

Zusammenfassung

Tenascine sind matrizelluläre Proteine, von denen angenommen wird, dass sie vorwiegend eine regulatorische Funktion haben. Säugetiere weisen 4 Tenascine auf, diese modulieren alle in *in vitro* Experimenten die Zelladhäsion und Migration. Tenascin-C und -X werden während der Embryonalentwicklung stark exprimiert, in den jeweiligen Knockoutmäusen werden aber keine entwicklungsbedingten Störungen beobachtet. Hingegen weisen adulte Tenascin-X Knockoutmäuse eine Bindegewebeschwäche auf, beim Menschen führt der Verlust von Tenascin-X zu einem Subtyp von Ehler-Danlos-Syndrom. Diese seltene Erbkrankheit führt ebenfalls zu einer Bindegewebeschwäche.

Tenascin-N wird während der Embryonalentwicklung im Mesenchym des Darms, der Milz, der Niere und der Leber exprimiert. Bei erwachsenen Menschen ist Tenascin-N im Zahnhalteapparat und im Periost lokalisiert. Ferner wurde bei Mäusen noch eine Lokalisation in der Stammzellnische von Schnurrhaaren und im Limbus der Cornea gefunden. Im Gegensatz zu der limitierten Expression im gesunden adulten Organismus, kann Tenascin-N im perivaskulären Bindegewebe von soliden Tumoren verstärkt nachgewiesen werden. Die immunhistologische Färbeintensität korreliert mit der Tumorgradierung. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass Tenascin-N die Zelladhäsion an Fibronectin moduliert und die Zellen sich dadurch abrunden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde erstmals die *in vivo* Funktion von Tenascin-N untersucht. Dafür wurde von uns eine Knockoutmaus neu generiert. Diese Mäuse weisen unter Stress eine erhöhte Sterblichkeit auf, das Wachstum ist verzögert und im Alter nehmen die Tiere im Gegensatz zu C57/B6N Kontrolltieren nicht an Gewicht zu. Makroskopisch können bei 6 Monate alten Tenascin-N defizienten Tieren Zahnschmelzdefekte an den oberen Schneidezähnen beobachtet werden. Die Tiere weisen sonst keine morphologischen Defekte auf. Isolierte Schneidezähne und μ CT Aufnahmen haben gezeigt, dass bei den kontinuierlich wachsenden Schneidezähnen die postnatale Hartsubstanzbildung gestört ist. Das kontinuierliche Wachstum dieser Zähne wird durch epitheliale und mesenchymale Stammzellen ermöglicht. Die epithelialen Stammzellen sind in einer zervikalen Schlinge des Schmelzorgans lokalisiert. Die Schneidezähne weisen mindestens 2 verschiedene Pools an mesenchymalen Stammzellen (MSC) auf: 1. Perivaskuläre Zellen und 2. Glia-Vorläuferzellen können zu MSCs differenzieren. Tenascin-N ist entlang der Gefäßnervenbündel lokalisiert. Bei den Tenascin-N defiziente Knockoutmäusen ist die Zellproliferation im Bereich des Gefäßnervenbündels reduziert. Ferner ist die Expression von Axin-2 und Gli-1, zweier bekannter Marker für Vorläuferzellen, stark reduziert. Die neu gebildeten Odontoblasten weisen Zellpolarisationsdefekte auf und die

Dentindicke nimmt bei allen Knockoutmäusen stark zu. Bei den meisten Mäusen sind die Zahnschmelz-bildenden Zellen ebenfalls depolarisiert. Bei den Schneidezähnen ist zudem das parodontale Ligament verbreitert, im Gegensatz dazu weisen die Molaren und deren Parodont keine Defekte auf.

Ähnliche Defekte finden sich in Periostin und Integrin- α 11 defizienten Mäusen, bei den Periostin defizienten bestehen zusätzlich Defekte im Parodont der Molaren. Bei Periostin Knockoutmäusen konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung des Phänotyps durch einen Wechsel von Pelletfutter zu mehlartigem Futter deutlich vermindert wird. Dies lässt vermuten, dass mechanische Kräfte vermittelt über Integrine bei der Entstehung des Phänotyps eine Rolle spielen könnten. Zudem konnte beobachtet werden, dass die apikale Pulpa bei den Knockouttieren verbreitert ist.

Zusammen mit der verringerten Ausdehnung von gli1 in dieser Region ergeben sich die folgenden Hypothesen: 1. Tenascin-N ist vermutlich für die Migration der Zellen verantwortlich. 2. Da Integrin- α 11 Knockoutmäuse einen sehr ähnlichen Phänotyp aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass beim Fehlen von Tenascin-N primär Integrin Signalwege gestört sind. Und dass dies sekundär Wnt Signalwege beeinflusst und damit verbunden zu einer Verdickung des Dentins führt. Um diese Hypothesen zu überprüfen, wird derzeit eine Gli-1 Reportermaus generiert.

Die Tenascin-N defizienten Tiere entwickeln teilweise im juvenilen Alter eine Kardiomyopathie. Diese wird als Grund für die erhöhte Sterberate angenommen. Der rechte Herzventrikel ist exzentrisch vergrößert. Diese Störung kann bereits bei neugeborenen Mäusen beobachtet werden, was bedeutet, dass die primäre Störung im Herz selber liegt und dass die Veränderung nicht von einem veränderten Lungenwiderstand hervorgerufen wird.

Summary

Tenascins are matricellular proteins, a family of proteins with predominantly regulatory functions. In mammals 4 different tenascins are found, their function was extensively studied in *in vitro* experiments and those experiments showed a role in cell migration and adhesion. Tenascin-C und -X are widely expressed in the embryonal body, but the corresponding knockout mice have no developmental phenotype. Tenascin-X deficiency in humans is leading to Ehler-Danlos Syndrome, a rare inherited connective tissue disorder.

In embryos tenascin-N is widely expressed. It is found in the smooth muscle layer of the gut, in the spleen, in the kidney and in liver. However in adult humans, tenascin-N is just found in the periodontal ligament and in the periosteum. In mice tenascin-N is known to be expressed in the whisker stem cell niche and in the cornea limbus. In contrast to this, tenascin-N expression is upregulated in the perivascular stroma of most human cancers. The level of upregulation of tenascin-N expression positively correlates with the tumor grading. *In vitro* experiments revealed that tenascin-N is interfering with cell adhesion on fibronectin coated surfaces.

To elucidate the function of tenascin-N we have generated a global tenascin-N knockout mouse. Tenascin-N knockout animals are vital and fertile, however their lifespan is limited to the age of 6 to 12 months and their body weight is significantly reduced. Macroscopically those animals are normal, except enamel defects are visible in the upper incisors of 6 month old animals. Isolated incisors and μ CT scans of jaws showed that the postnatal growth of the incisors is disturbed. Both epithelial and mesenchymal stem cells are needed for the continuous growth. The epithelial stem cells are found in the cervical loop of the enamel organ. So far, two distinct mesenchymal stem cell pools were identified, gli-1 positive perivascular cells and glia cell. In 4 weeks old mice tenascin-N is localized in the region of the neurovascular bundle. Immunohistological stainings showed that tenascin-N deficiency leads to a decrease in proliferation in this area. Furthermore *in situ* hybridization experiments revealed that the expression of axin-2 and gli-1, two established mesenchymal stem cell markers, is strongly reduced in the neurovascular bundle of tenascin-N knockout mice. In addition to that the thickness of the dentin layer is increased in all animals and the polarization of the odontoblasts is disturbed. The width of the periodontal ligament of the incisors is increased in all animals, in contrast to that the molars and their periodontal ligament are normal. In around 90% of the tenascin-N deficient animals we could observe that the enamel formation was severely disturbed.

Similar defects were reported in periostin and integrin- α 11 deficient mice, however in periostin deficient mice the periodontal ligament of the molars is also affected. Interestingly, placing the periostin knockout mice on a soft diet resulted in a partial rescue of both the enamel and periodontal phenotype. This finding suggests that mechanical forces mediated by integrins might play a role in the formation of the incisor phenotype. Furthermore, it could be observed in 4 weeks old tenascin-N knockout mice that the width of apical pulp is enlarged.

This finding and the shorter expansion of gli1 expressing cells cause the following hypothesis: 1. Tenascin-N might have a role in cell migration. 2. Moreover, as integrin- α 11 knockout mice exhibit a very similar phenotype and tenascins are known to interfere with fibronectin action *in vitro*, will constitute a presumption that integrin signaling is disturbed in the absence of tenascin-N. And this might lead to a decrease in Wnt signaling and pronounced dentin formation.

To verify these hypotheses, we will use a connective tissue specific conditional inducible knockout mouse. Furthermore we are planning to cross the tenascin-N knockout mice with a Gli-1 reporter mouse and to perform cell lineage tracing experiments. Beside the tooth phenotype juvenile tenascin-N knockout animals are developing a cardiomyopathy, which could be the reason for the limited life expectancy. The right ventricle is already enlarged in new born mice, which supposes a congenital heart defect.