

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

Die Expressionen der Klasse IIb-HDACs (HDAC6, HDAC10) in gesunden und in entzündeten
Odontoblasten der humanen Molaren

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

Vorgelegt von

Sebastian Marcus Breyer
aus Koblenz

Mainz, 2025

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

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 13. April 2026

Nachnutzungslizenz: CC-BY-ND-4.0

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Rolle der Odontoblasten bei der Dentinmatrixbildung unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.....	1
1.2 Die Transkriptionsfaktoren, die in Odontoblasten die Dentinmatrixbildung induzieren	1
1.3 Die strukturelle Ordnung des Chromatins und der Histonproteine	2
1.3.1 Der Aufbau der Histone.....	2
1.3.2 Der Aufbau eines Chromatins	3
1.3.3 Die Steuerung der Histone durch die Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs).....	3
1.4 Die Klassifikation der Histondeacetylasen (HDACs).....	3
2 Ziele der Arbeit	4
3 Material und Methoden	5
3.1 Materialien	5
3.1.1 Untersuchungsmaterial.....	5
3.1.2 Angesetzte Lösungen.....	5
3.2 Methodik – Vorbereitungen für die Immunhistochemie (IHC).....	8
3.2.1 Präparation und Fixation der humanen Molaren	8
3.2.2 Entkalkung, Kryoprotektion und Einbettung	8
3.2.3 Anfertigen und Aufbewahren der Schnitte.....	8
3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und Charakterisierung der Schnitte.....	9
3.4 Methodik der Immunhistochemie (IHC)	10
3.4.1 Vorbereitung für die Immunhistochemie.....	10
3.4.2 Die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen HDAC6 und HDAC10.....	10
3.4.3 Anfertigung der Verdünnungsreihen.....	11
3.4.4 ABC-Methode (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode).....	11
3.4.5 Untersuchung der immunhistochemisch (IHC-) gefärbten Schnitte	12
3.5 Quantifizierung der Immunhistochemie (IHC).....	13
3.5.1 Densitometrie der gefärbten IHC-Schnitte.....	13
3.6 Statistische Auswertung.....	13
4 Ergebnisse.....	14
4.1 Histochemische Ergebnisse.....	15
4.1.1 Die physiologische Dentin-Pulpa-Einheit.....	15
4.1.2 Die pathologisch veränderte Dentin-Pulpa-Einheit.....	16
4.2 Ergebnisse der Verdünnungsreihe für die HDACs Klasse IIb.....	17
4.2.1 Ergebnisse der Verdünnungsreihe für HDAC6.....	17

4.2.2	Ergebnisse der Verdünnungsreihe für HDAC10.....	17
4.3	Die Expression von den HDACs Klasse IIb in gesunden Molaren.....	17
4.3.1	Die Expression von HDAC6 in gesunden Molaren.....	17
4.3.2	Die Expression von HDAC10 in gesunden Molaren.....	17
4.4	Die Expression von den HDACs Klasse IIb in der Odontoblastenschicht kariöser Molaren	19
4.4.1	Die Expression von HDAC6 in der Odontoblastenschicht kariöser Molaren ...	19
4.4.2	Die Expression von HDAC10 in der Odontoblastenschicht kariöser Molaren .	19
4.5	Die Expression von den HDACs Klasse IIb in den Odontoblastenfortsätzen kariöser Molaren	19
4.5.1	Die Expression von HDAC6 in den Odontoblastenfortsätzen kariöser Molaren.....	19
4.5.2	Die Expression von HDAC10 in den Odontoblastenfortsätzen kariöser Molaren.....	19
4.6	Statistische Ergebnisse.....	22
5	Diskussion	23
5.1	Methodische Arbeit	23
5.1.1	Die Spezifität der Antikörper	23
5.1.2	Die Bearbeitung der humanen Molaren.....	24
5.1.3	Eliminierung störender Faktoren bei der Immunhistochemie (IHC).....	24
5.1.4	Optimierung der Antikörperbindung an die Epitope	24
5.1.5	Konzentration der DAB- und H ₂ O ₂ -Lösung und die optimale Darstellung der Antigen-Antikörper Bindung.....	25
5.2	Die Rolle von HDAC Klasse IIb in gesunden Molaren	25
5.2.1	Die Rolle von HDAC6 in gesunden Molaren	25
5.2.2	Die Rolle von HDAC10 in gesunden Molaren	25
5.3	Die Rolle von HDAC IIb in kariösen Molaren	26
5.3.1	Die Rolle von HDAC6 in kariösen Molaren.....	26
5.3.2	Die Rolle von HDAC10 in kariösen Molaren.....	27
5.4	Schlussfolgerungen	27
5.5	Limitationen der Studie	27
6	Zusammenfassung	29
7	Literaturverzeichnis.....	30
8	Anhang	36
9	Danksagung.....	37
10	Tabellarischer Lebenslauf.....	38

Abkürzungsverzeichnis

ab.....	abcam
Abb.....	Abbildung
ABC.....	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AK.....	Antikörper
B.....	Biotin
BMP-9.....	bone morphogenetic protein 9
bp.....	base pair
BSA.....	Bovines Serumalbumin
bspw.....	beispielsweise
CEM 1.3.....	spezifische T-Zell-Leukämie-Zelllinie
CREB.....	cAMP-responsive element binding protein
DAB.....	Diaminobenzidin
Dlx3.....	Distal-Less Homeobox 3
DMP1.....	dentin matrix acidic phosphoprotein 1
DNA.....	deoxyribonucleic acid
DPP.....	Dentinphosphoprotein
DSP.....	Dentinsialoprotein
DSPP.....	Dentin Sialophosphoprotein
Dspp.....	Dentin Sialophosphoprotein (Gen)
engl.....	englisch
g.....	Gramm
gF.....	gefärbte Odontoblastenfortsätze
H1.....	Histon H1
H2A.....	Histon H2A
H2B.....	Histon H2B
H3.....	Histon H3
H4.....	Histon H4
H5.....	Histon H5
HAT.....	Histonacetyltransferase
HDAC.....	Histondeacetylase
HDAC1.....	Histondeacetylase 1
HDAC2.....	Histondeacetylase 2
HDAC3.....	Histondeacetylase 3
HDAC4.....	Histondeacetylase 4
HDAC5.....	Histondeacetylase 5
HDAC6.....	Histondeacetylase 6

HDAC7.....	Histondeacetylase 7
HDAC8.....	Histondeacetylase 8
HDAC9.....	Histondeacetylase 9
HDAC10.....	Histondeacetylase 10
HDAC11.....	Histondeacetylase 11
HE.....	Hämatoxylin-Eosin
HEK.....	human embryonic kidney
HeLa-cells.....	Henrietta Lacks cells
HSB-2.....	spezifische humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie
i.V.....	im Vergleich
DK.....	Dentinkaries
IHC.....	Immunhistochemie
KLF4.....	Krüppel-like factor 4
KLF6.....	Krüppel-like factor 6
KLF10.....	Krüppel-like factor 10
M.....	molar(e)
mg.....	Milligramm
MGV.....	mean grey value
ml.....	Milliliter
modif.....	modifiziert(e)
NGS.....	normal goat serum
o.....	Odontoblastenschicht
o.äz.....	Odontoblasten-ähnliche Zellen
o.g.....	oben genannt
OD.....	Odontoblast
P.....	Peroxidase
pAk.....	primärer Antikörper
PB.....	phosphate buffer
PBS.....	phosphate-buffered saline
pd.....	Prädentin
PFA.....	Paraformaldehyd
Prim.....	Primär(er)
rptd.....	reparatives Tertiärdentin
rtd.....	reaktives Tertiärdentin
RUNX2.....	runt-related transcription factor 2
sAK.....	sekundärer Antikörper
S.B.....	Sebastian Breyer
sc.....	Santa Cruz

sd.....	Sekundärdentin
Sek.....	Sekundär(er)
Sirt1.....	Sirtuin-1
Sirt7.....	Sirtuin-7
SOX2.....	sex determining region y (SRY)-box 2
SOX9.....	sex determining region y (SRY)-box 9
Sp7.....	Sp7 transcription factor
SZ.....	Stamzelle(n)
TB.....	tris buffer
TBS.....	tris-buffered saline
Tris-HCL.....	Tris-Hydrochlorid
TWIST1.....	twist-related protein 1
usw.....	und so weiter
Y.K.....	Yüksel Korkmaz
zaz.....	zellarme Zone
z.B.....	zum Beispiel
zrz.....	zellreiche Zone
µg.....	Mikrogramm
µl.....	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der ABC-Methode.....	12
Abbildung 2: Die gesunde Dentin-Pulpa-Einheit in HE-Färbung.....	15
Abbildung 3: Die entzündete Dentin-Pulpa-Einheit in HE-Färbung.....	16
Abbildung 4: Expression von HDAC6 und HDAC10 in Odontoblasten der gesunde Dentin-Pulpa-Einheit eines humanen Molaren.....	18
Abbildung 5: Expression von HDAC6 und HDAC10 in entzündeten Odontoblasten der kariös-veränderte Dentin-Pulpa-Einheit eines humanen Molaren.....	20
Abbildung 6: Expression von HDAC6 und HDAC10 in Odontoblastenfortsätzen der kariös-veränderte Dentin-Pulpa-Einheit eines humanen Molaren.....	21
Abbildung 7: Die Expression der HDAC6 und HDAC10 in den Odontoblasten der gesunden und kariösen humanen Molaren.....	22

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezeichnung und Konzentration der primären- und sekundären Antikörper.....	10
Tabelle 2: Mittlere Grauwerte der jeweiligen untersuchten Proben.....	36

1 Einleitung

Die Dentin-Pulpa-Einheit ist zellreich und enthält Odontoblasten (OD) und deren Fortsätze, die sich innerhalb der Dentintubuli bis hin zu der Schmelz-Dentin-Grenze erstrecken, pulpale Fibroblasten, Nervenfasern (mit peripheren Gliazellen: Schwannzellen), Blutgefäße (mit Endothelzellen und Muralzellen) und pulpale mesenchymale Stammzellen. Da die pulpale Stammzellen aus der Neuralleiste abstammen, werden diese Zellen als „ektomesenchymale Stammzellen“ bezeichnet. Durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen spielen die Zellen der Dentin-Pulpa-Einheit bei der Hämostase dieser Einheit unter physiologischen Bedingungen und bei der Regeneration/Reparatur unter kariösen Bedingungen eine entscheidende Rolle. (Galler et al., 2021, Farges et al., 2015, Ruch et al., 1995, Gronthos et al., 2000)

Um seiner Kaufunktion gerecht zu werden, entwickelt das dentale Organ Hartsubstanzen wie Schmelz, Dentin, Zement und Alveolarknochen. Während seiner Entwicklung werden auch Weichgewebe wie die Pulpa und das parodontale Ligament gebildet. Durch das Weichgewebe wird sowohl die Funktion der gebildeten Hartsubstanzen unter physiologischen Bedingungen in der Hämostase als auch die Regeneration/Reparatur derselbigen gewährleistet. (Smith et al., 1995, Sloan and Smith, 2007, Neves and Sharpe, 2018, Korkmaz et al., 2022)

Die regulatorischen Mechanismen sind für die Regeneration und Reparatur der Hartsubstanzen unter pathologischen Bedingungen von großer Bedeutung, da dadurch neue Therapieansätze für die Regeneration/Reparatur des dentalen Organs entwickelt werden können. Ein regulatorisch wichtiger Mechanismus stellt hierbei die Epigenetik dar. Da die Bearbeitung und Untersuchung von Hartgewebe schwierig durchzuführen ist, liegen bisher wenige Erkenntnisse darüber vor, wie die Funktionen der OD unter physiologischen und pathologischen Bedingungen epigenetisch reguliert werden. Darüber hinaus ist bisher unklar, ob die Histondeacetylasen (HDACs) der Gruppe IIb (HDAC6 und HDAC10) in gesunden und entzündeten OD (nach einer kariösen Läsion) exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher diesen Fragestellungen nachgegangen.

1.1 Die Rolle der Odontoblasten bei der Dentinmatrixbildung unter physiologischen und pathologischen Bedingungen

Die OD bilden während der Zahnentwicklung das Primärdentin. Die terminal differenzierten OD der adulten dentalen Pulpa sind die Zellen, die unter physiologischen Bedingungen das Sekundärdentin bilden (Goldberg et al., 2011, Bleicher, 2014). Unter kariösen Bedingungen bilden die OD das Tertiärdentin (Smith et al., 1995, Tucker and Sharpe, 2004). Nach einer kariösen Läsion im Dentin bilden die OD das reaktive Tertiärdentin (Farges et al., 2015, Neves and Sharpe, 2018). Die OD können nekrotisch zugrunde gehen, wenn tief kariöse Läsionen die dentale Pulpa erreichen und in der Pulpa eine starke Entzündung verursachen. Dann können die pulpale Stammzellen sich zu den OD-ähnlichen Zellen differenzieren, um reparatives Tertiärdentin zu bilden (Sloan and Smith, 2007, Neves and Sharpe, 2018, Korkmaz et al., 2022).

1.2 Die Transkriptionsfaktoren, die in Odontoblasten die Dentinmatrixbildung induzieren

In Säugetieren gibt es vier Arten von Hartsubstanzen: Den Schmelz, das Dentin, den Wurzelzement und den Knochen. Drei dieser Substanzen finden sich im dentalen Organ (Schmelz, Dentin und Zement). Der Schmelz wird von den Ameloblasten (aus dem inneren Schmelzepithel) gebildet. Nach der Eruption des Zahnes gehen alle Ameloblasten durch den programmierten Zelltod (Apoptose) zu Grunde. Aus diesem Grund ist eine Regeneration des

Zahnschmelzes nicht möglich. Während OD (aus den pulpalen Ektomesenchymzellen) das Dentin bilden, bilden die Zementoblasten (aus den Dentalfollikelzellen) den Wurzelzement. Der Alveolarknochen wird durch Osteoblasten (aus den Dentalfollikelzellen) und das parodontale Ligament durch die Fibroblasten (aus den Dentalfollikelzellen) gebildet. Unter pathologischen Bedingungen existieren Regenerations- und Reparaturprozesse für Dentin, Zement und Alveolarknochen. (Goldberg et al., 2011, Bleicher, 2014, Lacruz et al., 2017, Grzesik and Narayanan, 2002, Sodek and McKee, 2000)

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die nach der Translation im Zytoplasma in den Zellkern wandern und im Nukleus an spezifische DNA-Sequenzen der Zielgene binden, um die Expression dieser Zielgene zu regulieren (Spitz and Furlong, 2012, Lambert et al., 2018). In Zellen, die während der embryonalen Entwicklung Hartschmelze bilden, oder die Hartschmelze unter pathologischen Bedingungen reparieren/regenerieren, regulieren Transkriptionsfaktoren die Zell-spezifische extrazelluläre Matrixbildung.

In humanen OD kodiert das Dmp1-Gen für das extrazelluläre Protein Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) (Qin et al., 2003, Qin et al., 2007, Sun et al., 2011). Das Dspp-Gen kodiert für ein einzelnes Protein DSPP, das durch proteolytische Bearbeitung in DSP und DPP gespalten wird (MacDougall et al., 1997, Suzuki et al., 2009, Zhu et al., 2012). Die Regulation der Expressionen von Dmp1- und Dspp-Genen in OD wird von den Transkriptionsfaktoren RUNX2 (Chen et al., 2009, Li et al., 2011, Qin et al., 2021), Osterix (Chen et al., 2009, Yang et al., 2014, Zhang et al., 2015), Krüppel-like factor 4 (KLF4) (Lin et al., 2013), KLF6 und KLF10 (Chen et al., 2016, Chen et al., 2021), Twist1 (Galler et al., 2007, Meng et al., 2015), Bone Morphogenetic Protein-9 (BMP-9) (Wang et al., 2014, Omi et al., 2020), SOX9 (Wang et al., 2014), SOX2 (Sanz-Navarro et al., 2018), Specificity Protein 7 (Sp7) (Bae et al., 2018), cAMP-responsive element binding protein (CREB) (Klinz et al., 2012b) und von Dlx3 (Choi et al., 2010, Zhao et al., 2000, Duverger et al., 2012) reguliert.

1.3 Die strukturelle Ordnung des Chromatins und der Histonproteine

Um die Expression ihres Zielgens zu induzieren, müssen Transkriptionsfaktoren im Chromosom an die DNA-Sequenz ihres Zielgens binden. Die Gene befinden sich in den Chromosomen in einer Verpackungsordnung. In dieser Ordnung kodiert das Gen, das aus einem Abschnitt der DNA-Sequenz besteht, das Protein. Die komprimierte Verpackung der Gene im Zellkern der Säugetiere wird von Proteinen, die als Histone bezeichnet werden, ermöglicht (Grunstein, 1997, Shahbazian and Grunstein, 2007).

1.3.1 Der Aufbau der Histone

Die Histone werden als Kern-Histone und Linker-Histone in zwei Gruppe eingeteilt (Jenuwein and Allis, 2001, Lee et al., 2010). Kern-Histone werden als H2A, H2B, H3, H4 bezeichnet. Linker-Histone werden als H1 und H5 beschrieben.

Die Histone bestehen aus positiv geladenen Lysin- und Arginin-Aminosäureresten. Daher haben diese Proteine eine positive Ladung. Durch die positive Ladung ziehen die Histone die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA an. Dies induziert eine starke elektrostatische Bindung zwischen DNA und Histonen (Sabari et al., 2017, Shahbazian and Grunstein, 2007).

1.3.2 Der Aufbau eines Chromatins

In einem Chromatin bilden die Histonproteine das Nukleosom. Ein Nukleosom besteht aus etwa 147 bp einer DNA-Sequenz, die um ein Oktamer aus vier Kernhistonen gewickelt ist. Die acht Histonproteine bilden ein Histonoktamer, das aus je zwei Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 besteht. Um im Zellkern einen Platz mit einem Durchmesser von 10 µm finden zu können, wird die zwei Meter lange DNA-Sequenz durch die Windung um den Histonoktamer im Zellkern der Säugetiere räumlich komprimiert (Andrews and Luger, 2011, McGinty and Tan, 2015). Das Linker-Histon-Protein 1 ist ein Bestandteil des Nukleosoms, welches die um den Histonkern gewickelte DNA an ihrem Platz fixiert und mit dem Linker-Histon-Protein 5 zur strukturellen Ordnung des Chromatins beitragen kann (Fan and Roberts, 2006, Fyodorov et al., 2018).

1.3.3 Die Steuerung der Histone durch die Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs)

Die Histone haben eine C-terminale und eine N-terminale Domäne (Shahbazian and Grunstein, 2007, Marmorstein and Zhou, 2014). Die basische N-terminale Domäne der Histonproteine unterliegt reversiblen posttranslationalen Modifikationen (Methylierung, Demethylierung, Acetylierung, Deacetylierung, Ubiquitylierung, Deubiquitynylierung, Phosphorylierung und Dephosphorylierung) an spezifischen Resten, die die Transkription eines Gens regulieren (Yang and Seto, 2008, Chi et al., 2010, Audia and Campbell, 2016, Allis and Jenuwein, 2016). Die Histonacetyltransferasen (HATs) sind die Enzyme, die eine Acetylgruppe in die Lysin-Aminosäurereste der Histonarme anfügen. Dies führt zu einer Reduzierung der positiven Ladung in Histonen. Eine Abnahme der elektrostatischen Bindung zwischen Histonen und den Phosphatgruppen der DNA macht die DNA für die Transkriptionsfaktoren zugänglich.

Histondeacetylasen (HDACs) sind die Enzyme, die eine Acetylgruppe an den Lysin-Aminosäureresten der Histonarme entfernen. Dies führt zu einer Zunahme der positiven Ladung in den Histonen. Eine Zunahme der elektrostatischen Bindung zwischen Histonen und den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA erhöht die Bindung zwischen DNA und Histonen, was die Transkription der Gene unterdrückt, indem die verpackte DNA für die Transkriptionsfaktoren unzugänglich wird (Wu and Grunstein, 2000, Shahbazian and Grunstein, 2007, Kazantsev and Thompson, 2008, Marmorstein and Zhou, 2014).

1.4 Die Klassifikation der Histondeacetylasen (HDACs)

Die HDACs werden aufgrund ihrer Struktur in vier Klassen eingeteilt: HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8 bilden Klasse I der HDACs. Klasse II der HDACs umfasst HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 und HDAC10 (Gao et al., 2002, Haberland et al., 2009, Falkenberg and Johnstone, 2014, Houtkooper et al., 2012, Seto and Yoshida, 2014, Chen et al., 2015). Die Klasse II der HDACs wird weiter als Klasse IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9) und Klasse IIb (HDAC6, HDAC10) in zwei Subklassen unterteilt (Yang and Grégoire, 2005, Lahm et al., 2007, Parra and Verdin, 2010). Sirt1-Sirt7 bilden die Klasse III der HDACs (Kumar and Lombard, 2017, Zhu et al., 2019), während HDAC11 zur Klasse IV der HDACs zählt (Zhu et al., 2017, Núñez-Álvarez and Suelves, 2022). Die Klassen I und II der HDACs funktionieren über einen Zink-abhängigen Mechanismus, während die Klasse III der HDACs NAD-abhängig reguliert wird (Imai et al., 2000, Hallows et al., 2006, Haigis and Sinclair, 2010, Du et al., 2011, Chen et al., 2015, Bonkowski and Sinclair, 2016).

2 Ziele der Arbeit

Karies gilt weltweit als eine der häufigsten chronischen Erkrankung des dentalen Organs (Selwitz et al., 2007). Die Odontoblasten (OD) bilden nach einer Karies reaktives Tertiärdentin, um die dentale Pulpa gegen schädliche Mikroorganismen und deren Produkte zu schützen. Um den Mechanismus der reaktiven Tertiärdentinbildung nach einer kariösen Läsion zu verstehen, ist es daher essenziell, die transkriptionelle Regulation der Bildung der Dentinmatrixproteine DMP1 und DSPP in OD unter physiologischen und kariösen Bedingungen zu klären. Die Bindung und Induktion der Expression von Dmp1- und Dspp-Genen durch die Transkriptionsfaktoren in OD hängt von den Acetylierungs- und Deacetylierungszuständen der Histondeacetylasen (HDACs) ab. In OD der gesunden humanen Molaren wurden HDAC2 und HDAC9 mit einer starken Expression und HDAC1, HDAC3 und HDAC4 mit einer schwachen Expression detektiert (Klinz et al., 2012a). Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle von HDACs, die nach einer Karies die Transkription von Dmp1- und Dspp-Gene in OD regulieren können, hin. In gesunden und entzündeten OD sind die Rollen von HDAC6 und HDAC10 unbekannt. In den geplanten Experimenten werden daher die Antworten auf die folgenden Fragen gesucht:

1. **Werden HDAC6 und HDAC10 in Odontoblasten der gesunden Molaren exprimiert?**
2. **Werden HDAC6 und HDAC10 in Odontoblasten der Molaren, die eine kariöse Läsion im Dentin haben, exprimiert?**

In humanen OD wurde bisher die Expression von HDAC6 und HDAC10 nicht untersucht. In OD können HDACs die Acetylgruppen an den Lysinresten der Histone entfernen, um die Transkription der Gene, welche in OD für die Bildung des reaktiven Tertiärdentins nötige extrazelluläre Dentinmatrixproteine herstellen, zu unterdrücken. Die Aktivitäten von HDAC6 und HDAC10 sind hauptsächlich von den subzellulären Lokalisationen und den pathologischen Zuständen der Zellen abhängig. HDAC6 ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (Verdel et al., 2000, Bertos et al., 2004, Cabrero et al., 2006, Gao et al., 2007, Schlüter et al., 2019). Im Zytoplasma katalysiert HDAC6 die α -Tubulin-Deacetylierung und fördert somit die Zellmotilität (Gao et al., 2007, Sánchez de Diego et al., 2014). HDAC10 ist sowohl subzellulär im Zytoplasma (Tong et al., 2002, Zhou et al., 2022, Srivastava et al., 2022) als auch im Zellkern lokalisiert (Guardiola and Yao, 2002). Im Zellkern ist HDAC10 in der Lage, die Transkription über einen deacetylaseunabhängigen Mechanismus zu unterdrücken (Guardiola and Yao, 2002). Diese Ergebnisse deuten sowohl auf die nukleäre als auch zytoplasmatische Funktion von HDAC10 hin (Guardiola and Yao, 2002). Es ist zu erwarten, dass HDAC6 und HDAC10 nach einer kariösen Läsion entzündungsabhängig unterschiedlich reguliert werden.

In den geplanten Untersuchungen werden daher die Expressionen von HDAC6 und HDAC10 in OD der gesunden und entzündeten humanen Molaren untersucht. Die vergleichenden Ergebnisse sollen zeigen, ob kariesbedingte Veränderungen in den Expressionen von HDAC6 und HDAC10 vorkommen. Nach der Charakterisierung der gezielten Ergebnisse könnten mit Inhibitoren von HDAC6 (Jiang and Ma, 2022, Tiwari et al., 2022) und HDAC10 (Ibrahim Uba and Yelekçi, 2019, Zeyen et al., 2022) neue Behandlungsstrategien für Karies entwickelt werden (bspw. pharmakologische Nutzung der HDAC-Inhibitoren in Form von Unterfüllungsmaterialien).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Im Rahmen der durchgeführten Studie wurden 32 humane Molaren gesammelt, deren Spender zwischen 17 und 35 Jahren alt waren. Es gab sowohl klinisch gesunde als auch kariös veränderte Zähne (Dentinkaries, ohne Eröffnung der dentalen Pulpa), die aufgrund verschiedenster Indikationen extrahiert worden waren (z.B. wegen retromolaren Engstands). Die Patienten willigten vor dem Eingriff ein, dass Überschussmaterial (z.B. Zähne) im Zuge der indizierten Extraktion für Forschungszwecke genutzt werden darf. Die Zähne wurden in der Poliklinik für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz extrahiert. 19 der Molaren wurden als klinisch kariös, 14 weitere als klinisch gesund eingestuft. Hiervon mussten jedoch 14 der klinisch kariösen und 9 klinisch gesunde Molaren von der Studie ausgeschlossen werden, da diese Zähne Kriterien aufwiesen, die eine Verfälschung der Ergebnisse hätten hervorrufen können (z.B. Pulpengangrän, Pulpennekrose, sterile Entzündung der dentalen Pulpa, Entzündung der dentalen Pulpa ohne kariöse Ursache). Somit wurden 10 Molaren in die Studie einbezogen.

3.1.2 Angesetzte Lösungen

Phosphatpuffer (PB)

Ein Liter der 0,2-molaren Phosphatpuffer-Lösung (Stammlösung) wurde folgendermaßen hergestellt:

Zunächst wurden 28,8 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) [Carl Roth GmbH] und 5,2 g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) [Merck KGaA] abgewogen und in 900 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend durch entsprechende Hinzugabe von Chlorwasserstoffsäure (HCL) und/oder Natriumhydroxid (NaOH) auf einen pH-Wert von 7,2 - 7,4 eingestellt. Es folgte das Auffüllen der entstandenen Lösung mittels destillierten Wassers auf einen Liter.

Diese Stammlösung wurde durch Hinzugabe von destilliertem Wasser (1:1) verdünnt und zu einer 0,1-molaren Lösung mit einem pH-Wert von 7,4 eingestellt. Hierfür wurden erneut die entsprechend benötigten Mengen Chlorwasserstoffsäure (HCL) und/oder Natriumhydroxids (NaOH) beigemischt.

Die nach dem o.g. Protokoll gefertigte Lösung entsprach der benötigten Gebrauchslösung und wurde nach der Herstellung zur Lagerung in einen Kühlschrank verbracht (4°C).

Phosphatpuffer-Natriumchlorid (PBS)

Für die 0,2-molare Stammlösung wurden 28,8 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) [Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland] mit 5,2 g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) [Merck KGaA] und 17,53 g Natriumchlorid (NaCl) gemischt. Die Lösung wurde anschließend durch entsprechende Hinzugabe von Chlorwasserstoffsäure (HCL) und/oder Natriumhydroxid (NaOH) auf einen pH-Wert von 7,2 - 7,4 eingestellt. Es folgte das Auffüllen der entstandenen Lösung mittels destillierten Wassers auf einen Liter.

Die 0,1-molare Gebrauchslösung wurde durch eine 1:1-Verdünnung der Stammlösung mit destilliertem Wasser erreicht. Der gewünschte pH-Wert von 7,4 wurde durch die Zugabe von

der entsprechend benötigten Mengen Chlorwasserstoffsäure (HCL) und/oder Natriumhydroxids (NaOH) erreicht.

Die nach dem o.g. Protokoll gefertigte Lösung entsprach der benötigten Gebrauchslösung und wurde nach der Herstellung zur Lagerung in einen Kühlschrank verbracht (4°C).

Fixierlösung

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

Die Herstellung der modif. Zamboni-Lösung erfolgte unter einem Abzug. Zunächst wurden 40 g Paraformaldehyd (PFA) [Roth] in 400 ml destilliertem Wasser, unter Zugabe von 15 ml 10%igem Natriumhydroxid (NaOH), auf einem Heizmagnetrührer (75°C) gelöst. Durch das Natriumhydroxid (NaOH) wurde der Prozess der Auflösung des Paraformaldehyds (PFA) beschleunigt. Nach der erfolgreichen Lösung des PFAs (die Lösung klarte sichtbar auf) folgte eine Filtration der PFA-Lösung mittels Filterpapiers in einem Messzylinder und wurde dort bis zur Abkühlung belassen. Folgend wurden 500 ml einer 0,2-molaren PBS-Lösung (Gebrauchslösung) herangezogen und mit der, nun auf Zimmertemperatur temperierten, PFA-Lösung gemischt. Eine 0,2%ige Pikrinsäure (TNP) [Fluka] wurde hinzugegeben und die entstandene Lösung mit entsprechend benötigten destillierten Wassers auf 1000 ml aufgefüllt. Die entstandene Lösung mit dem pH-Wert 7,35 wurde anschließend, bis zur Verwendung, in einen Kühlschrank (4°C) verbracht.

Entkalkungslösung

Für die Entkalkungslösung wurden 150,885 ml Ameisensäure (CH₂O₂) [Carl Roth] mit 849,115 ml der angesetzten 0,1-molaren PB-Lösung (Gebrauchslösung) gemischt. Die entstandene Lösung wurde anschließend bis zu Verwendung in einen Kühlschrank (4°C) eingelagert.

Trispuffer (TB)

Für die 0,5-molare Stammlösung wurden 60,57 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris; C₄H₁₁NO₃) [Carl Roth] in 500 ml destilliertem Wasser gelöst. Um den pH-Wert auf den gewünschten Wert von 7,6 zu bringen, wurden 150-250 ml einer 1%igen Chlorwasserstoffsäure (HCL) zugegeben. Zuletzt wurde die Lösung mittels destillierten Wassers auf 1000 ml aufgefüllt und der pH-Wert (7,6) erneut kontrolliert.

Diese Lösung stellte die Stammlösung für die TBS-Lösung und die Tris-HCl-Lösung dar.

Trispuffer-NaCl (TBS)

Für die 0,05-molare Gebrauchslösung wurden 8,76 g Natrium-Chlorid (NaCl) in 800 ml destilliertem Wasser und 100 ml der 0,5-molaren angesetzten TB-Lösung (Stammlösung) gelöst. Der gewünschte pH-Wert von 7,6 wurde kontrolliert, die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und hinsichtlich des pH-Werts (7,6) geprüft.

Trispuffer-HCL (Tris-HCL)

Für die 0,05-molare Gebrauchslösung wurden 100 ml der 0,5-molaren angesetzten TB-Lösung mit 900 ml destilliertem Wasser gemischt. Es wurde der gewünschte pH-Wert von 7,6 überprüft. Diese Lösung wurde nur bei der Herstellung der DAB-Substratlösung verwendet.

Kryoprotektionslösung

Für 100 ml der Kryoprotektionslösung wurden 30 g Saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) in Pulverform in 70 ml der angesetzten 0,1-molaren PBS-Lösung (Gebrauchslösung) gelöst. Der pH-Wert wurde kontrolliert und auf 7,4 eingestellt.

H₂O₂ Lösung (0,3 %)

Für die 0,3%ige Wasserstoff-Peroxid-Lösung wurden 10 µl 30%igen Wasserstoff-Peroxids (H_2O_2) mit 990 µl der angesetzten 0,05-molaren TBS-Lösung gemischt.

Triton[®] X-100 (0,25 %)

Für 100 ml der 0,25%igen Triton[®] X-100-Lösung wurden 0,25 ml der 100%igen Triton[®] X-100-Lösung mit 99,75 ml der angesetzten 0,05-molaren TBS-Lösung verdünnt. Die hergestellte Lösung wurde anschließend bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Blockierungspuffer (2 % BSA + 5 % NGS + 0,05 M TBS-Lösung)

Für den Blockierungspuffer wurden 0,95 ml der angesetzten 0,05-molaren TBS-Lösung mit 20 mg 2%igen Bovinen Serumalbumins (BSA) und 0,05 ml 5%igen normal goat serums (NGS) gemischt.

Antikörper-Verdünnungspuffer

Für den Antikörper-Verdünnungspuffer wurden 970 µl der angesetzten 0,05-molaren TBS-Lösung mit 30 µl 5%igen normal goat serums (NGS) gemischt.

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

Für den ABC-Komplex wurden in 6 ml der angesetzten 0,05-molaren TBS-Lösung je ein Tropfen (\approx 50 µl) der Lösung A und B gegeben.

Nickelsulfatlösung

Für 1 ml der Nickelsulfatlösung wurden 13 µg Nickelsulfat ($NiSO_4$) in 987 µl destilliertem Wasser aufgelöst und lichtgeschützt, in Aliquots (von jeweils 50 µl) bei -20°C aufbewahrt.

DAB-Lösung (Diaminobenzidin-Lösung)

Für die DAB-Lösung wurde eine Tablette (10 mg) Diaminopimelinsäure (DAP; $C_7H_{14}N_2O_4$) [Sigma] in einer Lösung aus 50 ml der angesetzten 0,05-molaren Tris-HCL-Lösung gelöst. Diese Lösung wurde anschließend filtriert und mit 6,5 µl 30%igem Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) und 30 µl Nickelsulfatlösung gemischt. Die Lösung wurde nach zwei Minuten verwendet und musste lichtgeschützt angesetzt und gelagert werden.

3.2 Methodik – Vorbereitungen für die Immunhistochemie (IHC)

3.2.1 Präparation und Fixation der humanen Molaren

Nach der erfolgten Extraktion wurden die Zähne sofort in ein mit Fixierlösung (modif. Zamboni-Lösung) gefülltes Falcon-Röhrchen verbracht. Dieses wurde mit einer anonymisierten Patientennummer, Datum der Extraktion, Zahnnummer und der jeweiligen klinischen Pathogenese versehen. Das Falcon-Röhrchen mit der darin enthaltenen Fixierlösung befand sich stets in einem Kühlschrank bei 4°C und wurde nur zum Zwecke der Einbringung des Zahnes in das Röhrchen, oder für den Transport in einer Kühlbox zur Anatomie der Johannes Gutenberg-Universität aus diesem entfernt. Der Abtransport in die Anatomie erfolgte jeweils drei Tage nach der Extraktion.

3.2.2 Entkalkung, Kryoprotektion und Einbettung

In der Anatomie angekommen, wurde die Fixativ-Lösung fachgerecht (unter einem Abzug) entsorgt und die angesetzte Entkalkungslösung (Ameisensäure in 0,1 M PB) in die Röhrchen zu den Zähnen gegeben. Der Prozess der Entkalkung erstreckte sich über drei Wochen, in denen die Lösung zweimal in der Woche gewechselt werden musste. Nach dem abgeschlossenen Entkalkungsvorgang wurde die Entkalkungslösung durch die 0,1-molare PBS-Lösung ersetzt (Gebrauchslösung), um die Reste der Entkalkungslösung aus den Zähnen zu waschen. Hierfür verblieben die Zähne 72 Stunden im Kühlschrank (4°C) in der PBS-Lösung, welche täglich gewechselt wurde.

Für die Kryoprotektion wurden die zu untersuchenden Zähne aus der PBS-Lösung in eine angesetzte Kryoprotektionslösung (30 % Saccharose in 0,1 M PBS) verbracht, in der die Molaren über fünf Tage lagerten. Durch diesen Prozess wurde den Proben die Feuchtigkeit entzogen, um eine Kristallbildung beim Kühlen zu verhindern, die eine Untersuchung unter dem Mikroskop behindert hätte.

Für die Einbettung wurden die Zähne in eine speziell angefertigte Aluminiumform eingebracht, an der die Daten des jeweiligen Zahnes angebracht wurden. Diese Formen wurden zunächst mit Tissue-Tek® O.C.T. Compound [Sakura] befüllt. Anschließend wurde in jede Form jeweils ein Zahn eingebracht, wobei die räumliche Orientierung: „mesial zu distal“, stets streng eingehalten wurde. Durch die so gewählte Schnittebene gab es eine größtmögliche Menge an Schnitten mit vorhandener Kronenpulpa. Nach dem Einbringen des Zahnes wurde die Form verschlossen und für mindestens eine Minute in flüssigen Stickstoff (-196°C) eingebracht, bis der Block schockgefroren war.

Für die Lagerung wurden die Aluminiumformen bis zum Schneiden der Proben in einen speziellen Tiefkühlschrank mit einer Temperatur von -82°C verbracht. Im Tiefkühlschrank wurden die Proben in verschiedene Kartons sortiert, je nach Pathogenese des jeweiligen Zahnes. Um die Qualität der Proben zu gewährleisten, wurde streng drauf geachtet, dass die eingebetteten Zähne während der Umlagerung aus dem Stickstoffgefäß in den Kühlschrank nicht länger als fünf Minuten der Raumtemperatur ausgesetzt waren. Die Gewebeproben wurden für mindestens 7 Tage in dem o.g. Tiefkühlschrank belassen.

3.2.3 Anfertigen und Aufbewahren der Schnitte

Vor dem Schneiden wurden 24er Wellplatten [Orange Scientific] nummeriert, mit 0,1-molarer PBS-Lösung gefüllt (Gebrauchslösung) und in einem Kühlschrank (4°C) bis zur Einbringung der Schnitte gelagert. Die eingebetteten Zähne wurden aus dem Kühlschrank sofort, ohne den Zahn lange der Zimmertemperatur auszusetzen, in den Kryostaten eingebracht, der bereits

seit mindestens 24h eingeschaltet war. Nach der Verbringung der Proben in den Kryostaten wurde vier Stunden gewartet, bis die Blöcke die Temperatur von -20°C erreicht hatten.

Die Aluminiumform wurde mitsamt des darauf aufgebracht Klebestickers mit den Daten des Zahnes aus dem Kryostaten entfernt, und der Aufkleber in ein Protokollheft eingepflegt, um eine Zuordnung der Schnitte zu der jeweiligen Pathogenese zu gewährleisten. Unter dem Aufkleber wurde das jeweilige Schneidedatum dokumentiert.

Der nun ausgebettete, im Kryostaten liegende Zahn wurde mittels Tissue-Tek® O.C.T. Compound [Sakura] auf der Objektplatte fixiert und nach dem erfolgten Aushärtevorgang in den Objektkopf eingespannt. Es wurde streng auf einen festen Sitz geachtet, um die Schnittqualität zu maximieren. Anschließend wurde der Zahn bis zur punktförmigen Eröffnung der Pulpa zügig geschnitten. Nach dem Erreichen der Pulpa, wurden im Folgenden $30\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte per Handdrehung angefertigt. Dabei wurde auf eine gleichmäßige, langsam- bis mittelschnelle Bewegung geachtet, um ein homogenes Schnittbild zu gewährleisten. Nach jedem erfolgten Schnitt wurde dieser vorsichtig mit Hilfe eines Pinsels in die mit 0,1-molarer PBS-Lösung gefüllten Wellplatten-Einsenkung gegeben. Die Wellplatten wurden mit der jeweiligen Patientenummer versehen, um eine Zuordnung zu ermöglichen.

Der gesamte Schneidvorgang wurde sorgfältig und zügig vollzogen, da ein zu langer Verbleib der PBS-Lösung im Kryostaten zu einem Gefrieren der Lösung hätte führen können. Die Schnitte wären durch solch ein Ereignis nicht mehr verwertbar gewesen, da die sich so bildenden Kristalle sämtliche Zellstrukturen zerschnitten hätten.

Nach dem Einbringen des letzten Schnittes auf der Wellplatte, wurde diese sofort in den Kühlschrank (4°C) verbracht. Eine neue Wellplatte wurde aus dem Kühlschrank in den Kryostaten eingebracht und der zuvor geschnittene Zahn weiter geschnitten, bis das Ende der dentalen Pulpa erreicht wurde. Zu dem Zeitpunkt, zu dem das jeweilige Ende erreicht worden war, wurde ein weiterer eingebetteter Zahn aus dem Kühlschrank in den Kryostaten verbracht und das oben geschilderte Procedere erneut vollzogen.

3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und Charakterisierung der Schnitte

Vor dem Färbeprozess wurden diejenigen Schnitte zunächst ausgewählt, die sich auf der jeweiligen Wellplatte an erster Stelle befanden. Der jeweilige Schnitt wurde aus der 0,1-molaren PBS-Lösung entnommen und in einer mit destilliertem Wasser gefüllten Küvette auf den zuvor beschrifteten, mit poly-L-Lysin beschichteten, Objektträger verbracht. Dieser wurde mit der Patientenummer, der Schnittnummer und dem aktuellen Datum versehen. Es wurde besonders darauf geachtet, dass sich der Schnitt an keiner Stelle überlagert, um eine höchstmögliche Qualität für den folgenden Befundungsprozess gewährleisten zu können. Nach der Entnahme des Objektträgers aus der mit destilliertem Wasser gefüllten Küvette, wurde dieser auf ein Tuch gelegt und trocknen gelassen. Dieser Vorgang wurde für jeden ersten Schnitt einer Wellplatte des jeweiligen Patientenzahnes wiederholt.

Nach der Ruhezeit wurde das Färbeprotokoll angewandt: Zunächst wurden die Objektträger auf einem speziellen Träger für fünf Minuten in destilliertes Wasser gegeben. Anschließend folgte der erste Färbeprozess aller basophilen Zellanteile für zehn Minuten in der Hämatoxylin-Lösung (50 g Kalium/Ammonium, 0,2 g NaIO_3 , 1 g Zitronensäure und 1000 ml destilliertes Wasser) mit zwei folgenden Waschvorgängen für jeweils fünf Minuten in mit warmem Wasser gefüllten Küvetten. Durch den Waschvorgang wurde der pH-Wert erhöht und führte dadurch zu einer intensiveren Färbung der Schnitte. Die zweite Färbung erfolgte nach zehn Minuten in einer mit Eosin gefüllten Küvette. Dadurch wurden alle azidophilen Zellanteile angefärbt. Es erfolgte nun eine fünfsekündige Einbringung in destilliertes Wasser mit anschließender Entwässerung in unterschiedlich konzentrierten Ethanol-Lösungen: 10 Sekunden Ethanol (50 %), 15 Sekunden Ethanol (70 %), 60 Sekunden Ethanol (80 %), 5 Minuten Ethanol (90 %),

5 Minuten Ethanol I (100 %) und 5 Minuten Ethanol II (100 %). Nach der Ethanol-Entwässerung folgte die Klärung der Schnitte in 2 Küvetten mit Xylol, in die der Träger für jeweils drei Minuten eingebracht wurde.

Nach den erfolgten Färbeschritten wurden die jeweiligen Objektträger aus der Xylol-Küvette mittels einer Pinzette entfernt und die gefärbten Schnitte mit Entellan new [Sigma-Aldrich] benetzt. Nun wurde jeweils ein Deckglas vorsichtig aufgebracht, wobei auf die Vermeidung von möglichen Lufteinschlüssen geachtet wurde. Der Überschuss der Entellan-Lösung wurde mit einem Tuch aufgefangen und die einzelnen Schnitte zum Trocknen beiseitegelegt.

Für die Klassifizierung wurde somit jeder 24. Schnitt mit HE-Färbung gefärbt und folgend lichtmikroskopisch auf etwaige Pathologien untersucht, um eine diagnostische Aussage über den Gesundheitszustand des Zahnes treffen zu können. Im Rahmen der Untersuchung wurden Dentin und Pulpa berücksichtigt, ebenso das mögliche Vorhandensein von Vakuolen in der OD-Schicht. Die Anwesenheit von Tertiärdentin deutet, genau wie die Präsenz von Vakuolen innerhalb der OD-Schicht, auf eine vorliegende Pathologie (bspw. eine bis in das Dentin reichende Karies) hin. Die auf diesem Weg gestellten Diagnosen wurden notiert und die Präparate in einen Kasten einsortiert.

3.4 Methodik der Immunhistochemie (IHC)

3.4.1 Vorbereitung für die Immunhistochemie

Im Rahmen der Vorbereitung für die IHC wurden 12er-Wellplatten mit den jeweiligen Schnittnummern der zu untersuchenden Schnitten markiert. Anschließend wurden die Wellplatten mit 5 ml 0,1 M PBS-Lösung aufgefüllt. Die Schnitte wurden von den 24er-Wellplatten mittels eines Pinsels vorsichtig auf die mit PBS-Lösung gefüllten 12er-Wellplatten gemäß der vorherigen Markierung übertragen. Nach erfolgtem Übertrag wurden die Schnitte erneut in den Kühlschrank (4°C) verbracht.

Die IHC fand innerhalb einer Woche statt, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern.

3.4.2 Die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen HDAC6 und HDAC10

Die folgenden Antikörper wurden im Rahmen der Dissertationsarbeit verwendet:

Tabelle 1: Bezeichnung und Konzentration der primären- und sekundären Antikörper.

Primärer Antikörper	Verdünnung (prim. AK)	Sekundärer Antikörper	Verdünnung (sek. AK)
mouse monoclonal antibody (HDAC6; Klon: D-11; sc-28386) [Santa Cruz Biotechnology, Inc.]	1:500	goat-anti-mouse IgG [Vector, California, US]	1:500
mouse monoclonal antibody (HDAC10; Klon: F-4; sc-376121) [Santa Cruz Biotechnology, Inc.]	1:500	goat-anti-mouse IgG [Vector, California, US]	1:500

Die Spezifität der monoklonalen Maus-Antikörper gegen humane HDAC6 (Gradilone et al., 2014, Nakashima et al., 2015) und humane HDAC10 (Dose et al., 2016, Fan et al., 2021) wurde mittels Westernblot-Methode dargestellt.

3.4.3 Anfertigung der Verdünnungsreihen

Um eine optimale immunhistochemische Färbintensität mit reduzierter Hintergrundfärbung zu erhalten, wurde eine Verdünnungsreihe für die primären Antikörper (pAK) angefertigt. So wurde die optimale Verdünnung der pAK bestimmt, in der die Hintergrundfärbung nicht dominiert und gleichzeitig eine gute Färbung der OD sichtbar ist.

Hierfür wurden die Konzentrationen 1:500, 1:800, 1:1000 und 1:2000 auf einer 12er-Wellplatte jeweils für den pAK der HDAC6 und HDAC10 getestet. Zusätzlich wurde eine Kontrolle angefertigt. Die Verdünnung von 1:500 wurde als optimal befunden, notiert und in den weiteren Untersuchungen verwendet.

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

Um die zu untersuchenden Antigene mit Hilfe der spezifischen Antikörper (AK) nachzuweisen, wurde die immunhistochemische ABC-Methode angewandt: Zunächst wurden die 12er-Wellplatten mitsamt der Schnitte aus dem Kühlschrank entnommen, die alte Lösung mit einer Pipette entnommen und 1 ml 0,05 M TBS-Lösung zugegeben. Es erfolgte eine Standzeit von 15 Minuten auf einem Rüttler, um die Schnitte zu waschen. Der o.g. Waschvorgang wurde anschließend wiederholt. Die Spüllösung wurde entnommen und die Schnitte mit 1 ml der zuvor angesetzten Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt. Es folgte ein zwanzigminütiger Rüttelvorgang im Dunkeln. Anschließend wurden die Schnitte erneut nach dem o.g. Waschvorgang zweimal für 5 Minuten gewaschen. Es schloss sich die dreißigminütige Behandlung der Schnitte mit 1 ml der Triton[®] X-100-Lösung (0,25 %) [Sigma-Aldrich] auf einem Rüttler an, gefolgt von einem erneuten doppelten Waschvorgang (für jeweils 5 Minuten). Nun wurde 1 ml des Blockierungspuffers (2%iges bovine serum albumin (BSA) [Sigma-Aldrich] und 5%iges normal goat serum (NGS) [Vector Laboratiers]) für 30 Minuten auf die Schnitte gegeben und die Wellplatte so erneut auf den Rüttler gestellt. Bereits während der letzten 10 Minuten wurden die primären AK (monoklonale Maus-Antikörper [Santa Cruz]) in 0,05 M TBS-Lösung, gemäß der während der Verdünnungsreihe ermittelten optimalen Verdünnung (1:500), verdünnt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper versetzt (mit Ausnahme der Kontrolle).

Die behandelten Schnitte wurden für 24 Stunden auf einem Rüttler in den Kühlschrank (4°C) verbracht und am folgenden Tag entsprechend weiterbehandelt:

Die Wellplatten mit den Schnitten wurden aus dem Kühlschrank entnommen und jeweils zweimal für 15 Minuten mit 0,05 M TBS-Lösung auf einem Rüttler gewaschen. Während des letzten Waschvorgangs wurde der sekundärer AK vorbereitet, indem er mit 0,05 M TBS-Lösung verdünnt wurde (1:500). Es folgte die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Anschließend wurden die Zahnschnitte zweimal für jeweils 15 Minuten in 0,05 M TBS-Lösung gewaschen.

Nun wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex hinzugegeben und unter Lichtausschluss für eine Stunde inkubiert. Erneut erfolgte ein doppelter TBS-Waschvorgang (diesmal im Dunkeln) für 15 Minuten. Um den erfolgten Bindungsvorgang sichtbar zu machen, wurde DAB-Lösung (Diaminobenzidin-Lösung) für 20 Minuten hinzugegeben und die Schnitte anschließend bei Raumtemperatur mit destilliertem Wasser für zweimal 15 Minuten gewaschen. Die Peroxidase wurde durch die Umwandlung von inaktivem DAB in chromogenes DAB angefärbt.

Die jeweiligen Schnitte wurden auf den jeweils beschrifteten, mit poly-L-Lysin beschichteten, Objektträger verbracht und für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Nun erfolgte die Dehydrierung der Gewebeschnitte für jeweils 4 Minuten in Ethanol-Lösungen aufsteigender Konzentration: 70 %, 80 %, 90 %, 100 % I und 100 % II. Es schloss sich die Klärung der Schnitte in Xylol I und Xylol II an (jeweils 2 Minuten) und die Eindeckung der

Schnitte mittels Entellan. Die eingedeckten Schnitte wurden lichtgeschützt drei Tage getrocknet und danach weiter lichtgeschützt gelagert. Eine lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte nach dem Trocknungsvorgang, frühestens 3 Tage nach erfolgter Eindeckung.

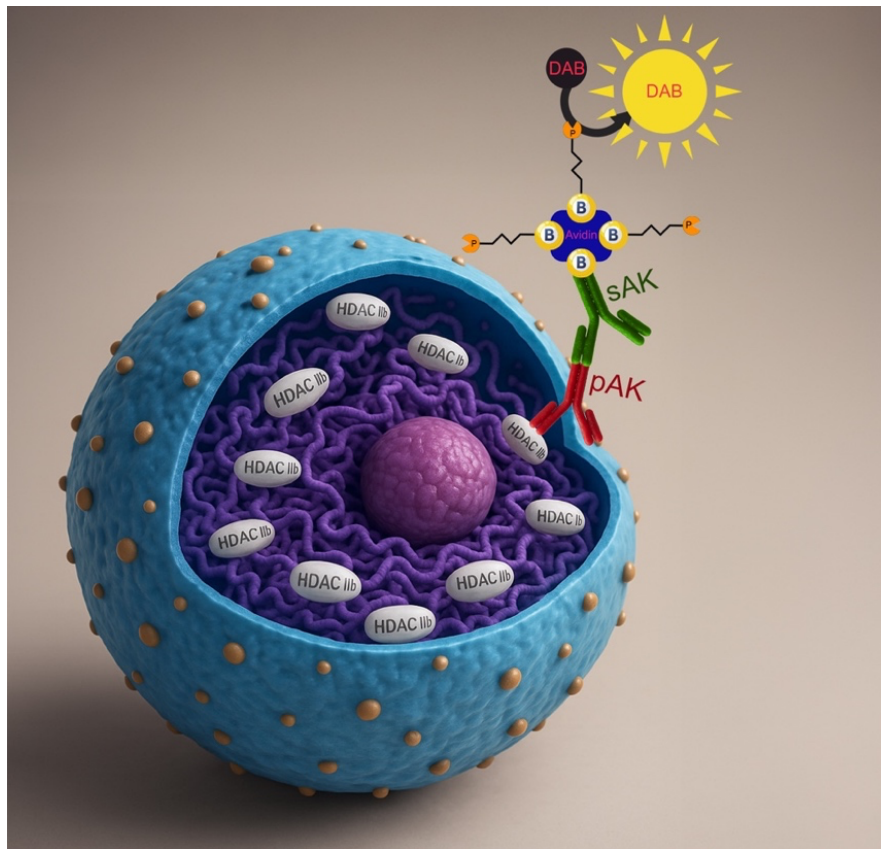


Abbildung 1: Schematische Darstellung der ABC-Methode; (pAK = primärer Antikörper; sAK = sekundärer biotinylierter Antikörper; Avidin + B + P = Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex; DAB = Diaminobenzidin).

[Eigene Komposition; Teile der Abbildung wurden mit Unterstützung eines Bildgenerierungssystems (ChatGPT, Open AI) erstellt].

3.4.5 Untersuchung der immunhistochemisch (IHC-) gefärbten Schnitte

Es folgte zunächst die lichtmikroskopische Untersuchung der IHC-gefärbten Schnitte. Hierzu wurden die jeweiligen Präparate blind von zwei erfahrenen Wissenschaftlern betrachtet (S.B., Y.K.). Dabei wurden zunächst die Kontrollschnitte kontrolliert, um mögliche Fehler in der Inkubation ausschließen zu können. Anschließend wurde die Qualität der Präparate in Hinblick auf die Befundbarkeit beurteilt. Bei guter Qualität und negativer Kontrolle wurde wie folgt vorgegangen:

Zuerst wurde die OD-Schicht begutachtet und insbesondere auf die OD-Zellkerne und das OD-Zytosol geachtet. Bei einer positiven Färbung wurde die jeweilige subjektive Intensität notiert. Anschließend folgte die Betrachtung der OD-Fortsätze. Bei einer positiven Färbung wurde die jeweilige subjektive Intensität notiert.

Die genaue Färbeintensität der OD-Zellkerne wurde im nächsten Schritt bestimmt.

3.5 Quantifizierung der Immunhistochemie (IHC)

3.5.1 Densitometrie der gefärbten IHC-Schnitte

Die jeweiligen IHC-gefärbten Schnitte wurden zwecks Quantifizierung densitometrisch untersucht: Hierzu wurden mit einem Lichtmikroskop [Leica DMRB] und dessen Kamera [Leica] Bilder der gesunden und pathologisch-veränderten OD in 40x-Vergrößerung angefertigt, sowie von zellfreien Bereichen zur Erfassung der Hintergrundfärbung. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Bilder mit gleich eingestellten Parametern an einem Tag gemacht. Die densitometrische Vermessung erfolgte anhand dieser Bilder mit einem entsprechenden Programm [ImageJ]:

Drei Grauwerte der zellfreien Zone des Präparats wurden gemessen und ein entsprechender Mittelwert berechnet (= Hintergrundfärbung). Im Bereich der OD-Schicht wurden ebenfalls drei Grauwerte gemessen, ein Mittelwert berechnet und mit dem der zellfreien Zone verrechnet (Differenz).

Die Ergebnisse wurden statistisch analysiert und ausgewertet.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde durchgeführt, um Unterschiede im mittleren Grauwert (engl.: MGV) der Enzyme (HDAC6 und HDAC10) in Odontoblasten zwischen gesunden Molaren und kariösen Molaren zu untersuchen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Unterschiede im MGV zwischen HDAC6 und HDAC10 bei gesunden und kariösen Molaren beobachtet werden können. Die Normalverteilung wurde visuell anhand von Q-Q-Plots überprüft.

Unabhängige t-Tests wurden berechnet, um die Mittelwerte des MGV der jeweiligen Enzyme (HDAC6, HDAC10) zwischen beiden Gruppen (gesund und kariös) zu vergleichen (z.B. HDAC6 gesund vs. HDAC6 kariös). Die t-Tests wurden einseitig durchgeführt, wobei die Hypothese getestet wurde, dass bei HDAC6 die gesunden Molaren niedrigere MGV-Mittelwerte aufweisen als die kariösen Molaren.

Zusätzlich wurden abhängige t-Tests berechnet, um die Mittelwerte der MGV der jeweiligen Enzyme (HDAC6, HDAC10) innerhalb jeder Gruppe zu vergleichen (z.B. HDAC6 gesund vs. HDAC10 gesund). Die t-Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Alle Analysen wurden mit RStudio (RStudio PBC, Boston, USA, 2024.4.2.764) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,050$ festgelegt.

4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden in Summe 32 humane Molaren gesammelt. Jeder dieser Molaren wurde vollständig geschnitten und Schnitte mit Anteilen der dentalen Pulpa wurden in nummerierte 24er-Wellplatten verbracht, die mit 0,1 M PBS-Lösung (pH 7,4) gefüllt waren. Die Wellplatten wurden anschließend in einem Kühlschrank (4°C) verwahrt. Die immunhistochemische Färbung erfolgte in einem Zeitraum von drei Monaten.

Zunächst wurden die Schnitte mit HE-Färbung gefärbt, um eine histopathologische Diagnostik der Zähne zu ermöglichen. Die Diagnose der einzelnen Schnitte wurden von zwei erfahrenen Wissenschaftlern gemeinsam gestellt und der jeweilige Zahn so als gesund oder kariös eingestuft. Jeder 24. Schnitt wurde auf diese Weise untersucht. Pro Zahn wurden so etwa 5-7 Schnitte (bei 30 µm Schnittdicke) untersucht. Klinisch als gesunde eingestufte Zähne ohne vorliegende Dentinkaries (DK), aber mit histopathologisch sichtbarer vakuolärer OD-Degeneration, Hyalindegeneration, Fettdegeneration, Dentikelbildung, Verkalkung oder Entzündung ohne kariöse Läsion (bspw. sterile Entzündung durch okklusales Trauma) wurden von der Studie ausgeschlossen.

Nach Ausschluss stellten sich fünf Molaren als histopathologisch gesund dar. Fünf Molaren wurden mit vorliegender DK als histopathologisch entzündet eingestuft. Für die folgende immunhistochemische Färbung wurden aufeinanderfolgende Schnitte des zu untersuchenden Zahnes verwendet. Dabei wurde jeweils der erste Schnitt mit HE-Färbung gefärbt, der zweite Schnitt mit HDAC6 inkubiert und der dritte Schnitt mit HDAC10. Der vierte Schnitt diente als Kontrolle.

4.1 Histochemische Ergebnisse

4.1.1 Die physiologische Dentin-Pulpa-Einheit

Bei einer physiologischen Dentin-Pulpa-Einheit (**Abb. 1**) fand sich eine breite Odontoblastenschicht (**o**) zwischen der zellarmen Zone (**zaz**) der dentalen Pulpa und des hellen Prädentins (**pd**). An das Prädentin gliederte sich nach außen das Sekundärdentin (**sd**) an, welches eine geordnet wellenförmige, gut sichtbare Anordnung der Dentintubuli besaß und in das äußere Primärdentin überging (nicht abgebildet). Nach innen gerichtet schloss sich an die zellarme Zone eine zellreiche Zone (**zrz**) an. Die dentale Pulpa stellte sich frei von Immunzellen dar. Die vaskuläre Versorgung ließ sich durch regelmäßig in der Pulpa verteilte Blutgefäße (*) erkennen. Im Bereich dieser Gefäße fanden sich histologisch häufig Erythrozyten (#), die die Versorgung der dentalen Pulpa sicherstellen. Auch Nervenfasern ließen sich in den Präparaten finden und bildeten gemeinsam mit Blutgefäßen den subodontoblasten-Plexus.



Abbildung 2: Die gesunde Dentin-Pulpa-Einheit in HE-Färbung (10x-Vergrößerung); (sd = Sekundärdentin; pd = Prädentin; o = Odontoblastenschicht; zaz = zellarme Zone; zrz = zellreiche Zone; * = Blutgefäße; # = Erythrozyten)

4.1.2 Die pathologisch veränderte Dentin-Pulpa-Einheit

Die pathologisch veränderte Dentin-Pulpa-Einheit (**Abb. 3**) unterschied sich maßgeblich vom physiologischen Zustand, da hier keine geordnete histologische Struktur der einzelnen Zellschichten, wie in der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit, vorhanden war.

Die Dentin-Pulpa-Einheit stellte sich mit veränderter Odontoblastenschicht unterhalb des kariösen Defekts dar. Es war eine vakuoläre Degeneration (“) in dieser Schicht sichtbar, sodass man nahezu keine Odontoblasten (OD) mehr erkennen konnte. Auch die Breite der OD-Schicht schien sich innerhalb des Präparats zu unterscheiden. Hierbei war die OD-Schicht unterhalb der kariösen Läsion verschmälert i.V. zur umliegenden Schicht (**Abb. 3**).

In vielen Fällen war eine pulpennahe Bildung von Tertiärdentin (**rptd** und **rtd**) im Bereich des Defekts sichtbar, welches sich in seiner Struktur von der des Primär- oder Sekundärdentins augenscheinlich unterschied. Bei einer vorliegenden weitestgehend intakten OD-Schicht waren, ähnlich dem Bereich des Sekundärdentins (**sd**), Dentinkanälchen innerhalb der Dentinmatrix zu erkennen, die jedoch einen irregulären Verlauf aufwiesen. Dieser Bereich stellt das reaktive Tertiärdentin (**rtd**) dar. In vielen Fällen, in denen diese o.g. physiologische Schicht einer vakuolären Degeneration gewichen war, stellte sich eine gebildete Zahnhartsubstanz dar, die keine Dentinkanälchen, sondern fortlaufende Kollagenfasern zu besitzen schien (**Abb. 3**). Diese Zahnhartsubstanz stellt das reparative Tertiärdentin (**rptd**) dar.

Im Bereich der Pulpa ließen sich vermehrt Entzündungszellen (#) antreffen. Zudem war eine Vasodilatation der Gefäße (*) im Bereich der Pulpa zu erkennen, gepaart mit einer Hypervaskularisierung. Gelegentlich ließen sich auch Dentinmatrix-Strukturen (Dentikel) innerhalb der dentalen Pulpa erkennen (hier nicht gezeigt).

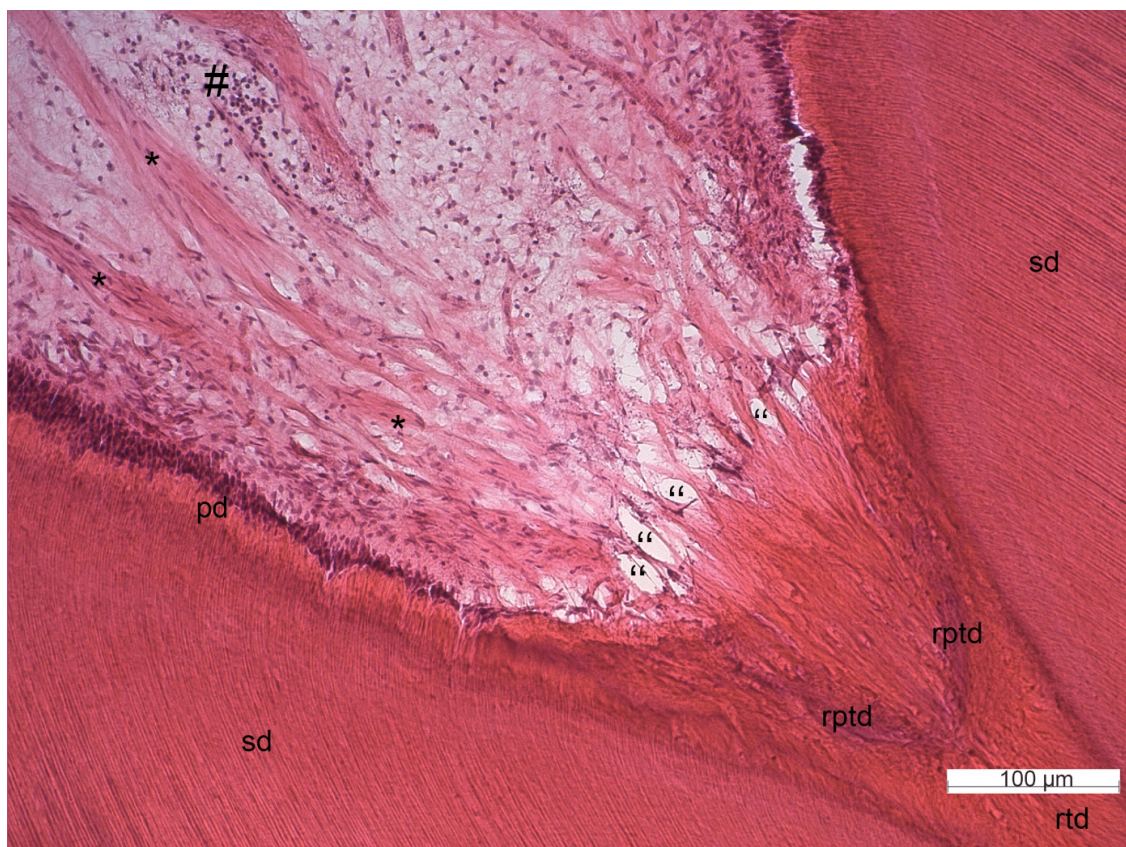


Abbildung 3: Die entzündete Dentin-Pulpa-Einheit in HE-Färbung (10x-Vergrößerung); (sd = Sekundärdentin; rtd = reaktives Tertiärdentin; rptd = reparatives Tertiärdentin; pd = Prädentin; “ = vakuoläre OD-Degeneration; * = Blutgefäße; # = Entzündungszellen)

4.2 Ergebnisse der Verdünnungsreihe für die HDACs Klasse IIb

4.2.1 Ergebnisse der Verdünnungsreihe für HDAC6

Nach dem Erstellen der Verdünnungsreihe für HDAC6 wurde sich für die Verdünnung des primären Antikörpers (pAK) von 1:500 entschieden, da hier eine gute Färbeintensität, ohne starkes Vorkommen von verfälschender Hintergrundfärbung, erkennbar war (Daten wurden hier nicht gezeigt).

4.2.2 Ergebnisse der Verdünnungsreihe für HDAC10

Nach dem Erstellen der Verdünnungsreihe für HDAC10 wurde sich ebenfalls für die Verdünnung des pAKs von 1:500 entschieden, da auch bei dieser Verdünnung eine gute Färbeintensität, ohne starkes Vorkommen von verfälschender Hintergrundfärbung, erkennbar war (Daten wurden hier nicht gezeigt).

4.3 Die Expression von den HDACs Klasse IIb in gesunden Molaren

4.3.1 Die Expression von HDAC6 in gesunden Molaren

In gesunden humanen Molaren war keine immunhistochemische Färbung für HDAC6 in der OD-Schicht oder deren Fortsätzen erkennbar. Auch die Zellkerne wiesen eine negative Immunreaktivität für HDAC6 auf. Durch den Vergleich mit der Kontrolle (**Abb. 4 [g/h]**) ließ sich die sichtbare Färbung auf eine Hintergrundfärbung zurückführen (**Abb. 4 [c/d]**).

4.3.2 Die Expression von HDAC10 in gesunden Molaren

In gesunden humanen Molaren war keine immunhistochemische Färbung der OD-Schicht oder deren Fortsätzen zu finden. Durch den Vergleich mit der Kontrolle (**Abb. 4 [g/h]**) ließ sich die sichtbare Färbung auf eine Hintergrundfärbung zurückführen (**Abb. 4 [e/f]**).

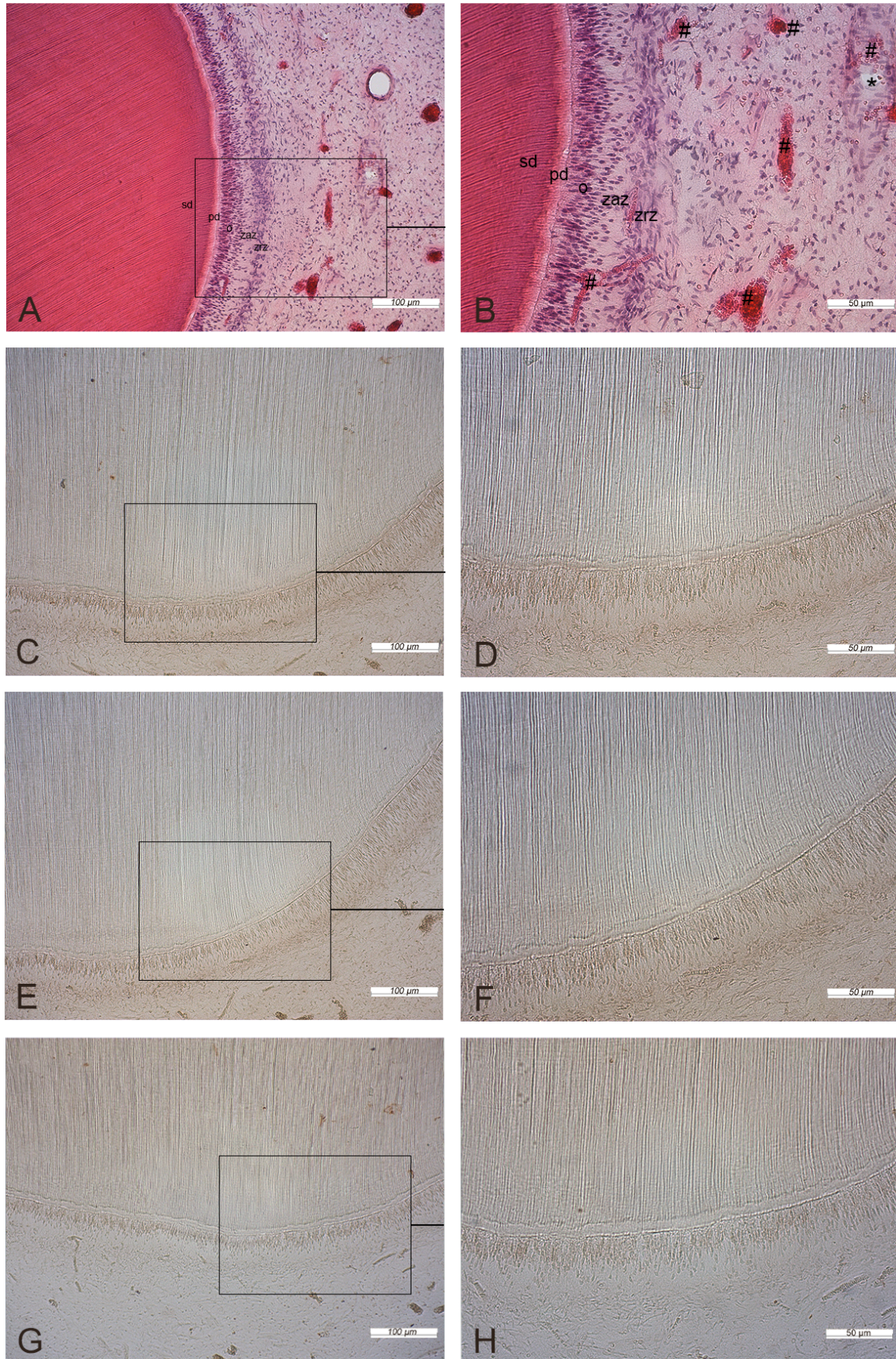


Abbildung 4: Expression von HDAC6 und HDAC10 in Odontoblasten der gesunde Dentin-Pulpa-Einheit eines humanen Molaren (jeweils 10x- und 20x-Vergrößerung) in HE-Färbung [a/b], inkubiert mit HDAC6-AK [c/d], inkubiert mit HDAC10-AK [e/f] und die Kontrolle [g/h]. (sd = Sekundärdentin; pd = Prädentin; o = Odontoblastenschicht; zaz = zellarme Zone; zrz = zellreiche Zone; * = Blutgefäße; # = Erythrozyten)

4.4 Die Expression von den HDACs Klasse IIb in der Odontoblastenschicht kariöser Molaren

4.4.1 Die Expression von HDAC6 in der Odontoblastenschicht kariöser Molaren

In einer Subpopulation der OD stellten sich die Zellkerne in der OD-Schicht moderat gefärbt dar, jedoch waren auch die Zellkerne mehrerer OD ohne immunhistochemische Färbung sichtbar. Im Zytoplasma der OD ließ sich auch eine moderate Färbung erkennen (**Abb. 5 [c/d]**). Die Kontrolle (**Abb. 5 [g/h]**) zeigte nur Hintergrundfärbung.

4.4.2 Die Expression von HDAC10 in der Odontoblastenschicht kariöser Molaren

In der OD-Schicht war eine schwach bis moderate Färbung der OD-Zellkerne und dessen Zytoplasmas in einer Subpopulation der OD erkennbar (**Abb. 5 [e/f]**). Im Vergleich zu der Kontrolle (**Abb. 5 [g/h]**) war eine Zunahme der Immunreaktivität für HDAC10 in der OD-Schicht erkennbar (**Abb. 5 [e/f]**).

4.5 Die Expression von den HDACs Klasse IIb in den Odontoblastenfortsätzen kariöser Molaren

4.5.1 Die Expression von HDAC6 in den Odontoblastenfortsätzen kariöser Molaren

Die OD-Fortsätze des Primär- und Sekundärdentins (**sd**) stellten sich mit starker immunhistochemischer Reaktion für HDAC6 (**gF**) dar. Im Bereich des reparativen- und reaktiven Tertiärdentins (**rptd** und **rtd**) ließ sich keine immunhistochemische Fortsatzfärbung für HDAC6 erkennen (**Abb. 6 [c/d]**). Die Kontrolle war für HDAC6 negativ (**Abb. 6 [g/h]**).

4.5.2 Die Expression von HDAC10 in den Odontoblastenfortsätzen kariöser Molaren

Die OD-Fortsätze im Bereich des Sekundär- (**sd**) und Tertiärdentins (**rptd** und **rtd**) stellten sich für HDAC10 ungefärbt dar (**Abb. 6 [e/f]**). In der immunhistochemischen Kontrollinkubation war keine Immunreaktivität für HDAC10 ersichtlich (**Abb. 6 [g/h]**).

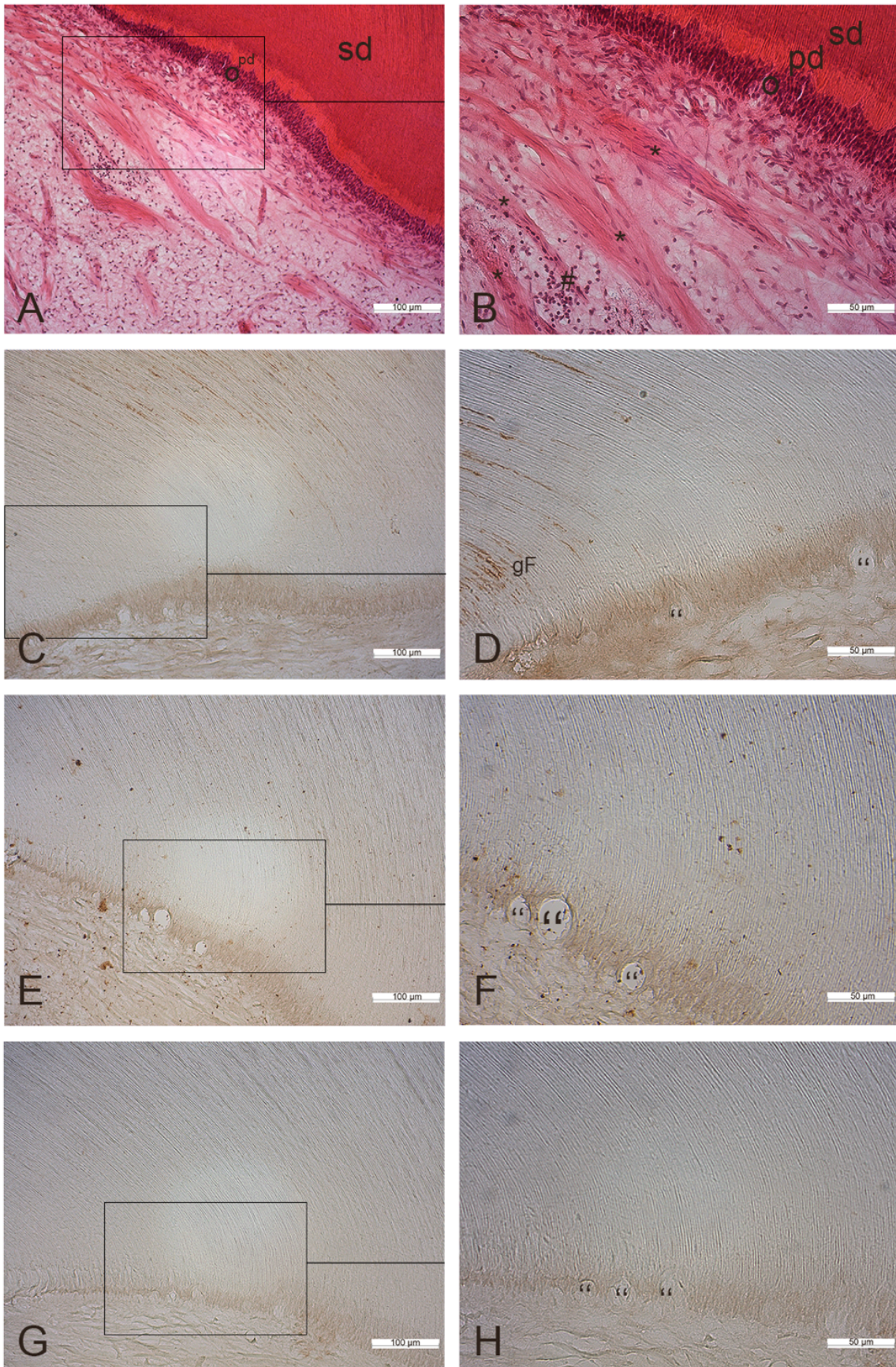


Abbildung 5: Expression von HDAC6 und HDAC10 in entzündeten Odontoblasten der kariös-veränderte Dentin-Pulpa-Einheit eines humanen Molaren (jeweils 10x- und 20x-Vergrößerung) in HE-Färbung [a/b], inkubiert mit HDAC6-AK [c/d], inkubiert mit HDAC10-AK [e/f] und die Kontrolle [g/h]. (sd = Sekundärdentin; pd = Prädentin; o = Odontoblastenschicht; * = Blutgefäße; # = Entzündungszellen; gF = gefärbte OD-Fortsätze; '' = vakuoläre OD-Degeneration)

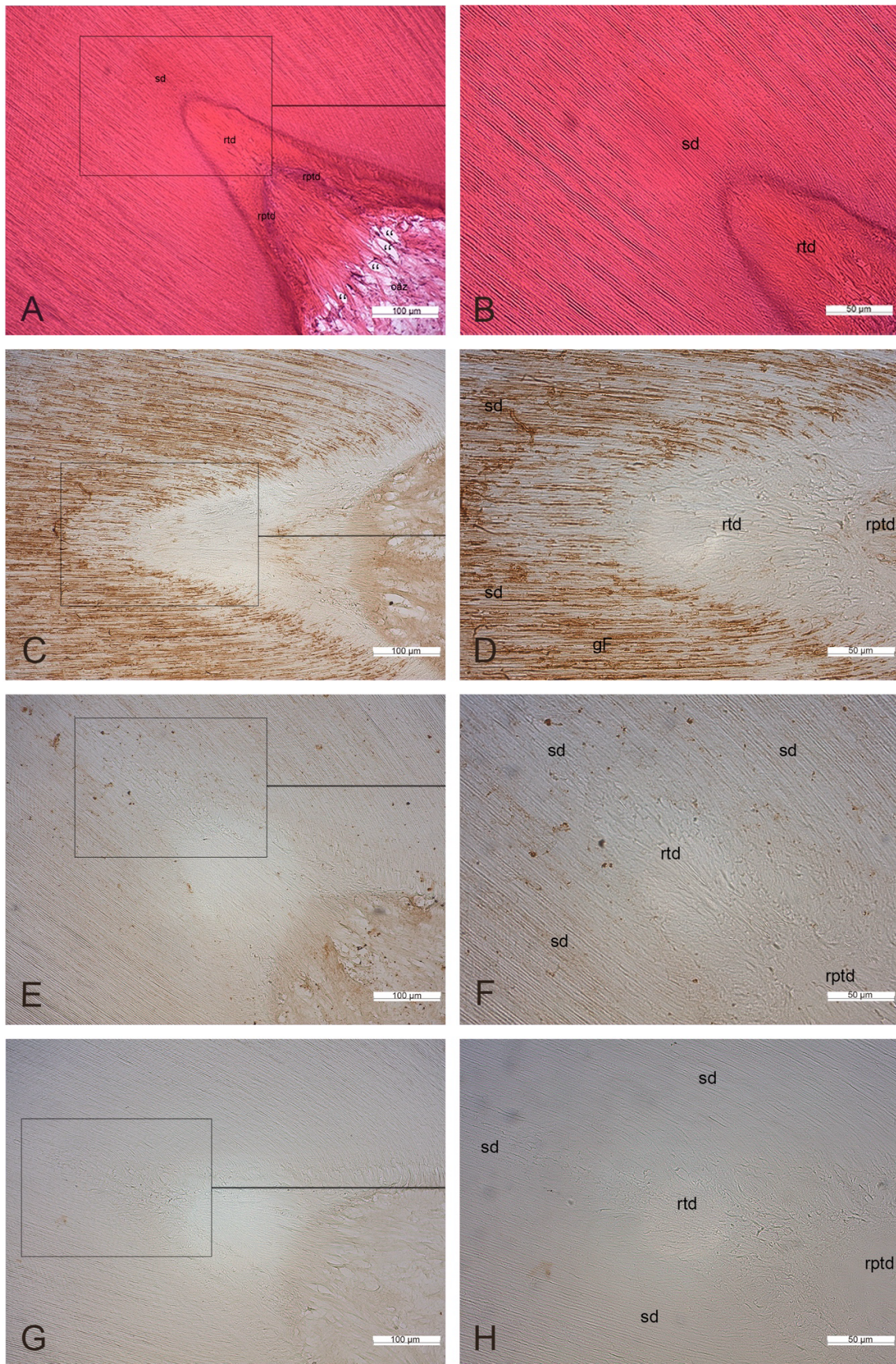


Abbildung 6: Expression von HDAC6 und HDAC10 in Odontoblastenfortsätzen der kariös-veränderte Dentin-Pulpa-Einheit eines humanen Molaren (jeweils 10x- und 20x-Vergrößerung) in HE-Färbung [a/b], inkubiert mit HDAC6-AK [c/d], inkubiert mit HDAC10-AK [e/f] und die Kontrolle [g/h]. (sd = Sekundärdentin; rtd = reaktives Tertiärdentin; rptd = reparatives Tertiärdentin; gF = gefärbte OD-Fortsätze; v = vakuoläre OD-Degeneration; oaz = OD-ähnliche Zellen)

4.6 Statistische Ergebnisse

Der t-Test ergab einen statistisch signifikant niedrigeren MGW-Wert für HDAC6 bei gesunden Molaren im Vergleich zu den kariösen Molaren ($t = -2,28$, $df = 7,91$, $p = 0,026$). Für HDAC10 wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (gesunde Molaren, kariösen Molaren) festgestellt ($t = 0,63$, $df = 5,01$, $p = 0,723$).

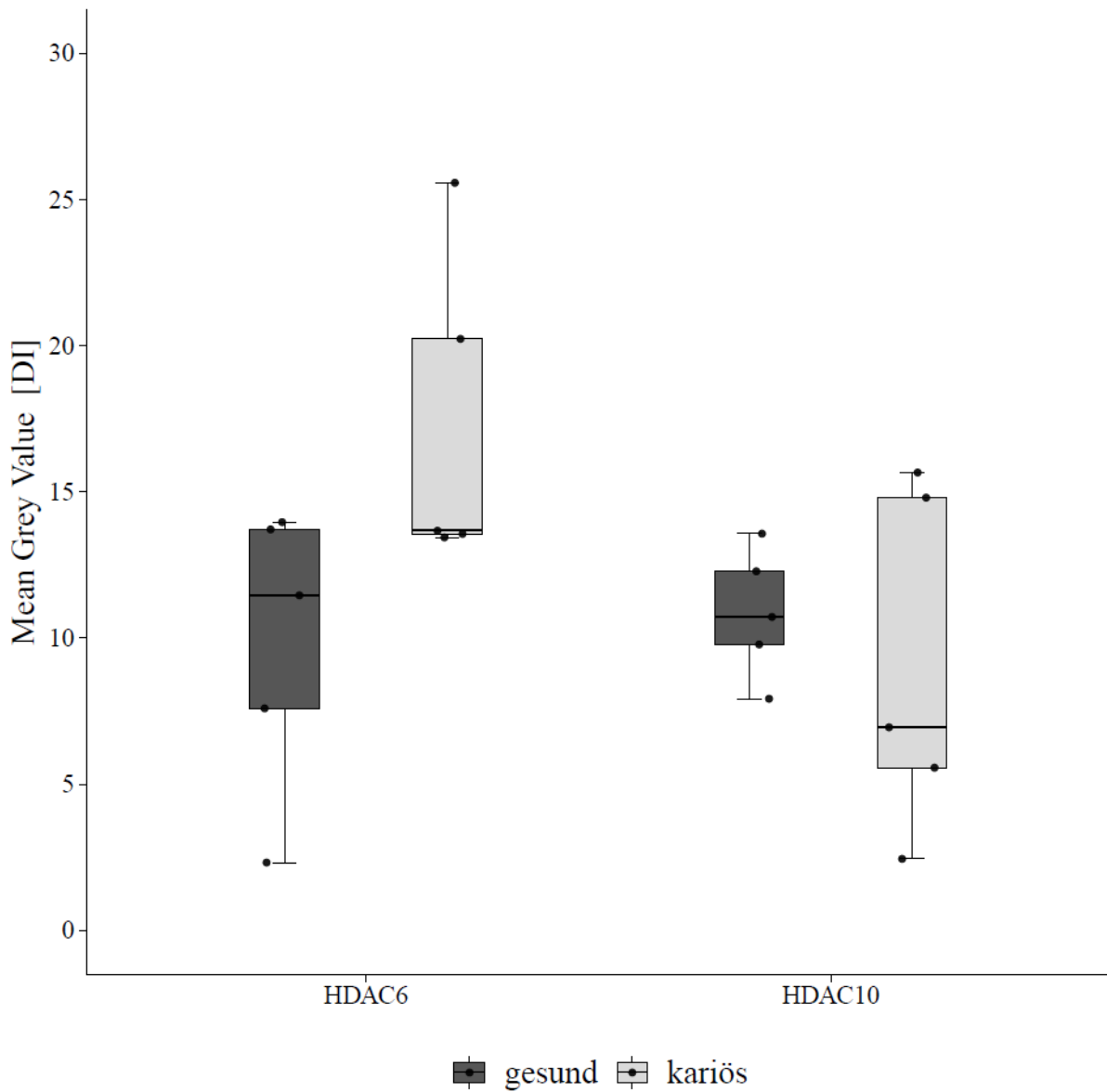


Abbildung 4: Die Expression der HDAC6 und HDAC10 in den Odontoblasten der gesunden und kariösen humanen Molaren.

5 Diskussion

Die Expression eines Gens wird sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen durch die Aktivität unterschiedlicher zellspezifischer Transkriptionsfaktoren reguliert. Dies beginnt im Zellkern mit der Transkription der DNA in mRNA und dem sich anschließenden Transport der mRNA zu den im Zytoplasma befindlichen Ribosomen. In den Ribosomen wird die jeweilige Nukleotidsequenz der mRNA in eine Aminosäuresequenz translatiert, die schließlich ein spezifisches Protein für eine bestimmte Funktion bildet. Proteine werden für verschiedene zelluläre Prozesse benötigt, daher ist der Nachweis der Expression eines spezifischen Proteins in Schnitten aus unterschiedlichen humanen Geweben unter physiologischen und pathologischen Bedingungen von großer Bedeutung, um die Rolle des jeweiligen Proteins in der Zelle unter den jeweiligen Bedingungen (physiologisch und pathologisch-verändert) herauszufinden. Der Vergleich der Ergebnisse gesunder und kranker Gewebeproben ermöglicht wertvolle klinische Schlussfolgerungen auf Basis der Expressionsmuster der jeweiligen Proteine.

In der vorliegenden Studie wurde die immunhistochemische Expression von HDAC6 und HDAC10 in Odontoblasten (OD) der gesunden und kariösen Molaren untersucht. Die vergleichenden Ergebnisse zeigen, dass HDAC6 und HDAC10 (Klasse IIb der HDACs) unter physiologischen Bedingungen nicht in den OD der humanen Molaren exprimiert werden. Eine kariöse Läsion, die in allen Fällen eine Entzündung der dentalen Pulpa verursacht, induzierte eine signifikant erhöhte Expression für HDAC6 in den OD-Fortsätzen innerhalb der Dentintubuli und im Zellkörper der OD. Im Bereich des reaktiven Tertiärdentins wurde keine Expression für HDAC6 in den Fortsätzen der OD detektiert. Auch im Bereich der reparativen Tertiärdentinmatrix war keine Immunreaktivität für HDAC6 erkennbar. HDAC10 wurde weder in den Fortsätzen der gesunden noch in denen der entzündeten OD detektiert. In den Zellkernen der entzündeten OD war eine moderate Expression von HDAC6 nur in einer Subpopulation der Zellen erkennbar. HDAC10 war in den Zellkernen der entzündeten Molaren nur sehr schwach bis gar nicht detektierbar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass HDAC6 und HDAC10 unter physiologischen Bedingungen in gesunden OD keine inhibitorische Rolle bei der transkriptionellen Regulation der Bildung der Sekundärdentinmatrix spielen können. Unter entzündlichen Bedingungen kann HDAC6 nach dessen Bildung in das Zytoplasma (in die Odontoblastenfortsätze) translokieren, sodass die transkriptionelle Regulation der reaktiven Tertiärdentinmatrixbildung erleichtert wird. Die moderate Färbung von HDAC6 in einer Subpopulation der OD deutet auf eine inhibitorische Rolle von HDAC6 in der transkriptionellen Tertiärdentinmatrixbildung hin. HDAC10 spielt keine wesentliche Rolle bei der transkriptionellen Regulation der Sekundär- und Tertiärdentinmatrixbildung.

5.1 Methodische Arbeit

Die Spezifität der Antikörper (AK), die Bearbeitung der Gewebeproben für die Immunhistochemie (IHC) sowie die sorgfältige Anwendung der immunhistochemische Methode ist entscheidend für den Erfolg der gewonnenen Ergebnisse.

5.1.1 Die Spezifität der Antikörper

In den Inkubationen wurden monoklonale Mäuse-Antikörper gegen HDAC6 und HDAC10 verwendet. Der AK gegen HDAC6 ist ein monoklonaler (clon: D-11) Maus-Antikörper, der gegen die Aminosäuresequenz 916-1215 von humanen HDAC6 gerichtet ist [Santa Cruz Biotechnology, sc28386]. Die Spezifität des HDAC6-Antikörpers wurde mittels Westernblot

getestet (Gradilone et al., 2014, Nakashima et al., 2015). Der HDAC10-AK ist ein monoklonaler (clon: F-4) Maus-Antikörper, der gegen die Aminosäuresequenz 61-116 in der Nähe des N-Terminus von humanen HDAC10 gerichtet ist [Santa Cruz Biotechnology, sc-376121]. Die Spezifität des HDAC10-Antikörpers wurde mittels Westernblot charakterisiert (Dose et al., 2016, Fan et al., 2021).

5.1.2 Die Bearbeitung der humanen Molaren

Nach der erfolgten Extraktion wurden die Gewebeproben sofort in die modif. Zamboni-Lösung verbracht. Einer Autolyse der Proben und der damit verbundenen Zerstörung der Epitope wurde durch diesen Schritt vorgebeugt.

Dem Schneidevorgang im Kryostaten wurde eine dreiwöchige Entkalkung mittels Ameisensäure vorgeschaltet, um so Ca^{2+} -Ionen aus Schmelz, Dentin und Zement zu lösen. Der Schmelz wurde somit aufgelöst und vom Dentin und Zement verblieb die extrazelluläre Matrix.

Zur Kryoprotektion wurden die Schnitte mit Saccharose-Lösung (30 %) versetzt, dessen Konzentration der von bereits veröffentlichten in vivo Untersuchungen an humanen Zähnen entsprach (Klinz et al., 2012b, Korkmaz et al., 2005). Durch diesen Prozess wurde eine Entstehung von Wasser-Kristallen während des Gefrierens verhindert, da die Kristalle sonst die Zellstrukturen hätten durchschneiden können.

5.1.3 Eliminierung störender Faktoren bei der Immunhistochemie (IHC)

Um eine starke Hintergrundfärbung im Rahmen der ABC-Methode auf ein Minimum zu reduzieren, musste die mögliche Bindung von DAB an die körpereigene endogene Peroxidase (z.B. in Granulozyten und Erythrozyten) unterbunden werden. Eine Befundbarkeit wäre durch falsch positive Färbungen nicht mehr gegeben (Bussolati and Radulescu, 2011). Diese Blockierung der endogenen Peroxidase wurde durch die Zugabe von der H_2O_2 -Lösung (0,3 %) erreicht.

Zusätzlich erfolgte, um einer unspezifischen Bindung der sekundären AK (sAK) an freien Bindungsstellen der im Schnitt vorliegenden Proteinen vorzubeugen, eine Behandlung mit dem Blockierungspuffer (2 % BSA + 5 % NGS + 0,05 M TBS-Lösung). In der vorliegenden Studie wurden sAK verwendet, die in der Ziege entwickelt worden sind. Aus diesem Grund wurde im Blockierungspuffer 5%iges normal goat serum verwendet, um alle Antigene, die im humanen Molaren vom sAK erkannt werden könnten zu blockieren. So wurden die unspezifischen Ergebnisse verhindert und nur die Bindung der sAK an die primären AK (pAK) ermöglicht. Die genutzte Konzentration erwies sich bereits in vorangegangene Untersuchung als besonders effektiv, um die in der dentalen Pulpa enthaltenen Proteinstrukturen zu untersuchen (Korkmaz et al., 2011, Klinz et al., 2012a).

5.1.4 Optimierung der Antikörperbindung an die Epitope

Um die Antigen-Antikörper-Bindung zu optimieren, wurden die Schnitte der humanen Molaren mit Triton[®] X-100 (0,25 %) behandelt. Durch diesen Prozess wurde die Oberflächenspannung der mit wässriger Lösung behandelten Schnitte herabgesetzt und ein besserer Zugang der primären AK zu den Epitopen gewährleistet. Ohne diesen Schritt hätten ionische Spannungen die Antigen-Antikörper-Bindung maßgeblich beeinflussen können. Eine 0,25%ige Konzentration des Triton[®] X-100 hat sich bereits in vorangegangenen Untersuchungen an humanen OD als effektiv erwiesen (Klinz et al., 2012a, Erdek et al., 2022).

Auch die o.g. Behandlung mit BSA (2 %) führte zu einer Optimierung der Antigen-Antikörper-Bindung, da BSA die hydrophoben Kräfte auf den Schnittoberflächen reduziert und dem pAK den Zugang zu den Epitopen erleichtert.

5.1.5 Konzentration der DAB- und H₂O₂-Lösung und die optimale Darstellung der Antigen-Antikörper Bindung

Zur visuellen Darstellung der spezifischen AK-Bindung an den jeweiligen Epitopen (HDAC6 & HDAC10), wurden die freischwimmenden Schnitte mit DAB-Lösung behandelt. Hierbei bindet DAB an die Peroxidase des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes. Der sichtbare braune Niederschlag im Falle einer positiven Färbung ist auf eine Oxidationsreaktion des DABs zurückzuführen. Für eine optimale immunhistochemische Färbung ohne Hintergrundfärbung ist die Konzentration der DAB- und H₂O₂-Lösung entscheidend. Die verwendete Konzentration erwies sich bereits in vorangegangenen Untersuchungen als besonders effektiv (Korkmaz et al., 2008, Korkmaz et al., 2023).

5.2 Die Rolle von HDAC Klasse IIb in gesunden Molaren

5.2.1 Die Rolle von HDAC6 in gesunden Molaren

In der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit stellte sich der Schnitt (OD-Schicht und OD-Fortsätze) weitestgehend ungefärbt dar, was darauf schließen lässt, dass HDAC6 im gesunden humanen Molaren nicht exprimiert wird. Dies wiederum deutet darauf hin, dass HDAC6 im gesunden humanen Molar nicht die Transkription bestimmter Gene in den OD reguliert und bei der Homöostase unter physiologischen Bedingungen vermutlich keine entscheidende Rolle einnimmt. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Studie ist anzunehmen, dass eine Inhibierung der physiologischen Transkription (mit Verdickung des Chromatins) der Dentinmatrixproteine unwahrscheinlich ist.

In der Literatur findet sich bisher keine Untersuchung der HDAC6 an gesunden Zähnen. Auch die in der Literatur beschriebene, hauptsächliche subzelluläre Lokalisation von HDAC6 im Zytoplasma (Verdel et al., 2000, Bertos et al., 2004, Cabrero et al., 2006, Gao et al., 2007, Schlüter et al., 2019) ließ sich unter physiologischen Bedingungen der OD nicht bestätigen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die vorangegangenen Untersuchungen an humanen Zellkulturen (HeLa-cells, HEK 293 cells, HSB-2 oder CEM 1.3) (Bertos et al., 2004, Cabrero et al., 2006, Verdel et al., 2000) oder an anderen Spezies (mouse embryonic fibroblasts, mouse retinal ganglion cells) (Gao et al., 2007, Schlüter et al., 2019) stattfanden. Auch die Zellherkunft unterscheidet sich stark von den hier untersuchten OD (Zervix-Epithel, Nierenzellen, T-Zellen usw.), was mit unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen einhergehen könnte. Für eine genaue Beurteilung der subzellulären Lokalisation von HDAC6 in gesunden humanen Molaren sind weitere Untersuchungsmethoden nötig (Doppel- oder Triple-Färbung).

5.2.2 Die Rolle von HDAC10 in gesunden Molaren

In der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit stellte sich der Schnitt (OD-Schicht und OD-Fortsätze) weitestgehend ungefärbt dar, was darauf schließen lässt, dass HDAC10 im gesunden humanen Molaren keine erhöhte Expression erfährt. Dies wiederum deutet darauf hin, dass HDAC10 im gesunden humanen Molar nicht die Transkription bestimmter Gene in den OD reguliert und vermutlich keine entscheidende Rolle während des physiologischen Zustandes

einnimmt. Eine Inhibierung der physiologischen Transkription der Dentinmatrixproteine ist unwahrscheinlich.

In der Literatur finden sich bisher keine Untersuchung der HDAC10 an gesunden Zähnen. Auch die in der Literatur beschriebene subzelluläre Lokalisation im Zytoplasma (Tong et al., 2002, Zhou et al., 2022, Srivastava et al., 2022) und Zellkern (Guardiola and Yao, 2002) wurde nicht bestätigt. Dies könnte daher kommen, dass sich die Zellherkunft stark von den hier untersuchten OD unterscheidet (hippocampal tissues, HEK 293 cells, HeLa-cells, NIH/3T3 usw.), was auch mit unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen einhergehen könnte. Für eine genaue Beurteilung der subzellulären Lokalisation von HDAC6 in gesunden humanen Molaren sind weitere Untersuchungsmethoden nötig (Doppel- oder Triple-Färbung).

Unter physiologischen Bedingungen wird die Sekundärdentinmatrix in adulten menschlichen Molaren von terminaldifferenzierten OD gebildet, dessen epigenetische Regulation (der Transkription) von HDAC6 und HDAC10 nicht beeinflusst wird. Es ist jedoch möglich, dass sich alle HDACs in den OD periodisch in ihrer Exprimierung abwechseln. Um diese Annahme zu bestätigen, sind zusätzliche in-vivo und in-vitro-Untersuchungen nötig.

5.3 Die Rolle von HDAC IIb in kariösen Molaren

5.3.1 Die Rolle von HDAC6 in kariösen Molaren

In der pathologisch veränderten Dentin-Pulpa-Einheit stellten sich die Zellkerne im Bereich der OD-Schicht teilweise mit HDAC6 gefärbt dar. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass in einer kleinen vorliegenden Subpopulation der OD bereits eine höhere Menge an HDAC6 in den Zellkern translokiert wurde, um dort vermutlich durch den pathologischen Reiz ausgelöst, die Transkription bestimmter Gene zu inhibieren. Dadurch, dass nur eine Subpopulation der OD mit gefärbten Zellkernen sichtbar war, lässt sich vermuten, dass nur bei entzündetem OD eine vermehrte Translokation von HDAC6 aus dem Zytoplasma in den Zellkern erfolgt. Dies wiederum bestätigt, dass HDAC6 nur auf einen pathologischen Reiz hin die Transkription der Dentinmatrixproteine (z.B. DMP1 und DSPP) inhibieren könnte. Es ist auch möglich, dass die OD mit heterogener Differenzierung vorlagen und sich die Färbung daher auf die OD eines bestimmten Differenzierungsgrades beschränkten.

Das Zytoplasma der OD stellte sich moderat gefärbt dar, was ein Anstieg der Expression der HDAC6 im Zytoplasma im Vergleich zu einer physiologischen Dentin-Pulpa-Einheit zeigt. Diese Beobachtung ist kongruent mit vorangegangenen Untersuchungen, die die subzelluläre Lokalisation von HDAC6 im Bereich des Zytoplasmas festgestellt haben (Verdel et al., 2000, Bertos et al., 2004, Cabrero et al., 2006, Gao et al., 2007, Schlüter et al., 2019). Dies könnte dadurch begründbar sein, dass auf einen pathologischen Reiz (z.B. Dentinkaries) hin vermehrt HDAC6 durch die Ribosomen synthetisiert wird und bei voranschreitenden pathologischen Geschehnissen in den Zellkern eingeschleust wird, um dort angekommen die Transkription von Dentinmatrixproteinen im Rahmen der Tertiärdentinbildung zu inhibieren.

Die OD-Fortsätze waren im Bereich des Sekundärdentins partiell stark gefärbt, besonders bei vorliegender vakuolärer Degeneration des betroffenen OD. Die Fortsätze der noch intakt erscheinenden OD waren nicht gefärbt, was insgesamt darauf hindeuten könnte, dass bei voranschreitender Degeneration der OD zunehmend HDAC6 in den Bereich der OD-Fortsätze translokiert wird. Bei ausbleibender Degeneration der OD scheint keine erhöhte Expression/Translokation im/in den Bereich der Fortsätze zu erfolgen. Eine weitere denkbare Ursache der Färbung der Fortsätze von vakuolär degenerierten OD ist, dass das im Zellkern von vakuolär degenerierten OD stark angereicherte HDAC6 nach Untergang desselbigen (und somit auch seines Zellkerns) durch Kernhüllenzerfall bis in die Fortsätze gelangen könnte.

Im Bereich des sichtbaren reaktiven Tertiärdentins wurde keine Färbung der wenigen irregulär verlaufenden Tubuli detektiert. Auch in der reparative Dentinmatrix, die keine Dentintubuli

enthält, war keine Immunreaktivität für HDAC6 zu erkennen, was vermutlich daran liegt, dass diese Art von Dentin nicht von OD gebildet wird, sondern von OD-ähnlichen Zellen, die aus pulpalen Stammzellen (SZ) differenzieren (Sloan and Smith, 2007, Neves and Sharpe, 2018, Korkmaz et al., 2022). HDAC6 scheint somit weder im Bereich der irregulär verlaufenden Tubuli des reaktiven noch in der Matrix des reparativen Tertiärdentins lokalisiert zu sein.

In der Literatur finden sich bisher keine vorherigen Untersuchungen der HDAC6 an kariösen Zähnen. Für eine genaue Beurteilung der subzellulären Lokalisation von HDAC6 in kariös veränderten humanen Molaren sind weitere Untersuchungsmethoden nötig (Doppel- oder Triple-Färbung).

5.3.2 Die Rolle von HDAC10 in kariösen Molaren

In der pathologisch veränderten Dentin-Pulpa-Einheit waren die OD-Zellkerne und das OD-Zytoplasma lediglich in einer Subpopulation der OD schwach-moderat gefärbt dar. Der Bereich der OD-Fortsätze war homogen ohne Färbung. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass HDAC10, wie bereits in anderen Gewebearten und Zellen (bspw.: hippocampal tissues, HEK 293 cells, HeLa-cells, NIH/3T3 usw.) in vorherigen Untersuchungen beschrieben, subzellulär im Bereich des Zytoplasmas (Tong et al., 2002, Zhou et al., 2022, Srivastava et al., 2022) und des Zellkerns (Guardiola and Yao, 2002) befindlich ist. Die lediglich schwach-moderate Färbung der o.g. Strukturen lässt darauf schließen, dass HDAC10, wenn überhaupt nur einen geringen Einfluss auf die Inhibition der Transkription der Dentinmatrixproteine im Rahmen der Tertiärdentinmatrixbildung hat. Verstärkt wird diese Annahme dadurch, dass die weitaus größte Menge der sichtbaren OD in Gänze ungefärbt waren. Somit kam es in diesen Zellen zu keiner erhöhten Expression von HDAC6 im Rahmen der DK und auch vermutlich keiner Einflussnahme auf die Gen-Regulation.

In der Literatur finden sich bisher keine vorherigen Untersuchungen der HDAC10 an kariösen Zähnen. Für eine genaue Beurteilung der subzellulären Lokalisation von HDAC10 in kariös veränderten humanen Molaren sind weitere Untersuchungsmethoden nötig (Doppel- oder Triple-Färbung).

5.4 Schlussfolgerungen

HDAC6 scheint in der pathologisch veränderten Dentin-Pulpa-Einheit (bei vorliegender DK), i.V. zur physiologischen Dentin-Pulpa-Einheit, stark exprimiert und eine bedeutende Rolle im Bereich der Gen-Regulation der OD zu spielen. HDAC6 könnte durch seine inhibierende Wirkung auf den Transkriptionsvorgang eine Tertiärdentinbildung unterdrücken und ein möglicher Angriffspunkt zukünftiger Überkappungsmaterialien sein (HDAC-Inhibitoren). HDAC10 scheint weder in der physiologischen noch in der pathologisch veränderten Dentin-Pulpa-Einheit eine signifikante Rolle in der Gen-Regulation zu spielen. Die Dentinbildung scheint von HDAC10 nicht inhibiert zu werden.

5.5 Limitationen der Studie

In der vorliegenden Studie wurde die Expression von HDAC6 und HDAC10 erstmals in OD gesunder und kariöser Molaren (DK) untersucht. Die Anzahl der Proben sollte weiter erhöht werden und die subzelluläre Lokalisation der HDAC IIB durch Immunfluoreszenzmethoden (Doppel- oder Triple-Färbung) erscheint sinnvoll, um den Zustand der Deacetylierung der OD nachvollziehen zu können. Daher sind weitere ex-vivo-Untersuchungen mit einer höheren Anzahl von Molaren (und Patienten) geplant, um die Expression und subzelluläre Lokalisation

von HDAC6 und HDAC10 in den humanen Molaren zu klären. Zudem sind funktionelle in-vitro-Untersuchungen mit OD-ähnlichen Zellen geplant, um eine abschließende Aussage über die funktionelle Rolle der HDAC IIb bei der Bildung der Sekundär- und Tertiärdentinmatrix treffen zu können.

6 Zusammenfassung

Acetylierung und Deacetylierung sind wichtige epigenetische Regulationsmechanismen, deren Bedeutung in entzündeten humanen Odontoblasten (OD) (durch Karies bedingt) bislang nicht geklärt worden ist. Im Zuge des Acetylierungsvorgangs wird eine Lockerung des Chromatins induziert, wodurch etwaige Zielgene für Transkriptionsfaktoren zugänglich werden. Dem entgegen wird das Chromatin im Zuge einer Deacetylierung verpackt und Zielgene so für Transkriptionsfaktoren unzugänglich. Die Enzyme, die diese Deacetylierung regulieren werden Histondeacetylasen (HDACs) genannt. HDAC6 und HDAC10 bilden die Klasse IIb der HDACs. Da die Expression von HDAC6 und HDAC10 in gesunden und kariösen Molaren bisher nicht geklärt worden ist wurde dies in der vorliegenden Studie untersucht, um in Zukunft neue Therapiestrategien für kariöse Zähne entwickeln zu können.

Es wurden extrahierte humane Molaren gesammelt, entkalkt, kryo-protectiert und mit Hilfe eines Kryostaten geschnitten. Diese Schnitte wurden anschließend histochemisch und immunhistochemisch aufgearbeitet. Es erfolgte die Diagnosestellung und Unterteilung der Zähne durch erfolgte HE-Färbung in gesunde humane Molaren und pathologische humane Molaren mit vorliegender Dentinkaries (DK). Anschließend wurden die dem jeweiligen Zahn zugeordneten aufeinanderfolgende Schnitte immunhistochemisch aufgearbeitet und die Färbungsintensität von HDAC6 und HDAC10 in den OD mit der Densitometrie quantifiziert. Die Daten wurden anschließend statistisch ausgewertet.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die Enzyme HDAC6 und HDAC10 in OD gesunder humaner Molaren nicht exprimiert werden. Eine vorliegende DK induziert hingegen eine signifikant erhöhte Expression von HDAC6 in den Fortsätzen der OD innerhalb der Sekundärdentinmatrix. Im Bereich des reparativen und reaktiven Tertiärdentins konnte keine Expression von HDAC6 in den OD-Fortsätzen nachgewiesen werden. Es wurde keine Expression von HDAC10 in den OD-Fortsätzen gefunden. In den Zellkernen entzündeter OD war eine moderate Expression von HDAC6 nur in einer Subpopulation der OD erkennbar, während HDAC10 in den Zellkernen nur schwach oder gar nicht nachweisbar war.

Die fehlende Expression von HDAC6 und HDAC10 in OD der gesunden Molaren lässt darauf schließen, dass die HDAC Klasse IIb keine (entscheidende) Rolle in der inhibierenden Gen-Regulation der physiologischen OD spielen. Eine Transkription der OD-DNA scheint im physiologischen Zustand nicht von HDAC6 oder HDAC10 inhibiert zu sein. Im kariösen Zustand (DK) der Dentin-Pulpa-Einheit war eine signifikant erhöhte Expression von HDAC6 im Bereich der OD-Fortsätze sichtbar, was auf eine Translokation des Enzyms in diese Bereiche hindeutet. Die moderate Färbung einer Subpopulation der OD-Zellkerne für HDAC6 kann darauf hindeuten, dass HDAC6 in einer Subpopulation der OD eine Rolle in der Gen-Regulation spielt und die für die Bildung der Dentinmatrixproteine nötige Transkription in diesem Zustand aktiv inhibieren kann. Zudem lässt dies auf heterogene Differenzierungsgrade der OD schließen. Da HDAC10 keine erhöhte Expression im Zuge einer DK erfährt, ist anzunehmen, dass HDAC10 keine Rolle bei der transkriptionellen Regulation der Tertiärdentinmatrixbildung spielt.

7 Literaturverzeichnis

- ALLIS, C. D. & JENUWEIN, T. 2016. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*, 17, 487-500.
- ANDREWS, A. J. & LUGER, K. 2011. Nucleosome structure(s) and stability: variations on a theme. *Annu Rev Biophys*, 40, 99-117.
- AUDIA, J. E. & CAMPBELL, R. M. 2016. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8, a019521.
- 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.
- BERTOS, N. R., GILQUIN, B., CHAN, G. K., YEN, T. J., KHOCHBIN, S. & YANG, X. J. 2004. Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J Biol Chem*, 279, 48246-54.
- BLEICHER, F. 2014. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res*, 325, 65-71.
- BONKOWSKI, M. S. & SINCLAIR, D. A. 2016. Slowing ageing by design: the rise of NAD(+) and sirtuin-activating compounds. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17, 679-690.
- BUSSOLATI, G. & RADULESCU, R. T. 2011. Blocking endogenous peroxidases in immunohistochemistry: a mandatory, yet also subtle measure. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 19, 484.
- CABRERO, J. R., SERRADOR, J. M., BARREIRO, O., MITTELBRUNN, M., NARANJO-SUÁREZ, S., MARTÍN-CÓFRECES, N., VICENTE-MANZANARES, M., MAZITSCHEK, R., BRADNER, J. E., AVILA, J., VALENZUELA-FERNÁNDEZ, A. & SÁNCHEZ-MADRID, F. 2006. Lymphocyte chemotaxis is regulated by histone deacetylase 6, independently of its deacetylase activity. *Mol Biol Cell*, 17, 3435-45.
- CHEN, B., ZANG, W., WANG, J., HUANG, Y., HE, Y., YAN, L., LIU, J. & ZHENG, W. 2015. The chemical biology of sirtuins. *Chemical Society Reviews*, 44, 5246-5264.
- 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.
- CHI, P., ALLIS, C. D. & WANG, G. G. 2010. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 10, 457-69.
- 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.
- DOSE, A., SINDLINGER, J., BIERLMEIER, J., BAKIRBAS, A., SCHULZE-OSTHOFF, K., EINSELE-SCHOLZ, S., HARTL, M., ESSMANN, F., FINKEMEIER, I. & SCHWARZER, D. 2016. Interrogating Substrate Selectivity and Composition of Endogenous Histone Deacetylase Complexes with Chemical Probes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 55, 1192-5.
- DU, J., ZHOU, Y., SU, X., YU, J. J., KHAN, S., JIANG, H., KIM, J., WOO, J., KIM, J. H., CHOI, B. H., HE, B., CHEN, W., ZHANG, S., CERIONE, R. A., AUWERX, J., HAO, Q. & LIN, H. 2011. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*, 334, 806-9.
- DUVERGER, O., ZAH, A., ISAAC, J., SUN, H. W., BARTELS, A. K., LIAN, J. B., BERDAL, A., HWANG, J. & MORASSO, M. I. 2012. Neural crest deletion of Dlx3 leads to major dentin defects through down-regulation of Dspp. *J Biol Chem*, 287, 12230-40.

- ERDEK, Ö., BLOCH, W., RINK-NOTZON, S., ROGGENDORF, H. C., UZUN, S., MEUL, B., KOCH, M., NEUGEBAUER, J., DESCHNER, J. & KORKMAZ, Y. 2022. Inflammation of the Human Dental Pulp Induces Phosphorylation of eNOS at Thr495 in Blood Vessels. *Biomedicines*, 10.
- FALKENBERG, K. J. & JOHNSTONE, R. W. 2014. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 13, 673-91.
- FAN, L. & ROBERTS, V. A. 2006. Complex of linker histone H5 with the nucleosome and its implications for chromatin packing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 8384-9.
- FAN, Q., LI, L., WANG, T. L., EMERSON, R. E. & XU, Y. 2021. A Novel ZIP4-HDAC4-VEGFA Axis in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*, 13.
- 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.
- FYODOROV, D. V., ZHOU, B. R., SKOULTCHI, A. I. & BAI, Y. 2018. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 192-206.
- 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.
- GALLER, K. M., YASUE, A., CAVENDER, A. C., BIALEK, P., KARSENTY, G. & D'SOUZA, R. N. 2007. A Novel Role for Twist-1 in Pulp Homeostasis. *Journal of Dental Research*, 86, 951-955.
- GAO, L., CUETO, M. A., ASSELBERGS, F. & ATADJA, P. 2002. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem*, 277, 25748-55.
- GAO, Y. S., HUBBERT, C. C., LU, J., LEE, Y. S., LEE, J. Y. & YAO, T. P. 2007. Histone deacetylase 6 regulates growth factor-induced actin remodeling and endocytosis. *Mol Cell Biol*, 27, 8637-47.
- GOLDBERG, M., KULKARNI, A. B., YOUNG, M. & BOSKEY, A. 2011. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*, 3, 711-35.
- GRADILONE, S. A., HABRINGER, S., MASYUK, T. V., HOWARD, B. N., MASYUK, A. I. & LARUSSO, N. F. 2014. HDAC6 is overexpressed in cystic cholangiocytes and its inhibition reduces cystogenesis. *Am J Pathol*, 184, 600-8.
- GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, J., ROBEY, P. G. & SHI, S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13625-30.
- GRUNSTEIN, M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389, 349-52.
- GRZESIK, W. J. & NARAYANAN, A. S. 2002. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13, 474-84.
- GUARDIOLA, A. R. & YAO, T. P. 2002. Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J Biol Chem*, 277, 3350-6.
- 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.
- HAIGIS, M. C. & SINCLAIR, D. A. 2010. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*, 5, 253-95.
- HALLOWS, W. C., LEE, S. & DENU, J. M. 2006. Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10230-10235.
- HOUTKOOPER, R. H., PIRINEN, E. & AUWERX, J. 2012. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 225-238.
- IBRAHIM UBA, A. & YELEKÇİ, K. 2019. Homology modeling of human histone deacetylase 10 and design of potential selective inhibitors. *J Biomol Struct Dyn*, 37, 3627-3636.

- IMAI, S., ARMSTRONG, C. M., KAEBERLEIN, M. & GUARENTE, L. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403, 795-800.
- JENUWEIN, T. & ALLIS, C. D. 2001. Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-80.
- JIANG, D. & MA, P. 2022. Canagliflozin, characterized as a HDAC6 inhibitor, inhibits gastric cancer metastasis. *Front Oncol*, 12, 1057455.
- KAZANTSEV, A. G. & THOMPSON, L. M. 2008. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 854-68.
- KLINZ, F., KORKMAZ, Y., BLOCH, W., RAAB, W. & ADDICKS, K. 2012a. Histone deacetylases 2 and 9 are coexpressed and nuclear localized in human molar odontoblasts in vivo. *Histochemistry and cell biology*, 137.
- KLINZ, F.-J., KORKMAZ, Y., CHO, B., RAAB, W. & ADDICKS, K. 2012b. Transcription factor CREB is phosphorylated in human molar odontoblasts and cementoblasts in vivo. *Histochemistry and cell biology*, 139.
- KORKMAZ, Y., BAUMANN, M. A., STEINRITZ, D., SCHRÖDER, H., BEHREND, S., ADDICKS, K., SCHNEIDER, K., RAAB, W. H. & BLOCH, W. 2005. NO-cGMP signaling molecules in cells of the rat molar dentin-pulp complex. *J Dent Res*, 84, 618-23.
- KORKMAZ, Y., BLOCH, W., SCHNEIDER, K., ZIMMER, S., ADDICKS, K. & RAAB, W. H.-M. 2008. Time-dependent Activation of ERK1/2 in Nerve Terminals of the Dentin-Pulp Complex following Bradykinin Treatment. *Journal of Dental Research*, 87, 1149-1154.
- 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.
- KUMAR, S. & LOMBARD, D. B. 2017. For Certain, SIRT4 Activities! *Trends Biochem Sci*, 42, 499-501.
- LACRUZ, R. S., HABELITZ, S., WRIGHT, J. T. & PAINE, M. L. 2017. DENTAL ENAMEL FORMATION AND IMPLICATIONS FOR ORAL HEALTH AND DISEASE. *Physiol Rev*, 97, 939-993.
- LAHM, A., PAOLINI, C., PALLAORO, M., NARDI, M. C., JONES, P., NEDDERMANN, P., SAMBUCINI, S., BOTTOMLEY, M. J., LO SURDO, P., CARFÌ, A., KOCH, U., DE FRANCESCO, R., STEINKÜHLER, C. & GALLINARI, P. 2007. Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 17335-40.
- LAMBERT, S. A., JOLMA, A., CAMPITELLI, L. F., DAS, P. K., YIN, Y., ALBU, M., CHEN, X., TAIPALE, J., HUGHES, T. R. & WEIRAUCH, M. T. 2018. The Human Transcription Factors. *Cell*, 172, 650-665.
- LEE, J. S., SMITH, E. & SHILATIFARD, A. 2010. The language of histone crosstalk. *Cell*, 142, 682-5.
- 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.

- 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.
- MARMORSTEIN, R. & ZHOU, M. M. 2014. Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a018762.
- MCGINTY, R. K. & TAN, S. 2015. Nucleosome structure and function. *Chem Rev*, 115, 2255-73.
- MENG, T., HUANG, Y., WANG, S., ZHANG, H., DECHOW, P. C., WANG, X., QIN, C., SHI, B., D'SOUZA, R. N. & LU, Y. 2015. Twist1 Is Essential for Tooth Morphogenesis and Odontoblast Differentiation. *J Biol Chem*, 290, 29593-602.
- NAKASHIMA, H., KAUFMANN, J. K., WANG, P.-Y., NGUYEN, T., SPERANZA, M.-C., KASAI, K., OKEMOTO, K., OTSUKI, A., NAKANO, I., FERNANDEZ, S., GOINS, W. F., GRANDI, P., GLORIOSO, J. C., LAWLER, S., CRIPE, T. P. & CHIOCCA, E. A. 2015. Histone deacetylase 6 inhibition enhances oncolytic viral replication in glioma. *The Journal of Clinical Investigation*, 125, 4269-4280.
- NEVES, V. C. M. & SHARPE, P. T. 2018. Regulation of Reactionary Dentine Formation. *J Dent Res*, 97, 416-422.
- NÚÑEZ-ÁLVAREZ, Y. & SUELVEZ, M. 2022. HDAC11: a multifaceted histone deacetylase with proficient fatty deacylase activity and its roles in physiological processes. *Febs j*, 289, 2771-2792.
- OMI, M., KULKARNI, A. K., RAICHUR, A., FOX, M., UPTERGROVE, A., ZHANG, H. & MISHINA, Y. 2020. BMP-Smad Signaling Regulates Postnatal Crown Dentinogenesis in Mouse Molar. *JBMR Plus*, 4, e10249.
- PARRA, M. & VERDIN, E. 2010. Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol*, 10, 454-60.
- 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.
- QIN, X., JIANG, Q., KOMORI, H., SAKANE, C., FUKUYAMA, R., MATSUO, Y., ITO, K., MIYAZAKI, T. & KOMORI, T. 2021. Runt-related transcription factor-2 (Runx2) is required for bone matrix protein gene expression in committed osteoblasts in mice. *J Bone Miner Res*, 36, 2081-2095.
- RUCH, J. V., LESOT, H. & BÈGUE-KIRN, C. 1995. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*, 39, 51-68.
- SABARI, B. R., ZHANG, D., ALLIS, C. D. & ZHAO, Y. 2017. Metabolic regulation of gene expression through histone acylations. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 90-101.
- SÁNCHEZ DE DIEGO, A., ALONSO GUERRERO, A., MARTÍNEZ, A. C. & VAN WELY, K. H. 2014. Dido3-dependent HDAC6 targeting controls cilium size. *Nat Commun*, 5, 3500.
- SANZ-NAVARRO, M., SEIDEL, K., SUN, Z., BERTONNIER-BROUTY, L., AMENDT, B. A., KLEIN, O. D. & MICHON, F. 2018. Plasticity within the niche ensures the maintenance of a Sox2(+) stem cell population in the mouse incisor. *Development*, 145.
- SCHLÜTER, A., AKSAN, B., FIORAVANTI, R., VALENTE, S., MAI, A. & MAUCERI, D. 2019. Histone Deacetylases Contribute to Excitotoxicity-Triggered Degeneration of Retinal Ganglion Cells In Vivo. *Mol Neurobiol*, 56, 8018-8034.
- SELWITZ, R. H., ISMAIL, A. I. & PITTS, N. B. 2007. Dental caries. *Lancet*, 369, 51-9.
- SETO, E. & YOSHIDA, M. 2014. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a018713.
- SHAHBAZIAN, M. D. & GRUNSTEIN, M. 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*, 76, 75-100.
- SLOAN, A. J. & SMITH, A. J. 2007. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*, 13, 151-7.

- SMITH, A. J., CASSIDY, N., PERRY, H., BÈGUE-KIRN, C., RUCH, J. V. & LESOT, H. 1995. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*, 39, 273-80.
- SODEK, J. & MCKEE, M. D. 2000. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000, 24, 99-126.
- SPITZ, F. & FURLONG, E. E. 2012. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet*, 13, 613-26.
- SRIVASTAVA, A., BANERJEE, J., DUBEY, V., TRIPATHI, M., CHANDRA, P. S., SHARMA, M. C., LALWANI, S., SIRAJ, F., DODDAMANI, R. & DIXIT, A. B. 2022. Role of Altered Expression, Activity and Sub-cellular Distribution of Various Histone Deacetylases (HDACs) in Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis. *Cell Mol Neurobiol*, 42, 1049-1064.
- 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.
- TIWARI, S., KAUR, H., ANEES, M., GUPTA, P., DALELA, M., KHARBANDA, S. & SINGH, H. 2022. Co-encapsulation of PI3-K δ /HDAC6 dual inhibitor and Navitoclax in Quatramer™ nanoparticles for synergistic effect in ER+ breast cancer. *Int J Pharm*, 628, 122343.
- TONG, J. J., LIU, J., BERTOS, N. R. & YANG, X. J. 2002. Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res*, 30, 1114-23.
- TUCKER, A. & SHARPE, P. 2004. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet*, 5, 499-508.
- VERDEL, A., CURTET, S., BROCARD, M. P., ROUSSEAU, S., LEMERCIER, C., YOSHIDA, M. & KHOCHBIN, S. 2000. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol*, 10, 747-9.
- WANG, J., ZHANG, H., ZHANG, W., HUANG, E., WANG, N., WU, N., WEN, S., CHEN, X., LIAO, Z., DENG, F., YIN, L., ZHANG, J., ZHANG, Q., YAN, Z., LIU, W., ZHANG, Z., YE, J., DENG, Y., LUU, H. H., HAYDON, R. C., HE, T. C. & DENG, F. 2014. Bone morphogenetic protein-9 effectively induces osteo/odontoblastic differentiation of the reversibly immortalized stem cells of dental apical papilla. *Stem Cells Dev*, 23, 1405-16.
- WU, J. & GRUNSTEIN, M. 2000. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci*, 25, 619-23.
- YANG, G., LI, X., YUAN, G., LIU, P. & FAN, M. 2014. The effects of osterix on the proliferation and odontoblastic differentiation of human dental papilla cells. *J Endod*, 40, 1771-7.
- YANG, X. J. & GRÉGOIRE, S. 2005. Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol*, 25, 2873-84.
- YANG, X. J. & SETO, E. 2008. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell*, 31, 449-461.
- ZEYEN, P., ZEYN, Y., HERP, D., MAHMOUDI, F., YESILOGLU, T. Z., ERDMANN, F., SCHMIDT, M., ROBAA, D., ROMIER, C., RIDINGER, J., HERBST-GERVASONI, C. J., CHRISTIANSON, D. W., OEHME, I., JUNG, M., KRÄMER, O. H. & SIPPL, W. 2022. Identification of histone deacetylase 10 (HDAC10) inhibitors that modulate autophagy in transformed cells. *Eur J Med Chem*, 234, 114272.
- 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.
- ZHAO, Z., STOCK, D., BUCHANAN, A. & WEISS, K. 2000. Expression of Dlx genes during the development of the murine dentition. *Dev Genes Evol*, 210, 270-5.
- ZHOU, W., WANG, J., WANG, X., WANG, B., ZHAO, Z., FU, J., WANG, Y., ZHANG, X., ZHU, P., JIANG, M. & CAO, X. 2022. Degradation of HDAC10 by autophagy promotes IRF3-mediated antiviral innate immune responses. *Sci Signal*, 15, eabo4356.

- ZHU, B.-Y., SHANG, B.-Y., DU, Y., LI, Y., LI, L., XU, X.-D. & ZHEN, Y.-S. 2017. A new HDAC inhibitor cinnamoylphenazine shows antitumor activity in association with intensive macropinocytosis. *Oncotarget*, 8.
- 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.
- ZHU, S., DONG, Z., KE, X., HOU, J., ZHAO, E., ZHANG, K., WANG, F., YANG, L., XIANG, Z. & CUI, H. 2019. The roles of sirtuins family in cell metabolism during tumor development. *Semin Cancer Biol*, 57, 59-71.

8 Anhang

Tabelle 2: Mittlere Grauwerte der jeweiligen untersuchten Proben.

gesund	HDAC6	HDAC10
P116	7,591	12,28
P135c	13,712	9,777
P1002	2,321	7,922
P1003	13,96	13,566
P1003b	11,458	10,72
kariös	HDAC6	HDAC10
P94	13,668	5,562
P113	13,438	6,945
P116b	13,557	15,657
P128	25,565	2,445
P135	20,227	14,798

9 Danksagung

10 Tabellarischer Lebenslauf