

Aus der Poliklinik für Parodontologie und Zahnerhaltung
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Expressionen der HDACs der Klasse I in humanen Odontoblasten der gesunden und
durch Karies entzündlich veränderten Dentin-Pulpa-Einheit

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Michelle Breyer geb. Lennartz
aus Simmerath

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 27. Oktober 2025

Nachnutzungslizenz: CC-BY-ND-4.0

„Wer hohe Türme bauen will, muss lange beim Fundament verweilen“

Anton Bruckner

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Die Odontoblasten und die Bildung der Dentinmatrix.....	1
1.1.1 Dentinbildung unter physiologischen Bedingungen	1
1.1.2 Dentinbildung unter entzündlichen Bedingungen	1
1.2 Die Struktur der Histone und deren Acetylierung und Deacetylierung ...	2
1.2.1 Einteilung und Eigenschaften der Histondeacetylasen.....	3
1.2.2 Histondeacetylasen in Zellen der Dentin-Pulpa-Einheit.....	4
1.2.3 Die Rolle der HDACs bei der transkriptionalen Regulation der Gene und Proteine.....	4
1.2.4 Die transkriptionale Regulation der Dentinmatrixbildung	5
2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	7
3 Material und Methoden	8
3.1 Materialien	8
3.1.1. Untersuchungsmaterial	8
3.1.2 Pufferlösungen, Fixativ und Entkalkungslösung	8
3.2 Methoden.....	9
3.2.1 Präparation und Immersionsfixation des Untersuchungsmaterials	9
3.2.2 Dekalzifizierung, Waschung und Kryoprotektion der Molaren	9
3.2.3 Kryoeinbettung und Schockgefrieren der Zähne	10
3.2.4 Kryoschneiden der Molaren und Lagerung der Schnitte.....	10
3.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Charakterisierung der Schnitte	10
3.3 Die Spezifität der primären Antikörper.....	11
3.4 Immunhistochemische Inkubationsmethoden.....	11
3.4.1 Die Bestimmung der optimalen Verdünnung der primären Antikörper.....	12
3.4.2 Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC-Methode) ..	12
3.4.3 Densitometrie zur Quantifizierung der Immunhistochemie	13

3.5	Statistische Auswertung	14
4	Ergebnisse.....	15
4.1	Histologische Charakterisierung der gesunden und der durch Karies entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit.....	15
4.2	Die Expression der HDACs Klasse I in Odontoblasten der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit.....	16
4.2.1	Die Expression von HDAC1 in Odontoblasten der gesunden Molaren	18
4.2.2	Die Expression von HDAC2 in Odontoblasten der gesunden Molaren	18
4.2.3	Die Expression von HDAC3 in Odontoblasten der gesunden Molaren	18
4.2.4	Die Expression von HDAC8 in Odontoblasten der gesunden Molaren	18
4.3	Die Expression der HDACs Klasse I in Odontoblasten der durch Karies entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit.....	19
4.3.1	Die Expression von HDAC1 in Odontoblasten der kariösen Molaren	20
4.3.2	Die Expression von HDAC2 in Odontoblasten der kariösen Molaren	21
4.3.3	Die Expression von HDAC3 in Odontoblasten der kariösen Molaren	22
4.3.4	Die Expression von HDAC8 in Odontoblasten der kariösen Molaren	23
4.4	Kontrolle der immunhistochemischen Färbungen	24
4.5	Statische Auswertung der Färbungsintensitäten	25
5	Diskussion.....	26
5.1	Diskussion der Methodik.....	26
5.1.1	Vorbereitung des Untersuchungsmaterials.....	26
5.1.2	Immunhistochemische Methodik.....	26
5.1.2.1	Blockierung der endogenen Peroxidase.....	26
5.1.2.2	Die Anwendung von Triton X-100.....	27
5.1.2.3	Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen.....	27
5.1.2.4	Darstellung der immunhistochemischen Bindungsstellen.....	27
5.2	Die Rolle von HDAC Klasse I in gesunden Odontoblasten	28
5.2.1	Die Rolle von HDAC1 in Odontoblasten der gesunden Molaren	28
5.2.2	Die Rolle von HDAC2 in Odontoblasten der gesunden Molaren	29

5.2.3	Die Rolle von HDAC3 in Odontoblasten der gesunden Molaren	29
5.2.4	Die Rolle von HDAC8 in Odontoblasten der gesunden Molaren	29
5.3	Die Rolle von HDAC Klasse I in entzündeten Odontoblasten	30
5.3.1	Die Rolle von HDAC1 in Odontoblasten der entzündeten Molaren	30
5.3.2	Die Rolle von HDAC2 in Odontoblasten der entzündeten Molaren	30
5.3.3	Die Rolle von HDAC3 in Odontoblasten der entzündeten Molaren	31
5.3.4	Die Rolle von HDAC8 in Odontoblasten der entzündeten Molaren	31
5.4	Schlussfolgerungen der Ergebnisse	31
6	Zusammenfassung	33
7	Literaturverzeichnis	35
8	Anhang.....	40
9	Danksagung.....	42
10	Tabellarischer Lebenslauf.....	43

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex Methode
Ac	Acetylgruppe
BSA	engl. bovine serum albumin; Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
CoA	Acetyl-Coenzym A
CREB	cAMP-responsive element binding protein
DAB	Diaminobenzidin
DMP1	Dentin Matrix Protein 1
DNA	deoxyribonucleid acid; Desoxyribonukleinsäure
dp	dentale Pulpa
DPP	Dentinphosphoprotein
DSP	Dentinsialoprotein
DSPP	Dentin Sialophosphoprotein
Dspp	Dentin Sialophosphoprotein (Gen)
EM	Elektronenmikroskop
HAT	Histonacetylase
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylaseinhibitor
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IHC	Immunhistochemie
KLF4	krüppel-like factor 4
M.B.	Michelle Breyer
MGW	Mittlerer Grauwert
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	Nuclear Factor κB
NGS	normal goat serum; Normales Ziegenserum
o	Odontoblasten
of	Odontoblastenfortsätze
Osx	Osterix

P	Peroxidase
pAk	primärer Antikörper
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatpuffer-Natriumchlorid
pd	Primärdentin
PFA	Paraformaldehyd
Runx2	Runt-related transcription factor 2
sAk	sekundärer Antikörper
Sc	Santa Cruz
sd	Sekundärdentin
STAT 3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
Syn.	Synonym
TB	Trispuffer
TBS	Trispuffer-NaCl
td	Tertiärdentin
TNP	Prikinsäure
v.a.	vor allem
Y.K.	Yüksel Korkmaz
z. B.	zum Beispiel
zaz	zellarme Zone
zrz	zellreiche Zone

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Histonoktamers.....	3
Abbildung 2: Darstellung der Wirkung der Histonacetylierung und -deacetylierung auf die Transkription.....	5
Abbildung 3: Prinzip der ABC-Methode.....	12
Abbildung 4: Darstellung der gesunden und entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit	15
Abbildung 5: Expressionen der HDACs der Klasse I in der physiologischen Dentin-Pulpa-Einheit	17
Abbildung 6: Expressionen der HDACs der Klasse I in der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit	19
Abbildung 7: Expression von HDAC1 in der gesunden und kariösen Dentin-Pulpa-Einheit ..	20
Abbildung 8: Expression von HDAC2 in der gesunden und kariösen Dentin-Pulpa-Einheit ..	21
Abbildung 9: Expression von HDAC3 in der gesunden und kariösen Dentin-Pulpa-Einheit ..	22
Abbildung 10: Expression von HDAC8 in der gesunden und kariösen Dentin-Pulpa-Einheit	23
Abbildung 11: Kontrollschnitte der gesunden und kariösen Dentin-Pulpa-Einheit	24
Abbildung 12: Statistische Auswertung der Färbungsintensitäten der Odontoblasten	25

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	40
Tabelle 2: Verwendete Antikörper im Rahmen der Immunhistochemie	41
Tabelle 3: Mittelwerte der gemessenen Färbungsintensitäten in Densitometrischer Einheit.	41

1 Einleitung

Das Dentale Organ setzt sich aus dem Schmelz, dem Dentin, der Pulpa und dem Zahnhalteapparat zusammen. Der Zahnhalteapparat besteht wiederum aus dem Zement, der Gingiva, dem parodontalen Ligament und dem Alveolarknochen. Das Dentin bildet mit der dentalen Pulpa eine Einheit, die als Dentin-Pulpa-Einheit bezeichnet wird. Der Begriff Dentin-Pulpa-Einheit (Syn.: Dentin-Pulpa-Komplex) soll verdeutlichen, dass die Zahnpulpa mit dem umliegenden Gewebe, dem Dentin, in ständiger Interaktion steht (Pashley, 1996). Die Pulpa enthält neben Blutgefäßen, Nervenfasern, Fibroblasten, pulpalen Stammzellen und Immunzellen (bspw. Lymphozyten und Makrophagen) die hochspezialisierten Odontoblasten, die die Pulpa auskleiden und wichtige Aufgaben erfüllen (Yu and Abbott, 2007, Bleicher, 2014). In Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen erfüllen die Zellen der Dentin-Pulpa-Einheit mehrere Funktionen. In der Zahnheilkunde ist die Bildung der Dentinmatrix durch die Odontoblasten eine zentrale und wichtige Funktion.

1.1 Die Odontoblasten und die Bildung der Dentinmatrix

Entwicklungsgeschichtlich entstammen die Odontoblasten aus der Neuralleiste (Bleicher, 2014). Odontoblasten sind Zellen, die eine Kollagenmatrix produzieren, die schlussendlich zu Dentin mineralisiert (Galler et al., 2021). Sie hinterlassen bei der Bildung der Dentinmatrix innerhalb des Dentins ihre Fortsätze, die dem Dentin seine röhrenförmige Struktur verleihen (Galler et al., 2021). Weiterhin spielen sie eine wichtige Rolle bei Entzündungs- und Reparaturprozessen, da die terminal differenzierten Odontoblasten die ersten Zellen sind, die nach Einbruch des Zahnschmelzes auf Bakterien oder Toxine reagieren können (Hahn and Liewehr, 2007, Staquet et al., 2008, Farges et al., 2013).

Dentin kann lebenslänglich in verschiedenen Formen gebildet werden (Pashley, 1996).

1.1.1 Dentinbildung unter physiologischen Bedingungen

Im Zuge der Zahnentwicklung bilden die Odontoblasten bis zum Zahndurchbruch zunächst das Primärdentin (Goldberg et al., 2011). Nach Abschluss der Zahneruption beginnt kontinuierlich und lebenslänglich die Bildung des Sekundärdentins (Goldberg et al., 2011).

Hinsichtlich seiner Struktur kann das Dentin noch weiter unterteilt werden: Es gibt das Manteldentin, welches wenige, dünne Dentintubuli enthält und im peripheren Bereich unterhalb des Zahnschmelzes liegt (Goldberg et al., 2011). Weiterhin existiert das zirkumpulpale Dentin, welches den größten Anteil der Dentinmatrix bildet. Es enthält deutlich mehr und dickere Dentintubuli als das Manteldentin (Goldberg et al., 2011).

Sowohl das Primär- als auch das Sekundärdentin werden durch die terminal differenzierten Odontoblasten gebildet (Korkmaz et al., 2022).

1.1.2 Dentinbildung unter entzündlichen Bedingungen

Unter dem Einfluss von verschiedenen Stimuli und Noxen (bspw. Karies oder Traumata) kann man zwei Arten von Tertiärdentin unterscheiden. Man unterscheidet das reaktive Tertiärdentin von dem reparativen Tertiärdentin.

Kommt es durch Noxen oder Toxine zu einer milden Entzündungsreaktion, die die terminal differenzierten Odontoblasten nicht schädigt, bilden diese das reaktive Tertiärdentin (Smith et al., 1995). Hinsichtlich seiner Struktur ähnelt es dem physiologisch gebildeten Dentin und dient dem Schutz der Pulpa vor tieferer Infiltration der Pathogene (Bleicher, 2014).

Sobald die terminal differenzierten Odontoblasten aufgrund einer starken Entzündungsreaktion degradieren (bspw. durch eine Karies profunda), wird das reparative Tertiärdentin von den sogenannten odontoblastenähnlichen Zellen gebildet (Smith et al., 1995). Diese differenzieren sich aus den pulpalen Stammzellen, die auch Stromazellen genannt werden (Bleicher, 2014). Die Struktur der Dentinmatrix des reparativen Tertiärdentins ähnelt zumeist einer atubulären Knochenstruktur, welche auch Fibrodentin genannt wird (Goldberg and Smith, 2004).

Allgemein besteht die extrazelluläre Dentinmatrix aus 70% Hydroxylapatit-Kristallen, 20% Wasser und 10% organischer Matrix (Chaussain-Miller et al., 2006). Diese organische Matrix setzt sich wiederum zu 90% aus Kollagen und zu 10% aus nichtkollagenen extrazellulären Dentinmatrix Proteinen zusammen (Chaussain-Miller et al., 2006). Die entscheidenden Dentinmatrixproteine sind das Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) und das Dentin Sialophosphoprotein (DSPP), welches nach der Bildung unmittelbar in das Dentinsialoprotein (DSP) und Dentinphosphoprotein (DPP) gespalten wird (Yamakoshi et al., 2006, Zhu et al., 2012).

Trotz der geringen Anteile der nicht-kollagenen extrazellulären Dentinmatrixproteine in der Dentinmatrix sind DMP1, DSP und DPP entscheidend für die Bildung und Biomineralisation der Dentinmatrix. Um neue Therapieansätze zur Behandlung kariöser Läsionen zu entwickeln ist es wichtig die Details zur Expression der Gene, die die DMP1- und DSPP-Proteine kodieren, zu kennen. Bereits postulierte Ergebnisse aus in-vitro Studien und Knockout-Mausmodellen zeigen, dass bei der Bildung der Dentinmatrix bestimmte Transkriptionsfaktoren die Expression von Dmp1 und Dspp regulieren (Chen et al., 2009, Li et al., 2011, Klinz et al., 2012, Chen et al., 2016, Chen et al., 2021). Weiterhin ist bekannt, dass die posttranslationalen epigenetischen Modifikationen eine Schlüsselrolle bei der Transkription der Gene spielen. Zu diesen Modifikationen zählen die Methylierung und Demethylierung, die Acetylierung und Deacetylierung, die Phosphorylierung und Dephosphorylierung, sowie die Ubiquitinierung. Ob die DNA-Gen-Sequenzen der spezifischen Gene von einer bestimmten Zelle unter gesunden und entzündlichen Bedingungen für die Transkriptionsfaktoren zugänglich oder unzugänglich vorliegen, wird von der Acetylierung und Deacetylierung maßgeblich beeinflusst.

1.2 Die Struktur der Histone und deren Acetylierung und Deacetylierung

Epigenetische Prozesse regulieren die Expression von Genen während verschiedener biologischer Prozesse, ohne die in der DNA gespeicherte Erbinformation zu verändern (Wang et al., 2021). Zur Änderung der strukturellen Chromatinordnung gibt es einige epigenetische Systeme, wie beispielsweise die Histonmodifikationen (Cavalli and Heard, 2019).

Histone sind eine Gruppe von Proteinen in oktamerer Form, die die Erbinformation komprimiert verpacken, indem die DNA um sie gewickelt wird (Smith, 1991). Die 8 Histonproteine in oktamerer Form werden als Nukleosom bezeichnet, welches wiederum die Grundeinheit des Chromatins bildet. Histone werden in zwei Klassen eingeteilt: Die Kern-Histone und die Linker-Histone. Die Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden die Gruppe der Kern-Histone, während H1 und H5 zur Gruppe der Linker-Histone gehören (Smith, 1991, Strahl and Allis, 2000). Histone sind stark alkalische Proteine, die viele positiv geladene Aminosäuren (z. B. Arginin und Lysin) enthalten und somit selbst positiv geladen sind (Annunziato, 2008). Die positiv geladenen Histone sind elektrostatisch mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA, die um ein Histonoktamer gewickelt sind, verbunden (Annunziato, 2008).

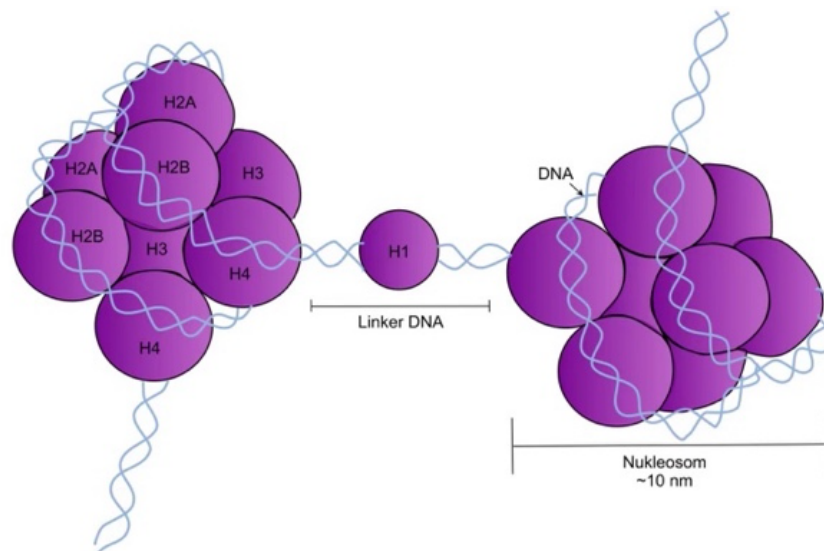


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Histonoktamers (in Anlehnung an Lu et al., 2017). Ein Histonoktamer setzt sich aus je zwei Kernhistonen H2A, H2B, H3 und H4 zusammen. Die Oktamere werden über das Linker-Histon H1 miteinander verbunden. Zur Komprimierung der DNA ist diese um die Histone gewickelt. Ein Histonoktamer mit der umwickelten DNA wird Nucleosom genannt.

Histone können posttranslational mittels reversibler Histon-Acetylierung an den Aminosäuren ihrer N-terminalen Arme modifiziert werden (Grunstein, 1997, Strahl and Allis, 2000). Diese Acetylierung erleichtert den Zugang zu den Transkriptionsfaktoren an den Genen, da die DNA aufgrund der Acetylierung weniger dicht verpackt ist (Grunstein, 1997, Bártová et al., 2008).

Im Gegensatz zu den Acetylase unterdrücken die Deacetylase die Transkription der Gene, indem sie die hinzugefügte Acetylgruppe an der Lysin-Aminosäure des N-terminalen Histonarms entfernen (Seto and Yoshida, 2014). Dies führt zu einer erhöhten Bindung zwischen der DNA und den Histonen, sodass der Zugang zu den Transkriptionsfaktoren erschwert wird und infolgedessen die Transkription der Gene unterdrückt wird (Marks et al., 2001, Gallinari et al., 2007, Seto and Yoshida, 2014).

1.2.1 Einteilung und Eigenschaften der Histondeacetylasen

Die Histondeacetylase (HDACs) können anhand ihrer Proteinstruktur, Funktion, subzellulärer Lokalisation und Expression in vier Klassen eingeteilt werden (Bradley et al., 2015, Carpio et al., 2016).

Die Klasse I der HDACs besteht aus HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8. Sie werden ubiquitär exprimiert und haben eine hohe enzymatische Aktivität gegenüber den Substraten der Histone (Carpio et al., 2016, Wang et al., 2021). HDACs der Klasse I sind überwiegend im Zellkern lokalisiert, während HDAC 3 und HDAC 8 auch in Plasmamembranen detektiert wurden (Longworth and Laimins, 2006, Cantley et al., 2017).

Die HDACs der Klasse II lassen sich in zwei Unterklassen einteilen: HDAC Klasse IIa, bestehend aus HDAC4, HDAC5, HDAC7 und HDAC9 und Klasse IIb, die HDAC6 und HDAC10 enthält (Yang and Gregoire, 2005). Die HDACs der Klasse II können im Gegensatz zu den HDACs der Klasse I zwischen dem Zellkern und Zytoplasma hin- und herpendeln und weisen mehr Genexpressionsmuster auf (Carpio et al., 2016).

Die HDACs der Klasse I und II benötigen für ihre katalytische Aktivität Zink (Zn^{2+}), während die Klasse III der HDACs (auch Sirtuine genannt) Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) benötigt (Carpio et al., 2016).

HDAC 11 weist strukturelle Ähnlichkeiten der Klassen I und II auf, sodass es zu einer eigenen Gruppe, der Klasse IV, unterteilt wurde (Grunstein, 1997, Bradley et al., 2015).

1.2.2 Histondeacetylasen in Zellen der Dentin-Pulpa-Einheit

In vitro-Studien an kultivierten Stammzellen der dentalen Pulpa zeigten, dass die HDACs bei der Bildung der Zahnhartsubstanz eine wichtige Rolle spielen (Duncan et al., 2016, Yamauchi et al., 2020). In Stammzellen der dentalen Pulpa induzierten HDAC-Inhibitoren (HDACi) eine verstärkte Differenzierung der pulpalen Stammzellen zu Osteoblasten- und Odontoblasten-ähnlichen Zellen, die in der Lage waren, mineralisierte extrazelluläre Matrix zu bilden (Kwon et al., 2012, Duncan et al., 2012, Duncan et al., 2013, Luo et al., 2018, Man et al., 2021). Basierend auf den Ergebnissen der HDACi in den kultivierten Osteoblasten- und Odontoblastenähnlichen Zellen wurde angenommen, dass die epigenetischen Mechanismen in Zellen der Dentin-Pulpa-Einheit bei der Regulation der regenerativen Vorgänge von wichtiger Bedeutung sind (Duncan et al., 2016, Yamauchi et al., 2020). Eine in vivo Studie an gesunden humanen Molaren untersuchte bereits die Expressionen und subzellulären Lokalisationen von HDAC1-4 und HDAC9 in Odontoblasten der Dentin-Pulpa-Einheit (Klinz et al., 2012). Die Ergebnisse zeigten, dass HDAC2 und HDAC9 in den Zellkernen der gesunden Odontoblasten stark exprimiert wurden, während HDAC1, HDAC3 und HDAC4 in gesunden Molaren mit einer schwachen Expression detektiert wurden (Klinz et al., 2012). Diese Ergebnisse zeigen, dass HDAC2 und HDAC9 in Odontoblasten des Menschen unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle bei der transkriptionalen Regulation der Dentinmatrixbildung spielen könnten. Es ist bisher jedoch unbekannt, inwiefern die HDACs in durch Karies entzündeten Molaren exprimiert werden und wie sie sich unter entzündlichen Bedingungen in Odontoblasten subzellulär verhalten.

1.2.3 Die Rolle der HDACs bei der transkriptionalen Regulation der Gene und Proteine

Histondeacetylasen (HDACs) sind Enzyme, die als Korepressoren der Transkription fungieren (Haberland et al., 2009, Carpio et al., 2016). HDACs unterdrücken die Transkription der Gene, indem sie die Acetylgruppe der Lysinseitenkette im N-terminalen Histonarm entfernen (Grunstein, 1997, Shahbazian and Grunstein, 2007). Dies verhindert die Rekrutierung von Proteinen, welche normalerweise die spezifische DNA-Sequenz in den Genen ablesen. Die posttranslationale Modifikation mittels HDACs an Histonen bewirkt, dass das Chromatin kompakt verpackt bleibt und die RNA-Polymerase II-abhängige Expression der Gene unterdrückt wird (Grunstein, 1997, Shahbazian and Grunstein, 2007, Haberland et al., 2009, Carpio et al., 2016).

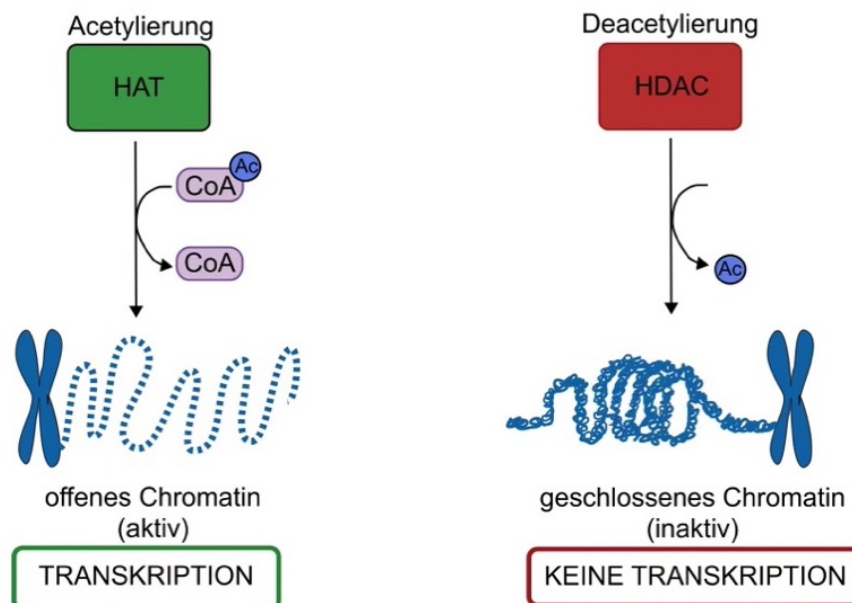


Abbildung 2: Darstellung der Wirkung der Histonacetylierung und -deacetylierung auf die Transkription. Die Histonacetylase (HAT) fügt eine Acetylgruppe (Ac) aus dem Acetyl-Coenzym A (CoA) in die Lysin-Aminosäure des Histonarms, sodass schlussendlich das Chromatin geöffnet wird und die Transkription durch die Polymerasen stattfinden kann. Die Histondeacetylase (HDAC) entfernt die hinzugefügte Acetylgruppe. So liegt das Chromatin kompakt vor und es kann keine Transkription durch die Polymerasen stattfinden.

HDACs können nicht Histone, sondern auch andere Proteine deacetylieren (Glozak et al., 2005, Choudhary et al., 2009). Die Transkriptionsfaktoren RUNX2 (Jeon et al., 2006), p53 (Juan et al., 2000, Luo et al., 2000), Nuclear Factor κ B (NF- κ B) (Chen et al., 2001, Perkins, 2007) und Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) (Yuan et al., 2005) werden durch die Enzymaktivität der HDACs deacetyliert, indem die posttranslationale Stabilität und Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Carpio et al., 2016).

1.2.4 Die transkriptionale Regulation der Dentinmatrixbildung

Das Primär-, Sekundär- und reaktive Tertiärdentin werden von den terminal differenzierten Odontoblasten gebildet, während das reparative Tertiärdentin von Odontoblasten-ähnlichen Zellen gebildet wird. Das Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) ist ein wichtiger Regulator der Odontoblastendifferenzierung und der Bildung des Dentintubulärsystems (Terasawa et al., 2004, Qin et al., 2007). In der extrazellulären Matrix existiert es hauptsächlich in seinen gespaltenen Fragmenten (Qin et al., 2003, Sun et al., 2011).

In den humanen Odontoblasten kodiert das Gen namens Dentin-Sialophosphoprotein (Dspp) das gleichnamige Protein DSPP, das in Dentinsialoprotein (DSP) und Dentinphosphoprotein (DPP) gespalten wird (MacDougall et al., 1997, Zhu et al., 2012). Bei der Biomineralisierung der Dentinmatrix sind die proteolytische Spaltung von DMP1 zu einem DMP 57-kDa Fragment (Qin et al., 2007, Sun et al., 2011) und von DSPP zu DSP und DPP die entscheidenden Schritte zur Umwandlung in die funktionelle Form der Proteine (Suzuki et al., 2009, Zhu et al., 2012). Die vielen Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, die die Expression von DSPP und DMP1 in den Odontoblasten regulieren, induzieren nach der proteolytischen Spaltung die Bildung der Dentinmatrix unter physiologischen (Primär- und Sekundärdentin) und entzündlichen (Tertiärdentin) Bedingungen (Tucker and Sharpe, 2004, Farges et al., 2015).

Weiterhin werden die Odontoblasten durch folgende Transkriptionsfaktoren reguliert: Die Transkriptionsfaktoren Homeoboxprotein Dlx3 (Choi et al., 2010), Krüppel-like factor 4 (KLF4) (Lin et al., 2013), cAMP-responsive element binding protein (CREB) (Klinz et al., 2013), Sp7

(Bae et al., 2018), Runt-related transcription factor 2 (Runx2) und Osterix (Osx) (Chen et al., 2009) wurden laut Literatur bereits in den Odontoblasten entdeckt. Ebenso ist bekannt, dass während der Kronenbildung die Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osx in den Odontoblasten stark exprimiert werden (Chen et al., 2009). Bei der Wurzelbildung des dentalen Organs hingegen nimmt zwar die Expression der Osx zu, jedoch nimmt die Expression von Runx2 bei der Wurzelbildung stark ab (Chen et al., 2009, Zhang et al., 2015, Kim et al., 2015, He et al., 2016). Es wurde postuliert, dass Klf4 die Dentinbildung durch die Differenzierung der Odontoblasten über Modulation des TGF- β und Interaktion mit der Histon-Acetylierung fördert (Tao et al., 2019).

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Klärung der molekularen Mechanismen, welche die Transkription von Genen in den Odontoblasten regulieren, ist für das Verständnis der Tertiärdentinbildung von wichtiger Bedeutung, um neue Therapiestrategien für die Behandlung von kariösen Läsionen zu entwickeln. Im Gegensatz zur Acetylierung verhindert die Deacetylierung der Histone den Zugang der Transkriptionsfaktoren an den Bindungsdomänen in den Genen und unterdrückt somit die Transkription in der Zelle (Seto and Yoshida, 2014).

Bisher ist der Acetylierungs- und Deacetylierungszustand der Histone in Odontoblasten nach einer bakteriellen Infiltration unbekannt. Die Kenntnis über den Zustand der Histone hat eine große Relevanz bei der Kontrolle der Expression von Dmp1 und Dssp. Die nicht-kollagenen extrazellulären Dentinmatrixproteine DMP1 und DSSP sind maßgeblich an der Dentinmatrixbildung und somit auch an der Tertiärdentinbildung beteiligt. Mit diesem neuen Wissen könnte man pharmakologische Arzneimittel entwickeln, die entweder die Acetylierung ermöglichen oder die Deacetylierung unterbinden, sodass es in jedem Fall zu einer Bildung von Tertiärdentin kommt, welches die Pulpa vor dem weiteren Eindringen von Noxen schützt.

Es wurde bereits postuliert, dass die HDACs der Klasse I (HDAC1-3 und HDAC8) bei der Bildung der extrazellulären Knochenmatrix eine wichtige Rolle spielen (Schroeder and Westendorf, 2005, Bradley et al., 2015, Gordon et al., 2015, Cantley et al., 2017). Mit dieser Arbeit werden die Expressionen der HDACs der Klasse I in Odontoblasten der humanen Molaren unter physiologischen Bedingungen und nach Kariesinfiltration untersucht, um die Acetylierungs- und Deacetylierungszustände im entzündeten Odontoblasten zu bestimmen.

Mit den Untersuchungen sollen daher Antworten auf die folgenden Fragen gefunden werden:

- 1.) Wie sind die Expressionen der HDACs der Klasse I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8) in humanen Odontoblasten der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit?
- 2.) Verändern kariöse Läsionen die Expressionen von HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8 in Odontoblasten der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit?

Der Vergleich der quantitativen Expression von HDAC1-3 und HDAC8 in gesunden und durch Karies entzündeten Odontoblasten kann für die Funktionen von HDACs der Klasse I in der transkriptionalen Regulation der Tertiärdentinbildung von wichtiger Bedeutung sein. Man kann so feststellen, ob sich die Histone in humanen Odontoblasten unter entzündlichen Bedingungen in Acetylierungs- oder Deacetylierungszuständen befinden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können bei der Entwicklung neuer Therapieansätze zur Bekämpfung der Karies helfen, indem spezifische Inhibitoren der HDACs bei der transkriptionalen Regulation der Tertiärdentinbildung (z. B. als Überkappungsmaterial) für die Kariestherapie zur Anwendung kommen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1. Untersuchungsmaterial

Das ausgewählte Untersuchungsmaterial bestand aus 11 bleibenden Molaren von Patienten, die zwischen 17 und 35 Jahre alt waren. Für die Studie wurden sowohl klinisch-asymptomatische, gesunde Zähne, als auch Molaren (insbesondere 8er) mit beginnenden kariösen Läsionen ohne Eröffnung der Pulpa gesammelt. Alle Patienten haben im Vorfeld eine Einwilligungserklärung unterzeichnet, die die Nutzung der ohnehin extraktionswürdigen Zähne als Überschussmaterial für medizinische Forschungszwecke erlaubt. Die Extraktionen erfolgten in der zahnärztlichen Chirurgie der Universitätsmedizin Mainz aufgrund kieferorthopädischer Notwendigkeit, prothetischer Gesamtplanung, retromolarem Engstand (8er) bei erschwerter Reinigungsmöglichkeit und anderen Diagnosen. Nach der histopathologischen Diagnosestellung mittels HE-Färbung bestand die Kontrollgruppe, welche ausschließlich histopathologisch gesund eingestufte Molaren enthält, aus 5 Molaren. Die weiteren untersuchten 6 Molaren enthielten kariöse Läsionen.

3.1.2 Pufferlösungen, Fixativ und Entkalkungslösung

Für die vorliegende Arbeit wurden die unten aufgeführten Lösungen benötigt, welche wie folgt angesetzt wurden:

Phosphatpuffer (PB):

Um eine 0,1 molare PB-Gebrauchslösung zu erhalten, wurde zuerst eine 1 Liter Stammlösung 0,2 molarer PB mit einem pH-Wert von 7,4 angesetzt. Hierzu wurden 28,8 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) [Carl Roth GmbH] und 5,2g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat [Merck KGaA] abgewogen und in 900 ml destilliertem Wasser gelöst. Im Weiteren bestimmte man den pH-Wert und stellte diesen mittels Natriumhydroxids (NaOH) und Chlorwasserstoffsäure (HCl) auf den gewünschten Wert von 7,4 ein. Danach wurde die 0,2 molare Stammlösung auf einen Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Damit nun aus der Stammlösung die Gebrauchslösung hergestellt wurde, verdünnte man die Stammlösung 1:1 mit destilliertem Wasser und stellte den pH-Wert erneut auf 7,4 ein. Der hergestellte Phosphatpuffer wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Phosphatpuffer-Natriumchlorid (PBS):

Für den 0,2 M Phosphatpuffer-Natriumchlorid (PBS) wurden die gleichen Chemikalien in derselben Menge wie für den PB verwendet (28,8g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und 5,2g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$). Zusätzlich wurden für diese PBS-Stammlösung 17,53g Natriumchlorid (NaCl) abgewogen und mit den PB-Chemikalien zusammen in 900ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,4 angepasst und die Lösung mit destilliertem Wasser aufgefüllt, sodass man einen Liter 0,2M PBS-Stammlösung erhielt. Für die benötigte 0,1M PBS-Gebrauchslösung wurde diese Stammlösung ebenfalls 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. 0,1M PBS wurde ebenfalls bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Trispuffer (TB), Tris-HCl Puffer und Trispuffer-NaCl (TBS):

Zur Herstellung von einem Liter einer 0,5 M TB-Stammlösung wurden 60,57 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) von Carl Roth abgewogen und mit 800ml destilliertem Wasser vermischt. Aus dieser Stammlösung wurden nun der Tris-HCl Puffer und die TBS-Gebrauchslösung folgendermaßen angefertigt:

Für einen Liter 0,05M TBS-Gebrauchslösung löste man 8,76 g Natriumchlorid in 900 ml destilliertem Wasser und fügte im Anschluss 100 ml 0,5M TB-Stammlösung hinzu.

Um den 0,05M Tris-HCl Puffer herzustellen, wurden 100 ml 0,5M TB-Stammlösung mit 900 ml destilliertem Wasser gemischt.

Bei beiden Puffern (Tris-HCl und TBS) wurde anschließend der pH-Wert auf 7,6 eingestellt.

Fixativ (Zamboni-Lösung: 4% Paraformaldehyd+0,2% Pikrinsäure in 0,1 M PBS):

Die 4%ige Paraformaldehyd (PFA) Fixationslösung musste unter dem Abzug hergestellt werden. Zunächst wurden 40g Paraformaldehyd (PFA) (Roth) in 400ml destilliertem Wasser auf einem Heizmagnetrührer gelöst. Um diesen Prozess zu beschleunigen wurden 10 ml 10%iges Natriumhydroxid (NaOH) in die Lösung hinzugegeben. Nachdem das PFA in Aquadest vollständig aufgelöst war, wurde die PFA-Lösung mittels Filterpapiers in einen Messzylinder filtriert. Nach der Abkühlung wurde die PFA-Lösung mit 500 ml 0,2 M PBS gemischt. In diese Lösung wurde 0,2%ige Pikrinsäure (TNP) hinzugegeben. Im Anschluss wurde das Gemisch auf insgesamt 1000ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Diese Zamboni-Fixativlösung, welche 4% PFA, 0,2% Pikrinsäure in 0,1 M PBS, pH 7,35 enthält, wurde bei +4°C aufbewahrt.

Entkalkungslösung:

Zur Herstellung der Entkalkungslösung wurden 150,885 ml Ameisensäure [Carl Roth] mit 849,115 ml der zuvor hergestellten 0,1 M Phosphatpuffer-Gebrauchslösung vermengt. Die verwendete Ameisensäure hatte eine Äquivalentkonzentration von 4. Die 4N Ameisensäure-Entkalkungslösung wurde ebenfalls bei +4°C gelagert.

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation und Immersionsfixation des Untersuchungsmaterials

Die für die vorliegende Arbeit gesammelten Molaren wurden direkt nach der Extraktion in einem beschrifteten Falcon-Röhrchen mit Fixativlösung (4% PFA und 0.2% TNP in 0.1 M PBS) gelagert und im Kühlschrank bei 4°C für 48-72 Stunden fixiert.

3.2.2 Dekalzifizierung, Waschung und Kryoprotektion der Molaren

Für den dreiwöchig andauernden Dekalzifizierungsprozess der Zähne behandelte man diese mit der hergestellten Entkalkungslösung (4 N Ameisensäure in 0,1 M PB) und lagerte die Zähne weiterhin bei 4°C. Der Wechsel dieser Lösung erfolgte zweimal wöchentlich.

Nach der Entkalkung wurden die Proben in 0,1 M PBS (pH 7,4) für 72 Stunden bei +4°C gewaschen.

Im Anschluss erfolgte die Kryoprotektion: Hierfür wurden die Molaren in einer 30%igen Saccharose/PBS Lösung (30% Saccharose in 0,1 M PBS, pH 7.4) über 24 Stunden bei +4°C gelagert.

3.2.3 Kryoeinbettung und Schockgefrieren der Zähne

Um die Molaren einzubetten, wurden kleine Würfel aus Aluminiumfolie gefaltet, welche zunächst an einer Seite offenblieben. Nun wurden diese mit dem Einbettmedium Tissue-Tek O.C.T. Compound [Sakura] befüllt und die Zähne in den Aluminiumfolie-Boxen horizontal positioniert. Nach Kontrolle der korrekten Position der Molaren wurde die offene Seite mittels Folie verschlossen und in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren.

Für das weitere Procedere wurden die nun tiefgefrorenen Blöcke umgehend in einen speziellen Tiefkühlschrank gelegt. Dort verbleiben diese für mindestens 7 Tage bei -82°C.

3.2.4 Kryoschneiden der Molaren und Lagerung der Schnitte

Die zu schneidende Probe wurde aus dem Tiefkühlschrank entnommen und zunächst für zwei bis drei Stunden in der Kühlkammer des Kryostats gelagert, um eine Temperaturanpassung von -82°C auf -28°C zu bewirken. Nun wurde der Zahn parallel zum Metallmesser des Kryostats ausgerichtet. Im Anschluss wurde dieser mit Hilfe des Kryostats bei -20°C geschnitten: Hierbei wurde eine Schichtdicke von 30 µm eingestellt und die Schnitte in mesio-distaler Richtung angefertigt.

Die 30 µm dicken, freischwimmenden Schnitte wurden in 24er Wellplatten in 0,1 M PBS bei +4°C aufbewahrt und im Weiteren für die geplante Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und für immunhistochemische Inkubationen verwendet.

3.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Charakterisierung der Schnitte

Für die Auswahl der aufeinanderfolgenden Schnitten für die immunhistochemischen Untersuchungen der Histondeacetylasen (HDACs) der Klasse I musste zunächst die endgültige Diagnose der gesunden und entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit mittels Histopathologie gestellt werden. Hierzu wurde je ein Schnitt pro 24er Wellplatte [Orange Scientific] mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gefärbt, um so beispielsweise Entzündungsherde, die Odontoblastendegeneration und die verschiedenen Dentinarten zu erkennen.

Die Schnitte wurden nach Entnahme aus der 24er Wellplatte mittels eines Pinsels in destilliertes Wasser überführt und im Anschluss auf einen Objektträger zum Trocknen aufgebracht.

Die HE-Färbung verlief wie folgt: Als erstes wurde der zu färbende Schnitt für 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Um alle basophilen Strukturen (insbesondere die Zellkerne) anzufärben, wurde dann für 10 Minuten die Färbung mit der Hämatoxylin-Lösung nach Mayer (50 g Kalium/Ammonium, 0,2 g NaIO₃, 1 g Zitronensäure und 1000 ml destilliertes Wasser) durchgeführt. Im Anschluss wurde der zu färbende Schnitt 2x5 Minuten lang in Küvetten mit warmem Leitungswasser gewaschen, um den pH-Wert für eine intensivere Färbung der Strukturen zu erhöhen. Dann färbte man für 10 Minuten alle azidophilen Strukturen (v.a. die Zytoplasma-Proteine) mit Hilfe der Eosin-Lösung. Nach der Eosin-Lösung wurden die Schnitte für 5 Sekunden mit destilliertem Wasser gespült. Im Anschluss erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Alkohollösungen: 50% Ethanol für 10

Sekunden, 70% Ethanol für 15 Sekunden, 80% Ethanol für 1 Minute, 90% Ethanol für 5 Minuten, 100% Ethanol I für 5 Minuten und 100% Ethanol II für 5 Minuten.

Vor dem Eindecken in Entellan new [Sigma-Aldrich] wurde eine letzte Klärung des Gewebeschnittes in Xylol I und Xylol II für jeweils 3 Minuten durchgeführt. Bei der Eindeckung der Schnitte durften keine Luftbläschen zwischen dem Objektträger und dem Deckglas eingeschlossen werden.

Zur Charakterisierung des Schnittes und Erstellung der endgültigen Diagnose des extrahierten Zahnes wurde jeder 24. Schnitt mittels HE-Färbung gefärbt und dann unter einem Lichtmikroskop begutachtet. Ein genaues Augenmerk wurde hierbei auf die Pulpa und das Tertiärdentin gelegt. Sobald man dort beispielsweise Vakuolen im Bereich der Odontoblasten oder sonstige Veränderungen der Zellmorphologie (Entzündungen, Hyalindegeneration, Odontoblastendegeneration, ...) identifizieren konnte, wurde der extrahierte Zahn als pathologisch verändert eingestuft. So wurden die Zähne in zwei Gruppen eingeteilt: Eine Gruppe von Molaren mit ausschließlich physiologischen Odontoblasten und eine weitere mit degenerierten/entzündeten Odontoblasten aufgrund von Noxen.

3.3 Die Spezifität der primären Antikörper

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden folgende monoklonale Antikörper von Santa Cruz (Sc) verwendet, die alle in Mäusen hergestellt wurden: HDAC1 (Klon: 10E2; sc-81598), HDAC2 (Klon: 3F3; sc-81599), HDAC3 (Klon: 3G6; sc-81600) und HDAC8 (Klon: B-4; sc-365620).

Der monoklonale Mausantikörper HDAC1 richtet sich gegen die Aminosäuresequenz 467-482 des humanen HDAC1. Der Antikörper wurde in verschiedenen Untersuchungen mittels Westernblot und Immunhistochemie validiert (Datta et al., 2018, Kim et al., 2021). Der Mausantikörper HDAC2 erkennt ein Epitop zwischen der Aminosäuresequenz 473-488 im C-Terminus des humanen HDAC2. Auch dieser Antikörper wurde mittels Westernblot und Immunhistochemie charakterisiert (Regel et al., 2012, Lodrini et al., 2013). Der monoklonale Mausantikörper HDAC3 richtet sich wie HDAC2 im C-Terminus gegen eine Aminosäuresequenz, jedoch gegen die Sequenz 411-428. Eine Validierung von HDAC3 mittels Westernblot und Immunhistochemie liegt ebenfalls vor (Sferra et al., 2017, Yadav et al., 2021). HDAC8 erkennt zwischen der Aminosäuresequenz 2-28 am N-Terminus des humanen HDAC8 ein Epitop und kann dort spezifisch binden. Auch dieser Antikörper wurde mittels Westernblot und Immunhistochemie charakterisiert (Sferra et al., 2017, Yao et al., 2020).

Zur Darstellung der Odontoblasten wurde ein monoklonaler Kaninchenantikörper namens „Anti-Nestin antibody“ (Klon: SP103; ab105389) von abcam verwendet. Dieser Antikörper richtet sich gegen eine Sequenz, die sich innerhalb der Aminosäure 1600 bis zum C-terminalen Ende des humanen Nestins befindet. Die Spezifität dieses monoklonalen Kaninchenantikörpers wurde ebenfalls mittels immunhistochemischer Methoden dargestellt (Pijuan-Galitó et al., 2016, Li et al., 2018).

3.4 Immunhistochemische Inkubationsmethoden

Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Inkubationen erfolgten an freischwimmenden Schnitten in einer 12er Wellplatte [Orange Scientific].

3.4.1 Die Bestimmung der optimalen Verdünnung der primären Antikörper

Durch die Verdünnungsreihe wurde die ideale Verdünnung der primären Antikörper bestimmt. Mit der optimalen Verdünnung wurden alle Antikörperbindungsstellen besetzt, ohne dass ein Überschuss an Antikörpern bestand. Ein Überschuss von Antikörpern führte zu einer Überlappung auf den Schnitten, sodass diese zu intensiv gefärbt waren und die einzelnen Strukturen der Dentin-Pulpa-Einheit nicht mehr eindeutig beurteilbar waren.

Hierzu wurden insgesamt 16 Schnitte in einer Wellplatte mit den 4 verschiedenen primären Antikörpern (HDAC1, 2, 3 und 8) in 4 verschiedenen Verdünnungen 1:500, 1:800, 1:1000 und 1:2000 inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde bei allen Untersuchungen immer 1:500 verdünnt. Der Ablauf immunhistochemischen Inkubationen entsprach dem der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (Details siehe Kapitel 3.4.2). Nach einmaliger Durchführung der Verdünnungsreihe wurde für alle weiteren Inkubation die folgenden Verdünnungen festgelegt: HDAC1, HDAC2 und HDAC3 wurden 1:1000 verdünnt und HDAC8 1:800 verdünnt.

3.4.2 Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC-Methode)

Mit der ABC-Methode wurden die Gewebeschnitte zwei Tage lang mit unterschiedlichen Reagenzien inkubiert. Wenn keine weiteren Angaben vorliegen, wurde die Methode unter Raumtemperatur durchgeführt und die Schnitte mit 0,05 M TBS, pH 7,6 gewaschen.

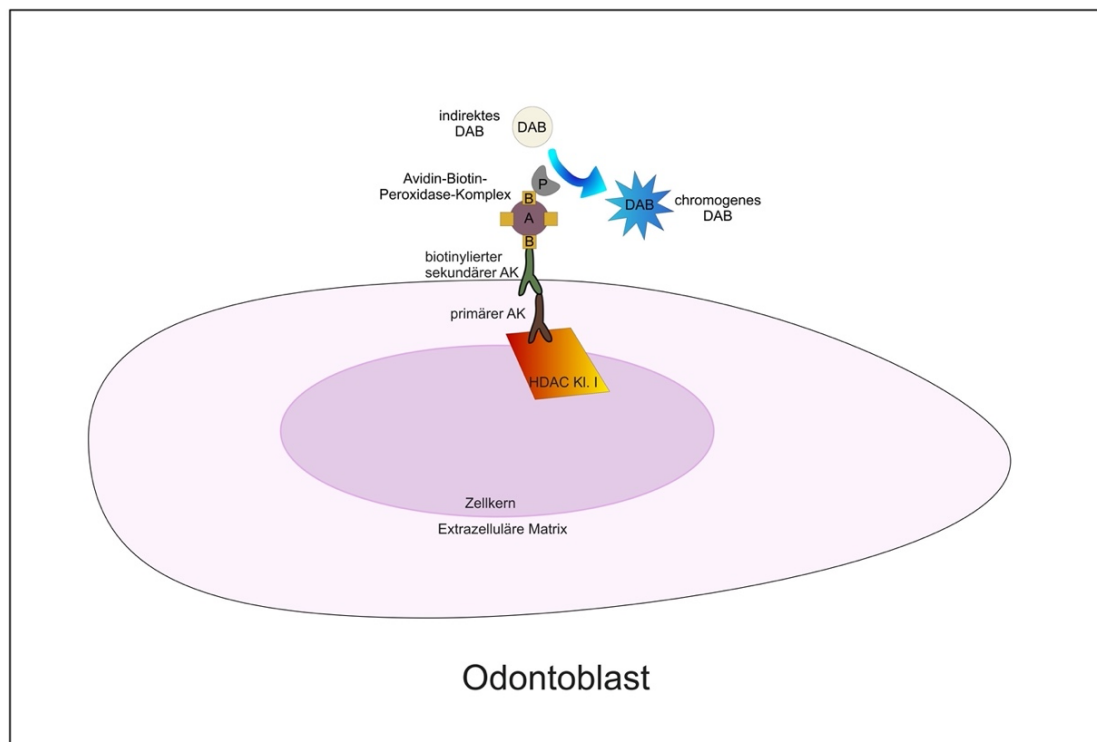


Abbildung 3: Prinzip der ABC-Methode. Der primäre Antikörper (pAk) ist ein monoklonaler Mausantikörper [Santa Cruz] und bindet spezifisch an die entsprechende HDAC der Klasse I. Der biotinylierte sekundäre, in der Ziege hergestellte Antikörper (sAk) bindet spezifisch an den pAk, da der Schnitt vor der Inkubation mit einem Blockierungspuffer (BP), welcher Normal Goat Serum (NGS) enthält, behandelt wurde. Mit Hilfe des ABC-Komplexes und dem Diaminobenzidin (DAB) wurden die spezifischen Bindungen an der entsprechenden HDAC visualisiert. Das Avidin des ABC-Komplexes bindet an das Biotin des sAk. Das Substrat DAB reagiert mit der Peroxidase (P) des ABC-Komplexes, wodurch eine bräunliche Färbung im Gewebeschnitt entsteht, die im Lichtmikroskop sichtbar ist.

Am ersten Tag wurden die Schnitte zweimal für jeweils 15 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurde zur Hemmung der endogenen Peroxidasen im Dunkeln TBS und 0,3% H₂O₂ in die Wellplatten gegeben (20 Minuten). Hiernach wurden die Proben erneut zweimal für jeweils 5 Minuten gewaschen. Nun inkubierte man die Schnitte mit 0,25%igem Triton X-100 [Sigma-Aldrich] für 30 Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut für jeweils 5 Minuten gewaschen.

Es folgte die 30-minütige Inkubation mit der Blockierungslösung. Diese setzte sich aus 2%igem bovine serum albumin (BSA) [Sigma-Aldrich] und 5%igem normal goat serum (NGS) [Vector Laboratiers] in 0,05 M TBS zusammen und sollte die unspezifischen Verbindungen der Immunglobuline unterbinden.

Während der letzten 5-10 Minuten in der Blockierungslösung wurden vorbereitend die primären Antikörper (monoklonale Mausantikörper von Santa Cruz) in 0,05 M TBS verdünnt. Nach Ablauf der halben Stunde wurden die primären Antikörper in die Wellplatten hinzugefügt und über 24 Stunden bei 4°C inkubiert.

Zu Beginn des zweiten Tages wurden die Schnitte zunächst zweimal für jeweils 15 Minuten gewaschen. Nun inkubierte man den zuvor ebenfalls in TBS verdünnten sekundären Antikörper aus der Ziege für 1 Stunde. Nach Ablauf der Stunde wurden die Gewebeschnitte zweimal für jeweils 15 Minuten gewaschen, damit im Anschluss die Inkubation mit dem ABC-Komplex unter Lichtausschluss erfolgte (1 Stunde). Dann wurden die Proben im Dunkeln gewaschen (2x 15 Min.). Nun behandelte man die Schnitte mit der Diaminobenzidin (DAB)-Lösung entsprechend der Entwicklungszeit jedes Antikörpers (5-15 Minuten). Nach Ablauf der Zeit wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser bei Raumtemperatur gewaschen werden (2x 15 Min.).

Sobald das Waschen abgeschlossen war, zog man die Schnitte auf poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern auf und ließ sie bei Raumtemperatur mindestens 15 Minuten lang trocknen.

Nun wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 100% I, 100% II) für jeweils 4 Minuten pro Lösung dehydriert und dann durch die Behandlung mit Xylol-I und -II geklärt (2 Min. je Xylol).

Nach Abschluss der Xylol Behandlung konnten die Schnitte in Entellan eingedeckt werden.

Zur Kontrolle der ABC-Methode wurde pro Wellplatte jeweils ein Schnitt nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert und nach den oben beschriebenen Schritten angefertigt.

Nach mindestens 3-tägiger, lichtgeschützter Lagerung wurden die Schnitte mikroskopiert und ausgewertet.

3.4.3 Densitometrie zur Quantifizierung der Immunhistochemie

Um die durchgeführte Immunhistochemie zu quantifizieren, wurden immunhistologische Bilder der gesunden und entzündeten Odontoblasten in 40facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop (Leica DMRB) und einer Kamera der Marke Leica angefertigt. Die Bilder wurden innerhalb eines Tages ohne zwischenzeitliche Umstellung der Parameter (Belichtungszeit, Sättigung etc.) angefertigt. Die densitometrischen Vermessungen erfolgten mit dem Programm ImageJ. Mit Hilfe dieser Messungen wurden die Färbungsintensitäten der HDACs der Klasse I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8) in den Odontoblastenzellkernen bestimmt und statistisch ausgewertet.

Hierfür wurden zuerst drei Hintergrundgrauwerte in den zellfreien Zonen eines Schnittes vermessen und der Mittelwert berechnet. Im Anschluss wurden die zuvor immunhistochemisch eingefärbten Odontoblasten an drei verschiedenen Stellen gemessen und ebenfalls ein Mittelwert dieser Messungen gebildet.

Die Färbungsintensität ließ sich aus der Differenz des Mittelwerts der Hintergrundfärbung und dem Mittelwert der gemessenen Odontoblastenschicht berechnen.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde durchgeführt, um die Unterschiede des mittleren Grauwerts (MGW) der HDACs der Klasse I in Odontoblasten (HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8) in gesunden und kariösen Molaren zu untersuchen. Die Normalverteilung wurde mit Hilfe von Q-Q-Plots visuell überprüft. Es wurden unabhängige t-Tests durchgeführt, um die Mittelwerte der MGW der jeweiligen Proteine (HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8) zwischen den beiden Gruppen (gesund n=5, kariös n=6) zu vergleichen. Die t-Tests wurden durchgeführt, um die Hypothese zu verifizieren, dass die gesunden Molaren niedrigere mittlere MGW-Werte als die kariösen Molaren aufweisen. Alle Analysen erfolgten mit RStudio (RStudio PBC, Boston, USA, 2024.4.2.764). Es galt ein Signifikanzwert von $p \leq 0,050$.

4 Ergebnisse

4.1 Histologische Charakterisierung der gesunden und der durch Karies entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit

Zur histopathologischen Diagnose wurde jeder 24. Schnitt eines Zahnes mittels HE-Färbung gefärbt. Anhand dieser Schnitte wurden die finalen Diagnosen der Zähne im 4 Augen (M.B., Y.K.) Prinzip gestellt.

4.1.1 Histologische Darstellung der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit

In der Zahnheilkunde gibt es eine große Diskrepanz zwischen der klinischen und histopathologischen Diagnose. Die endgültige Diagnose in der Zahnheilkunde wird histopathologisch gestellt. In der vorliegenden Studie wurden daher die Schnitte der gesunden und entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit basierend auf der histopathologischen Diagnose ausgewählt (Korkmaz et al., 2011, Korkmaz et al., 2023).

In der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit wurden die Dentinschichten (Primärdentin, Sekundärdentin, Prädentin) in einer strukturellen Ordnung beobachtet (Abb. 4A). Die zellulären Schichten der gesunden Pulpa (Odontoblastenschicht, die zellarme und zellreiche Zone, der subodontoblastische Plexus) waren ebenfalls in einer strukturellen Ordnung ersichtlich. In der gesunden dentalen Pulpa wurden zahlreiche Pulpazellen beobachtet. Die Blutgefäße und die Nervenfasern verzweigten sich in der koronalen Pulpa und bildeten unterhalb der Odontoblastenschicht den Subodontoblasten-Plexus (Abb. 4A).

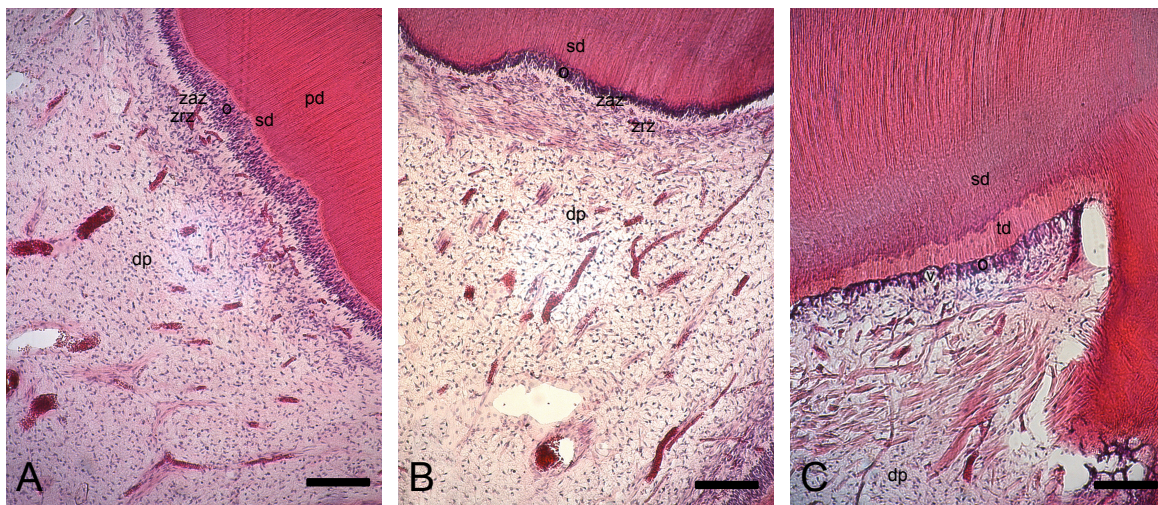


Abbildung 4: Darstellung der gesunden und entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit
Entkalkte Schnitte in HE-Färbung und 10-facher Vergrößerung, Messbalken = 100µm.

(A) Gesunder Zahn. Das Primärdentin (pd) ummantelt die Pulpa. Die Odontoblastenschicht (o) stellt sich regelrecht dar. Zwischen den Odontoblasten und dem Sekundärdentin (sd) ist das Prädentin als hell rosane Linie klar abgrenzbar ersichtlich. Die zellreiche Zone (zrz) und die zellarme Zone (zaz) sind klar voneinander abgrenzbar. Die dentale Pulpa (dp) ist frei von Entzündungszellen.

(B) Zahn mit initialer Dentinkaries. Die Odontoblastenschicht ist im Vergleich zum gesunden Zahn schmaler, da ein Teil der Odontoblasten bereits degeneriert ist. Die zellarme Zone ist teilweise nicht mehr von der zellreichen Zone trennbar.

(C) Zahn mit ausgeprägter Odontoblastendegeneration und Vakuolenbildung (v). Die Odontoblasten sind aufgrund einer starken Entzündungsreaktion degeneriert. Unterhalb der kariösen Läsion und des Sekundärdentins ist das Tertiärdentin (td) sichtbar. In der dentalen Pulpa sind viele Entzündungszellen sichtbar.

4.1.2 Histologische Darstellung der durch Karies entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit

Die histologische Ordnung der Struktur und Zellschichten, die in der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit ersichtlich war, konnte in den kariösen Molaren nicht beobachtet werden. In der vorliegenden Studie wurden die kariösen Molaren, bei denen die Pulpa eröffnet war, für die immunhistochemischen Inkubationen ausgeschlossen. Es wurden ausschließlich Molaren mit initialer Dentinkaries und Dentinkaries ohne Eröffnung der dentalen Pulpa in die Studie eingeschlossen.

In der durch Karies entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit war eine unregelmäßig dick verlaufende Odontoblastenschicht innerhalb der Pulpa ersichtlich. Die Odontoblastenschicht unterhalb der kariösen Läsion zeigte sich im Vergleich zur gesunden Odontoblastenschicht schmaler (Abb. 4C). Zwischen den Odontoblastenfortsätzen zeigten sich teilweise Vakuolen von unterschiedlicher Größe und Intensität. Weiterhin sind teilweise Entzündungszellen unterhalb der kariösen Läsion in der Pulpa ersichtlich (Abb. 4B, C). In der entzündeten dentalen Pulpa wurden gelegentlich Matrixablagerungen (Dentikel) und Verkalkungen beobachtet (Daten wurden nicht gezeigt).

4.2 Die Expression der HDACs Klasse I in Odontoblasten der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit

Nachdem die histopathologische Diagnose für die Schnitte der gesunden und entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit von humanen Molaren gestellt worden war, wurden sechs aufeinanderfolgende, freischwimmenden Kryoschnitte ausgewählt. Der erste Schnitt wurde erneut mit einer HE-Färbung gefärbt, um die Diagnose zu bestätigen. Der zweite Schnitt wurde mit dem Antikörper gegen HDAC1, der dritte Schnitt mit dem Antikörper gegen HDAC2, der vierte Schnitt mit dem Antikörper gegen HDAC3 und der fünfte Schnitt mit dem Antikörper gegen HDAC8 inkubiert. Der sechste Schnitt diente als Kontrolle und wurde ohne primären Antikörper inkubiert.

In den Odontoblasten der gesunden Molaren war HDAC1 im Zellkern und im Zytoplasma zu erkennen (Abb. 5A, Abb. 7A, B). HDAC2 wurde hauptsächlich in den Zellkernen der gesunden Molaren identifiziert (Abb. 5B, Abb. 8A, B). HDAC3 war hauptsächlich im Zytoplasma der Fortsätze der gesunden Odontoblasten erkennbar (Abb. 5C, Abb. 9A, 9B). Im Zellkern und Zytoplasma der gesunden Odontoblasten war keine Expression von HDAC8 ersichtlich (Abb. 5D, Abb. 10A, B). In der immunhistochemischen Kontrolle wurde keine Immunreaktivität detektiert (Abb. 5E, Abb. 11A, B).

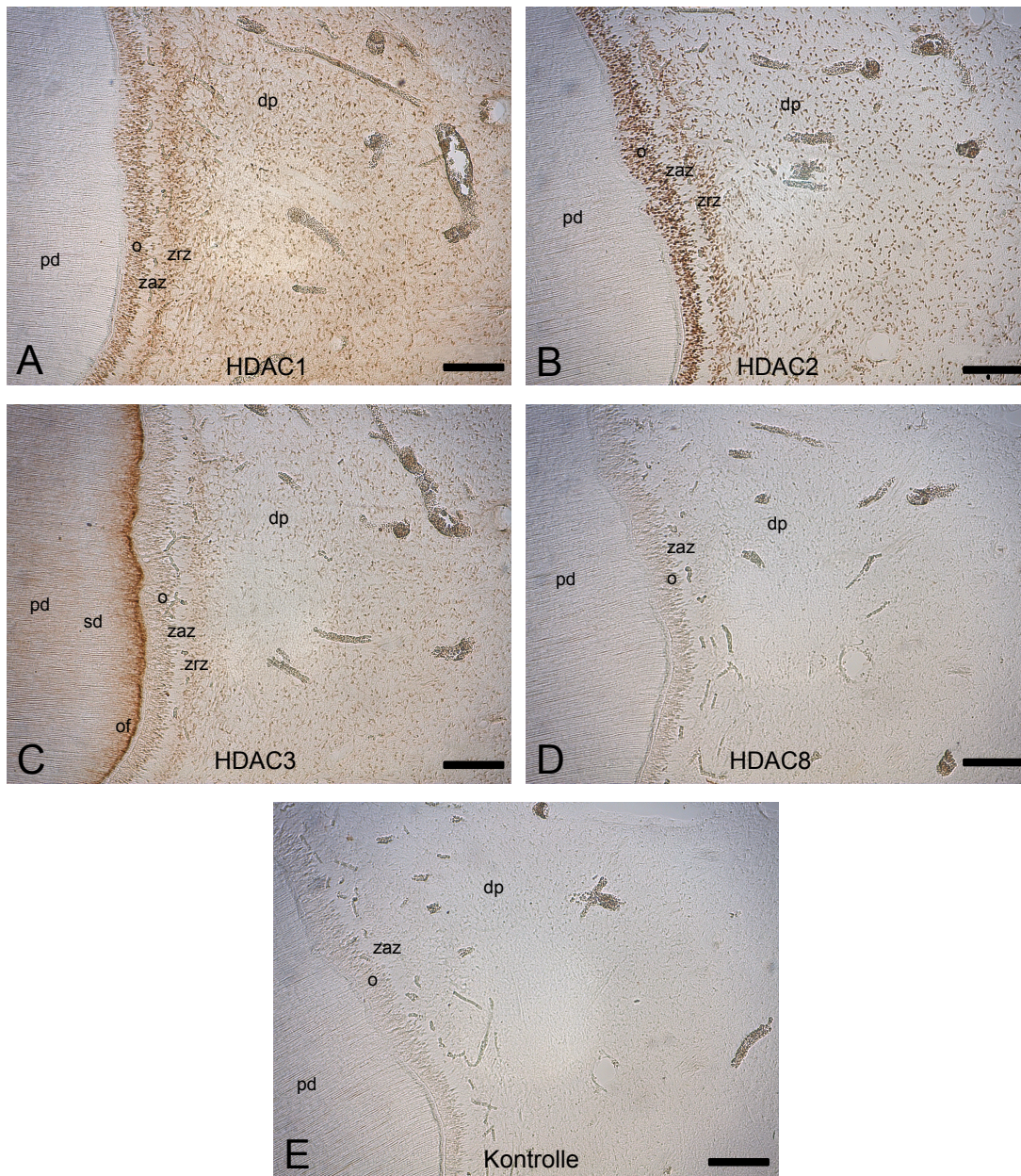


Abbildung 5: Expressionen der HDACs der Klasse I in der physiologischen Dentin-Pulpa-Einheit

Entkalkte Schnitte nach IHC in 10-facher Vergrößerung, Messbalken = 100µm. In allen Schnitten ist die zellarme Zone (zaz) ist klar von der zellreichen Zone (zrz) abgrenzbar. Die dentale Pulpa (dp) stellt sich regelrecht dar und ist frei von Entzündungszellen. Das Primärdentin (pd) ummantelt die Pulpa. Die Odontoblastenschicht (o) ist homogen und frei von Vakuolen.

(A) Es ist eine Färbung in den Odontoblastenzellkernen sichtbar. Eine Subpopulation von Odontoblasten ist stark gefärbt, eine andere schwach. Im Zytoplasma ist teilweise eine schwache HDAC1-Färbung ersichtlich.

(B) Der Schnitt zeigt eine starke Färbung einer großen Subpopulation von Odontoblasten. Eine Färbung des Zytoplasmas oder der Fortsätze ist nicht ersichtlich. HDAC2 wurde ausschließlich in den Zellkernen exprimiert.

(C) Die Abbildung zeigt eine deutliche Färbung der Odontoblastenfortsätze (of), vor allem im Bereich des Prädentins. Eine kleine Subpopulation von Odontoblasten zeigt eine schwache Färbung in den Zellkernen.

(D) HDAC8 wurde in den Odontoblasten nicht detektiert. Ebenso ist keine Färbung der Fortsätze oder im Zytoplasma ersichtlich. Die Kontrolle (E) zeigte ebenfalls keinerlei Färbungen.

4.2.1 Die Expression von HDAC1 in Odontoblasten der gesunden Molaren

Die Odontoblasten zeigten nach Durchführung der IHC eine Färbung in den Zellkernen. Diese waren in den entsprechenden Präparaten teilweise stark, teilweise schwach gefärbt. Weiterhin zeigte sich in der Pulpa eine Färbung der Zellen in der zellreichen Zone und in der dentalen Pulpa (Abb. 5A, 7A, B).

In einer Subpopulation von Odontoblastenzellkörpern wurde HDAC1 im Zellkern detektiert. Auch in diesen Zellen war eine schwache Färbung von HDAC1 im Zytoplasma zu erkennen. In einer großen Subpopulation von Odontoblasten wurde HDAC1 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma mit mittlerer Färbungsintensität gefunden (Abb. 5A, Abb. 7A, B).

4.2.2 Die Expression von HDAC2 in Odontoblasten der gesunden Molaren

In Odontoblasten der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit wurde HDAC2 ausschließlich in den Zellkernen detektiert. In einer großen Subpopulation von gesunden Odontoblasten wurde HDAC2 sehr stark exprimiert, während in einer kleiner Subpopulation HDAC2 schwach exprimiert wurde. Im Zytoplasma der gesunden Odontoblasten konnten keine immunhistochemische Färbungen für HDAC2 beobachtet werden (Abb. 5B, Abb. 8A, B).

4.2.3 Die Expression von HDAC3 in Odontoblasten der gesunden Molaren

In gesunden Molaren wurde HDAC3 im Zytoplasma mit einer deutlichen Färbung und detektiert (Abb. 5C, Abb. 9A, B). In einer Subpopulation von Odontoblasten konnte in deren Zellkörpern eine geringgradige Färbung detektiert werden. In den Odontoblastenfortsätzen innerhalb des Prädentins und den initialen Dentinkanälchen wurde HDAC3 deutlich mit einer starken Färbungsintensität identifiziert (Abb. 5C, Abb. 9A, B).

In der zellreichen Zone der gesunden Pulpa wurde in den Stromazellen eine Expression von HDAC3 sowohl im Zytoplasma als auch in den Kernen entdeckt (Abb. 5C, Abb. 9A, B).

4.2.4 Die Expression von HDAC8 in Odontoblasten der gesunden Molaren

In Odontoblasten der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit wurde HDAC8 nicht detektiert. Es war keinerlei Färbung in den Fortsätzen, Zytoplasma oder Zellkernen der Odontoblasten ersichtlich. Auch in Zellen der zellreichen Zone wurde keine Immunreaktivität für HDAC8 festgestellt (Abb. 5D, Abb. 10A, B).

4.2.5 Die immunhistochemische Kontrolle

In Zellen der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit war kein immunhistochemisches Signal in den Kontrollschnitten ersichtlich. Die Schnitte wurden mit allen Reagenzien mit Ausnahme des primären Antikörpers inkubiert. In den Zellen wurde eine einheitliche Hintergrundfärbung beobachtet, welche aufgrund der durchgeführten Inkubationen zu erwarten war (Abb. 5E, 11A, B).

4.3 Die Expression der HDACs Klasse I in Odontoblasten der durch Karies entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit

Im Vergleich zu den gesunden Odontoblasten induzieren kariöse Läsionen eine signifikant höhere Expression von HDAC1 (Abb. 6A, Abb. 7C, D) und HDAC2 (Abb. 6B, Abb. 8C, D) in den entzündeten Odontoblastenzellkernen. Kariöse Läsionen bewirken zwar eine erhöhte Expression für HDAC3 in den Zellkernen und Fortsätzen der Odontoblasten, jedoch waren die Befunde statistisch nicht signifikant (Abb. 6C, Abb. 9C, D, Abb. 12). In gesunden und durch Karies entzündeten Odontoblasten war eine Expression für HDAC8 nicht identifizierbar (Abb. 6D, Abb. 10C, D). Die immunhistochemische Kontrolle zeigten sich ohne relevante Färbung (Abb. 6E, 11C, D).

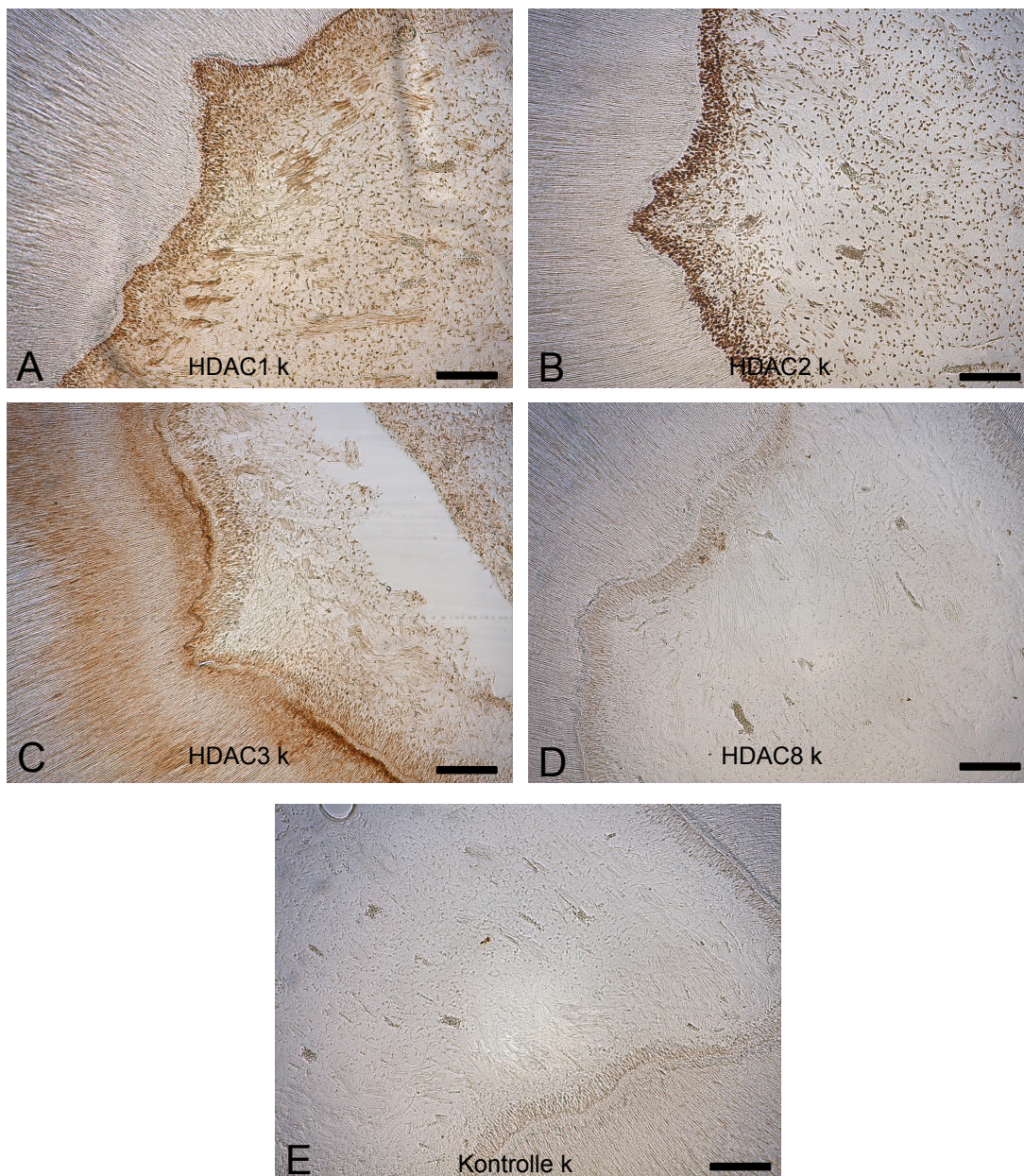


Abbildung 6: Expressionen der HDACs der Klasse I in der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit
Entkalkte Schnitte nach IHC in 10-facher Vergrößerung, Messbalken = 100µm. Darstellung von HDAC1 (A), HDAC2 (B), HDAC3 (C), HDAC8 (D) und der Kontrolle (E). Einzelheiten siehe Text und in den weiteren Abbildungen.

4.3.1 Die Expression von HDAC1 in Odontoblasten der kariösen Molaren

Die initiale Dentinkaries induzierte eine starke Expression von HDAC1 im Zellkern der Odontoblasten, die sich unterhalb der kariösen Läsion befinden (Abb. 6A, Abb. 7B, C). In Odontoblasten, die sich nicht unterhalb der kariösen Läsion befinden, war eine Expression von HDAC1 wie im gesunden Odontoblasten zu erkennen (Abb. 7).

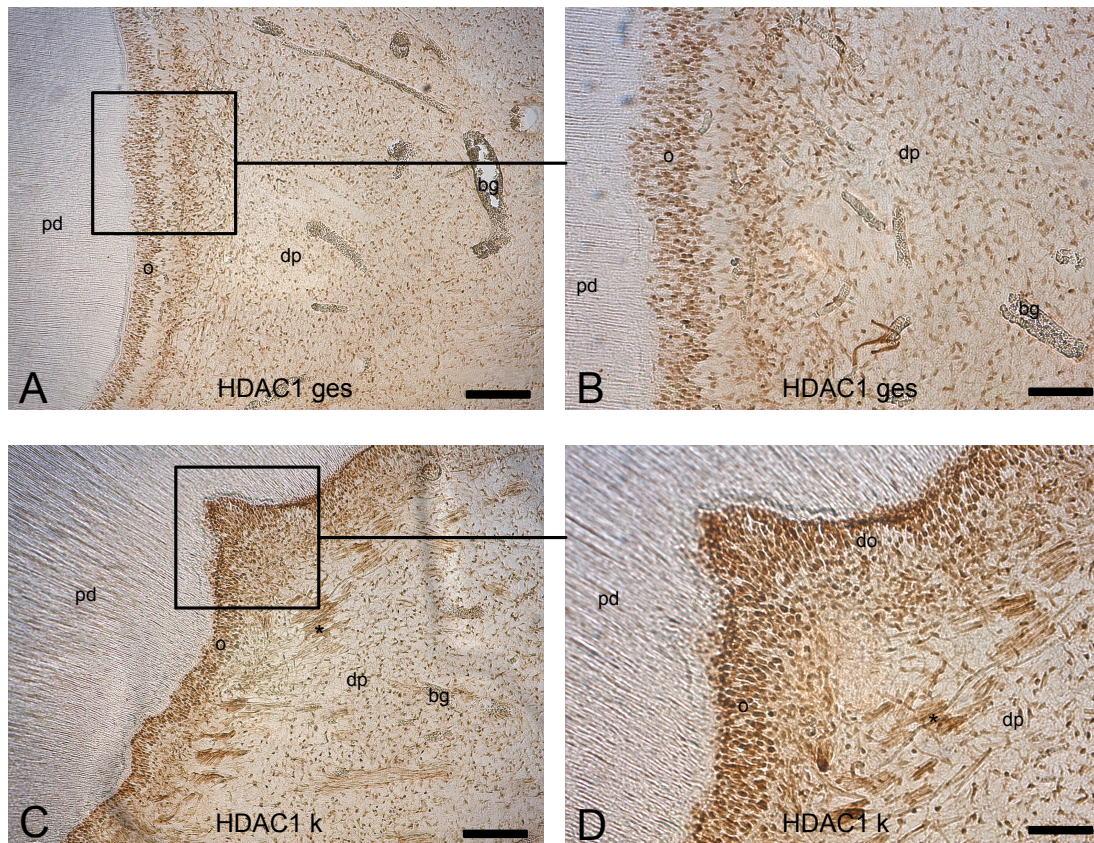


Abbildung 7: Expression von HDAC1 in der gesunden und kariösen Dentin-Pulpa-Einheit
Entkalkte Schnitte nach IHC in 10-facher (links, Messbalken = 100µm) und 20-facher (rechts, Messbalken = 50µm) Vergrößerung.

(A, B) Die gesunde Pulpa (dp) ist frei von Entzündungszellen und zeigt eine heterogen gefärbte Odontoblastenschicht (o). Das Primärdentin (pd) zeigt sich regelrecht. Es sind Blutgefäßanschnitte (bg) mit Erythrozyten ersichtlich.

(C, D) In der kariösen dentalen Pulpa (dp) sind Entzündungszellen und hyperämische Blutgefäße (*) aufgrund der Entzündung sichtbar. Die Odontoblasten (o) zeigen sich im Bereich unterhalb der kariösen Läsion teilweise bereits degeneriert (do). Im Vergleich zur gesunden Pulpa ist eine deutlich stärkere Färbung der Odontoblastenzellkerne ersichtlich.

4.3.2 Die Expression von HDAC2 in Odontoblasten der kariösen Molaren

In Odontoblasten der durch Initialkaries der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit wurde in nahezu allen Zellkernen eine starke Expression für HDAC2 detektiert. In einer sehr kleinen Subpopulation von entzündeten Odontoblastenzellkernen wurde HDAC2 schwach exprimiert (Abb. 6B, Abb. 8C, D).

Die initiale Dentinkaries induzierte auch eine starke Expression von HDAC2 in den Kernen der Pulpazellen, die sich in der zellreichen Zone befanden (Abb. 6B, Abb. 8C, D).

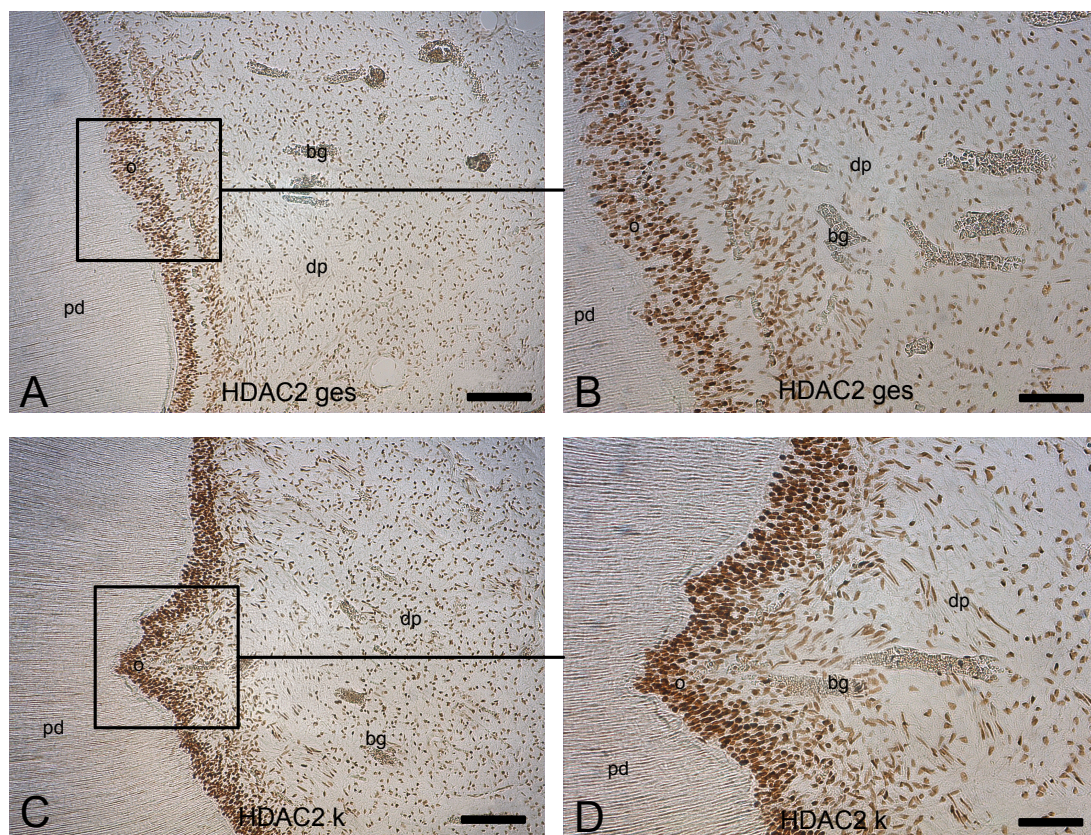


Abbildung 8: Expression von HDAC2 in der gesunden und kariösen Dentin-Pulpa-Einheit
Entkalkte Schnitte nach IHC in 10-facher (links, Messbalken = 100µm) und 20-facher (rechts, Messbalken = 50µm) Vergrößerung.

(A, B) Es zeigt sich eine heterogene Färbung in den Odontoblastenzellkernen (o). Das Primärdentin (pd) erscheint regelrecht. Die dentale Pulpa (dp) ist entzündungsfrei mit Blutgefäßen (bg) die Erythrozyten enthalten.

(C, D) Im Vergleich zur gesunden Dentin-Pulpa-Einheit ist eine deutliche Zunahme der Färbungsintensität der Odontoblastenzellkerne (o) ersichtlich. Die Blutgefäße (bg) in der Pulpa (dp) enthalten neben den Erythrozyten auch Entzündungszellen.

4.3.3 Die Expression von HDAC3 in Odontoblasten der kariösen Molaren

Die Dentinkaries induzierte im Vergleich zu gesunden Molaren eine starke Färbung von HDAC3 in den Fortsätzen der Odontoblasten, die sich innerhalb des Sekundärdentins befanden. Eine Expression von HDAC3 in den Odontoblastenzellkernen wurde nur in einer kleinen Subpopulation von Odontoblasten unterhalb der kariösen Läsion festgestellt (Abb. 6C, Abb. 9C, D).

In den Stromazellen der dentalen Pulpa, die sich in der zellreichen Zone befinden, wurde nach der initialen Dentinkaries eine sehr schwache Färbung von HDAC3 festgestellt (Abb. 6C, Abb. 9C, D).

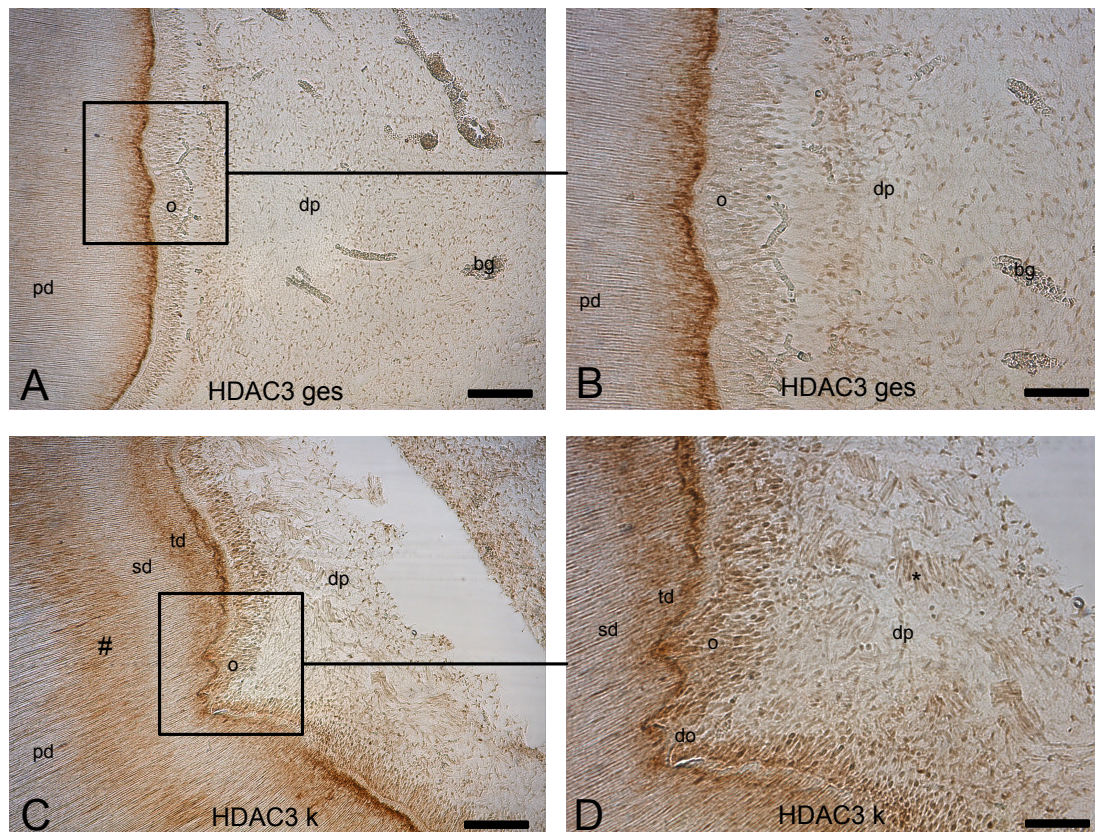


Abbildung 9: Expression von HDAC3 in der gesunden und kariösen Dentin-Pulpa-Einheit
Entkalkte Schnitte nach IHC in 10-facher (links, Messbalken = 100µm) und 20-facher (rechts, Messbalken = 50µm) Vergrößerung.

(A, B) Gesunde Pulpa (dp) mit regelrechter Odontoblastenschicht (o) und Blutgefäßen (bg) ohne Entzündungszellen. Eine Subpopulation von Odontoblastenzellkernen zeigt eine geringe Färbung. Im Zytoplasma ist eine deutliche Färbung ersichtlich.

(C, D) In der kariösen Pulpa (dp) sind eine degenerierte Odontoblastenschicht (do) unterhalb der kariösen Läsion und hyperanämische Blutgefäße mit Entzündungszellen (*) sichtbar. Die Odontoblastenzellkerne (o) zeigen sich schwach gefärbt. Im Vergleich zur gesunden Pulpa zeigt sich eine Zunahme der Färbung in den Fortsätzen (#) der Odontoblasten, die sich innerhalb des Sekundärdentins (sd) befinden.

4.3.4 Die Expression von HDAC8 in Odontoblasten der kariösen Molaren

Nach der initialen Dentinkaries wurde in den Fortsätzen, dem Zytoplasma und den Zellkernen der Odontoblasten keine Expression von HDAC8 detektiert. Auch in Zellen der zellreichen Zone zeigte sich keine Expression von HDAC8 (Abb. 6D, Abb. 10C, D).

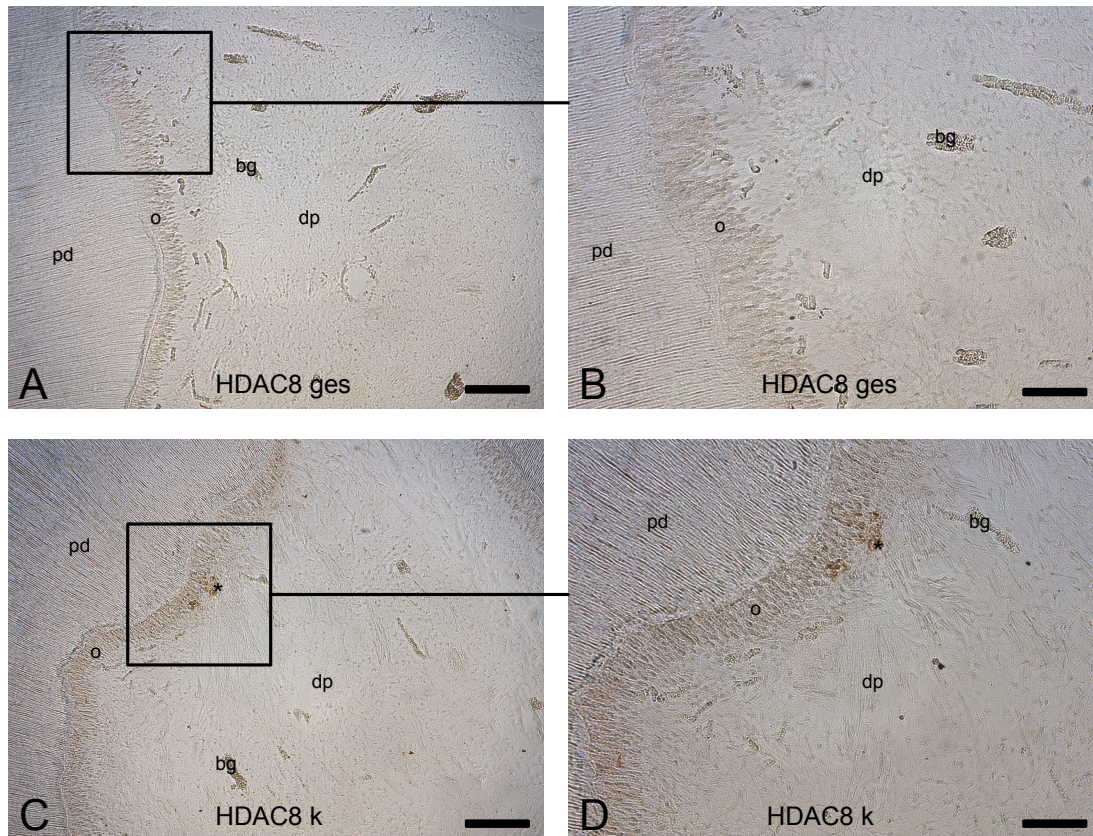


Abbildung 10: Expression von HDAC8 in der gesunden und kariösen Dentin-Pulpa-Einheit
Entkalkte Schnitte nach IHC in 10-facher (links, Messbalken = 100µm) und 20-facher (rechts, Messbalken = 50µm) Vergrößerung.

(A, B) Physiologische dentale Pulpa (dp) mit ungefärbten Odontoblasten (o). Auch sonst sind keine spezifischen Färbungen ersichtlich.

(C, D) Die kariöse Pulpa (dp) zeigt sich mit hyperanämischen BlutgefäÙen (bg) und Entzündungszellen (*). Die Odontoblasten (o), das Zytoplasma und die Odontoblastenfortsätze zeigen keine spezifischen Färbungen.

4.4 Kontrolle der immunhistochemischen Färbungen

Die Kontrollschnitte der durchgeführten ABC-Methode wurden ohne die primären Antikörper inkubiert. Es zeigten sich keine spezifischen Färbungen (Abb. 6E, Abb. 11C, D).

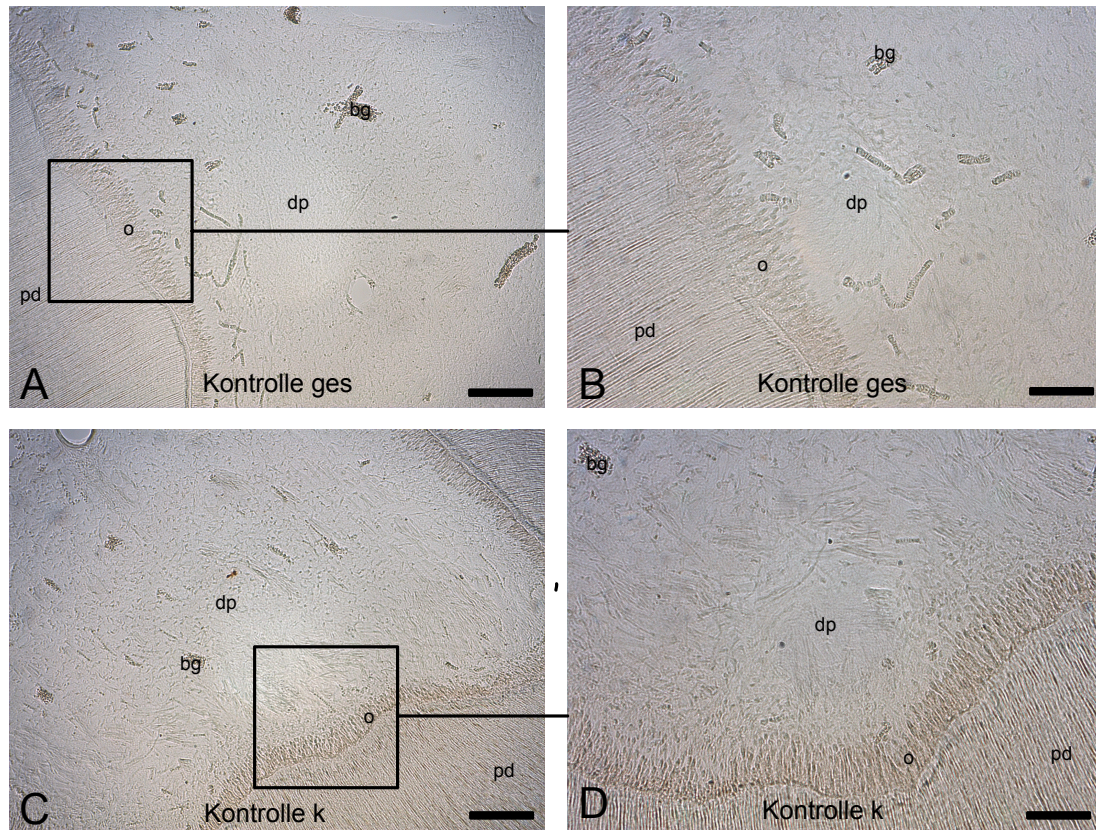


Abbildung 11: Kontrollschnitte der gesunden und kariösen Dentin-Pulpa-Einheit
Entkalkte Schnitte nach IHC in 10-facher (links, Messbalken = 100µm) und 20-facher (rechts, Messbalken = 50µm) Vergrößerung.

(A, B) Der Kontrollschnitt der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit zeigt eine regelrechte Pulpa (dp) mit physiologischer Odontoblastenschicht (o) ohne spezifische Färbungen.

(C, D) Auch der Kontrollschnitt der entzündeten Pulpa (dp) zeigt keine spezifischen Färbungen in den Odontoblastenzellkernen, dem Zytoplasma und den Odontoblastenfortsätzen.

4.5 Statische Auswertung der Färbungsintensitäten

Die densitometrischen Daten wurden mit Hilfe des Programms RStudio ausgewertet. Dabei wurden die mittleren Grauwerte (MGW) der gesunden ($n=5$) und kariösen Molaren ($n=6$) gepaarten t-Tests unterzogen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,050$ festgelegt (Abb. 12).

Der t-Test ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Odontoblastenfärbungen der gesunden und kariösen Molaren für HDAC1 ($t = -4,34$, $df = 6,26$, $p = 0,002$) und HDAC2 ($t = -4,23$, $df = 7,88$, $p = 0,001$). Für HDAC3 und HDAC8 wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den gesunden und kariösen Molaren festgestellt ($t = -1,48$, $df = 8,89$, $p = 0,086$ bzw. $t = -0,96$, $df = 7,06$, $p = 0,184$).

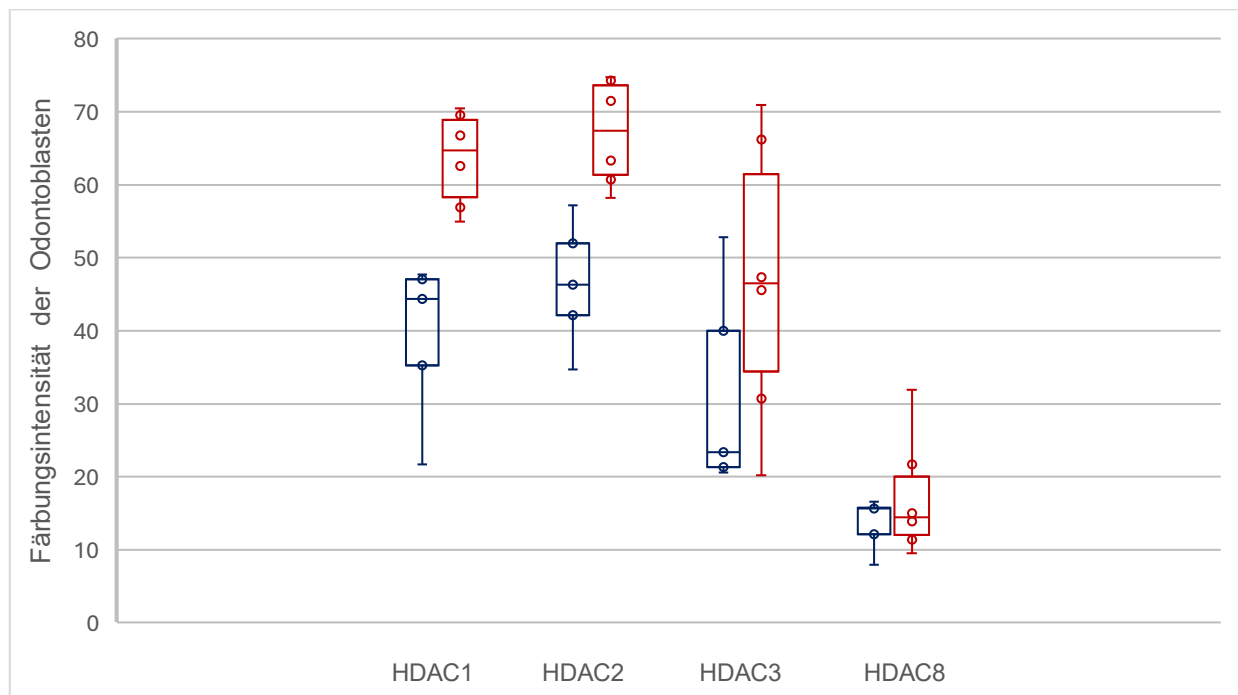


Abbildung 12: Statistische Auswertung der Färbungsintensitäten der Odontoblasten
Darstellung im Boxplot-Diagramm. Zu sehen ist die Statistische Analyse der Färbungsintensitäten der HDACs der Klasse I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8) in gesunden ($n=5$, in blau) und durch Karies entzündeten ($n=6$, in rot) Odontoblastenzellkernen. Es ist eine signifikante Zunahme der Färbungsintensitäten der Proteine HDAC1 und HDAC2 in kariösen Molaren ersichtlich. Für HDAC3 und HDAC8 konnte kein signifikanter Unterschied in der Zunahme der Färbungsintensität in den Odontoblastenzellkernen festgestellt werden.

5 Diskussion

Mit der vorliegenden Studie wurde der Deacetylierungszustand der gesunden und entzündeten Odontoblasten der humanen Dentin-Pulpa-Einheit näher beleuchtet. Hierbei wurden die Expressionen der HDACs der Klasse I in Odontoblasten der gesunden humanen Molaren untersucht und mit den Expressionen in Odontoblasten der kariösen Molaren (initiale Dentinkaries) verglichen. Zur Identifikation der Expression von Proteinen ist die Immunhistochemie eine Schlüsselmethode (Felsenthal and Zelzer, 2021) und somit eine wissenschaftlich anerkannte Untersuchungsmethode. Alle verwendeten monoklonalen Antikörper der Firma Santa Cruz und der Firma abcam wurden in mehreren Arbeiten mittels Western Blot und Immunhistochemie charakterisiert und validiert (Details siehe Kapitel 3.3: Die Spezifität der primären Antikörper).

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

Zum Erhalt der zu untersuchenden Gewebestrukturen wurden die Zähne unmittelbar nach der Extraktion chemisch fixiert. Hierzu wurden 4% Paraformaldehyd und 0,2% Pikrinsäure in 0,1M PBS gelöst. Mit dieser Lösung wurde eine Autolyse des Untersuchungsmaterials unterbunden. Andernfalls wären die Epitope zur Antikörperbindung an den HDACs zerstört worden.

Bevor die Zähne mit einem Kryostat in 30µm dicke Schnitte geschnitten wurden, mussten diese zuvor 3 Wochen lang entkalkt werden. Die Entkalkung der Proben erfolgte durch 4N Ameisensäure. Hierdurch wurden die Ca²⁺-Ionen aus den Hydroxylapatitkristallen im Schmelz, Dentin und Zement herausgelöst. Da Schmelz zu 97% aus Hydroxylapatit besteht wurde der Schmelz vollständig herausgelöst, sodass dieser in den vorliegenden Schnitten nicht mehr ersichtlich ist. Das Dentin und der Zement sind mit ihrer extrazellulären Matrix in den Schnitten sichtbar.

Nach der Entkalkung wurden die Schnitte mit 30% Saccharose Lösung (Saccharosepulver in 0,1M PBS) mit einem pH-Wert von 7,4 kryoprotectiert. Die Konzentration entspricht der von bereits veröffentlichten in vivo Untersuchungen an humanen Zähnen (Klinz et al., 2013, Korkmaz et al., 2023). Im Anschluss wurden die Zähne in Tissue-Tek eingebettet und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Durch die Kryoprotektion wurde die Entstehung von Wasser-Kristallen in den Gewebeproben verhindert. Wenn die Kryoprotektion nicht durchgeführt wird, zerstören die vorhandenen Wasserkristalle die Zellstrukturen erheblich, sodass im Lichtmikroskop keine zelluläre und strukturelle Ordnung mehr beobachtet werden kann.

5.1.2 Immunhistochemische Methodik

5.1.2.1 Blockierung der endogenen Peroxidase

Ein häufiger Fehler bei der Durchführung der ABC-Methode ist eine verstärkte Hintergrundfärbung aufgrund der Bindung von DAB an die körpereigenen endogenen Peroxidasen. Endogene Peroxidasen sind physiologisch in einigen Zellen (z.B. Erythrozyten, Granulozyten und Neuronen) enthalten und müssen blockiert werden, um signifikante, falsch positive Färbungen bei den Untersuchungen zu verhindern (Bussolati and Radulescu, 2011). Auch in der Zahnpulpa sind solche Zellen mit hoher Peroxidase Aktivität enthalten, sodass zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse die endogenen Peroxidasen mit 0,3% H₂O₂ in 0,5M TBS irreversibel inhibiert wurden.

5.1.2.2 Die Anwendung von Triton X-100

Zur Herabsetzung der Oberflächenspannung der mit wässrigen Lösungen behandelten Schnitte wurden diese mit 0,25% Triton X-100 behandelt. Wässrige Lösungen führen oftmals zu ionischen Spannungen, welche die Antigen-Antikörper-Bindung erheblich beeinträchtigen können. Durch die Tensid-Wirkung des Tritons wurde die Zugänglichkeit der Epitope für die primären Antikörper verbessert, da aufgrund der reduzierten Oberflächenspannung die Epitope für den Antikörper besser erkennbar waren. Die gewählte Konzentration von 0,25% Triton X-100 erwies sich in einer bereits vorliegenden *in vivo* Untersuchung an humanen Odontoblasten als besonders geeignet (Klinz et al., 2013). Ein Nachteil der Anwendung von Triton X-100 ist die Denaturierung der Proteine, sodass Triton X-100 für Untersuchungen am Elektronenmikroskop (EM) ungeeignet ist, da Triton X-100 die Zellorganellen (z. B. Zellmembranen, Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, ...) strukturell zerstören kann.

5.1.2.3 Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen

Bei der Durchführung der ABC-Methode können unspezifische Bindungen der Antikörper an den freien Bindungsstellen der im Schnitt vorhandenen Proteine entstehen. Diese führen zu verstärkter Hintergrundfärbung und verfälschen so die Ergebnisse. Damit die Ergebnisse der vorliegenden Studie hierdurch nicht verfälscht werden konnten, wurden die Schnitte mit 2% Rinderserumalbumin (BSA) und 5% Ziegenserum (NGS) behandelt. Die vorliegenden Konzentrationen erwiesen sich in bereits vorliegenden Untersuchungen als besonders geeignet, um die Proteinstrukturen der dentalen Pulpa zu untersuchen (Korkmaz et al., 2023). Ein Vorteil der Anwendung von BSA ist, dass es die hydrophoben Kräfte auf den Schnittoberflächen reduziert, sodass die primären Antikörper leichter an ihre Epitope binden können. Mit Hilfe des NGS wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Gewebeschnitte gesättigt, sodass der sekundäre Antikörper ausschließlich die primären Antikörper bindet.

5.1.2.4 Darstellung der immunhistochemischen Bindungsstellen

Zur Visualisierung der spezifischen Antikörperbindung an den entsprechenden HDACs wurden die freischwimmenden Schnitte mit einer DAB-Lösung behandelt. Hierzu wurden 0,05% DAB in 0,05M Tris-HCl mit 0,01% Nickelsulfat und 0,01% H₂O₂ gelöst. Die Konzentration der hergestellten DAB-Lösung erwies sich bereits in vorhandener Literatur für die chromogene Reaktion als besonders geeignet (Korkmaz et al., 2008, Korkmaz et al., 2011, Korkmaz et al., 2023). Durch die Behandlung der Schnitte mit H₂O₂ wurden die endogenen Peroxidasen des restlichen Gewebes blockiert, sodass das DAB ausschließlich die Peroxidase des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes bindet. Hierdurch kam es zu einer Oxidationsreaktion des DABs, welche sich auf dem Präparat als unlöslicher, brauner Niederschlag darstellte. Ohne die Anwendung von H₂O₂ hätte das DAB auch die endogenen Peroxidasen von bspw. den Erythrozyten gefärbt, sodass eine verstärkte Hintergrundfärbung die densitometrischen Messungen signifikant verfälscht hätte.

5.2 Die Rolle von HDAC Klasse I in gesunden Odontoblasten

5.2.1 Die Rolle von HDAC1 in Odontoblasten der gesunden Molaren

HDAC1 wurde in einer Subpopulation von Odontoblasten in den Zellkernen sehr stark exprimiert, während in diesen Zellen HDAC1 im Zytoplasma mit schwacher Färbungsintensität sichtbar war. In einer großen Subpopulation von Odontoblasten wurde HDAC1 sowohl in den Zellkernen als auch im Zytoplasma mit mittlerer Färbungsintensität detektiert.

Die unterschiedlichen Färbungsintensitäten von HDAC1 in humanen Odontoblasten unterstützen die Annahme der vorliegenden Studie, dass sich die Odontoblasten in der Odontoblastenschicht heterogen differenziert befinden und nach der Differenzierungsphase in unterschiedlicher Intensität HDAC1 exprimieren können. In welcher Differenzierungsphase HDAC1 in Zellkern und im Zytoplasma stark und in welcher schwach exprimiert wird, erfordert zusätzliche *in vitro* Untersuchungen, um die Differenzierungszustände von Odontoblasten mit HDAC1 zu charakterisieren.

In einer kleinen Subpopulation von Odontoblasten wurde HDAC1 im Zellkern sehr stark detektiert. Im Zytoplasma dieser Odontoblasten war HDAC1 schwach ersichtlich. Diese Befunde zeigen, dass HDAC1 in einer Differenzierungsphase von Odontoblasten im Zellkern vorkommt. Es ist anzunehmen, dass HDAC1 in den Zellkernen dieser Odontoblasten die Expression von Genen, die die Dentinmatrixproteine (DMP1, DSPP, ...) bilden, inhibieren kann.

In mehreren Odontoblasten einer großen Subpopulation wurde HDAC1 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma fast mit der gleichen Färbungsintensität identifiziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HDAC1 im Vergleich zur starken Zellkernfärbung im Zytoplasma eine untergeordnete Rolle spielen kann. Da HDAC 1 im Zytoplasma die Expression der Gene nicht unterdrücken kann, ist anzunehmen, dass HDAC1 in diesen Odontoblasten die Gene, die die Dentinmatrixproteine bilden, nicht inhibiert. Es ist wahrscheinlich, dass in diesen Odontoblasten die transkriptionale Regulation der Expression von Dmp-1 und Dspp nicht von HDAC1 inhibiert wird. Neuere Untersuchungen der Dentin-Pulpa-Einheit an Zähnen von Ratten während der Dentinogenese zeigen, dass HDAC1 in den Odontoblasten von adulten Zähnen stark exprimiert wird (Yamauchi et al., 2024). Dies bestätigt die Annahme der vorliegenden Ergebnisse.

Die vorliegenden Befunde stimmen in Teilen mit der Erstbeschreibung der Expression von HDAC1 *in vivo* von Klinz et al. überein. Bereits 2012 wurde beschrieben, dass HDAC1 in einer Subpopulation von Zellkörpern der Odontoblasten schwach exprimiert wird, jedoch wurden keine Färbungen im Zytoplasma oder intensive Färbungen von Zellkernen einer Subpopulation von Odontoblasten detektiert (Klinz et al., 2012). Die Fortschritte in der Entwicklung von qualitativ höherwertigen und spezifischeren Antikörpern könnte erklären, warum 2012 keine starke Expression von HDAC1 in den Zellkörpern einer Subpopulation von Odontoblasten und im Zytoplasma ersichtlich war.

In Odontoblasten, in denen HDAC1 im Zellkern oder Zytoplasma vorkommt, sollten HDAC2, HDAC3 und HDAC8 mit Doppelfärbungen charakterisiert werden, um herauszufinden, ob in diesen Odontoblasten alle HDACs der Klasse I in den Zellkernen, im Zytoplasma oder sowohl im Zellkern als auch Zytoplasma lokalisiert sind. In zukünftigen Untersuchungen sollten daher die Kolo-kalisationen der HDACs der Klasse I in Odontoblasten, die sich in unterschiedlichen Differenzierungsphasen befinden, untersucht werden.

5.2.2 Die Rolle von HDAC2 in Odontoblasten der gesunden Molaren

Der Befund der hier vorliegenden Studie stimmt mit der Erstbeschreibung der Lokalisation von HDAC2 in der gesunden humanen Dentin-Pulpa-Einheit überein (Klinz et al., 2012). Die spezifische Expression von HDAC2 nur in den Zellkernen der gesunden Odontoblasten zeigt, dass HDAC2 die Transkription der Gene in den Odontoblasten zur Dentinmatrixbildung hemmen kann. Die Regulation der transkriptionalen Expression der Gene, die die Sekundärdentinmatrix bilden, ist unbekannt. Da das Sekundärdentin die Dentinmatrix ist, die unter physiologischen Bedingungen gebildet wird, kann angenommen werden, dass die Sekundärdentinbildung ebenfalls von HDAC2 stark reguliert wird.

Die Transkription der Dentinmatrixproteine kann unter harmonischen und physiologischen Bedingungen von HDAC2 beeinflusst werden. Bei dieser Regulierung kann HDAC2 die physiologische Transkription der Sekundärdentinbildung in einer großen Subpopulation von Odontoblasten stark und in einer kleinen Subpopulation schwach hemmen. Ob dies vom Differenzierungsgrad der Odontoblasten abhängt, erfordert weitere Untersuchungen.

5.2.3 Die Rolle von HDAC3 in Odontoblasten der gesunden Molaren

Die Lokalisation von HDAC3 wurde sowohl im Zytoplasma als auch in wenigen Zellkernen der gesunden Odontoblasten detektiert. In den Zellkernen einer kleinen Subpopulation von Odontoblasten wurde HDAC3 schwach exprimiert. Daraus schließt sich, dass HDAC3 unter physiologischen Bedingungen eine untergeordnete Rolle bei der transkriptionalen Regulation der Gene zur Dentinmatrixbildung spielt, da die Odontoblasten keine oder nur eine sehr schwache Färbung für HDAC3 im Zellkern aufweisen. Der vorliegende Befund bestätigt das Ergebnis von Klinz et al., dass HDAC3 im Vergleich zu HDAC1 und HDAC2 in der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit sehr schwach im Zellkern exprimiert wird (Klinz et al., 2012). Eine aktuelle Untersuchung der Dentin-Pulpa-Einheit von Ratten zeigt ebenfalls eine geringe Expression von HDAC3 in den Odontoblasten im Rahmen der Dentinogenese (Yamauchi et al., 2024).

Im Zytoplasma und den gesunden Odontoblastenfortsätzen im Bereich des Sekundärdentins war eine deutliche HDAC3 Färbung ersichtlich. Die Ergebnisse legen nahe, dass HDAC3 unter physiologischen Bedingungen nach der Bildung subzellulär im Zytoplasma verbleibt und keine inhibitorische Rolle für die transkriptionale Regulation der Dentinmatrixproteine (Dsp, Dmp-1, ...) spielen kann. Die zytoplasmatische Proteinlokalisierung von HDAC3, die mit den immunhistochemischen Ergebnissen der vorliegenden Studie zum ersten Mal dargestellt wurde, zeigt, dass neben HDAC2 auch HDAC3 bei der Regulation der Sekundärdentinmatrixbildung von wichtiger Bedeutung ist.

5.2.4 Die Rolle von HDAC8 in Odontoblasten der gesunden Molaren

Da unter physiologischen Bedingungen in den Fortsätzen, dem Zytoplasma und den Zellkernen der humanen Odontoblasten keine HDAC8-Immunreaktivität zu erkennen war, kann angenommen werden, dass HDAC8 bei der transkriptionalen Regulation der Gene, die die Dentinmatrixproteine bilden, keine epigenetische Funktion erfüllt. Die fehlende Lokalisation von HDAC8 in den Zellen der zellreichen Zone deutet auf keine regulatorische Rolle von HDAC8 in der Differenzierung dieser Zellen hin. Bisher liegen keine weiteren in vivo Untersuchungen an humanen Molaren zur Bekräftigung der vorliegenden Ergebnisse vor. Eine Untersuchung der Expression von HDAC8 in gesunder und durch Parodontitis entzündeter Gingiva zeigte eine leichte Expression von HDAC8 in gesunden Zahnfleischbiopsien (Cantley et al., 2016). HDAC8 könnte somit eher eine Rolle im Gewebe des Zahnhalteapparats spielen.

5.3 Die Rolle von HDAC Klasse I in entzündeten Odontoblasten

Zurzeit liegen noch keine spezifischen Studien zur Expression von HDACs der Klasse I in entzündeten Odontoblasten der Dentin-Pulpa-Einheit vor. Bereits vorliegende Studien befassen sich mit der Expression von HDACs unter entzündlichen Bedingungen in anderen Gewebeproben (bspw. Gingivabiopsien) und untersuchen andere Zellarten (Osteoblasten, Osteoklasten und Immunzellen).

In der vorliegenden Studie wurden HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8 zum ersten Mal in entzündeten Odontoblasten der humanen kariösen Molaren untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die epigenetische Deacetylierung bei der Bildung der Tertiärdentinmatrix eine wesentliche Rolle spielen kann.

5.3.1 Die Rolle von HDAC1 in Odontoblasten der entzündeten Molaren

Im Vergleich zu den gesunden Molaren wurde HDAC1 in Odontoblasten unterhalb der kariösen Läsion sehr stark exprimiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Entzündung in Odontoblasten eine starke Expression von HDAC1 in den Zellkernen induziert. Es ist davon auszugehen, dass HDAC1 allgemein bei entzündlichen Prozessen der Zähne und des Zahnhalteapparats hochreguliert wird. Eine bereits vorliegende Studie zeigt in durch Parodontitis entzündeten Gingivaproben eine Hochregulation von HDAC1, besonders in den Osteoklasten-Vorläuferzellen (TRAP-Zellen) und in CD3-Lymphozyten (Cantley et al., 2016).

Eine starke Expression von HDAC1 in den Zellkernen der Odontoblasten kann darauf hindeuten, dass HDAC1 die Expression der Gene, die die Dentinmatrix bilden, unterdrückt. Es ist möglich, dass die Entzündungsmediatoren nach einer kariösen Läsion eine Translokation von HDAC1 vom Zytoplasma in den Zellkern der Odontoblasten verursachen. Aufgrund dieser Zellkern-Translokation von HDAC1 in den entzündeten Odontoblasten bleiben die DNA-Sequenzen der Gene, die *Dmp-1* und *Dspp* kodieren, für den Zugang der Transkriptionsfaktoren, die die Expression dieser Gene regulieren, verschlossen, sodass keine Bildung der Proteine DMP-1 und DSPP in den kariösen Molaren erfolgen konnte.

5.3.2 Die Rolle von HDAC2 in Odontoblasten der entzündeten Molaren

In der vorliegenden Studie wurde erstmals gezeigt, dass kariöse Läsionen eine erhöhte Protein-Expression von HDAC2 in den Odontoblasten induzieren. Im Vergleich zu den gesunden Odontoblasten zeigten die durch die Dentinkaries entzündeten Odontoblasten eine erhöhte Expression von HDAC2 im Zellkern. Basierend auf diesen Ergebnissen kann angenommen werden, dass Karies eine starke Bildung von HDAC2 induziert. Es ist möglich, dass das im Zytoplasma von den Ribosomen gebildete HDAC2-Protein durch den Effekt der Entzündungsmediatoren vom Zytoplasma in den Zellkern der Odontoblasten translokiert. HDAC2 kann im Zellkern eine Komprimierung der Histonprotein-Arme verursachen, sodass die Transkriptionsfaktoren nicht mehr an ihre Zielgene binden können und so die Expression der Gene (z. B. *Dmp1*, *Dspp*), die die Dentinmatrix bilden, inhibiert wird.

Ein kleiner Teil der Odontoblasten zeigte eine schwache Immunreaktivität für HDAC2, was darauf hindeuten kann, dass die Transkription in diesen Odontoblasten weniger stark gehemmt wird als in der großen Subpopulation der Odontoblasten mit starker HDAC2-Expression. Es ist möglich, dass diese kleine Subpopulation von Odontoblasten noch nicht terminal differenziert ist. Bereits veröffentlichte *in vitro* Studien an einer Zelllinie humaner Osteoblasten-ähnlicher-Zellen zeigen, dass HDAC2 ein Schlüsselenzym für die osteogene Differenzierung ist, da bei der Inhibition von HDAC2 die Differenzierung zu Odontoblasten gefördert wird (Paino et al., 2014, Yamauchi et al., 2024).

5.3.3 Die Rolle von HDAC3 in Odontoblasten der entzündeten Molaren

Die starke Färbung von HDAC3 in den Fortsätzen der durch die Initialkaries entzündeten Odontoblasten kann zeigen, dass ein Teil der HDAC3 Proteine durch den Einfluss der Entzündungsmediatoren vom Zellkern ins Zytoplasma transloziert. HDAC3 wurde vor allem im Zytoplasma in den Fortsätzen der entzündeten Odontoblasten detektiert. Eine kleine Subpopulation der degenerierten Odontoblastenschicht unterhalb der kariösen Läsion zeigte jedoch eine starke Expression von HDAC3 innerhalb der Zellkerne. Die Ergebnisse scheinen darauf hinzudeuten, dass HDAC3 unter entzündlichen Bedingungen die Gene zur Dentinmatrixbildung sehr schwach bis gar nicht inhibiert. Eine Blockade der Transkriptionsfaktoren zur Dentinmatrixbildung könnte nur durch die kleine Subpopulation von Odontoblasten unterhalb der kariösen Läsion erfolgen, da sich HDAC3 nur in dieser Subpopulation im Zellkern der entzündeten Odontoblasten befindet. Trotz der tendenziellen Hochexpression von HDAC3 in den Zellkörpern dieser Odontoblasten waren die Ergebnisse statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die transkriptionale Regulation der Dentinmatrixbildung über die Deacetylierung durch die HDACs in Abhängigkeit des Differenzierungszustandes der Zelle komplex reguliert werden kann.

5.3.4 Die Rolle von HDAC8 in Odontoblasten der entzündeten Molaren

Da nach der initialen Dentinkaries keine Expression von HDAC8 in den entzündeten Odontoblasten detektiert wurde, kann angenommen werden, dass HDAC8 keine Rolle bei der transkriptionalen Regulation der Gene zur Dentinmatrixbildung spielt. Darüber hinaus zeigte sich ebenso keine Immunreaktivität in den Zellen der zellreichen Zone, was darauf hindeuten kann, dass HDAC8 bei der Differenzierung der Zellen in der zellreichen Zone keine regulatorische Rolle spielt. Bisher liegen keine weiteren in vivo Untersuchungen an humanen Molaren zur Bestätigung dieses Befundes vor. Möglicherweise spielt HDAC8 im Rahmen der chronischen Parodontitis eine höhergeordnete Rolle. In einer bereits vorliegenden Studie wurde eine hohe Expression von HDAC8 in Gingivabiopsien von Parodontitis Patienten festgestellt (Cantley et al., 2016).

5.4 Schlussfolgerungen der Ergebnisse

Heutiger Standard bei der Anwendung von Unterfüllungsmaterialien sind calciumhydroxidbasierte Produkte. Diese führen jedoch zu Schädigungen (bspw. Nekrosen) in den Odontoblasten. Da die Dentinbildung zum Vitalerhalt und Schutz der Pulpa vor dem Eindringen von Noxen von wichtiger klinischer Bedeutung ist, ist das Verständnis der molekularen Mechanismen, die die Bildung des Dentins induzieren oder unterbinden, von großer Relevanz, um neue Therapieansätze zur Behandlung tiefer Karies zu entwickeln.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der HDACs der Klasse I in gesunden und kariösen humanen Molaren untersucht. Die Untersuchungen zeigen, dass HDAC1 durch kariöse Läsionen in den Zellkernen der Odontoblasten stärker exprimiert wird, weshalb es plausibel erscheint, dass HDAC1 die Bildung von Dentin unter kariösen Bedingungen inhibieren kann.

Weiterhin wurde festgestellt, dass HDAC2 unter physiologischen und pathologischen Bedingungen nur im Zellkern lokalisiert ist. Karies induziert eine erhöhte Protein-Expression von HDAC2 im Zellkern. Es kann daher als wahrscheinlich angesehen werden, dass HDAC2 in der Lage ist, die Dentinmatrixbildung stark zu hemmen.

HDAC3 wurde nach kariösen Läsionen hauptsächlich in den Fortsätzen der Odontoblasten detektiert, sodass ein maßgeblicher Einfluss bei der Regulation der Dentinmatrixbildung unwahrscheinlich scheint.

HDAC8 scheint keine regulatorische Rolle bei der Inhibition der Dentinbildung zu spielen, da weder in der gesunden noch in der kariösen Dentin-Pulpa-Einheit eine Immunreaktivität festgestellt werden konnte.

Die vorliegenden Ergebnisse sollten weitergehend untersucht werden. Eine größere Anzahl gesunder und kariöser Zähne in verschiedenen Stadien (initiale Dentinkaries, tiefe Dentinkaries mit und ohne Pulpaeröffnung), sowie die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der HDACs der Klasse I mittels Immunfluoreszenzmethoden (bspw. mittels Doppelfärbung oder tripple-Färbung) wären erstrebenswert, um ein tieferes Verständnis für den Deacetylierungszustand der humanen Odontoblasten zu entwickeln um schlussendlich ein neues Medikament als Unterfüllungsmaterial zu entwickeln, welches die Bildung von Dentin ohne Schädigung der Odontoblasten fördert.

6 Zusammenfassung

Zur Entwicklung neuer Therapiestrategien gegen Karies ist das Verständnis der molekularen Mechanismen, die die Transkription der Gene in den Odontoblasten regulieren, von wichtiger Bedeutung. Die Deacetylierung der Histone kann den Zugang der Transkriptionsfaktoren zur Expression der Gene, die die Dentinmatrix bilden, unterbinden. Dies ist für die Bildung des Tertiärdentins nach kariösen Läsionen von großer Relevanz. Darüber hinaus ist nach jetzigem Forschungsstand unbekannt, wie die Bildung der Sekundärdentinmatrix durch die Kaukräfte reguliert werden kann, sobald das dentale Organ in Okklusion kommt. Es wurde bereits gezeigt, dass die HDACs der Klasse I (HDAC1-3 und HDAC8) bei der Bildung der extrazellulären Knochenmatrix eine wichtige Rolle spielen. Bisher liegen keine Untersuchungen zur Expression von HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8 in humanen Odontoblasten der durch Karies entzündlich veränderten Dentin-Pulpa-Einheit vor. Die Kenntnisse über die Expressionen von HDAC1-3 und HDAC8 in gesunden und kariösen Odontoblasten können von großer klinischer Relevanz bei der transkriptionalen Regulation der Dmp1- und Dssp-Gene im Rahmen der Kariesbehandlung sein.

Um neue Erkenntnisse über die Expression von HDACs der Klasse I nach der initialen Dentinkaries zu gewinnen, wurden gesunde und kariöse humane Molaren extrahiert, in Fixativlösung fixiert, über 3 Wochen in 4 N Ameisensäure entkalkt, in Saccharose-Lösung kryoprotectiert und im Anschluss in Tissue-Tek eingebettet und mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Nach Schneiden der Proben mittels Kryostat wurden die freischwimmenden Schnitte der humanen Molaren mit einer HE-Färbung gefärbt, um die Zähne histopathologisch als gesund und kariös zu charakterisieren. Zur Protein-Expression von HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8 in gesunden und entzündeten Odontoblasten wurden aufeinanderfolgende Schnitte von gesunden (n=5) und kariösen (n=6) humanen Molaren unter Anwendung einer immunhistochemischen Methode (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex) untersucht. Die Färbungsintensitäten der Antikörper in gesunden und entzündeten Odontoblastenzellkernen wurden densitometrisch gemessen und statistisch ausgewertet.

In Odontoblasten der gesunden Molaren wurde HDAC1 im Zellkern und im Zytoplasma detektiert, während HDAC2 hauptsächlich in den Zellkernen der gesunden Molaren identifiziert wurde. HDAC3 wurde hauptsächlich im Zytoplasma der Fortsätze der gesunden Odontoblasten gefunden. Im Zellkern und Zytoplasma der gesunden Odontoblasten war keine Expression für HDAC8 ersichtlich. Im Vergleich zu den gesunden Odontoblasten induzieren kariöse Läsionen eine signifikant höhere Expression von HDAC1 und HDAC2 in den entzündeten Odontoblastenzellkernen. Kariöse Läsionen induzieren zwar eine erhöhte Expression von HDAC3 in den Zellkernen und Fortsätzen der Odontoblasten, jedoch waren die Befunde statistisch nicht signifikant. In den entzündeten Odontoblasten wurde HDAC8 ebenfalls nicht detektiert.

Die moderate Expression von HDAC1 im Zytoplasma und im Zellkern, sowie von HDAC2 im Zellkern der gesunden Odontoblasten zeigt, dass HDAC1 und HDAC2 in gesunden Odontoblasten bei der Regulation der Sekundärdentinmatrixbildung eine große Rolle spielen können. Die Expression von HDAC3 im Zytoplasma der gesunden Odontoblasten deutet auf keine inhibitorische Rolle von HDAC3 bei der transkriptionalen Regulation der Sekundärdentinmatrixbildung hin. In gesunden Odontoblasten spielt HDAC8 keine Rolle bei der transkriptionalen Regulation der Sekundärdentinmatrixbildung.

Die signifikant starke Expression von HDAC1 und HDAC2 in Zellkernen der entzündeten Odontoblasten zeigt, dass HDAC1 und HDAC2 nach einer kariösen Läsion die transkriptionale Regulation der Expression der Gene, die die extrazellulären Dentinmatrixproteine für die Tertiärdentinmatrix kodieren, inhibieren können. Die statistisch nicht signifikante Hochexpression von HDAC3 im Zytoplasma und im Zellkern der entzündeten Odontoblasten kann tendenziell auf eine inhibitorische Rolle von HDAC3 bei der Tertiärdentinmatrixbildung hindeuten. HDAC8 hat keinen Effekt bei der Regulation der Tertiärdentinmatrixbildung. Basierend auf den in der Studie vorliegenden Ergebnissen könnten HDAC1-, HDAC2- und

HDAC3-Inhibitoren bei der Behandlung der kariösen Läsionen z. B. als Überkappungsmaterialien in Betracht kommen, um eine Tertiärdentinbildung zu induzieren.

7 Literaturverzeichnis

- ANNUNZIATO, A. 2008. DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin. *Nature Education*.
- BAE, J. M., CLARKE, J. C., RASHID, H., ADHAMI, M. D., MCCULLOUGH, K., SCOTT, J. S., CHEN, H., SINHA, K. M., DE CROMBRUGGHE, B. & JAVED, A. 2018. Specificity Protein 7 Is Required for Proliferation and Differentiation of Ameloblasts and Odontoblasts. *J Bone Miner Res*, 33, 1126-1140.
- BÁRTOVÁ, E., KREJČÍ, J., HARNIČAROVÁ, A., GALIOVÁ, G. & KOZUBEK, S. 2008. Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56, 711-721.
- BLEICHER, F. 2014. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res*, 325, 65-71.
- BRADLEY, E. W., CARPIO, L. R., VAN WIJNEN, A. J., MCGEE-LAWRENCE, M. E. & WESTENDORF, J. J. 2015. Histone Deacetylases in Bone Development and Skeletal Disorders. *Physiol Rev*, 95, 1359-81.
- BUSSOLATI, G. & RADULESCU, R. T. 2011. Blocking endogenous peroxidases in immunohistochemistry: a mandatory, yet also subtle measure. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 19, 484.
- CANTLEY, M. D., DHARMAPATNI, A. A., ALGATE, K., CROTTI, T. N., BARTOLD, P. M. & HAYNES, D. R. 2016. Class I and II histone deacetylase expression in human chronic periodontitis gingival tissue. *J Periodontal Res*, 51, 143-51.
- CANTLEY, M. D., ZANNETTINO, A. C. W., BARTOLD, P. M., FAIRLIE, D. P. & HAYNES, D. R. 2017. Histone deacetylases (HDAC) in physiological and pathological bone remodelling. *Bone*, 95, 162-174.
- CARPIO, L. R., BRADLEY, E. W., MCGEE-LAWRENCE, M. E., WEIVODA, M. M., POSTON, D. D., DUDAKOVIC, A., XU, M., TCHKONIA, T., KIRKLAND, J. L., VAN WIJNEN, A. J., OURSLER, M. J. & WESTENDORF, J. J. 2016. Histone deacetylase 3 supports endochondral bone formation by controlling cytokine signaling and matrix remodeling. *Sci Signal*, 9, ra79.
- CAVALLI, G. & HEARD, E. 2019. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*, 571, 489-499.
- CHAUSSAIN-MILLER, C., FIORETTI, F., GOLDBERG, M. & MENASHI, S. 2006. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Human Caries. *Journal of Dental Research*, 85, 22-32.
- CHEN, L., FISCHLE, W., VERDIN, E. & GREENE, W. C. 2001. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science*, 293, 1653-7.
- CHEN, S., GLUHAK-HEINRICH, J., WANG, Y. H., WU, Y. M., CHUANG, H. H., CHEN, L., YUAN, G. H., DONG, J., GAY, I. & MACDOUGALL, M. 2009. Runx2, osx, and dspp in tooth development. *J Dent Res*, 88, 904-9.
- CHEN, Z., LI, W., WANG, H., WAN, C., LUO, D., DENG, S., CHEN, H. & CHEN, S. 2016. Klf10 regulates odontoblast differentiation and mineralization via promoting expression of dentin matrix protein 1 and dentin sialophosphoprotein genes. *Cell Tissue Res*, 363, 385-98.
- CHEN, Z., XIE, H., YUAN, J., LAN, Y. & XIE, Z. 2021. Krüppel-like factor 6 promotes odontoblastic differentiation through regulating the expression of dentine sialophosphoprotein and dentine matrix protein 1 genes. *Int Endod J*, 54, 572-584.
- CHOI, S. J., SONG, I. S., FENG, J. Q., GAO, T., HARUYAMA, N., GAUTAM, P., ROBEY, P. G. & HART, T. C. 2010. Mutant DLX 3 disrupts odontoblast polarization and dentin formation. *Dev Biol*, 344, 682-92.
- CHOUDHARY, C., KUMAR, C., GNAD, F., NIELSEN, M. L., REHMAN, M., WALTHER, T. C., OLSEN, J. V. & MANN, M. 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 325, 834-40.
- DATTA, M., STASZEWSKI, O., RASCHI, E., FROSCHE, M., HAGEMEYER, N., TAY, T. L., BLANK, T., KREUTZFELDT, M., MERKLER, D., ZIEGLER-WALDKIRCH, S., MATTHIAS, P., MEYER-LUEHMANN, M. & PRINZ, M. 2018. Histone Deacetylases 1 and 2 Regulate Microglia Function during Development, Homeostasis, and Neurodegeneration in a Context-Dependent Manner. *Immunity*, 48, 514-529.e6.

- DUNCAN, H. F., SMITH, A. J., FLEMING, G. J. & COOPER, P. R. 2012. Histone deacetylase inhibitors induced differentiation and accelerated mineralization of pulp-derived cells. *J Endod*, 38, 339-45.
- DUNCAN, H. F., SMITH, A. J., FLEMING, G. J. & COOPER, P. R. 2013. Histone deacetylase inhibitors epigenetically promote reparative events in primary dental pulp cells. *Exp Cell Res*, 319, 1534-43.
- DUNCAN, H. F., SMITH, A. J., FLEMING, G. J. & COOPER, P. R. 2016. Epigenetic modulation of dental pulp stem cells: implications for regenerative endodontics. *Int Endod J*, 49, 431-46.
- FARGES, J. C., ALLIOT-LICHT, B., BAUDOUIN, C., MSAKA, P., BLEICHER, F. & CARROUEL, F. 2013. Odontoblast control of dental pulp inflammation triggered by cariogenic bacteria. *Front Physiol*, 4, 326.
- FARGES, J. C., ALLIOT-LICHT, B., RENARD, E., DUCRET, M., GAUDIN, A., SMITH, A. J. & COOPER, P. R. 2015. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm*, 2015, 230251.
- FELSENTHAL, N. & ZELZER, E. 2021. Immunofluorescent Staining of Adult Murine Paraffin-Embedded Skeletal Tissue. *Methods Mol Biol*, 2230, 337-344.
- GALLER, K. M., WEBER, M., KORKMAZ, Y., WIDBILLER, M. & FEUERER, M. 2021. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci*, 22.
- GALLINARI, P., DI MARCO, S., JONES, P., PALLAORO, M. & STEINKUHLER, C. 2007. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res*, 17, 195-211.
- GLOZAK, M. A., SENGUPTA, N., ZHANG, X. & SETO, E. 2005. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, 363, 15-23.
- GOLDBERG, M., KULKARNI, A. B., YOUNG, M. & BOSKEY, A. 2011. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*, 3, 711-35.
- GOLDBERG, M. & SMITH, A. J. 2004. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15, 13-27.
- GORDON, J. A. R., STEIN, J. L., WESTENDORF, J. J. & VAN WIJNEN, A. J. 2015. Chromatin modifiers and histone modifications in bone formation, regeneration, and therapeutic intervention for bone-related disease. *Bone*, 81, 739-745.
- GRUNSTEIN, M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389, 349-52.
- HABERLAND, M., MONTGOMERY, R. L. & OLSON, E. N. 2009. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*, 10, 32-42.
- HAHN, C. L. & LIEWEHR, F. R. 2007. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod*, 33, 643-51.
- HE, Y. D., SUI, B. D., LI, M., HUANG, J., CHEN, S. & WU, L. A. 2016. Site-specific function and regulation of Osterix in tooth root formation. *Int Endod J*, 49, 1124-1131.
- JEON, E. J., LEE, K. Y., CHOI, N. S., LEE, M. H., KIM, H. N., JIN, Y. H., RYOO, H. M., CHOI, J. Y., YOSHIDA, M., NISHINO, N., OH, B. C., LEE, K. S., LEE, Y. H. & BAE, S. C. 2006. Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J Biol Chem*, 281, 16502-11.
- JUAN, L. J., SHIA, W. J., CHEN, M. H., YANG, W. M., SETO, E., LIN, Y. S. & WU, C. W. 2000. Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem*, 275, 20436-43.
- KIM, C. H., PARK, S. M., LEE, S. J., KIM, Y. D., JANG, S. H., WOO, S. M., KWON, T. K., PARK, Z. Y., CHUNG, I. J., KIM, H. R. & JUN, C. D. 2021. NSrp70 is a lymphocyte-essential splicing factor that controls thymocyte development. *Nucleic Acids Res*, 49, 5760-5778.
- KIM, T. H., BAE, C. H., LEE, J. C., KIM, J. E., YANG, X., DE CROMBRUGGHE, B. & CHO, E. S. 2015. Osterix regulates tooth root formation in a site-specific manner. *J Dent Res*, 94, 430-8.

- KLINZ, F. J., KORKMAZ, Y., BLOCH, W., RAAB, W. H. & ADDICKS, K. 2012. Histone deacetylases 2 and 9 are coexpressed and nuclear localized in human molar odontoblasts in vivo. *Histochem Cell Biol*, 137, 697-702.
- KLINZ, F. J., KORKMAZ, Y., CHO, B., RAAB, W. H. & ADDICKS, K. 2013. Transcription factor CREB is phosphorylated in human molar odontoblasts and cementoblasts in vivo. *Histochem Cell Biol*, 139, 615-20.
- KORKMAZ, Y., BLOCH, W., SCHNEIDER, K., ZIMMER, S., ADDICKS, K. & RAAB, W. H. 2008. Time-dependent activation of ERK1/2 in nerve terminals of the dentin-pulp complex following bradykinin treatment. *J Dent Res*, 87, 1149-54.
- KORKMAZ, Y., IMHOF, T., KÄMMERER, P. W., BLOCH, W., RINK-NOTZON, S., MÖST, T., WEBER, M., KESTING, M., GALLER, K. M. & DESCHNER, J. 2022. The colocalizations of pulp neural stem cells markers with dentin matrix protein-1, dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein in human denticle (pulp stone) lining cells. *Ann Anat*, 239, 151815.
- KORKMAZ, Y., LANG, H., BEIKLER, T., CHO, B., BEHREND, S., BLOCH, W., ADDICKS, K. & RAAB, W. H. 2011. Irreversible inflammation is associated with decreased levels of the alpha1-, beta1-, and alpha2-subunits of sGC in human odontoblasts. *J Dent Res*, 90, 517-22.
- KORKMAZ, Y., PLOMANN, M., PULADI, B., DEMIRBAS, A., BLOCH, W. & DESCHNER, J. 2023. Dental Pulp Inflammation Initiates the Occurrence of Mast Cells Expressing the alpha(1) and beta(1) Subunits of Soluble Guanylyl Cyclase. *Int J Mol Sci*, 24.
- KWON, A., PARK, H. J., BAEK, K., LEE, H. L., PARK, J. C., WOO, K. M., RYOO, H. M. & BAEK, J. H. 2012. Suberoylanilide hydroxamic acid enhances odontoblast differentiation. *J Dent Res*, 91, 506-12.
- LI, H., ZHANG, J. & NISWANDER, L. 2018. Zinc deficiency causes neural tube defects through attenuation of p53 ubiquitylation. *Development*, 145.
- LI, S., KONG, H., YAO, N., YU, Q., WANG, P., LIN, Y., WANG, J., KUANG, R., ZHAO, X., XU, J., ZHU, Q. & NI, L. 2011. The role of runt-related transcription factor 2 (Runx2) in the late stage of odontoblast differentiation and dentin formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 410, 698-704.
- LIN, H., LIU, H., SUN, Q., YUAN, G., ZHANG, L. & CHEN, Z. 2013. KLF4 promoted odontoblastic differentiation of mouse dental papilla cells via regulation of DMP1. *J Cell Physiol*, 228, 2076-85.
- LODRINI, M., OEHME, I., SCHROEDER, C., MILDE, T., SCHIER, M. C., KOPP-SCHNEIDER, A., SCHULTE, J. H., FISCHER, M., DE PRETER, K., PATTYN, F., CASTOLDI, M., MUCKENTHALER, M. U., KULOZIK, A. E., WESTERMANN, F., WITT, O. & DEUBZER, H. E. 2013. MYCN and HDAC2 cooperate to repress miR-183 signaling in neuroblastoma. *Nucleic Acids Res*, 41, 6018-33.
- LONGWORTH, M. S. & LAIMINS, L. A. 2006. Histone deacetylase 3 localizes to the plasma membrane and is a substrate of Src. *Oncogene*, 25, 4495-500.
- LU, M., LIU, S., KUMARSANGAIAH, A., ZHOU, Y., PAN, Z. & ZUO, Y. 2017. Nucleosome Positioning With Fractal Entropy Increment of Diversity in Telemedicine. *IEEE Access*, 6, 33451-33459.
- LUO, J., SU, F., CHEN, D., SHILOH, A. & GU, W. 2000. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature*, 408, 377-381.
- LUO, Z., WANG, Z., HE, X., LIU, N., LIU, B., SUN, L., WANG, J., MA, F., DUNCAN, H., HE, W. & COOPER, P. 2018. Effects of histone deacetylase inhibitors on regenerative cell responses in human dental pulp cells. *Int Endod J*, 51, 767-778.
- MACDOUGALL, M., SIMMONS, D., LUAN, X., NYDEGGER, J., FENG, J. & GU, T. T. 1997. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J Biol Chem*, 272, 835-42.
- MAN, K., LAWLOR, L., JIANG, L. H. & YANG, X. B. 2021. The Selective Histone Deacetylase Inhibitor MI192 Enhances the Osteogenic Differentiation Efficacy of Human Dental Pulp Stromal Cells. *Int J Mol Sci*, 22.

- MARKS, P., RIFKIND, R. A., RICHON, V. M., BRESLOW, R., MILLER, T. & KELLY, W. K. 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*, 1, 194-202.
- PAINO, F., LA NOCE, M., TIRINO, V., NADDEO, P., DESIDERIO, V., PIROZZI, G., DE ROSA, A., LAINO, L., ALTUCCI, L. & PAPACCIO, G. 2014. Histone deacetylase inhibition with valproic acid downregulates osteocalcin gene expression in human dental pulp stem cells and osteoblasts: evidence for HDAC2 involvement. *Stem Cells*, 32, 279-89.
- PASHLEY, D. H. 1996. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*, 7, 104-33.
- PERKINS, N. D. 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 49-62.
- PIJUAN-GALITÓ, S., TAMM, C., SCHUSTER, J., SOBOL, M., FORSBERG, L., MERRY, C. L. R. & ANNERÉN, C. 2016. Human serum-derived protein removes the need for coating in defined human pluripotent stem cell culture. *Nature Communications*, 7, 12170.
- QIN, C., BRUNN, J. C., COOK, R. G., ORKISZEWSKI, R. S., MALONE, J. P., VEIS, A. & BUTLER, W. T. 2003. Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *J Biol Chem*, 278, 34700-8.
- QIN, C., D'SOUZA, R. & FENG, J. Q. 2007. Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. *J Dent Res*, 86, 1134-41.
- REGEL, I., MERKL, L., FRIEDRICH, T., BURGERMEISTER, E., ZIMMERMANN, W., EINWÄCHTER, H., HERRMANN, K., LANGER, R., RÖCKEN, C., HOFHEINZ, R., SCHMID, R. & EBERT, M. P. 2012. Pan-histone deacetylase inhibitor panobinostat sensitizes gastric cancer cells to anthracyclines via induction of CITED2. *Gastroenterology*, 143, 99-109.e10.
- SCHROEDER, T. M. & WESTENDORF, J. J. 2005. Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation. *J Bone Miner Res*, 20, 2254-63.
- SETO, E. & YOSHIDA, M. 2014. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a018713.
- SFERRA, R., POMPILI, S., FESTUCCIA, C., MARAMPON, F., GRAVINA, G. L., VENTURA, L., DI CESARE, E., CICCHINELLI, S., GAUDIO, E. & VETUSCHI, A. 2017. The possible prognostic role of histone deacetylase and transforming growth factor β /Smad signaling in high grade gliomas treated by radio-chemotherapy: a preliminary immunohistochemical study. *Eur J Histochem*, 61, 2732.
- SHAHBAZIAN, M. D. & GRUNSTEIN, M. 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*, 76, 75-100.
- SMITH, A. J., CASSIDY, N., PERRY, H., BEGUE-KIRN, C., RUCH, J. V. & LESOT, H. 1995. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*, 39, 273-80.
- SMITH, M. M. 1991. Histone structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, 3, 429-37.
- STAQUET, M. J., DURAND, S. H., COLOMB, E., ROMEAS, A., VINCENT, C., BLEICHER, F., LEBECQUE, S. & FARGES, J. C. 2008. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. *J Dent Res*, 87, 256-61.
- STRAHL, B. D. & ALLIS, C. D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41-5.
- SUN, Y., LU, Y., CHEN, L., GAO, T., D'SOUZA, R., FENG, J. Q. & QIN, C. 2011. DMP1 processing is essential to dentin and jaw formation. *J Dent Res*, 90, 619-24.
- SUZUKI, S., SREENATH, T., HARUYAMA, N., HONEYCUTT, C., TERSE, A., CHO, A., KOHLER, T., MÜLLER, R., GOLDBERG, M. & KULKARNI, A. B. 2009. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol*, 28, 221-9.
- TAO, H., LIN, H., SUN, Z., PEI, F., ZHANG, J., CHEN, S., LIU, H. & CHEN, Z. 2019. Klf4 Promotes Dentinogenesis and Odontoblastic Differentiation via Modulation of TGF- β Signaling Pathway and Interaction With Histone Acetylation. *J Bone Miner Res*, 34, 1502-1516.

- TERASAWA, M., SHIMOKAWA, R., TERASHIMA, T., OHYA, K., TAKAGI, Y. & SHIMOKAWA, H. 2004. Expression of dentin matrix protein 1 (DMP1) in nonmineralized tissues. *J Bone Miner Metab*, 22, 430-8.
- TUCKER, A. & SHARPE, P. 2004. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nature Reviews Genetics*, 5, 499-508.
- WANG, J. S., YOON, S. H. & WEIN, M. N. 2021. Role of histone deacetylases in bone development and skeletal disorders. *Bone*, 143, 115606.
- YADAV, A., HUANG, T.-C., CHEN, S.-H., RAMASAMY, T. S., HSUEH, Y.-Y., LIN, S.-P., LU, F.-I., LIU, Y.-H. & WU, C.-C. 2021. Sodium phenylbutyrate inhibits Schwann cell inflammation via HDAC and NFκB to promote axonal regeneration and remyelination. *Journal of Neuroinflammation*, 18, 238.
- YAMAKOSHI, Y., HU, J. C., IWATA, T., KOBAYASHI, K., FUKAE, M. & SIMMER, J. P. 2006. Dentin sialophosphoprotein is processed by MMP-2 and MMP-20 in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 281, 38235-43.
- YAMAUCHI, Y., COOPER, P. R., SHIMIZU, E., KOBAYASHI, Y., SMITH, A. J. & DUNCAN, H. F. 2020. Histone Acetylation as a Regenerative Target in the Dentine-Pulp Complex. *Front Genet*, 11, 1.
- YAMAUCHI, Y., SHIMIZU, E. & DUNCAN, H. F. 2024. Dynamic Alterations in Acetylation and Modulation of Histone Deacetylase Expression Evident in the Dentine-Pulp Complex during Dentinogenesis. *Int J Mol Sci*, 25.
- YANG, X. J. & GREGOIRE, S. 2005. Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol*, 25, 2873-84.
- YAO, Y., HAO, F., TANG, L. C., XU, X. H. & JIN, L. 2020. Downregulation of HDAC8 expression decreases CD163 levels and promotes the apoptosis of macrophages by activating the ERK signaling pathway in recurrent spontaneous miscarriage. *Mol Hum Reprod*, 26, 521-531.
- YU, C. & ABBOTT, P. V. 2007. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J*, 52, S4-16.
- YUAN, Z. L., GUAN, Y. J., CHATTERJEE, D. & CHIN, Y. E. 2005. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*, 307, 269-73.
- ZHANG, H., JIANG, Y., QIN, C., LIU, Y., HO, S. P. & FENG, J. Q. 2015. Essential role of osterix for tooth root but not crown dentin formation. *J Bone Miner Res*, 30, 742-6.
- ZHU, Q., GIBSON, M. P., LIU, Q., LIU, Y., LU, Y., WANG, X., FENG, J. Q. & QIN, C. 2012. Proteolytic processing of dentin sialophosphoprotein (DSPP) is essential to dentinogenesis. *J Biol Chem*, 287, 30426-35.

8 Anhang

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Lösungen

Handelsname	Hersteller
Ameisensäure	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammonium nickel (II) sulfat hexahydrat	Merck, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Aquadest	-
BSA (bovine serum albumin)	Merck, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Chlorwasserstoff	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAB (Diaminobenzidin)	Merck, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Entellan™	Merck, Darmstadt, Deutschland
Entellan™ rapid mounting medium for microscopy	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Flüssigstickstoff	-
H&E (Hämatoxylin/Eosin)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
NGS (normal goat serum)	ab7481, abcam, Cambridge, UK
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Tissue Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
TNP Pikrinsäure	Fluka Chemical Corp., Neu-Ulm, Deutschland
TRIS	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton™ X-100	Merck, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol I und II	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Antikörper im Rahmen der Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller
Anti-Nestin antibody SP103 ab105389	abcam, Cambridge, UK
HDAC1 (10E2): sc-81598	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
HDAC2 (3F3): sc-81599	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
HDAC3 (3G6): sc-81600	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
HDAC8 (B-4): sc-365620	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Tabelle 3: Mittelwerte der gemessenen Färbungsintensitäten in Densitometrischer Einheit

gesund	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8
P116	47,732	51,956	39,987	7,944
P135c	47,048	42,122	52,852	15,737
P1002	21,689	34,708	20,531	12,101
P1003	35,21	57,14	21,359	16,617
P1003b	44,369	46,31	23,392	15,63
kariös	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8
P94	66,734	74,289	70,906	13,859
P116b	62,588	60,667	20,218	15,015
P126	56,894	74,732	30,722	11,369
P128	54,927	58,219	47,369	9,504
P135a	69,556	63,314	66,141	31,939
P135b	70,44	71,496	45,567	21,679

9 Danksagung

„Dankbarkeit beinhaltet Demut - eine Erkenntnis, dass wir ohne die Unterstützung anderer nicht sein könnten, was wir sind oder wo wir im Leben stehen.“

Robert Emmons

10 Tabellarischer Lebenslauf