeziehen. In der quantitativen Analyse zeigte sich für *Mtss1*-defiziente Tiere ein Trend zu einer geringeren mittleren Mikrobeadgeschwindigkeit. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant. Untersuchungen an mehr ex-vivo Proben, als im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung standen, könnten helfen, diese Hypothese mit größerer statistischer Aussagekraft zu prüfen.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für den veränderten Oberflächentransport in *Mtss1*-defizienten Mäusen liegt im Einfluss des primären Liquorflusses auf die Orientierung der Zilien. Guirao et al. (2010) konnten zeigen, dass die planare Polarität der Ependymzellen und damit die Schlagrichtung der Zilien nicht ausschließlich intrinsisch festgelegt, sondern maßgeblich durch mechanische Reize wie den Fluss des Liquors beeinflusst wird. Dieser primäre Liquorfluss wird im Ventrikelsystem vor allem durch arterielle Pulsation generiert (vgl. 1.1). *Mtss1* wird neben neuralem Gewebe auch im Herz und in Gefäßwänden exprimiert. Ein Fehlen von MTSS1 kann zu einem herabgesetzten linksventrikulären Auswurf und damit zu einer abgeschwächten Herzleistung führen (Morley et al., 2019), was auch den primären Liquorfluss beeinträchtigen könnte. Eine solche Störung des primären Liquorflusses könnte wiederum eine fehlerhafte planare Ausrichtung der Zilien im Ependym zur Folge haben. Damit ist nicht auszuschließen, dass die beobachtete veränderte Flusssdynamik auf eine sekundär bedingte Desorganisation der Zilien zurückzuführen ist und nicht ausschließlich Folge einer zellulären Störung innerhalb des Ependyms ist.

Ein gerichteter und synchroner Flüssigkeitstransport entlang der Ventrikelwände erfüllt mehrere essenzielle Funktionen: Zum einen trägt er zur mechanischen Reinigung der Ventrikeloberflächen bei und stellt sicher, dass der Liquor in nachgeschaltete

Ventrikelabschnitte weitergeleitet wird (Faubel et al., 2016; Ibañez-Tallon et al., 2004). Zum anderen ermöglicht er die gezielte Verteilung von Signalmolekülen, Zytokinen und Leitmolekülen entlang des Ventrikelsystems (Del Bigio, 2010). Ein gestörter ziliengenerierter Transport kann somit nicht nur die Liquorzirkulation beeinträchtigen, sondern auch Auswirkungen auf die lokale CSF-Zusammensetzung und sogar auf die Zellmigration von Neuronen haben. Insbesondere im sich entwickelnden Gehirn stimuliert die Verteilung von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF), Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF), Sonic Hedgehog (SHH) und weiteren die Proliferation von verschiedenen Vorläuferzellen (Zappaterra und Lehtinen, 2012). Im adulten Gehirn migrieren Neuroblasten, welche in der subventrikulären Zone entstehen, in den Bulbus olfactorius. Die Migration wird durch die gezielte, zilienvermittelte Verteilung chemotaktischer Faktoren auf der Ventrikeloberfläche gelenkt (Sawamoto et al., 2006).

Die Ergebnisse der Analyse des Flüssigkeitstransports auf der Ventrikeloberfläche zeigen, dass *MTSS1* eine Rolle in der funktionellen Organisation der Zilienausstattung ependymaler Zellen spielen könnte. Die Kombination aus erhöhter Pfadabweichung und tendenziell reduzierter Transportgeschwindigkeit weist auf einen funktionell relevanten Einfluss des *Mtss1*-Knockouts auf die Liquorbewegung hin.

4.4 *MTSS1* beeinflusst die Größe der Lateralventrikel

Um zu prüfen, ob die gezeigten zellulären und funktionellen Einschränkungen ependymaler Zellen *Mtss1*-defizienter Mäuse auch makroskopische Konsequenzen im Ventrikelsystem nach sich ziehen, wurde eine MRT-gestützte Volumenanalyse der Ventrikel durchgeführt. Dabei zeigte sich eine signifikante Vergrößerung der Lateralventrikel bei *Mtss1*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, während das Volumen des vierten Ventrikels unbeeinträchtigt blieb (vgl. 3.5).

Eine Vergrößerung der Lateralventrikel einer anderen *Mtss1*-defizienten Mauslinie wurde von Minkeviciene et al. (2019) beschrieben. In dieser Studie wurden ein reduziertes Kortextvolumen als wahrscheinlichste Ursache für die Ventrikelvergrößerung genannt.

Die in dieser Arbeit beobachteten strukturellen und funktionellen Defizite der ependymalen Zilien *Mtss1*-defizienter Tiere deuten auf eine eingeschränkte Effektivität des ziliären Transportes hin. Ziliäre Störungen sind mit der Ausprägung einer Ventrikulomegalie assoziiert, auch wenn die Entstehung eines Hydrozephalus aufgrund einer Liquorakkumulation bei gestörten ziliären Transports mittlerweile als unwahrscheinlich erachtet wird (Duy et al., 2022). Um ein Gesamtbild des Einflusses ziliärer Defekte auf die Krankheitsentstehung zu schaffen, sind insbesondere die Entwicklungs- und Signalfunktionen der Zilien und des Zilienschlags zu berücksichtigen (vgl. auch 4.3).

Auch beim Menschen sind Störungen der ziliären Funktion eng mit pathologischen Veränderungen des Ventrikelsystems assoziiert. Zahlreiche primäre Ziliopathien wie die Primary Ciliary Dyskinesia (PCD) zeigen strukturelle und funktionelle Defizite ependymaler Zilien, die mit einer Ventrikelvergrößerungen einhergehen (Horani und Ferkol, 2021; Ibañez-Tallon et al., 2004). Auch bei idiopathischen oder sekundären Formen des Hydrozephalus, etwa im Rahmen des Normaldruckhydrozephalus (NPH) im Erwachsenenalter, wurden morphologische Veränderungen und Funktionsverluste der Ependymschicht einschließlich Zilienverlust, Zellverformung und Denudation beschrieben (Del Bigio, 2010).

Die in *Mtss1*-defizienten Mäusen nachgewiesene Kombination aus strukturellen Ziliendefekten, beeinträchtigter oberflächennaher Liquorströmung und Ventrikelvergrößerung spiegelt somit zentrale pathophysiologische Prinzipien wider, die auch in humanen Ventrikelerkrankungen beobachtet werden. Die Tatsache, dass alle beobachteten Störungen der Ziliogenese und Zilienfunktion in diesem Modell letztendlich auf den Verlust von MTSS1 zurückzuführen sind, unterstreicht die Bedeutung von MTSS1 als Ausgangspunkt für die Untersuchung der Pathomechanismen und der Zusammenhänge der beobachteten Befunde. Das hier verwendete Mausmodell könnte dazu beitragen, bestimmte Mechanismen ziliärer Dysfunktionen auch im menschlichen Ventrikelsystem besser zu verstehen.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *Mtss1* für die regelrechte Entwicklung und Funktion ependymaler Zellen und ihrer Zilien essenziell ist. Nach Knockout dieses Gens zeigten sich sowohl zelluläre Auffälligkeiten *in vitro* als auch ein gestörter oberflächennaher Flüssigkeitstransport der Lateralventrikel *in vivo*. Diese Erkenntnisse werfen mehrere weiterführende Fragestellungen auf, die in zukünftigen Arbeiten untersucht werden sollten.

Ein möglicher Ansatzpunkt für weitere Analysen ist die Rolle von MTSS1 auf die planare Zellpolarität (PCP). Die translationale und rotationale Polarität der Ependymzellen ist entscheidend für die Koordination des Zilienschalgs und beeinflusst damit maßgeblich den gerichteten Liquorfluss (Guirao et al., 2010; Ohata et al., 2015). Guirao et al. (2010) demonstrierten in einem Zellkulturmodell, dass ependymale Zellen unter dem Einfluss eines gerichteten Mediumflusses eine geordnete Zilienausrichtung entwickeln, während dieser Effekt in Abwesenheit einer Strömung ausbleibt, was die Bedeutung mechanischer Signale für die Zilienausrichtung unterstreicht. In Anlehnung an diese Studie habe ich im Rahmen meiner Laborarbeit versucht, ein entsprechendes Modell zu etablieren, bei dem ein linearer Mediumfluss mit physiologisch angepasster Geschwindigkeit über mit Ependymzellen besiedelte Deckgläschen geleitet wurde. Trotz sorgfältiger Anpassung der Flussparameter und Zellkulturbedingungen konnte mit diesem System kein Zellwachstum erreicht werden, welches dem Zellwachstum in den für die gezeigten Ergebnisse verwendeten primären Ependymzellkulturen unter „Normalbedingungen“ entspricht. Die Etablierung eines validen Modells wäre jedoch von großer Bedeutung, um den Zusammenhang zwischen mechanischer Stimulation, PCP und Zilienmorphologie in *Mtss1*-Knockout-Mäusen gezielt untersuchen zu können. Entsprechend sollte dieser Ansatz in modifizierter Form weiterverfolgt werden.

Ein weiterer zentraler Punkt zukünftiger Forschung sollte die zeitliche Einordnung der Bedeutung von *Mtss1* während der Ziliogenese sein. Bislang ist unklar, in welcher Phase der Zilienentwicklung *Mtss1* entscheidend eingreift – ob bereits bei der Differenzierung der Ependymzellen, bei der Ausbildung der Basalkörperchen oder erst im Rahmen der Ausrichtung und Funktion der Zilien. Um diese Frage zu adressieren, wären expressionsanalytische Untersuchungen sinnvoll, etwa durch quantitative PCR-

Analysen von *Mtss1* zu verschiedenen Zeitpunkten der ependymalen Zelldifferenzierung.

Auch der Zeitpunkt, zu dem die messbare Ventrikelvergrößerung erstmals auftritt, sollte näher untersucht werden. Die MRT-Analysen in adulten Tieren zeigten vergrößerte Lateralventrikel bei *Mtss1*-defizienten Mäusen. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Veränderungen bereits früh embryonal oder postnatal auftreten oder ob die Volumenzunahme im Verlauf der Zeit zum Beispiel durch kumulative Effekte eines gestörten Liquortransports entsteht. Längsschnittuntersuchungen, etwa durch MRT-Aufnahmen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, könnten zusätzliche Erkenntnisse liefern. Die Untersuchung der Dicke und Elastizität der Kortexwände sowie die Analyse der zellulären Zusammensetzung des Kortexgewebes könnten weitere Rückschlüsse auf den Entstehungszeitpunkt und -grund der Ventrikelvergrößerung geben: Eine gestörte Zellproliferation und -differenzierung könnte zu einem schmaleren Kortex und somit zu einer sekundär bedingten Liquoranreicherung führen.

Schließlich sollte die Frage adressiert werden, ob sich die in vitro beobachteten morphologischen Veränderungen der ependymalen Zellen auch in vivo nachweisen lassen. In einer Studie von Minkeviciene et al. (2019) wurden Gehirngewebeschnitte einer anderen *Mtss1*-defizienten Mauslinie bezüglich der ependymalen Ziliendichte und der Zilienlänge untersucht. Hier konnte kein Unterschied zu Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden. Ein erster Hinweis auf potenzielle Veränderungen in vivo ergibt sich jedoch aus den für meine Arbeit durchgeführten rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen, in denen sich in einzelnen Abschnitten der Lateralventrikel *Mtss1*-defizienter Tiere eine verminderte Ziliendichte zeigte. Aufgrund der geringen Fallzahl lassen sich aus diesen Beobachtungen noch keine belastbaren Schlussfolgerungen ziehen, sie unterstreichen jedoch die Notwendigkeit, diesen Aspekt mit geeigneten quantitativen Methoden und größeren Stichproben weiter zu verfolgen. Auch die Untersuchung von gefärbten Wholemountpräparaten von Lateralventrikeln würde eine genauere Beurteilbarkeit der Ziliendichte und der Zellgrößen erlauben und so eine Übertragbarkeit der in vitro erhobenen Befunde auf den in vivo Kontext überprüfen.

5. Zusammenfassung

Das Ventrikelsystem des Gehirns ist ein komplexes, miteinander verbundenes Hohlraumsystem, das mit Liquor cerebrospinalis gefüllt ist. Neben der mechanischen Schutzfunktion erfüllt der Liquor essenzielle Aufgaben im Transport von Stoffwechselprodukten und in der Verteilung von Signalmolekülen. Ependymale Zellen, die das Ventrikelsystem auskleiden, spielen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Liquorhomöostase. Die motilen Zilien der Ependymzellen erzeugen einen oberflächennahen, gerichteten Flüssigkeitstransport. Störungen in der Entwicklung oder Funktion dieser Zilien können den Liquorfluss beeinträchtigen und zu pathologischen Veränderungen wie einer Ventrikelerweiterung beitragen.

Das Protein MTSS1 (Metastasis Suppressor 1) wird nahezu ubiquitär, einschließlich Geweben des zentralen Nervensystems, exprimiert und wurde in früheren Arbeiten in Zusammenhang mit der Ausbildung primärer Zilien gebracht.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welchen Einfluss eine *Mtss1*-Defizienz auf die Morphologie und Funktion ependymaler Zellen hat und ob ein Fehlen des Proteins MTSS1 zu Veränderungen im Liquortransport und im Ventrikelvolumen führt.

Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf der Analyse primärer Ependymzellkulturen und der funktionellen Untersuchung des oberflächennahen Liquortransports. Primäre Ependymzellen wurden aus Wildtyp- und *Mtss1*-defizienten Mäusen isoliert, kultiviert und in verschiedenen Entwicklungsstadien nach Immunfluoreszenzfärbung analysiert, um Ziliendichte und Zellgrößenverteilung zwischen den Genotypen zu vergleichen. Ergänzend erfolgten funktionelle Untersuchungen des oberflächennahen Liquortransports, bei denen fluoreszente Mikrobeads auf vitale Lateralventrikelpräparate appliziert und ihr Transport durch motile Zilien videographisch aufgezeichnet und ausgewertet wurden. Ergänzend wurden Gehirnschnitte histologisch und immunhistochemisch untersucht und hochauflösende MRT-Aufnahmen zur Bestimmung der Ventrikelvolumina angefertigt.

Es zeigte sich, dass *Mtss1* in ependymalen Zellen der Maus exprimiert wird. In primären Zellkulturen führte das Fehlen von MTSS1 zu einer verminderten Ziliendichte und zu

einer Verschiebung in der Zellgrößenverteilung. Auch in situ wurden Veränderungen in der Morphologie der ependymalen Auskleidung festgestellt. Die Analyse des Mikrobeadtransports ergab, dass bei *Mtss1*-defizienten Mäusen der oberflächennahe Liquortransport weniger gerichtet verlief als bei Wildtyp-Kontrollen. In den MRT-Messungen wiesen *Mtss1*-defiziente Tiere zudem signifikant vergrößerte Lateralventrikelvolumina auf.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass MTSS1 für die regelrechte Entwicklung und Organisation ependymaler Zilien erforderlich ist und dass sein Fehlen mit funktionellen Defiziten im gerichteten Liquortransport sowie mit einer Erweiterung der Lateralventrikel einhergeht. Die Arbeit liefert damit neue Einblicke in den Einfluss von MTSS1 auf die Struktur und Funktion motiler ependymaler Zilien und verdeutlicht, dass Veränderungen dieser zu einer Beeinträchtigung des Liquortransports beitragen können.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Ventrikelsystem des Hirns	9
Abbildung 2: Aufbau des Ependyms	11
Abbildung 3: Translationale und rotationale Polarität	13
Abbildung 4: Funktionsweise der Genotypisierungs-PCR für <i>Mtss1</i>	20
Abbildung 5: Präparation der Lateralventrikel	29
Abbildung 6: Ablauf der Mikrobeadapplikation	33
Abbildung 7: <i>Mtss1</i> wird in der Ventrikelwand exprimiert	40
Abbildung 8: <i>Mtss1</i> wird in primärkultivierten Ependymzellen exprimiert	42
Abbildung 9: <i>Mtss1</i> -Defizienz beeinflusst die Zilienausbildung	44
Abbildung 10: <i>Mtss1</i> -Defizienz beeinflusst die Ependymzellgröße	46
Abbildung 11: <i>Mtss1</i> -Defizienz beeinflusst die Zilienorientierung	47
Abbildung 12: <i>Mtss1</i> -Defizienz beeinflusst die Ziliendichte	48
Abbildung 13: <i>Mtss1</i> -Defizienz beeinflusst den oberflächennahen Flüssigkeitstransport	51
Abbildung 14: <i>Mtss1</i> -Defizienz führt zu vergrößerten Lateralventrikeln	53

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kodierung des angeborenen Hydrozephalus nach ICD-10-GM	14
Tabelle 2: Einteilung des Hydrozephalus	14
Tabelle 3: Zusammensetzung des Lysis Puffers	19
Tabelle 4: Zusammensetzung der PCR-Ansatzlösung	19
Tabelle 5: Primersequenzen	19
Tabelle 6: Protokoll des verwendeten PCR-Amplifikationsprogramms	20
Tabelle 7: Zusammensetzung des Ladepuffers	20
Tabelle 8: Zusammensetzung der Paraformaldehydlösung	21
Tabelle 9: Zusammensetzung der PLL-Lösung	22
Tabelle 10: Zusammensetzung der Hank's Plus Lösung	24
Tabelle 11: Zusammensetzung der EnzymLösung	24
Tabelle 12: Zusammensetzung der Stopplösung	24
Tabelle 13: Zusammensetzung des Kulturmediums I	24
Tabelle 14: Zusammensetzung der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS)	25
Tabelle 15: Zusammensetzung des Kulturmediums II	25
Tabelle 16: Zusammensetzung der lacZ-Fixierlösung	26
Tabelle 17: Zusammensetzung der lacZ-Waschlösung	26
Tabelle 18: Zusammensetzung der lacZ-Färbelösung	26
Tabelle 19: Zusammensetzung der Blockierlösung I	28
Tabelle 20: Zusammensetzung der Blockierlösung II	28
Tabelle 21: Zusammensetzung der Mikrobeadlösung	31

8. Literaturverzeichnis

- Antoniades I, Stylianou P, Skourides PA. Making the connection: ciliary adhesion complexes anchor basal bodies to the actin cytoskeleton. *Dev Cell*. 2014; 28: 70–80
- Banizs B, Pike MM, Millican CL, Ferguson WB, Komlosi P, Sheetz J, Bell PD, Schwiebert EM, Yoder BK. Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development*. 2005; 132: 5329–5339
- Bear RM, Caspary T. Uncovering cilia function in glial development. *Ann Hum Genet*. 2024; 88: 27–44
- Bershteyn M, Atwood SX, Woo W-M, Li M, Oro AE. MIM and cortactin antagonism regulates ciliogenesis and hedgehog signaling. *Dev Cell*. 2010; 19: 270–283
- Bettencourt-Dias M, Glover DM. Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 451–463
- Carabalona A, Kallo H, Gonzalez M, ..., Rivera C. Identification of novel human microcephaly-linked protein Mtss2 that mediates cortical progenitor cell division and corticogenesis through Nedd9-RhoA. *Elife*. 2025; 13: RP92748
- Charras GT, Hu C-K, Coughlin M, Mitchison TJ. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J Cell Biol*. 2006; 175: 477–490
- Cserr HF. Physiology of the choroid plexus. *Physiological Reviews*. 1971; 51.2: 273–307
- Dawson JC, Timpson P, Kalna G, Machesky LM. Mtss1 regulates epidermal growth factor signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*. 2012; 31: 1781–1793
- Del Bigio MR. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia*. 1995; 14: 1–13
- Del Bigio MR. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119: 55–73

- Del Bigio MR, Di Curzio DL. Nonsurgical therapy for hydrocephalus: a comprehensive and critical review. *Fluids Barriers CNS*. 2016; 13: 3
- Deng S, Gan L, Liu C, Xu T, Zhou S, Guo Y, Zhang Z, Yang G-Y, Tian H, Tang Y. Roles of Ependymal Cells in the Physiology and Pathology of the Central Nervous System. *Aging Dis*. 2023; 14: 468–483
- Desmond ME, Jacobsen AG. Embryonic Brain Enlargement Requires Cerebrospinal Fluid Pressure. *Developmental Biology*. 1977; 57: 188–198
- Duy PQ, Greenberg ABW, Butler WE, Kahle KT. Rethinking the cilia hypothesis of hydrocephalus. *Neurobiol Dis*. 2022; 175: 105913
- Eraly SA. Striking Differences between Knockout and Wild-Type Mice in Global Gene Expression Variability. *PLOS ONE*. 2014; 9(5): e97734
- Fang C, Pan X, Di Li, ..., Yan X. Distinct roles of Kif6 and Kif9 in mammalian ciliary trafficking and motility. *J Cell Biol*. 2024; 223: e202312060
- Faubel R, Westendorf C, Bodenschatz E, Eichele G. Cilia-based flow network in the brain ventricles. *Science*. 2016; 353: 176–178
- Fliegau M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 880–893
- Grondona JM, Granados-Durán P, Fernández-Llebrez P, López-Ávalos MD. A simple method to obtain pure cultures of multiciliated ependymal cells from adult rodents. *Histochem Cell Biol*. 2013; 139: 205–220
- Guirao B, Meunier A, Mortaud S, ..., Spassky N. Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nat Cell Biol*. 2010; 12: 341–350
- Hirao T, Kim BG, Habuchi H. Transforming Growth Factor- β 1 and Bone Morphogenetic Protein-2 Inhibit Differentiation into Mature Ependymal Multiciliated Cells. *Biol Pharm Bull*. 2023; 46: 111–122
- Hoffman HK, Prekeris R. Roles of the actin cytoskeleton in ciliogenesis. *J Cell Sci*. 2022; 135: jcs259030
- Horani A, Ferkol TW. Understanding Primary Ciliary Dyskinesia and Other Ciliopathies. *J Pediatr*. 2021; 230: 15-22.e1

- Hou CC, Li D, Berry BC, Zheng S, Carroll RS, Johnson MD, Yang HW. Heterozygous FOXP1 Mutations Cause Incomplete Ependymal Cell Differentiation and Communicating Hydrocephalus. *Cell Mol Neurobiol*. 2023; 43: 4103–4116
- Ibañez-Tallon I, Pagenstecher A, Fliegau M, Olbrich H, Kispert A, Ketelsen U-P, North A, Heintz N, Omran H. Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum Mol Genet*. 2004; 13: 2133–2141
- Jiang Z, Zhou J, Qin X, Zheng H, Gao B, Liu X, Jin G, Zhou Z. MT1-MMP deficiency leads to defective ependymal cell maturation, impaired ciliogenesis, and hydrocephalus. *JCI Insight*. 2020; 5: e132782
- Kahle KT, Kulkarni AV, Limbrick DD, Warf BC. Hydrocephalus in children. *Lancet*. 2016; 387: 788–799
- Kammler G. Einteilung des Hydrozephalus. In: Bächli H, Lütschg J, Messing-Jünger M, Hrsg. *Pädiatrische Neurochirurgie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018: 246–250
- Langlet F. Targeting Tanycytes: Balance between Efficiency and Specificity. *Neuroendocrinology*. 2020; 110: 574–581
- Lee L. Riding the wave of ependymal cilia: genetic susceptibility to hydrocephalus in primary ciliary dyskinesia. *J Neurosci Res*. 2013; 91: 1117–1132
- Lee Y-G, Macoska JA, Korenchuk S, Pienta KJ. MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer. *Neoplasia*. 2002; 4: 291–294
- Lei R, Tang J, Zhuang X, ..., Hu G. Suppression of MIM by microRNA-182 activates RhoA and promotes breast cancer metastasis. *Oncogene*. 2014; 33: 1287–1296
- Lowery LA, Sive H. Totally tubular: the mystery behind function and origin of the brain ventricular system. *Bioessays*. 2009; 31: 446–458
- Ma X-Y, Yang T-T, Liu L, Peng X-C, Qian F, Tang F-R. Ependyma in Neurodegenerative Diseases, Radiation-Induced Brain Injury and as a Therapeutic Target for Neurotrophic Factors. *Biomolecules*. 2023; 13: 754

- Marshall WF, Kintner C. Cilia orientation and the fluid mechanics of development. *Curr Opin Cell Biol.* 2008; 20: 48–52
- Matskova L, Zheng S, Kashuba E, Ernberg I, Aspenström P. MTSS1: beyond the integration of actin and membrane dynamics. *Cell Mol Life Sci.* 2024; 81: 472
- Mattila PK, Pykäläinen A, Saarikangas J, Paavilainen VO, Vihinen H, Jokitalo E, Lappalainen P. Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J Cell Biol.* 2007; 176: 953–964
- Mattila PK, Salminen M, Yamashiro T, Lappalainen P. Mouse MIM, a tissue-specific regulator of cytoskeletal dynamics, interacts with ATP-actin monomers through its C-terminal WH2 domain. *J Biol Chem.* 2003; 278: 8452–8459
- Meijering E, Dzyubachyk O, Smal I. Chapter nine - Methods for Cell and Particle Tracking. In: conn PM, Hrsg. *Methods in Enzymology*, Volume 504: Academic Press, 2012: 183–200
- Mertz KD, Pathria G, Wagner C, ..., Wagner SN. MTSS1 is a metastasis driver in a subset of human melanomas. *Nat Commun.* 2014; 5: 3465
- Minkeviciene R, Hlushchenko I, Virenque A, Lahti L, Khanal P, Rauramaa T, Koistinen A, Leinonen V, Noe FM, Hotulainen P. MIM-Deficient Mice Exhibit Anatomical Changes in Dendritic Spines, Cortex Volume and Brain Ventricles, and Functional Changes in Motor Coordination and Learning. *Front Mol Neurosci.* 2019; 12: 276
- Mirzadeh Z, Han Y-G, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cilia organize ependymal planar polarity. *J Neurosci.* 2010; 30: 2600–2610
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell.* 2008; 3: 265–278
- Mitchell B, Jacobs R, Li J, Chien S, Kintner C. A positive feedback mechanism governs the polarity and motion of motile cilia. *Nature.* 2007; 447: 97–101
- Morley MP, Wang X, Hu R, ..., Cappola TP. Cardioprotective Effects of MTSS1 Enhancer Variants. *Circulation.* 2019; 139: 2073–2076

- Munch TN, Rostgaard K, Rasmussen M-LH, Wohlfahrt J, Juhler M, Melbye M. Familial aggregation of congenital hydrocephalus in a nationwide cohort. *Brain*. 2012; 135: 2409–2415
- Nobusue H, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Sumikawa Y, Chiyoda T, Akashi K, Saya H, Kano K. Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. *Nat Commun*. 2014; 5: 3368
- Ohata S, Herranz-Pérez V, Nakatani J, Boletta A, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Mechanosensory Genes Pkd1 and Pkd2 Contribute to the Planar Polarization of Brain Ventricular Epithelium. *J Neurosci*. 2015; 35: 11153–11168
- Pelaseyed T, Bretscher A. Regulation of actin-based apical structures on epithelial cells. *J Cell Sci*. 2018; 131: jcs221853
- Perez-Figares JM, Jimenez AJ, Rodriguez EM. Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microsc. Res. Tech*. 2001; 52: 591–607
- Podieh F, Overboom MC, Knol JC, Piersma SR, Goeij-de Haas R, Pham TV, Jimenez CR, Hordijk PL. AAMP and MTSS1 Are Novel Negative Regulators of Endothelial Barrier Function Identified in a Proteomics Screen. *Cells*. 2024; 13: 1609
- Reiter JF, Leroux MR. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017; 18: 533–547
- Rekate HL. Classification of Hydrocephalus. In: Cinalli, G., Ozek, M., Sainte-Rose, C., Hrsg. *Pediatric Hydrocephalus*. Cham: Springer, 2018: 1–17
- Saarikangas J, Mattila PK, Varjosalo M, ..., Lappalainen P. Missing-in-metastasis MIM/MTSS1 promotes actin assembly at intercellular junctions and is required for integrity of kidney epithelia. *J Cell Sci*. 2011; 124: 1245–1255
- Salbreux G, Charras G, Paluch E. Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends in Cell Biology*. 2012; 22: 536–545
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, ..., Alvarez-Buylla A. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*. 2006; 311: 629–632

Schuhmann MU. Pathophysiologie des Hydrozephalus. In: Bächli H, Lütschg J, Messing-Jünger M, Hrsg. Pädiatrische Neurochirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018: 251–259

Sistig T, Lang F, Wrobel S, Baader SL, Schilling K, Eiberger B. Mtss1 promotes maturation and maintenance of cerebellar neurons via splice variant-specific effects. *Brain Struct Funct.* 2017; 222: 2787–2805

Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci.* 2005; 25: 10–18

Tissir F, Qu Y, Montcouquiol M, ..., Goffinet AM. Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat Neurosci.* 2010; 13: 700–707

Tuli S, Drake J, Lawless J, Wigg M, Lamberti-Pasculli M. Risk factors for repeated cerebrospinal shunt failures in pediatric patients with hydrocephalus. *Journal of Neurosurgery.* 2000; 92: 31–38

Wagner W. Therapie des Hydrozephalus. In: Bächli H, Lütschg J, Messing-Jünger M, Hrsg. Pädiatrische Neurochirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018: 261–271

Woodings JA, Sharp SJ, Machesky LM. MIM-B, a putative metastasis suppressor protein, binds to actin and to proteine tyrosine phosphatase δ . *Biochem. J.* 2003; 371: 463–471

Worthington WC, Cathcart RS. Ependymal cilia: distribution and activity in the adult human brain. *Science.* 1963; 139: 221-222

Xia S, Li X, Johnson T, Seidel C, Wallace DP, Li R. Polycystin-dependent fluid flow sensing targets histone deacetylase 5 to prevent the development of renal cysts. *Development.* 2010; 137: 1075–1084

Zappaterra MD, Lisgo SN, Lindsay S, Gygi SP, Walsh CA, Ballif BA. A comparative proteomic analysis of human and rat embryonic cerebrospinal fluid. *J Proteome Res.* 2007; 6: 3537–3548

Zappaterra MW, Lehtinen MK. The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69: 2863–2878

Zhao H, Pykäläinen A, Lappalainen P. I-BAR domain proteins: linking actin and plasma membrane dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 2011; 23: 14–21

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Anatomischen Institut – Anatomie und Zellbiologie der Universität Bonn unter der Betreuung von Prof. Dr. Karl Schilling durchgeführt.

Die Konzeption der Versuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Britta Eiberger (Arbeitsgruppenleiterin).

Die Versuche und Analysen wurden wie folgt durchgeführt:

- Die Genotypisierungen, Anfertigung und Weiterverarbeitung der primären Zellkulturen, die Herstellung von Gewebeschnitten und -präparaten, die Färbung von Gewebe und Zellen und die Analyse des Flüssigkeitstransportes erfolgten selbstständig nach Einarbeitung durch Dr. Britta Eiberger, Helma Langmann und Andrea Christ.
- Die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte mit Unterstützung durch PD Dr. Gregor Kirfel (Institut für Zellbiologie, Universität Bonn).
- Die MRT-Untersuchungen erfolgten mit Unterstützung durch Dr. Vera Keil (Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinik Bonn).

Die Tötung der Versuchstiere sowie die Gewebegewinnung zur Genotypisierung erfolgte durch Dr. Britta Eiberger oder andere ausgebildete Labor- und Tierstallmitarbeiter*innen. Die weitere Verarbeitung des Gewebes erfolgte durch mich selbst.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde eigenständig und in Zusammenarbeit mit Dr. Britta Eiberger und Dr. Vera Keil generiert.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich nach Anleitung durch Prof. Dr. Karl Schilling, Christoph Wieners und Clemens Wagner.

Bei der Erstellung dieser Arbeit verwendete ich ChatGPT (basierend auf GPT-3.5, GPT-4 und GPT-5) um die Lesbarkeit und Sprache des Manuskripts zu verbessern. Nach der Verwendung dieses Tools habe ich die entsprechenden Passagen überprüft und bearbeitet und übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

10. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Karl Schilling, für die Bereitstellung des Themas und die fachliche Begleitung während der gesamten Promotionszeit. Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Dr. Britta Eiberger, deren fachliche Expertise, verlässliche Begleitung und konstruktive Beratung diese Arbeit in allen Phasen entscheidend geprägt haben. Dem Team der AG Eiberger und den Mitarbeiter*innen des Anatomischen Instituts danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, die sorgfältige Einarbeitung, die Begleitung im Laboralltag und die Unterstützung bei methodischen Fragestellungen, mit besonderem Dank an Helma Langmann, Andrea Christ, Thorsten Sistig und Clemens Wagner. Mein herzlicher Dank gilt meinem Mann, Felix Kalthoff, dessen Geduld, Verständnis und beständiger Rückhalt mir stets große Sicherheit gegeben haben. Ebenso danke ich meinen Eltern, Lucia und Christoph Wieners, die mir immer wieder Zeit und Raum für die Arbeit ermöglicht haben; meinem Vater danke ich darüber hinaus für seine wissenschaftliche Beratung und Unterstützung bei der Planung und Auswertung der Experimente. Abschließend danke ich meinen Freundinnen und Freunden, insbesondere Laura Stüssel und Luisa Wiedemann, für ihre Ermutigung, ihr offenes Ohr und die motivierende Begleitung während dieser Zeit.