

**Vergleichende Untersuchung
der Expression verschiedener S100-Proteine
in gesunder, asymptomatischer und symptomatischer
pulpitischer Zahnpulpa**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Lukas Brune

aus Essen

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Jochen Winter
2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Baader

Tag der Mündlichen Prüfung: 10.12.2024

Aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des
Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis.....	5
1.	Einleitung.....	8
1.1	Menschliche Zahnpulpa	8
1.1.1	Menschlicher Zahn.....	8
1.1.2	Gesunde Zahnpulpa	8
1.1.3	Entzündete Zahnpulpa	10
1.2	S100-Proteine	12
1.2.1	EF-Hand-Motiv	13
1.2.2	Aufbau S100-Proteine.....	14
1.2.3	Eigenschaften	15
1.2.4	S100-Protein Vertreter	16
1.3	Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	18
2.	Material und Methoden	20
2.1	Übersicht.....	20
2.2	Reagenzien und Materialien	20
2.3	Probengewinnung	20
2.4	RNA Extraktion aus Pulpagewebe.....	24
2.4.1	Bestimmung der RNA Konzentration	25
2.5	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion zur cDNA Synthese	26
2.6	Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion.....	26
2.7	Relative Quantifizierung.....	30
2.8	Statistische Auswertung.....	31
3.	Ergebnisse.....	32
3.1	Relative Genexpression der Zielgene.....	32

3.1.1	Genexpression in gesunder Pulpa	33
3.1.2	Relative Genexpression in AIP	34
3.1.3	Relative Genexpression in SIP	34
3.2	Relative differenzielle Genexpression der Zielgene.....	34
3.2.1	Relative differenzielle Genexpression in AIP	35
3.2.2	Relative differentielle Genexpression in SIP	35
4.	Diskussion	38
4.1	Methodendiskussion	38
4.2	Expressionsmuster in entzündlichem Pulpagewebe.....	42
4.2.1	S100-Proteine in SIP	42
4.2.2	S100-Proteine in AIP	48
4.2.3	Weitere S100-Proteine im Zusammenhang.....	49
4.2.4	Expressionsmuster von Entzündungsmarkern	51
4.3	Fazit und Ausblick.....	53
5.	Zusammenfassung	55
6.	Anhang.....	57
7.	Abbildungsverzeichnis.....	61
8.	Tabellenverzeichnis.....	62
9.	Literaturverzeichnis.....	63
10.	Danksagung	73

Abkürzungsverzeichnis

1q21	Bestimmter Abschnitt auf dem menschlichen Chromosom 1: 1q= langer Arm von Chromosom 1 21= genauer Bereich auf dem Arm
AAE	Amerikanische Vereinigung von Endodontologen (American Association of Endodontists)
Abb.	Abbildung
AIP	Asymptomatisch irreversible Pulpitis
BP	Basenpaare
C-Terminus	Aminosäureende mit freier Carboxylgruppe (COOH)
CD43+/ CD68+	Spezielle immunphänotypische Oberflächenmerkmale auf Zelloberflächen (Cluster of Differentiation)
cDNA	Komplementäre DNA (Produkt der reversen Transkriptase)
Cox-2	Cyclooxygenase-2
Ct	Schwellenwertzyklus (Cycle Threshold)
DAMP	Schaden-assoziiertes molekulares Muster (Damage associated molecular Patterns)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPSC	Dentale Pulpastammzellen (Dental Pulpal Stem Cells)
ECM	Extrazelluläre Matrix
et al.	und Mitarbeiter
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GTMP	Gentherapie-Arzneimittelprodukte - Innovativer pharmakologischer Ansatz therapeutisches genetisches Material in Zielzellen zu transportieren
HMGB-1	High Mobility Group Protein 1: körpereigenes Alarmin
HP	Gesunde Pulpa
HPLC	High Pressure liquid chromatography - Hochdruckflüssigchromatographie
IL-1 α	Interleukin 1 α
IL-8	Interleukin 8
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharide
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleotid acid)
n	„number“, Fallzahl
N-Terminus	Aminosäureende mit freier Aminogruppe (NH ₂)
NCBI	National Center for Biotechnology Information: Einrichtung, die eine umfassende Datenbank genetischer Informationen zu wissenschaftlichen Zwecken bereitstellt
NF- κ B	Nukleärer Faktor Kappa B
Oligo(dT)-Primer	Oligo(desoxythymidin)-Primer: synthetisches DNA-Oligonukleotid, bestehend aus einer Kette Desoxythymidin
One-Way ANOVA	Einweg-Varianzanalyse (One Way Analysis of Variance)
p-Wert	Signifikanzbereich
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

PEC	Plattenepithelkarzinom
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen konzentration
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RAGE	Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (Rezeptor for Advanced Glycation Endproducts)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettwenreaktion (Real-Time-PCR)
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts (Standard Error of the Mean)
SIP	Symptomatisch irreversible Pulpitis
SYBR Green	Cyanin-Floureszenzfarbstoff
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor beta (Transforming Growth Factor beta)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
tRNA	Transfer-RNA

1. Einleitung

1.1 Menschliche Zahnpulpa

1.1.1 Menschlicher Zahn

Der Hauptbestandteil des mineralisierten Zahngewebes besteht aus Dentin, das im Kronenbereich von Zahnschmelz und im Wurzelbereich von Wurzelzement umgeben ist. Der Wurzelzement stellt ebenfalls ein mineralisiertes Zahngewebe dar, das für die Befestigung des Zahnes in der Alveole mittels der Sharpey'schen Fasern sorgt. Im zentralen Teil des Zahnes befindet sich das Pulpenkavum mit der weichgewebigen Zahnpulpa. Über das Foramen apikale wird die Zahnpulpa mit Nervenfasern und einem vaskulären Netzwerk versorgt (Goldberg et al., 2011).

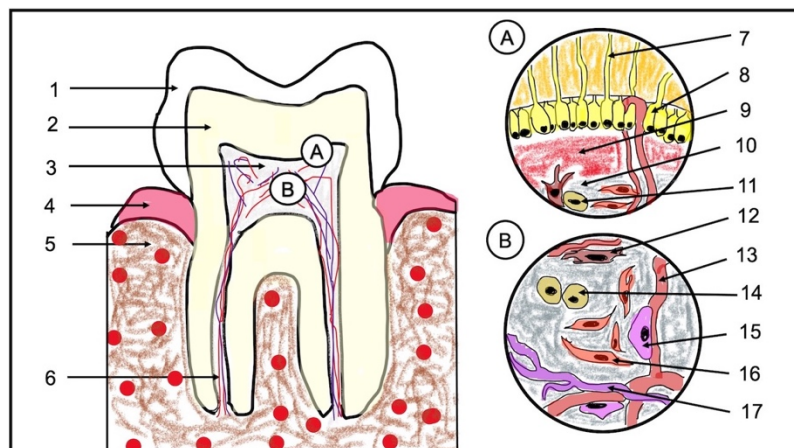


Abb. 1: Zahnbestandteile: (1) Schmelz (2) Dentin (3) Pulpa (4) Gingiva (5) Alveolarknochen (6) Neurovaskuläres Bündel (7) Odontoblastenfortsätze (8) Odontoblasten (9) Weil'sche Zone (10) Bipolare Zone (11 und 14) Präodontoblasten (12) Fibroblasten (13) Blutgefäße (15) Pericyten (16) DPSC (17) Nervenfasern (A) Die Odontoblasten grenzen an das Dentin und Odontoblastenfortsätze durchziehen das Dentin. Weiter zum Pulpenzentrum liegt die Weil'sche Zone gefolgt von der Bipolaren Zone (B) Unterschiedliche Zellpopulationen in der Zahnpulpa darunter DPSCs, Fibroblasten und Pericyten (modifiziert nach Baranova et al., 2020).

1.1.2 Gesunde Zahnpulpa

Die Zahnpulpa hat 4 Hauptaufgaben: eine formative, eine nutritive, eine sensorische und eine defensive Funktion. Sie bildet verschiedene Dentinarten und reagiert als Signal- und

Warnorgan auf thermische, chemische, physikalische, mechanische und infektiös-toxische Reize (Hellwig et al., 2013).

Die Pulpa entwickelt sich aus dem Ektomesenchym. Durch dessen Proliferation und Kondensation entsteht zunächst eine Zwischenstufe, die Dentinpapille, danach die Pulpa. In ihrer Beschaffenheit ähnelt Zahnpulpagewebe embryonalem Bindegewebe (Yu und Abbott, 2007).

Das lockere Pulpenbindegewebe besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I und III, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen. Eingebettet in dieser gallertartigen Masse befinden sich Pulpazellen in typischer Ausrichtung (Tjäderhane und Paju, 2020).

Die Odontoblasten bilden die äußerste Grenzschicht zwischen mineralisiertem Dentin und Pulpa. Zusammen mit subodontoblastischen Zellen formen sie die Höhl Zellschicht. Es sind postmitotisch polarisierte Zellen, die kontinuierlich mit der Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM) beschäftigt sind. Die ECM mineralisiert letztendlich zu den Zahnhartsubstanzen Primär- und später Sekundärdentin. Die allmähliche Verdickung des Dentinmantels führt zeitlebens zur Volumenabnahme des Pulpenlumens. Es folgt zum Pulpa-kammerzentrum die Weil'sche Zone, die sich durch Zellarmut auszeichnet (Hellwig et al., 2013; Koçkapan, 2003; Tjäderhane und Paju, 2020).

Im Zentrum der Pulpa liegt eine zellreiche Zone, die bipolare Zone. Hier sind Pulpafibroblasten hauptsächlich gebündelt lokalisiert. In einem deutlich geringeren Ausmaß verteilen sich die Pulpafibroblasten auch über die gesamte Pulpa (Tjäderhane und Paju, 2020; Trowbridge und Kim, 1994). Wie die Odontoblasten produzieren die Fibroblasten ebenfalls ECM, die aber nicht zu Hartgewebe mineralisiert (Goldberg und Smith, 2004).

Weiterhin findet man im Zentrum Pulpastammzellen (DPSC), die eine große Rolle bei der Geweberegeneration spielen. Pericyten steuern die Angiogenese sowie den Blutdruck innerhalb der Pulpa (Tjäderhane und Paju, 2020).

Zellen der Immunabwehr sind auch in gesunden pulpalen Geweben präsent z. B. dendritische Zellen, Histiozyten, Makrophagen, aber auch Lymphozyten und Mastzellen. Besonders zahlreich sind sie in der Peripherie der Pulpa aufzufinden (Goldberg und Smith, 2004).

Ein Netzwerk aus Blutgefäßen und Nervenbündeln, die der apikalen Region entspringen, durchziehen das Pulpagewebe und bilden ganz zentral den Raschkow'schen Plexus

(Koçkapan, 2003). Hierüber laufen eine Reihe verschiedenster Arten von inflammatorischen Reaktionen ab, die komplexe vaskuläre, lymphatische und lokale Gewebereaktionen involvieren (Demarco et al., 2011).

1.1.3 Entzündete Zahnpulpa

Die Reaktion der Pulpa auf anhaltend pathologische Reize ist eine Entzündung des Pulpagewebes, die Pulpitis. Unbehandelt führt diese langfristig zur Pulpanekrose. Die Entzündung kann auf den umgebenden Alveolarknochen übergreifen und periapikale Pathologien verursachen. Schwerwiegendste Folgen einer Pulpitis sind eine orale Sepsis oder Abszessformationen mit lebensbedrohlichen Folgen (Yu und Abbott, 2007).

Das Ausmaß der Entzündung entscheidet, ob Anteile der Pulpa (Pulpitis partialis) oder die gesamte Pulpa (Pulpitis totalis) betroffen sind. Eine Inflammation kann akut oder chronisch verlaufen. Die akute Pulpitis wird in serös oder purulent unterteilt. Bei den chronischen Pulpitiden wird unterschieden, ob die Pulpakammer mit Dentin bedeckt ist (Pulpitis chronica clausa) oder exponiert ist (Pulpitis chronica aperta) (Koçkapan, 2003).

Die Ursachen für pathologische Reize der Pulpa sind vielseitig. Am häufigsten handelt es sich um Karies, einen infektiös-toxischen Prozess. Aber auch Zahntraumata, iatrogene Schäden, Parodontopathien oder Sinusitiden können eine Pulpitis verursachen (Koçkapan, 2003; Yu und Abbott, 2007).

Um den Gesundheitsstatus der Pulpa möglichst genau beschreiben zu können, gibt es eine Reihe von Untersuchungsmethoden. Diese beinhalten die medizinische/ zahnmedizinische Anamnese, einen extra-/ sowie intraoralen Befund und mögliche Differentialdiagnosen. Anhand der Befundergebnisse wurden eine Vielzahl von Klassifikationen erarbeitet, die den Pulpastatus widerspiegeln (Krastl et al., 2021).

Grundsätzlich wird zwischen klinischen und histologischen Gesichtspunkten unterschieden. Histologisch ist eine genaue Beschreibung des Pulpazustands möglich, während die klinische Diagnostik nur eine grobe Einteilung bietet (Beer et al., 1997; Krastl et al., 2021; Okazaki et al., 2017; Yu und Abbott, 2007). Studien hierzu zeigen, dass die klinische und histologische Diagnosestellung insbesondere bei schweren Entzündungsverläufen nicht immer übereinstimmen müssen (Ricucci et al., 2014).

Die Therapieentscheidung durch den Zahnarzt kann nur anhand klinischer Gesichtspunkte erfolgen. Im klinischen Alltag ist das subjektiv empfundene Phänomen Schmerz häufig das wesentliche Beurteilungskriterium des pathologischen Pulpazustandes (Beer et al., 1997).

Die American Association of Endodontists (AAE) hat eine anerkannte nach klinischen Parametern orientierende Klassifikation erarbeitet. Dabei wird eine pulpale und eine apikale Diagnose getroffen (Okazaki et al., 2017):

1. Pulpale Diagnose:

- Gesunde Pulpa
- Reversible Pulpitis
- Symptomatisch irreversible Pulpitis
- Asymptomatisch irreversible Pulpitis
- Pulpanekrose
- Begonnene Wurzelkanalbehandlung
- Abgeschlossene Wurzelfüllung

2. Apikale Diagnose:

- Gesundes apikales Gewebe
- Symptomatisch apikale Parodontitis
- Asymptomatisch apikale Parodontitis
- Akuter apikaler Abszess
- Chronischer apikaler Abszess
- Kondensierende Ostitis

Die Klassifikation ermöglicht eine Einteilung in reversible oder irreversible Pulpitis (Krastl et al., 2021) und entscheidet damit, ob die Notwendigkeit zur Einleitung einer Wurzelkanalbehandlung besteht (Careddu und Duncan, 2021).

Die reversible Pulpitis stellt eine milde Form der Pulpitis dar, die nach Beseitigung des Reizes ausheilen kann. Klinische Anzeichen sind ein kurzer, heller, stechender, eindeutig lokalisierbarer Schmerz, der den Reiz nicht überdauert, z. B. Kälte und der Verzehr von zuckerhaltigen Lebensmitteln können Schmerzen auslösen, selten ist Schmerz durch

Wärme provozierbar. Im Gegensatz zur irreversiblen Pulpitis kommt es zu keiner spontanen Schmerzentstehung. Radiologisch sind keine apikalen Pathologien sichtbar (Abbott und Yu, 2007; Hellwig et al., 2013; Okazaki et al., 2017).

Bei der irreversiblen Pulpitis hat bereits ein schwerwiegender degenerativer Prozess im Pulpagewebe stattgefunden, sodass auch nach Beseitigung des Reizes eine Pulpanekrose einsetzen wird (Beer et al., 1997; Okazaki et al., 2017).

Symptomatisch irreversible Pulpitiden werden als dumpf, pochend, als ausstrahlender Schmerz wahrgenommen. Der Schmerz überdauert den Reiz, kann auch ohne Reiz auftreten. Häufig hat der Patient Schwierigkeiten, den schuldigen Zahn eindeutig zu benennen, teilweise kann der Patient den Schmerz sogar nicht eindeutig dem Ober- oder Unterkiefer zuordnen. Radiologisch sind ebenfalls keine apikale Osteolysen zu erkennen (Abbott und Yu, 2007; Hellwig et al., 2013; Okazaki et al., 2017).

Die asymptomatisch irreversible Pulpitis zeigt meist keine Klinik. Es handelt sich um eine sicher irreversible Pulpaschädigung aufgrund großflächiger Caries arrivata oder Traumata. Eine Abgrenzung gegenüber einer Pulpanekrose ist eine noch minimal vorhandene Restvitalität. Weiter zeigt sich radiologisch ebenfalls noch keine apikale Osteolyse (Abbott und Yu, 2007; Koçkapan, 2003; Okazaki et al., 2017).

1.2 S100-Proteine

Seit nunmehr 50 Jahren sind S100-Proteine im Fokus der wissenschaftlichen Forschung. Erstmalig aus bovinem Nervengewebe isoliert benannte B. W. Moore die Proteine nach ihrer charakteristischen Eigenschaft, in einer 100%-ig gesättigten Ammoniumsulfatlösung bei neutralem pH-Wert löslich zu sein (Moore, 1965). Seit über 500 Millionen Jahren sind S100-Proteine Bestandteil des vertebralen Genoms (Zimmer et al., 2013). Im epidermalen Differenzierungskomplex innerhalb des Gen-Clusters auf dem Chromosom 1q21 ist die Mehrzahl der S100-Proteinfamilie codiert (Marenholz et al., 2004).

Gegenwärtig sind 25 niedermolekulare Proteinsubtypen der S100-Protein-Familie mit ihren vielfältigen Funktionen und Expressionsmustern im menschlichen Körper bekannt

(Gonzalez et al., 2020). Es handelt sich um Ca^{2+} -bindende Moleküle, die sich in ihrer Aminosäuresequenz zu 25-65% ähneln. Die molekulare Masse beträgt 10-12kDa.

Damit stellen S100-Proteine die größte Untergruppe von Ca^{2+} -bindenden Proteinen dar, von denen viele auch andere Metallionen wie Zink (Zn^{2+}), Kupfer (Cu^{2+}) und Mangan (Mn^{2+}) binden können (Leclerc und Heizmann, 2011).

Ca^{2+} gehört zu den wichtigen, wenn nicht sogar den wichtigsten Metallionen des Lebens. Es steuert lebenswichtige Prozesse von der Knochenmineralisierung bis zur Zellsteuerung. Verschiedenste intra- sowie extrazelluläre Proteine interagieren dafür mit Ca^{2+} . Die Vielfalt der Konfigurationen für Ca^{2+} -Bindungsstellen ist begrenzt (Kawasaki und Kretsinger, 2017; Kretsinger und Nockolds, 1973).

1.2.1 EF-Hand-Motiv

Am häufigsten vorkommend ist das EF-Hand-Motiv. 1973 prägte R. H. Kretsinger den Begriff des „EF-Hand“-Motivs. Erstmals isolierte er das Ca^{2+} -bindende Parvalbumin mit EF-Hand-Motiv aus Karpfenmuskulatur (Kretsinger und Nockolds, 1973). Dieses strukturelle Motiv findet sich in einer großen Anzahl von Protein-Familien wieder. Mittlerweile sind etwa 66 Unterfamilien bekannt (Lewit-Bentley und Rety, 2000) und die NCBI Reference Sequence Data Bank enthält mehr als 3000 zugehörige Einträge (Grabarek, 2006). Der Name EF-Hand ist die graphische Beschreibung des im Parvalbumin beobachteten Ca^{2+} -Bindungsmotivs. Es beschreibt nicht nur die Polypeptid-Faltung sondern auch die potenzielle Bewegung, die die Bindung von Ca^{2+} induzieren kann (Lewit-Bentley und Rety, 2000).

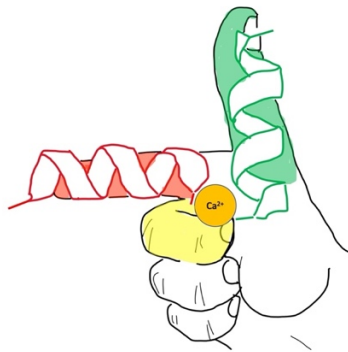


Abb. 2: EF-Hand-Motiv: Die E-Helix symbolisiert der Zeigefinger (rot), F-Helix den Daumen (grün) und der gekrümmte Mittelfinger (gelb) den Ca²⁺-bindenden Loop (modifiziert nach Capozzi et al., 2006)

Der charakteristische Aufbau der EF-Hand ist die Helix-Schleife-Helix-Struktur. Die sogenannte Schleife, bestehend aus 12-14 Aminosäuren, ist in der Lage, Ca²⁺ Ionen zu binden.

Die erste alpha-Helix „E“ symbolisiert den Zeigefinger, der Ca²⁺-bindende Loop einen gekrümmten zweiten Finger und die zweite Helix „F“ den Daumen einer rechten „Hand“ (Strynadka und James, 1989).

1.2.2 Aufbau S100-Proteine

Die typische S100-Proteinkonformation besteht aus 2 EF-Hand-Motiven, die dem Protein die Ca²⁺-Bindungseigenschaften verleihen. S100-Proteine kommen als symmetrische Dimere vor. Das typische S100-Protein enthält zwei unterschiedliche EF-Hand-Motive, ein kanonisches EF-Hand-Motiv am C-Terminus und ein nicht-kanonisches EF-Hand-Motiv am N-Terminus. Die kanonische EF-Hand, auch als „klassisch“ bezeichnet, besitzt eine in jedem S100-Protein gleiche Aminosäuresequenz der Schleife. Die nicht-kanonische, pseudo EF-Hand, hingegen variiert in ihrer Aminosäuresequenz der Schleife in den verschiedenen S100-Proteinen. Die verschiedenen Schleifenkonfigurationen bedingen unterschiedliche Bindungen des Liganden Ca²⁺. Die kanonische EF-Hand bindet Ca²⁺ über Seitenketten- Carboxylate/ Carbonylgruppen, wohingegen pseudo EF-Hände einen Chelatkomplex mit dem Liganden Ca²⁺ eingehen (Zhou et al., 2006). Die Bindungsaffinität ist dadurch an der klassischen EF-Hand 100-fach größer (Liang et al., 2023).

Verbunden sind die EF-Hände über eine flexible Scharnierregion. An den Amino- und Carboxyterminalen Enden liegen hydrophobe Reste. Die Affinität zur Bindung von Ca^{2+} ist bei fehlenden Zielproteinen gering, erhöht sich aber signifikant in Anwesenheit spezifischer Zielproteine (Liang et al., 2023).

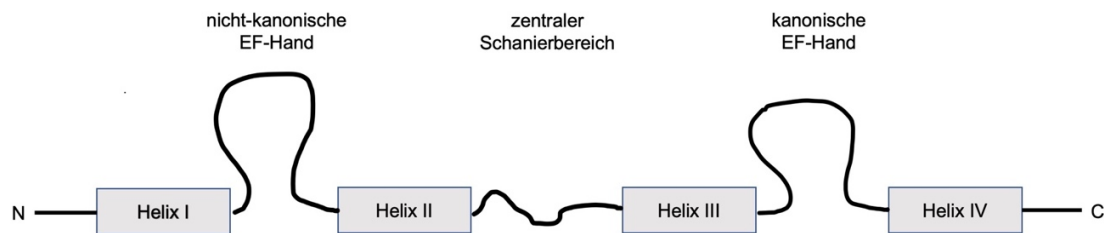


Abb. 3: S100-Proteinstruktur. Zusammensetzung: alpha-Helix 1-4, 2 verschiedene EF-Hand-Motive, zentraler Scharnierbereich, Amino- (N) und Carboxyterminale- (C) Enden (modifiziert nach Eckert et al., 2004)

Es gibt 3 mögliche Konformationszustände der S100-Proteine. Ohne Bindung des Liganden Ca^{2+} befinden sich die Proteine in der Apo-Konfiguration. Mit der Bindung von Ca^{2+} durchläuft das S100-Protein eine Konformationsveränderung. Es werden Erkennungsstellen für Zielproteine ausgebildet, die die Interaktionen mit Zielproteinen ermöglichen. Die Bindung des Zielproteins stellt die dritte Konformationsänderung dar (Liang et al., 2023).

1.2.3 Eigenschaften

Die Ca^{2+} -Bindungseigenschaften bedingen die Eigenschaften der S100-Proteine bei physiologischen und pathologischen Vorgängen im menschlichen Körper. Auf zellulärer Ebene spielen die S100-Proteine eine Rolle bei verschiedenen Zellprozessen einschließlich Zellzyklusprogression und -differenzierung, Ca^{2+} -Homöostase, Dynamik des Zytoskeletts und Stoffwechsels (Bresnick et al., 2015; Leclerc und Heizmann, 2011; Marenholz et al., 2004). Sie vermitteln außerdem intrazelluläre und extrazelluläre zytokinähnliche Funktionen (Leclerc und Heizmann, 2011; Sorci et al., 2011) und sind an verschiedenen Wegen des angeborenen und erworbenen Immunabwehrsystems beteiligt (Donato et al., 2013).

In der Klinik wird das Vorkommen von S100-Proteinen mit verschiedensten Krankheitsbildern in Verbindung gebracht z. B. Morbus Alzheimer, Down Syndrom, Depressionen, Rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Myokardinfarkt, Aortenaneurysma (Heizmann et al., 2002; Leclerc und Heizmann, 2011; Liang et al., 2023). Die Beteiligung an malignen Tumoren wird in Verbindung mit chromosomalen Abnormitäten auf Chromosom 1q21 gebracht. Hier befinden sich Gene von 14 S100-Proteinen auf dem Gencluster, deren deregulierte Expression in Verbindung mit Neoplasien steht (Heizmann et al., 2002).

Hinsichtlich der Beteiligung an verschiedensten Krankheitsbildern und zellulären Prozessen scheinen die S100-Proteine in vielen Körperzellen mit unterschiedlichen Genexpressionsmustern mit einer Vielzahl von Aufgaben vorzukommen (Donato et al., 2013).

Auch in der menschlichen Pulpa sind bereits erste S100-Proteine nachgewiesen worden. Zu deren Vorkommen und Wechselwirkungen liegen einige wenige Publikationen verschiedener Autoren vor. S100-Proteine werden hauptsächlich in Zusammenhang mit Komponenten der Immunabwehr gebracht.

Humoral und zelluläre Entzündungsreaktionen der Pulpa aber auch die durch Ca^{2+} -Signale vermittelte Bildung von Zahnhartgewebe (verschiedene Dentinarten) sind Prozesse, die mit der Beteiligung einiger Mitglieder der S100-Proteinfamilie in Verbindung stehen könnten (Komichi et al., 2019).

1.2.4 S100-Protein Vertreter

S100A1 wurde insbesondere im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen untersucht. Eine verringerte Expression von S100A1 ist verantwortlich für chronische Herzinsuffizienz, die durch die nachlassende positiv inotrope Wirkung erklärt werden kann. Weiter ist die geringe Expression ursächlich für arterielle und pulmonale Hypertonien und eine verringerte Regeneration des Myokards nach einem Herzinfarkt.

Zukünftig verspricht man sich mittels Gentherapie-Arzneimittelprodukten (GTMP) die Expression von S100A1 gezielt in den betroffenen Arealen zu steuern (Rohde et al., 2015). S100A2 konnte bereits als Tumor-Suppressor-Protein in diversen Tumoren nachgewiesen werden (Donato et al., 2013). Gegenteilige Funktionen jedoch hat es im Pankreaskarzinom (Chen et al., 2023).

S100A3 zeigt in Haarwurzelzellen und Astrozytomen ein erhöhtes Vorkommen. Durch seinen hohen Cysteingehalt wirkt es oxidativem Stress entgegen (Donato et al., 2013).

S100A4 konnte bereits in Tumor- und Stromazellen, myeloiden Zellen, Adipozyten, Fibroblasten, Immunzellen und vaskulären Zellen nachgewiesen werden (Donato et al., 2013). In vitro Studien konnten S100A4 auch in der menschlichen Zahnpulpa nachweisen. Unter den verschiedenen Pulpazellen weisen Zellen des Pulpa-Dentin-Komplexes und der Odontoblasten eine 10- bis 100-fach höhere Expression von S100A4 auf als die übrigen Zellen. Das macht S100A4 zur Differenzierung verschiedener pulpalen Linien zu einem vermeintlich interessanten Markerprotein (Gallorini et al., 2021).

S100A6 wird in Lungen-, Dickdarm-, Bauchspeicheldrüsen- und Leberkrebs sowie diversen anderen Krebsarten wie Melanomen exprimiert. Nicht nur an der Invasion, Proliferation und Migration von Tumoren ist S100A6 beteiligt sondern auch an der Pathogenese nicht-neoplastischer Krankheiten (Yang et al., 2023). In einer in vitro Studie wurde das Vorkommen in menschlichen Odontoblasten nachgewiesen (Ren et al., 2022).

S100A7 wird beim Fortschreiten kariöser Prozesse während des Abbaus von Dentin durch Matrix-Metalloprotease-20 (MMP-20) freigesetzt. Metabolisierte Dentinmatrix wird eine wichtige Rolle in regenerativen Prozessen von Pulpagewebe zugesprochen. S100A7 scheint die Tertiärdentinbildung bei der direkten Pulpaüberkappung anzuregen. S100A7 soll die Stammzelldifferenzierung anregen (Komichi et al., 2019). Unter mechanischem Stress z. B. bei intrapulpal erhöhtem Druck während einer Pulpitis oder bei kieferorthopädisch bewegten Zähnen exprimierten menschliche Pulpa-Zellen höhere Raten von S100A7. Monozyten differenzieren unter solchen Bedingungen zu Osteoklasten/ Odontoklasten. Wurzelresorptive Prozesse scheinen daher mit diesem Protein in Verbindung zu stehen (Charoenpong et al., 2019).

Bereits 2003 wurde eine erhöhte Genexpression von S100A8/-A9/-A12 und -A13 in Pulpagewebe von Zähnen mit chronisch kariösen Läsionen nachgewiesen. Man vermutet, dass im Rahmen der Pulpitis deren Hochregulierung durch Aktivierung der Neutrophilen erfolgt (McLachlan et al., 2004).

S100A16 ist ein ungewöhnliches Mitglied der S100-Familie, da es mehrere Merkmale vereint, die nicht mit den Eigenschaften dieser Gen- und Protein-Familie übereinstimmen. Im Gegensatz zu den sonstigen untersuchten S100 Proteinen besitzt -A16 nur ein funktionelles EF-Hand-Motiv und ist in sämtlichen Geweben weit verbreitet. Erstmals wurde

eine Überexpression aus einem Astrozytom isoliert (Basnet et al., 2023). Andere Studien zeigen eine Beteiligung bei der Adipogenese bedingt durch den negativen Einfluss auf die Insulinsensitivität (Liu et al., 2011).

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das Vorkommen von einzelnen S100-Proteinen konnte bereits in gesundem als auch entzündlichem Pulpagewebe nachgewiesen werden (Cai et al., 2022; Charoenpong et al., 2019; Gallorini et al., 2021; Khorasani et al., 2018; Komichi et al., 2019; McLachlan et al., 2004). Die Rolle einzelner S100-Proteine in inflammatorischen und regenerativen Prozessen in verschiedensten Geweben ist beschrieben (Donato et al., 2013).

Zu der spezifischen Rolle von S100-Proteinen in der Pulpitis wurde bisher wenig publiziert.

Ziel der Arbeit war es, die Expressionsmuster verschiedener S100-Proteine

- in gesunder humaner Zahnpulpa
- bei asyptomatisch irreversibler Pulpitis
- bei symptomatisch irreversibler Pulpitis

bezüglich des jeweils quantitativen Transkriptlevels zu untersuchen und gegenüberzustellen.

Die 13 S100-Mitglieder S100A1, S100A2, S100A3, S100A4, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, S100A10, S100A11, S100A13, S100A14, S100A16 wurden basierend auf ihrer Beteiligung an entzündlichen Prozessen, Zelldifferenzierung, Angiogenese oder als interagierende Partner (S100A8/ S100A9 können Heterodimere bilden) ausgewählt.

Aufgrund der bereits vorliegenden Studienlage zu S100-Proteinen in entzündlichen Prozessen im menschlichen Körper, einer aber noch unzureichenden wissenschaftlichen Untersuchung zu deren Vorkommen und Beteiligung an entzündlichen Prozessen in der menschlichen Zahnpulpa, ergaben sich folgende Fragestellungen und Ziele der Arbeit: Lassen sich die genannten 13 S100-Proteinmitglieder in menschlicher Zahnpulpa nachweisen und sind sie auch in allen 3 klinisch diagnostizierten Gruppen, der gesunden Pulpa

(HP), der asymptomatisch irreversiblen Pulpitis (AIP) und der symptomatisch irreversiblen Pulpitis (SIP) nachweisbar? Lassen sich quantitative Unterschiede des Genexpressionslevels feststellen?

- Gibt es quantitative Expressionsunterschiede zwischen HP und SIP sowie AIP?
- Gibt es quantitative Expressionsunterschiede zwischen SIP und AIP?
- Könnten etwaige Erkenntnisse zu den quantitativen Expressionsmustern zukünftig den klinischen Alltag bei der Diagnosefindung erleichtern, bestehende Therapieformen verbessern oder sogar neue Therapieformen etablieren?

2. Material und Methoden

2.1 Übersicht

Im Rahmen routinemäßiger zahnärztlicher Behandlungen konservierender und oralchirurgischer Art erfolgte die Gewinnung von Pulpagewebe. Es wurden Proben von gesunder Pulpa (n=19), von symptomatisch (n=15) und asymptomatisch (=7) irreversibler Pulpitis untersucht. Das Untersuchungsmaterial wurde mittels mRNA Extraktion, Synthetisierung komplementärer DNA-Stränge und anschließender quantitativer PCR auf die Expressionsmuster verschiedener Proteine untersucht und anschließend statistisch ausgewertet.

Aus den Ergebnissen dieser Dissertation erfolgte 2022 eine Veröffentlichung im Journal of Endodontics des Elsevier-Verlages (Jungbluth et al., 2022).

2.2 Reagenzien und Materialien

Nach Entnahme der Pulpaprobe wurden diese in Kryoröhrchen (Fa. Nalgene™ Nunc International, Rochester, NY, USA) bei -80° Celsius eingelagert.

Verschiedene Reaktionskits kamen zum Einsatz. Für die RNA Isolation wurde das peqGOLD Total RNA Kit (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), für die Synthetisierung der einsträngigen komplementären DNA das iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (Fa. Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA) und für die Real-Time-PCR das iQ™ SYBR® Green Supermix Kit (Fa. Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) verwendet. Bei den Primern handelte es sich um qualitativ hochwertige Exemplare der Fa. Metabion International AG (Martinsried, Deutschland). Das Primerdesign stammte von PD Dr. Winter.

2.3 Probengewinnung

Um Gewebeproben gesunder und eindeutig entzündungsfreier Pulpen zu gewinnen, sammeln wir die HP Proben im Rahmen elektiver Weisheitszahnentfernungen. Hierbei handelte es sich um vollretinierte dritte Molaren des Ober- sowie Unterkiefers junger Patienten.

ten. Die Entfernung der Weisheitszähne im Ganzen erfolgte durch Osteotomie. Der gesunde Zustand des Pulpengewebes konnte hier vorausgesetzt werden. Umgehend wurden die Weisheitszähne mit einer Diamant-Bandsäge EXAKT 300 (Fa. EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) längs getrennt. Dabei wurde darauf geachtet, nicht mit dem Sägeblatt in direkten Kontakt zum Pulpagewebe zu kommen. Anschließend wurde das Pulpagewebe entnommen und in Kryoröhrchen (Fa. Nalgene™ Nunc International, Rochester, NY, USA) auf -80° Celsius in der Gewebebank eingelagert. Die chirurgischen Eingriffe fanden bei Dr. Dr. Simonsmeier, Medico Klinik, Welschnonnenstraße 1, Bonn und in der Poliklinik für chirurgische Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Bonn (Direktor: Prof. Dr. G. Wahl) statt.

Pulpagewebe mit symptomatischer irreversibler Pulpitis (SIP) oder asymptomatischer irreversibler Pulpitis (AIP) konnte im Rahmen von endodontischen Behandlungen gewonnen werden. Die Diagnosestellung erfolgte streng nach klinischen Tests, die auf Grundlage der Konsensus-Konferenz-basierten Klassifikation der American Association of Endodontics (AAE) basierte (Duncan et al., 2019).

Klinische Voraussetzungen hierfür waren ein positiver Vitalitätstest mit Kältespray (Pluline, Fa. Pluradent, Deutschland), die Schmerzsymptomatik bei SIP mit Perkussionsempfindlichkeit und/ oder Palpationsschmerz. Radiologische Anzeichen auf apikale Osteolyse, einem sicheren Anzeichen für eine bereits bestehende Pulpanekrose, durften nicht vorliegen.

Die klinischen Parameter wurden auf einem standardisierten Formular erfasst, welches für die Studie entwickelt wurde. Die gesammelten Informationen umfassten die Zahnnummer, das Ergebnis der Vitalitätsprobe, des Perkussions- und Palpationstests, radiologische Befunde und prozedurale Merkmale bezüglich der klinischen Entnahme des Pulpagewebes. Die verwendeten Formblätter sind in Kapitel 6. Anhang abgedruckt (Abb.: 5-8).

Nach Trepanation erfolgte die Vitalexstirpation des vollständigen Pulpagewebe mit Exstirpationsnadeln VDW®STERILE Barbed Broaches (Fa. VDW GmbH, München, Deutschland). Die gesamte Exstirpationsnadel samt Pulpagewebefetzen wurde in Kryoröhrchen (Fa. Nalgene™ Nunc International, Rochester, NY, USA) gelegt. Die Proben wurden in

der zahnärztlichen Gemeinschaftspraxis Dres. Brune, Rüttenscheider Stern 5, Essen gewonnen. Wegen der geografischen Entfernung vom Entnahmeort und der in Bonn befindlichen Gewebebank erfolgte eine temporäre Zwischenlagerung in einem Flüssigstickstoffbehälter, der regelmäßig befüllt werden musste. Es erfolgte der Proben transport von Essen nach Bonn in einem Trockeneisbehälter. So konnte eine permanente Lagerung bei -80° Celsius gewährleistet werden.

Alle Patienten gaben ihre Zustimmung, ihre Gewebeproben zu wissenschaftlichen Zwecken zur Verfügung zu stellen. Vor der Studie erteilte die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät die ethische Genehmigung (Nr. 217/16, Ethikkommission, Universität Bonn). Bei minderjährigen Gewebespendern erfolgte die Zustimmung nach Aufklärung gemeinsam mit einem Erziehungsberechtigten, der die Einverständniserklärung unterzeichnete.

Tab. 1: Pulpagewebeproben mit Informationen zu Diagnose, Geschlecht und Alter der Patienten, ausgeschlossene Proben sind mit einem (*) gekennzeichnet

Proben	Diagnose	Geschlecht	Alter
B1	HP	w	18
B2	HP	w	18
B3	HP	w	18
B4	HP	w	20
B5	HP	w	20
B6	HP	w	20
B7	HP	w	29
B8	HP	w	29
B9	HP	w	15
B10	HP	w	15
B11	HP	w	15
B12 *	HP	w	76
B13	HP	m	17
B14	HP	w	27
B15	HP	w	18

Proben	Diagnose	Geschlecht	Alter
B16	HP	w	15
B17	HP	w	13
B18	HP	m	24
B19	HP	w	75
B20	AIP	w	75
B21	AIP	m	60
B22	AIP	m	53
B23	SIP	m	46
B24	SIP	m	46
B25	HP	w	19
P1	AIP	w	45
<i>P2 *</i>	<i>AIP</i>	<i>m</i>	<i>45</i>
<i>P3 *</i>	<i>SIP</i>	<i>w</i>	<i>49</i>
<i>P4 *</i>	<i>SIP</i>	<i>w</i>	<i>45</i>
P4 SW	AIP	m	54
<i>P5 *</i>	<i>SIP</i>	<i>w</i>	<i>57</i>
P7	SIP	w	35
P8	SIP	w	45
<i>P9 *</i>	<i>SIP</i>	<i>w</i>	<i>40</i>
<i>P10 *</i>	<i>SIP</i>	<i>w</i>	<i>28</i>
P11	SIP	w	48
P12	AIP	w	49
<i>P13 *</i>	<i>SIP</i>	<i>m</i>	<i>29</i>
P14	SIP	w	34
P15	SIP	w	41
<i>P16 *</i>	<i>SIP</i>	<i>m</i>	<i>37</i>
P17	SIP	w	57

Proben	Diagnose	Geschlecht	Alter
P18 *	SIP	m	44
P21	SIP	m	62
P22	SIP	w	45
P23	SIP	w	35
P24	SIP	w	58
P25	SIP	w	53
P26	SIP	m	36
P27	SIP	w	70
(P)28 *	HP	w	46
(P)29 *	HP	w	28
(P)30 *	HP	m	29
(P)31 *	HP	m	56
(P)33	HP	w	65
(P)34 *	SIP	w	53
(P)32	AIP	w	24

2.4 RNA Extraktion aus Pulpagewebe

Die Isolation der vollständigen Gewebe RNA erfolgte mit peqGOLD Total RNA Kits gemäß Herstellerangaben. Im Gegensatz zur Isolation von mRNA ist dies einfacher und weniger fehleranfällig. Nur in Fällen von geringsten Mengen RNA wäre die mRNA Isolierung notwendig, um ausreichend Ausgangsmaterial für die RT-PCR zu erhalten (Holzapfel und Wickert, 2007).

In einem ersten Schritt wurde genomische DNA aus dem Lysat gefiltert. Aufgetaute Gewebeproben kamen gemeinsam mit 300 µl Lysis Buffer in ein steriles Eppendorf-Röhrchen. Mit einem Pistill (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde das Lysat für 3 min homogenisiert, um es auf die DNA Removingsäule zu pipettieren und für 1 min bei 12.000 x g zu zentrifugieren. Die DNA Removingsäule wurde verworfen.

Im zweiten Schritt wurde die RNA aus dem Zentrifugat herausgefiltert, um wieder ausgewaschen zu werden und RNase-frei gelagert zu werden.

Dem Zentrifugat wurde das 1-fache Volumen 300 µl 70 % Ethanol hinzugefügt und kurz gevortext. Es wurde dann auf die PerfectBind RNA Säule pipettiert und für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen.

Auf die PerfectBind RNA Säule wurde dann einmalig 500 µl RNA Wash Puffer I gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g. Das Zentrifugat wurde verworfen. Dann wurde auf die PerfectBind RNA Säule 600 µl RNA Wash Puffer II gegeben und wieder für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde erneut verworfen. Der Waschvorgang mit Puffer II wurde zweimal durchgeführt.

Zur Trocknung wurde die Säule erneut zentrifugiert, diesmal für 2 min bei voreingestellten 10.000 x g.

Abschließend wurde die Elution der Total-RNA erstellt. 55 µl RNase-freies Wasser wurde über die Säule pipettiert und für 1 min bei 5000 x g zentrifugiert. Zur Bestimmung der RNA Konzentration schloss sich die NanoDrop® Untersuchung an.

2.4.1 Bestimmung der RNA Konzentration

Da jede Pulpagewebeprobe unterschiedlich viel RNA Material enthielt, musste die Konzentration der extrahierten RNA ermittelt werden. Hierzu verwendeten wir das NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer (Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Jeweils 1 µl jeder Probe wurde mit einer Lichtwellenlänge von 260 nm auf die RNA Konzentration untersucht. Um die Qualität der Proben zu überprüfen, wurden die Proben ebenfalls bei einer Lichtwellenlänge von 280 nm untersucht. Es wurde der Absorptionsquotient 260 nm / 280 nm bestimmt. Wenn ein Wert größer 1,8 ermittelt wurde, war die RNA-Qualität ausreichend, um in cDNA umgewandelt zu werden. Die Proben wurden dann bei -80 °C gelagert.

Anhand der Konzentration konnte berechnet werden, in welchem Verhältnis Probe und Nuklease-freies Wasser gemischt werden musste, um 13 µl Gesamtvolumen mit 500 ng RNA zu erhalten.

2.5 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion zur cDNA Synthese

Die Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion wird seit 1987 zur Untersuchung von mRNA Expressionsmustern angewendet. Außerdem kann hochsensitive virale RNA nachgewiesen werden (Holzapfel und Wickert, 2007).

In einem ersten Schritt wird anhand der RNA ein komplementäres DNA (cDNA) Fragment erstellt. Zur Initiierung der Synthese wird ein spezieller Primer, ein Oligo-(dT)₂₀-Primer, an die RNA hybridisiert. Mittels des Enzyms Reverse-Transkriptase wird ein cDNA Strang gewonnen. Weiter werden diese cDNA Stränge simultan durch PCR repliziert (Holzapfel und Wickert, 2007; Veres et al., 1987).

Zur cDNA Synthese verwendeten wir in unserer Untersuchungsreihe das iScript™ Select cDNA Synthesis Kit und den MyCycler™ Thermal Cycler. Das iScript™ Select cDNA Synthesis Kit enthielt Oligo(dT) Primer, der komplementär an die RNA bindet. Die ebenfalls enthaltene Reverse-Transkriptase ermöglichte letztendlich die Synthetisierung von cDNA Fragmenten.

Ein spezielles Temperaturprogramm bestand aus einer Inkubationszeit von 90 min bei 42 °C, einer Inaktivierung der reversen Transkriptase durch einen Temperaturanstieg auf 85 °C für 5 min und einer abschließenden Abkühlung der so gewonnenen cDNA für 1 min bei 4 °C. Der Mastermix für die cDNA-Synthese bestand aus 1 µl iScript™ reverse Transkriptase, 2 µl Oligo(dT) Primer und 4 µl 5x iScript™ select reaction Mix. Insgesamt hatte der Mastermix so ein Volumen von 7 µl. Streng nach Berechnungen des NanoDrop®-Berichtes wurde dem Mastermix noch 500 ng RNA mit entsprechendem Volumen Nuklease-freien Wassers hinzu pipettiert, sodass jedes PCR-Tube 20 µl enthielt. Die Proben wurden nach Abschluss des iCycler™ Programms bei -20 °C gelagert.

2.6 Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird verwendet, um DNA-Material zu vervielfältigen. Die PCR simuliert das natürliche Prinzip der DNA-Replikation. Es umfasst drei sich wiederholende Schritte. Ein PCR-Zyklus startet mit der Denaturierung der DNA-Vorlage, der bei 95 °C aufgeschmolzen wird. Dies führt zur Bildung einzelsträngiger DNA-Moleküle, an die sich in der zweiten Annealingphase bei etwa 55-60 °C zwei synthetische gegen-

läufig orientierte Oligonukleotide (Primer, ca. 20 Basenpaare lang) an die jeweils komplementäre Sequenz am 3'-Ende anlagern. Die Primer dienen als Startmoleküle zur Verlängerung der Zielsequenz. Die Verlängerung der Zielsequenz erfolgt bei 72 °C und wird in der Regel mit einer rekombinanten, hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) durchgeführt. Dieser Zyklus wird etwa 40 x wiederholt und führt zu einer exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz. Die PCR-Experimente werden in Thermocyclern durchgeführt, die automatisch ein zyklisches, individuell programmierbares Temperaturprofil steuern (Holzapfel und Wickert, 2007).

Bei der Real-Time-PCR wird dem PCR Ansatz SYBR® Green I beigemengt. Das fluoreszierende SYBR® Green I lagert sich während der Elongationsphase an die entstehenden DNA-Produkte (Amplifikationsprodukte) an. Es entsteht ein Fluoreszenzsignal das proportional zur DNA-Produktmenge ist. Mit zunehmender Amplifikation steigt das Fluoreszenzsignal an. SYBR® Green I bindet nicht am Primer sondern lagert sich unabhängig von diesen in kleinen Furchen der doppelsträngigen DNA-Produkte ein. Fluoreszenzmessungen finden immer am Ende der Elongationsphase statt. Hier liegt ein Maximum an gebundenen SYBR® Green vor, welches bei einer Wellenlänge von 490 nm fluoresziert (Fraga et al., 2008).

Kontinuierliche Fluoreszenzmessungen zu jedem PCR Zyklus ermöglichen es, die Zunahme des Fluoreszenzsignals zu registrieren. Bei der graphischen Darstellung zeigt sich der Ct-Wert genau dort, wo die Amplifikationskurve den Schwellenwert überschreitet und weiter exponentiell ansteigt. Hier sondert sich das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundfluoreszenz ab. Dieser sogenannte Schwellenwert dient der Quantifizierung. Je später der Schwellenwert erreicht wird, desto geringer die Ausgangs-cDNA-Konzentration und letztendlich die ursprüngliche RNA-Konzentration (Higuchi et al., 1993; Holzapfel und Wickert, 2007).

SYBR® Green I bindet unspezifisch an sämtliche entstehende Amplifikationsprodukte. Dies sind die spezifischen PCR-Produkte (Zielgene) aber auch andere doppelsträngige DNA-Moleküle (Amplifikationsartefakte). Amplifikationsartefakte stellen Primer-Dimer oder PCR-Beiprodukten. Die SYBR® Green Methode ist hoch sensitiv aber weniger spezifisch. Die Spezifität der Quantifizierung erfolgt durch die Spezifität der Primer.

Die PCR-Produkte werden am Ende der PCR mittels einer Schmelzkurvenanalyse auf Spezifität untersucht. Zielgene besitzen eine charakteristische Schmelzkurve, womit sie

sich von etwaigen Amplifikationsartefakten unterscheiden lassen (Holzapfel und Wickert, 2007).

Bei der Negativkontrolle, die anstelle von cDNA mit H₂O angesetzt wird, darf bei ausreichender Spezifität des Primers keinerlei PCR Produkt nachweisbar sein (Fraga et al., 2008).

In dieser Arbeit wurde die Real-Time-PCR im CFX ConnectTM Real-Time PCR Detection System (Fa. Bio Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Die eingesetzten Primer (Tab. 3) waren qualitativ hochwertige Produkte (HPLC gereinigt) der Fa. Metabion International AG (Martinsried, Germany). Bereits im Vorfeld unserer Studie waren diese analog zur Studie von Hoppe und Kollegen (Hoppe et al., 2016) validiert und optimiert worden. Effizienzen wurden durch Verdünnungsreihen und Korrelationsanalysen mit den entsprechenden Ct Werten durchgeführt (Pfaffl, 2001).

In einem ersten Schritt wurden die Real-Time-PCR Ansätze erstellt. Ein einzelner Ansatz bestand aus 24 µl Mastermix sowie 1 µl cDNA aus der vorhergegangenen reversen Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (Kap. 2.5). Der Mastermix für einen Ansatz setzte sich zusammen aus 12,5 µl SYBR[®] Green Supermix, 1 µl cDNA, 10,5 µl H₂O sowie 125 pmol Primer (rückwärts- und vorwärts -) für das entsprechende Zielgen.

Die Real-Time-PCR wurde dann nach dem aufgeführten Protokoll (Tab. 2) durchgeführt.

Tab. 2: Real-Time-PCR Protokoll

Einleitung:		
Initialer cDNA Denaturierungsschritt	95°C	3:00 min
40 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	0:15 min
Annealing	63°C- 69°C Temperatur primerspezifisch (Tab. 3)	0:30 min
Elongation	72°C	0:30 min

Die Primersequenzen und deren Annealing-Temperaturen sind Tab. 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Primer (modifiziert nach Jungbluth et al., 2022)

Gene	Primersequenz (vorwärts/rückwärts)	Effizienz	(°C)	(BP)
GAPDH	5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCA-3' 5'-CCAGTAGAGGCAGGGATGAT-3'	1,93	69	132
S100A1	5'-GATGGAGACCCTCATCAACGTGT-3' 5'-CAGCCACAAGCACCACATACTCCT-3'	1,92	67	218
S100A2	5'-CTGGCTGTGCTGGTCACTACCTT-3' 5'-TGGGCAGCCCTGGAAGAAGTCATT-3'	1,97	69	258
S100A3	5'-CCTTCCAGGAATACGCAGGGCGCT-3' 5'-CAGTAGAGACAGAGGCAGGCAAG-3'	2,03	69	227
S100A4	5'-ATGGCGTGCCCTCTGGAGAAGG-3' 5'-TCATTTCTTCCTGGGCTGCTTATC-3'	2,08	69	306
S100A6	5'-ATCTTCCACAAGTACTCCGGCAGG-3' 5'-CCCTTGAGGGCTTCATTGTAGATC-3'	2,06	69	227
S100A7	5'-ATGAGCAAACTCAAGCTGAGAGG-3' 5'-TCACTGGCTGCCCCCGGAAC-3'	1,95	69	306
S100A8	5'-GGTTCTGTTTTTCAGGTGGGGC-3' 5'-GGCTGCCACGCCCATCTTTATC-3'	1,98	68	283
S100A9	5'-AGCTGGAACGCAACATAGAGACCAT-3' 5'-CGTGGGAGGCCAGGTTAGC-3'	2,04	69	254
S100A10	5'-TCGCTGGGGATAAAGGCTACTT-3' 5'-GCAATGGTGAGGCCCGCAATTAG-3'	2,11	69	190
S100A11	5'-CCCTACAGAGACTGAGCGGTGCA-3' 5'-CAAGCCATAGCTAGGCCACCAA-3'	1,91	69	255
S100A13	5'-AGCAGAACCACTGACAGAGCTAG-3' 5'-CCAGCTCCCCAATCAATCTCCAGT-3'	1,89	69	245
S100A14	5'-GGCCATTGAGACCCTCATCAAGAA-3' 5'-TCTTGGCCGCTTCTCCAATCAGCT-3'	2,13	69	221
S100A16	5'-GAAGGCAGTCATTGTCCTGGTGG-3' 5'-TGATGCCGCCTATCAAGGTCCAG-3'	2,02	69	233

Gene	Primersequenz (vorwärts/rückwärts)	Effizienz	(°C)	(BP)
Cox-2	5'-ATTGACCAGAGCAGGCAGAT-3' 5'-CAGGATACAGCTCCACAGCA-3'	2,17	63	163
HMBG1	5'-GCCTCGCTGAGGAAAAATAACTAAACATG-3' 5'-CTTTAGCTCGATATGCAGCAATATCCTTTTC-3'	2,05	69	522
IL-8	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGG-3' 5'-TGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAC-3'	2,02	68	297

2.7 Relative Quantifizierung

GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist ein glykolytisches Enzym, welches neben der Glykolyse an weiteren Aufgaben auf zellulärer Ebene partizipiert z. B. DNA-Reparatur, Export von tRNA, Membranfusion und -transport, Zytoskelttdynamik und Apoptose (Tristan et al., 2011).

Housekeeping-Gene sind zur Aufrechterhaltung grundlegender zellulärer Funktionen notwendig. Sie sind in sämtlichen Geweben des menschlichen Körpers vertreten. Seit Jahrzehnten wird bei deren Verwendung vorausgesetzt, dass diese unabhängig von externen Faktoren ubiquitär und homogen exprimiert werden (Pfaffl, 2004). Bei der relativen Quantifizierung normalisiert man die Expression eines Zielgenes mit eben diesen konstanten Housekeeping Genen. Die Expressionsrate wird auf das Housekeeping Gen bezogen. Somit sind die gewonnenen Werte vergleichbar (Pfaffl, 2004). Die Varianz in den Ergebnissen der Genexpression kann so verringert werden. Dadurch sind die relativen Expressionsmuster der unterschiedlichen Gewebeproben miteinander vergleichbar.

Die Nachweisgrenze der Zielgene wurde bei kleiner 35 Zyklen gesetzt. Das Detektionslimit wurde bestimmt ab einem Ct Wert von 35 (gleich ein Molekül) (Kraus et al., 2021).

Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wurde in dieser Arbeit genutzt, um die relative differenzielle Quantifizierung zu ermitteln.

In einem ersten Schritt erfolgte die Ermittlung von ΔCt (relative Genexpression), um in einem zweiten Vorgang $\Delta\Delta\text{Ct}$ (relative differentielle Genexpression) zu errechnen (Rao et al., 2013).

1. $\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{GAPDH})$
2. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Pulpitis SIP oder AIP}) - \Delta Ct(\text{Gesunde Pulpa HP})$

2.8 Statistische Auswertung

Mit dem Computerprogramm SPSS Statistics Version 25 (Fa. IBM Corp., Armonk, New York, USA) erfolgte die statistische Auswertung der Ergebnisse.

In einem ersten Schritt wurde eine rein deskriptive statistische Auswertung durchgeführt. Dabei wurden Mittelwert und Standardabweichungen innerhalb der drei verschiedenen Gruppen gesunder Pulpa (HP), asymptomatisch irreversibler Pulpitis (AIP) und symptomatisch irreversibler Pulpitis (SIP) bestimmt.

Innerhalb der Gruppen HP, SIP und AIP lagen normalverteilte Werte vor. Mittels Kolmogorow-Smirnow-Test und Shapiro-Wilk-Test konnten wir die Varianzhomogenität bestätigen.

Weiter folgte die Einweg-Varianzanalyse (One-Way ANOVA). Hierfür nutzen wir die ΔCt -Werte (relativen Expressionsmuster) der 3 Gruppen (Tab. 4). Die ANOVA wurde über die Gruppen HP, AIP und SIP innerhalb jedes Zielgens durchgeführt. Dieser globale Test dient der Feststellung, ob signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen HP, AIP und SIP bestehen (Bewick et al., 2004).

Wo genau die Unterschiede bestehen, erfordert weitere Analysen. Hierfür eignen sich Mehrfachvergleichsverfahren, mit denen spezifische Unterschiede zwischen den Gruppen ausgemacht werden können. Im vorliegenden Fall kam der Bonferroni-Post-hoc-Test zum Einsatz. Hierbei wird das Signifikanzniveau durch die Anzahl der Vergleiche geteilt. Die Wahrscheinlichkeit eines Typ I Fehlers wird verringert, ein Typ II Fehler, also das Versäumnis eine alternative Hypothese zu erkennen, wird erhöht (Armstrong, 2014). Das Signifikanzlevel wurde auf gängige 5 % festgelegt ($p < 0.05$).

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 57 Pulpaprobe von verschiedenen Patienten gesammelt und molekularbiologisch auf Expressionsmuster von S100-Proteinen und Entzündungsmarkern untersucht. Die Proben wurden nach klinischen Gesichtspunkten in 3 Kategorien unterteilt:

1. Gesunde Pulpa HP (n=21)
2. Asymptomatisch irreversible Pulpitis AIP (n=8)
3. Symptomatisch irreversible Pulpitis SIP (n=28)

16 Gewebeproben, davon n=2 in der Gruppe HP, n=1 in der Gruppe AIP und n=13 in der Gruppe SIP, der ursprünglichen 57 Gewebeproben konnten aufgrund eines zu geringen PCR-Signals nicht verwertet werden und mussten daher ausgeschlossen werden.

Endgültig verblieben somit n=19 in der Gruppe HP, n=7 in der Gruppe AIP und n=15 in der Gruppe SIP.

3.1 Relative Genexpression der Zielgene

Nach Verrechnung der RNA-Expressionen der Zielgene mit dem Housekeeping Gen GAPDH lagen erste Werte zur relativen Gen-Expression vor. Bei der relativen Genexpression handelt es sich um das Verhältnis des Zielgens zur Expressionshöhe des Housekeeping Gens. Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen Genexpression sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Zielgene waren die 13 S100-Proteine S100A1, S100A2, S100A3, S100A4, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, S100A10, S100A11, S100A13, S100A14, S100A16 sowie drei klassische Entzündungsmarker IL-8, Cox-2 und HMGB-1.

Tab. 4: Relative Genexpression (Mittelwerte mit Standardabweichung der Mittelwerte [SEM]) in gesunder (HP), asymptomatisch irreversibler Pulpitis (AIP) und symptomatisch irreversibler Pulpitis (SIP) (modifiziert nach Jungbluth et al., 2022).

Gen	HP	+/- SEM	AIP	+/- SEM	SIP	+/- SEM
S100A1	0,1033	0,00951	0,0521	0,01613	0,0029	0,00047

Gen	HP	+/- SEM	AIP	+/- SEM	SIP	+/- SEM
S100A2	0,0081	0,00028	0,0102	0,00070	0,0016	0,00014
S100A3	0,0044	0,00025	0,0198	0,00395	0,0003	0,00002
S100A4	0,7709	0,56778	0,9240	9,34388	0,0722	0,01943
S100A6	10,0421	0,73982	7,1119	3,11065	0,1621	0,07066
S100A7	0,0024	0,00008	0,0053	0,00051	0,0019	0,00013
S100A8	0,0082	0,00040	0,0303	0,00248	0,0224	0,00346
S100A9	0,0101	0,00053	0,0914	0,01662	0,0259	0,00584
S100A10	1,2747	1,17786	0,8628	5,31120	0,0188	0,00421
S100A11	1,3736	2,03478	1,5694	1,37727	0,3281	0,09543
S100A13	9,7039	0,63962	9,2728	3,32428	0,0566	0,01621
S100A14	0,0005	0,00001	0,0022	0,00015	0,0014	0,00004
S100A16	0,0924	0,00284	0,1704	0,02636	0,1129	0,01220
IL-8	0,0002	0,00001	0,0043	0,00103	0,0008	0,00015
COX-2	0,0496	0,00240	0,1181	0,02019	0,0903	0,01323
HMGB-1	1,9248	0,27477	1,7174	1,08360	0,7867	0,90979

3.1.1 Relative Genexpression in gesunder Pulpa

Auffällig hoch sind die S100A6 (10,0421) und S100A13 (9,7039) Werte in der HP. Stark ausgeprägt sind weiter HMGB-1 (1,9248) mit dem 2 - fachen und S100A10 (1,2747) / - A11 (1,3736) mit dem 1,3 - fachen Expressionsniveau von GAPDH. Am niedrigsten ist der Wert von S100A14 (0,0005). Höchster und niedrigster Wert unterscheiden sich um den Faktor 20.000. Die restlichen S100-Protein Werte werden in geringerem Maße als das Housekeeping Gen exprimiert.

IL-8 (0,0002) und Cox-2 (0,0496) haben die geringste Expression in HP im Vergleich zu den beiden pulpitschen Gruppen AIP und SIP. Der dritte Entzündungsmarker HMGB-1 verhält sich gegensätzlich. In der HP ist er am stärksten ausgeprägt und gehört damit als Entzündungsmarker zu einem der am stärksten exprimierten Genen in HP.

3.1.2 Relative Genexpression in AIP

Auch in der AIP Gruppe sind die Expressionen von S100A6 (7,1119) und S100A13 (9,2728) weiter mit Abstand am stärksten ausgeprägt. HMGB-1 (1,7174) und S100A11 (1,5694) liegen weiterhin, wenn auch leicht verändert, über der Expression von GAPDH. S100A4 (0,924) sowie S100A10 (0,8628) werden minimal geringer als GAPDH exprimiert. Die Entzündungsparameter IL-8 (0,0043) und Cox-2 (0,1181) erreichen hier ihre Maximalwerte. HMGB-1 ist als Entzündungsmarker fast unverändert.

3.1.3 Relative Genexpression in SIP

Auffällig in der SIP Gruppe ist, dass keines der Gene stärker als das Housekeeping Gen exprimiert wird. Am stärksten vertreten unter den S100-Proteinwerten ist nun S100A11 (0,3281). S100A6 (0,1621) / -A16 (0,1129) weisen ebenfalls im Verhältnis zu den anderen S100-Proteinwerten starke Expressionen auf. In der SIP ist HMGB-1 (0,7867) nun als Entzündungsmarker mit dem höchsten Expressionswert vertreten.

3.2 Relative differenzielle Genexpression der Zielgene

Tab. 5: Differentielle Expression (Mittelwerte mit Standardabweichung der Mittelwerte [SEM] in asymptomatisch irreversibler Pulpitis (AIP) und symptomatisch irreversibler Pulpitis (SIP). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen AIP und HP oder SIP und HP sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet (modifiziert nach Jungbluth et al., 2022).

Gen	AIP	+/- SEM AIP	SIP	+/- SEM SIP
S100A1	0,504	0,156	0,028 *	0,005
S100A2	1,271	0,087	0,195 *	0,017
S100A3	4,515	0,901	0,062 *	0,006
S100A4	1,199	12,120	0,094 *	0,025
S100A6	0,708	0,310	0,016 *	0,007
S100A7	2,260	0,216	0,787	0,054
S100A8	3,703	0,302	2,734 *	0,422
S100A9	9,066	1,648	2,566	0,580

Gen	AIP	+/- SEM AIP	SIP	+/- SEM SIP
S100A10	0,677	4,167	0,015 *	0,003
S100A11	1,143	1,003	0,239	0,069
S100A13	0,956	0,343	0,006 *	0,002
S100A14	4,821 *	0,329	2,986 *	0,094
S100A16	1,846 *	0,285	1,223	0,132
IL-8	19,190 *	4,629	3,499 *	0,665
COX-2	2,383	0,408	1,822	0,267
HMGB-1	0,892	0,563	0,409 *	0,473

3.2.1 Relative differenzielle Genexpression in AIP

Die AIP Gruppe verzeichnet signifikante Expressionszunahmen für drei Zielgene. S100A14 steigt um das 4,82-fache und S100A16 lediglich auf das 1,85-fache an. IL-8 steigt am prominentesten um das 19,19-fache in der AIP an. Anders verhalten sich die restlichen zwei Entzündungsmarker: Cox-2 steigt leicht auf das 2,38-fache an, HBMGH-1 verzeichnet sogar einen minimalen Abfall um das 0,89 - fache. Beide Veränderungen sind nicht signifikant. Weiter auffällig, ebenfalls nicht signifikant, stellt sich für S100A3 (4,51-fach), S100A7 (2,26-fach), S100A8 (3,7-fach) und S100A9 (9,07-fach) eine Expressionszunahme dar. Die restlichen S100A1, S100A2, S100A4, S100A6, S100A10, S100A11 und S100A13 weichen ohne Signifikanz gering ab. Die Expressionsraten liegen grob beim 0,5- bis 1,27 – fachen der HP.

3.2.2 Relative differentielle Genexpression in SIP

Ein Vergleich von HP zu SIP zeigt deutliche Unterschiede. Insgesamt sind 11 signifikante Unterschiede zu verzeichnen. Drei Werte zeigen eine signifikante Expressionszunahme. Das sind die beiden Zielgene S100A8 (2,73 – fache) und S100 A14 (2,99 – fache). IL-8 zeigt ebenfalls eine Expressionszunahme auf die noch näher eingegangen wird. Die restlichen S100-Proteine mit signifikanten Änderungsraten fallen deutlich ab: S100A1

(0,03fach), S100A2 (0,2fach), S100A3 (0,06fach), S100A4 (0,09fach), S100A6 (0,02fach), S100A10 (0,01fach) und S100A13 (0,01).

Der Entzündungsmarker IL-8 zeigt eine signifikante Zunahme um das 3,5-fache. Im Vergleich dazu reduziert sich der zweite Entzündungsmarker HMGB-1 um das 0,41-fache signifikant. Der dritte Entzündungswert Cox-2 steigt ohne Signifikanz um das 1,82-fache an.

Vergleicht man die AIP Werte direkt mit den SIP Werten so liegen ausnahmslos höhere Expressionswerte in der Gruppe der AIP vor. 9 von den 13 Zielgenen sind sogar im direkten Vergleich signifikant erhöht. In der Gruppe der S100-Proteine zeigen S100A1, S100A2, S100A4, S100A6, S100A7, S100A10, S100A13 und S100A16 signifikante Unterschiede. Bei den Entzündungsmarkern ist lediglich die Reduktion von HMGB-1 signifikant.

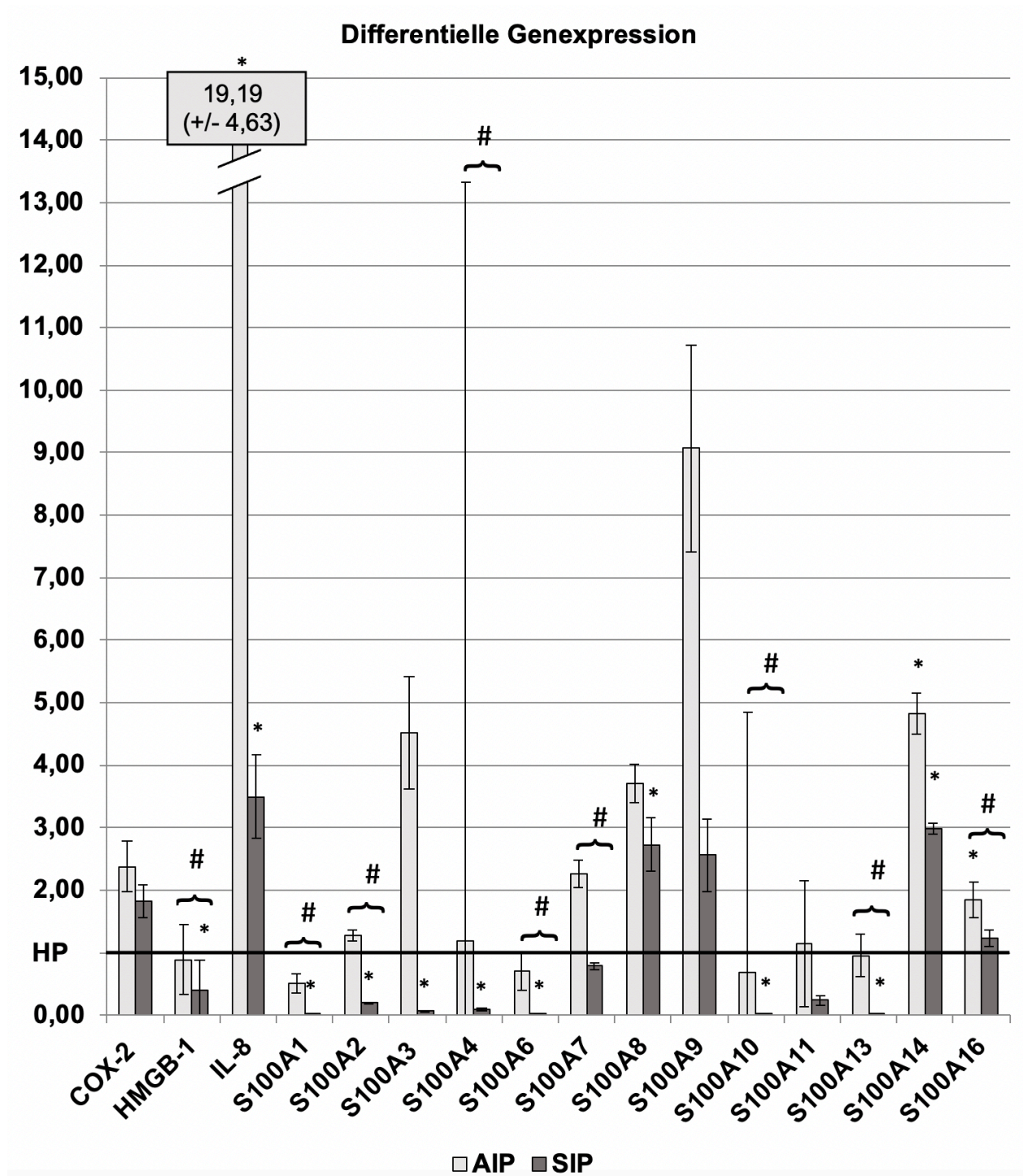


Abb. 4: Graphisch werden die Ergebnisse der differentiellen Genexpression der AIP (hellgraue Balken) und SIP (dunkelgraue Balken) im Vergleich zur auf Wert 1 normierten HP (verdickte schwarze Linie bei 1,00) in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Standardabweichung wird mittels Fehlerindikatoren und für IL-8 in Klammern angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen HP und AIP sowie HP und SIP sind durch ein Sternchen (*) oberhalb des entsprechenden Balkens gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen AIP und SIP sind durch ein Doppelkreuz (#) oberhalb der Balken kenntlich gemacht (modifiziert nach Jungbluth et al., 2022).

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Genexpressionsmuster von 13 Vertretern der S100-Proteine in symptomatisch irreversibel entzündeter Pulpa (SIP) und asymptomatisch irreversibel entzündeter Pulpa (AIP) im Vergleich zu gesundem Pulpagewebe (HP).

Von den ursprünglich gesammelten 57 Gewebeproben konnten 41 untersucht werden. Signifikante Expressionsratenänderungen unterschiedlicher Ausprägung stellten wir sowohl in der Gruppe SIP als auch AIP fest.

In der Gruppe SIP zeigten 7 der 13 untersuchten S100-Proteine starke Expressionsratenrückgänge. S100A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10 und -A13 waren signifikant verringert. Dagegen zeigten sich S100A8 sowie -A14 signifikant erhöht.

In der Gruppe AIP verhielten sich die Zielgenexpressionsraten weitestgehend konstant. Lediglich S100A14 und -A16 waren signifikant erhöht.

Zur Einordnung des Entzündungszustandes wurden ebenfalls Entzündungsmarker untersucht.

HMGB-1 zeigte in der Gruppe SIP einen signifikanten Expressionsabfall. IL-8 stieg in SIP signifikant an.

IL-8 zeigte in der Gruppe AIP eine signifikante Expressionszunahme.

4.1 Methodendiskussion

16 Gewebeproben (HP: n=2, AIP: n=1, SIP: n=13) konnten aufgrund des zu geringen PCR-Signals nicht verwertet werden und wurden daher ausgeschlossen.

Ursache war sehr wahrscheinlich die geringe Ausgangsmenge an Pulpagewebe und daraus resultierende niedrige RNA Mengen. Bereits in der NanoDrop Messung zeigten die ausgeschlossenen Proben die geringsten RNA Konzentrationen. Fast ausschließlich handelte es sich um Gewebeproben der Gruppe SIP. Die Gewinnung der SIP Gewebe im Zuge der Vitalextirpation stellte eine Herausforderung dar. Oft blieben nur kleine Anteile der Pulpa an den Widerhaken der Extirpationsnadeln hängen, sodass der Extirpations-

vorgang mehrfach wiederholt wurde. Weiter war es nicht möglich, mit der Feile in sämtliche Wurzelkanalanteile insbesondere die mit geringem Kanallumen vorzudringen. Entsprechend verblieb unbekannt viel Pulpagewebe im Kanallumen, das erst im Rahmen der Wurzelkanalaufbereitung mit Spülflüssigkeit abgetragen wurde und nicht mehr zur Untersuchung genutzt werden konnte.

Die übrigen 3 verworfenen Proben aus der AIP und HP gewannen wir von Patienten fortgeschrittenen Alters. Altersbedingt hatte eine ausgeprägte Sekundär- bzw. bei der AIP eine zusätzliche Tertiärdentinbildung zu einer Verringerung des Pulpenlumenvolumens von Krone und Wurzelkanal geführt. Entsprechend war das Pulpengewebe reduziert und das reduzierte Kanallumen stellte uns vor die bereits genannten Probleme bei der Extirpation.

Mit 13 der 16 ausgeschlossenen Proben stellten die klinisch als SIP eingestuften Proben die größte Gruppe dar. Studien belegen, dass die klinische und die tatsächliche histologische Diagnose nicht immer korrelieren, insbesondere bei der klinisch als irreversibel diagnostizierten Pulpitis (Ricucci et al., 2014). Denkbar wäre, dass die Pulpitis schon zu stark fortgeschritten war und große Anteile des Gewebes nekrotisch waren, also nur die nicht nekrotischen Anteile RNA-Material lieferten.

Die zu untersuchende RNA gewannen wir aus dem gesamten entnommenen Pulpagewebe (Kronen- und Wurzelpulpa). Die Ergebnisse der späteren molekularbiologischen Auswertung konnten nur Auskunft über die Expression im gesamten Pulpagewebe geben (quantitative Expressionsbestimmung). Mögliche Expressionsunterschiede (qualitative Expressionsbestimmung) zwischen verschiedenen Pulpabereichen, Zonen unterschiedlichen Entzündungszustandes oder eines Vorkommens innerhalb bestimmter Zellen konnte mit unserer Methode nicht untersucht werden. Es wäre also möglich, dass in der Gruppe der SIP und AIP auch Mischformen von HP und SIP oder HP und AIP vorlagen. Lediglich in der Gruppe HP konnten Mischformen ausgeschlossen werden, da es sich um vollreinierte Weisheitszähne handelte. Eine immunhistologische Untersuchung zur qualitativen Untersuchung sah die vorliegende Studie nicht vor.

Die Genexpressionsermittlung des Housekeeping Genes GAPDH war für die Normalisierung der Zielgen Expressionswerte notwendig. Außerdem nutzten wir sie zur indirekten Kontrolle der reversen Transkription. Das Housekeeping Gen muss per Definition in jeder

Probe vorhanden sein. Die Abwesenheit von GAPDH wäre ein Zeichen für eine fehlerhafte reverse Transkriptase gewesen (Bustin und Mueller, 2005). Insbesondere im Hinblick auf die ausgeschlossenen 15 Gewebeproben konnten wir eine fehlgeschlagenen reverse Transkriptase oder Real-Time-PCR ausschließen.

GAPDH ist ein seit Jahren verwandtes Housekeeping Gen zur Normalisierung von Genexpressionsmustern. Seine Verwendung wird mittlerweile aber teilweise kritisch gesehen (Lin und Redies, 2012; Montero-Melendez und Perretti, 2014). Die anfänglich zugeschriebenen Housekeeping Gen Eigenschaften, unabhängig von externen Faktoren ubiquitär und homogen in sämtlichen Geweben exprimiert zu werden (Pfaffl, 2004), wurden mittlerweile widerlegt. Die Expressionsmuster der verschiedenen Housekeeping Gene variieren untereinander und sind zudem gewebespezifisch (Lin und Redies, 2012).

Gewebespezifische Unterschiede stellten in unserem Studiendesign kein Problem dar. Wir untersuchten lediglich Pulpagewebe.

Neben ihrer Funktion als Housekeeping Gen können sie an weiteren zellulären Vorgängen beteiligt sein. Zusätzlich zur allgemeinen gewebespezifischen Expressionsrate scheinen weitere Faktoren im Gewebe (z. B. Entzündung) unterschiedlichen Einfluss auf die Expressionsrate der verschiedenen Housekeeping Gene zu nehmen (Lin und Redies, 2012; Montero-Melendez und Perretti, 2014). Eine für die Normalisierung der Zielgene stabile Expressionsrate über den gesamten Untersuchungsverlauf wäre unter Umständen nicht mehr gewährleistet.

Wir benötigten demnach ein stabiles Housekeeping Gen, das keine Interaktionen mit den entzündlichen Prozessen der Pulpitis eingeht, um eine konstante Expression sowohl in gesundem Pulpagewebe (HP) als auch entzündlichem Pulpagewebe (AIP und SIP) vorweisen zu können.

Zu Validierungen von GAPDH als Housekeeping Gen in menschlicher Pulpitis waren zu Studienbeginn keine Untersuchungen veröffentlicht. GAPDH wird seit Anfang der 2000er Jahre bis heute als Housekeeping Gen in molekularbiologischen Untersuchungen von entzündlicher Zahnpulpa verwendet. Erkenntnisse bezüglich instabiler Expressionsraten, die die Verwendung GAPDHs in Frage stellen würden, wurden bis dato nicht publiziert.

Zur Verwendung GAPDH's als Housekeeping Gen in entzündlichen Geweben gibt es in diesem Zusammenhang eine in vitro Studie am Beispiel der entzündlichen Arthritis

(Montero-Melendez und Perretti, 2014). Hier konnte eine erhebliche Expressionsabnahme (11 – fache) von gesundem zu entzündetem Knorpelgewebe beobachtet werden. In diesem speziellen Fall, der entzündlichen Arthritis, ist GAPDH also kein geeignetes Housekeeping Gen und es wird zur Verwendung alternativer Normalisierungsgene in der entzündlichen Arthritis geraten. Weiter stellen die Autoren aber fest, dass GAPDH in anderen Geweben durchaus ein zuverlässiges Housekeeping Gen sein kann (z. B. in Herzgewebe und Prostatakarzinomen) (Montero-Melendez und Perretti, 2014).

Im Vorfeld wurde auch β -Aktin als potentiell Housekeeping-Gen getestet, erwies sich jedoch als ungeeignet. GAPDH ließ sich dagegen in allen Gewebeproben nachweisen, weshalb es für die vorliegenden Analysen als nutzbares Housekeeping-Gen ausgewählt wurde.

Wir versprachen uns durch die Verwendung GAPDHs eine höhere Vergleichbarkeit der Werte mit anderen Studienergebnissen (Chang et al., 2003; Cooper et al., 2014; McLachlan et al., 2004; Nahás-Scocate et al., 2018). Wir konnten stabile Expressionsraten in all unseren Proben nachweisen, weshalb wir keinen Zweifel an der Verwendung GAPDHs in Pulpagewebe in gesunden und entzündlichen Zustand hatten.

Hauptbestandteil der Arbeit war die Untersuchung der Expression von 13 S100-Proteinen. Die Wahl fiel auf S100A1, S100A2, S100A3, S100A4, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, S100A10, S100A11, S100A13, S100A14, S100A16. Kriterien zur Aufnahme in die Untersuchung waren entweder der bereits erbrachte Nachweis des Vorkommens in menschlicher Zahnpulpa, der Beteiligung an entzündlichen Prozessen, Zelldifferenzierung sowie Angiogenese. Andere S100-Proteine wiederum waren bekannt, untereinander zu interagieren (Gonzalez et al., 2020; Heizmann, 2019). Pulpagewebe in gesundem und entzündetem Zustand wurde zusätzlich auf Entzündungsmarkergene untersucht. Die klinische Diagnose sollte so molekularbiologisch bestätigt werden.

In den untersuchten Gewebeproben konnten in HP, AIP und SIP S100A1, S100A2, S100A3, S100A4, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, S100A10, S100A11, S100A13, S100A14 und S100A16 sowie die Entzündungsmarker IL-8, HMGB-1 und Cox-2 nachgewiesen werden. Diese konnten bis zu einem Ct-Wert von “35” nachgewiesen werden.

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden in beiden Gruppen (SIP als auch AIP) signifikante Expressionsunterschiede gegenüber der gesunden Gruppe (HP) festgestellt. Insbesondere in der Gruppe der SIP waren eine Vielzahl S100-Proteine in ihrer Expression signifikant herunterreguliert. In der AIP hingegen hatten lediglich zwei S100-Proteine, S100A8 und S100A16, eine signifikant erhöhte Expressionsrate. Die Gegenüberstellung von AIP zu SIP ergab wieder 8 signifikante Unterschiede. S100A1, S100A2, S100A4, S100A6, S100A7, S100A10, S100A13 und S100A16 waren in der SIP signifikant verringert.

Die vor Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen aufgestellte Nullhypothese, dass keine Expressionsunterschiede zwischen gesunder und irreversibel entzündlicher Pulpa bestehen, konnte eindeutig widerlegt werden.

Somit stellte sich die Frage, welche Rolle die 13 untersuchten S100-Proteine im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen von Pulpagewebe, der Pulpitis, haben. Neben ihrer Rolle in zahlreichen, darunter auch inflammatorischen allgemeinmedizinischen Krankheitsbildern wäre auch eine direkte Beteiligung an der Pulpitis denkbar. Seit Jahren werden ihnen verschiedenste Aufgaben in Karzinomen, neurologischen Krankheitsbildern, Muskelzellen, epidermalen Funktionen zugeordnet (Donato et al., 2013).

4.2 Expressionsmuster in entzündlichem Pulpagewebe

4.2.1 S100-Proteine in SIP

In der Gruppe der SIP kam es bei sieben S100-Vertretern zu einer signifikanten Expressionsreduktion. Ausgeprägte pulpitische Bedingungen scheinen eine deutliche Verringerung der Expression nach sich zu ziehen. Die Expressionswerte schwankten zwischen dem 0,06-fachen bis 0,195-fachen. Diese Expressionsmuster sind nur teilweise mit bereits publizierten Erkenntnissen zu S100-Proteinen zu erklären.

S100A1 wird auch in Skelettmuskulatur und Neuronen exprimiert (Donato et al., 2013). Weiter kommen sie in Endothelzellen und in Kardiomyozyten vor. Hier werden aberrante

Expressionsniveaus von S100A1 in Verbindung mit chronischer Herzinsuffizienz und arterieller/ pulmonaler Hypertonie gebracht. Bei ischämisch geschädigten Kardiomyozyten werden die Kardiomyoblasten negativ beeinflusst, was die Regeneration ischämisch geschädigter Kardiomyozyten verzögert (Rohde et al., 2015). Auch im Pulpagewebe könnte S100A1 den physiologischen Gewebeumbau regulieren. Bei dem Eintreten der irreversiblen Pulpitis würde dann ein erniedrigter S100A1 Spiegel das fehlende Regenerationspotential erklären.

S100A2 wurde in Tumoren bestätigt, wo es hauptsächlich als Tumorsuppressor fungiert. In Pankreaskarzinomen, einer extrem aggressiven Tumorentität, konnte gegenteiliges beobachtet werden. S100A2 leitet dort den TGF- Signalweg indirekt ein. Der TGF- Signalweg soll die Tumorzellmigration und -invasion fördern (Chen et al., 2023). Eine andere Studie zeigt in dem Zusammenhang, dass ein erhöhter TGF- Spiegel in der Pulpa die Differenzierung von Dentalen Pulpa Stamm Zellen (DPSC) einleitet. Dieser Mechanismus ist bedeutsam im Rahmen von Zellreparaturen und der Aufrechterhaltung von Pulpagewebe (Bai et al., 2023). Eine Verbindung zwischen einer S100A2 Expressionsabnahme und einem sinkenden TGF- Spiegel in SIP Gewebe wäre denkbar. Die zu erwartende Abnahme der DPSC Differenzierung durch einen TGF- Abfall könnte ein möglicher Faktor sein, dass das Regenerationspotential in der irreversiblen Pulpitis abnimmt. Der TGF- Spiegel wurde in der Studie nicht ermittelt.

S100A3 besitzt einen hohen Cystein-Anteil in der Aminosäuresequenz, der vor oxidativen Schäden schützt (Donato et al., 2013; Xiao et al., 2020). In irreversiblen Pulpitiden konnten erhöhte Vorkommen von NF- κ B und TNF- α nachgewiesen werden. Bei TNF- α handelt es sich um ein potentes inflammatorisches Zytokin. Dieses wirkt sich entzündungsfördernd auf die Pulpa aus. Zunehmender oxidativer Stress mit einer veränderten mitochondrialen Dynamik und Zelltod durch Apoptose sind die Folge (Vaseenon et al., 2023). In der SIP sinkt der S100A3 Spiegel auf das 0,06 – fache. Fortschreitende Inflammation und Gewebeerstörung sind Folgen der SIP (Kritikou et al., 2021). In der AIP hingegen wird S100A3 um das 4,52 – fache stärker exprimiert, wo es die Inflammation samt oxidativen Stress noch einzudämmen scheint oder zumindest einen Beitrag dazu leisten kann.

Das S100A4 Protein gehört zu einem umfassend erforschten S-100-Protein (Cai et al., 2022). Unterschiedlichste zelluläre Funktionen sind bereits bekannt und beschrieben. Es

konnte in Tumor- und Stromazellen, myeloiden Zellen, Adipozyten, Fibroblasten, Immunzellen und vaskulären Zellen nachgewiesen werden. Es ist an der Beeinflussung der Zellbewegung und Differenzierung von Fibroblasten beteiligt (Donato et al., 2013). S100A4 konnte weiter in Pulpagewebe nachgewiesen werden. Odontoblasten und odontoblastenähnliche Zellen exprimieren S100A4 Proteine. Zur Funktion und deren speziellen Expressionsmustern gibt es aber noch keine Erkenntnisse (Cai et al., 2022). Intrazellulär wird S100A4 in Verbindung mit der Transkriptionsregulation von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gebracht (Donato et al., 2013). In einer Vielzahl von Studien wurden signifikant höhere Vorkommen von MMPs in irreversibel pulpitischen Pulpageweben nachgewiesen. Die verschiedenen MMPs können von Odontoblasten, Makrophagen und Plasmazellen synthetisiert werden. In geringen Mengen erfüllen sie physiologische Rollen, tragen aber bei vermehrtem Auftreten zur Gewebedestruktion und Verbreitung von Entzündungen bei. Zukünftig verspricht man sich, MMPs sogar als Biomarker nutzen zu können (Kritikou et al., 2021). Eine Abnahme von S100A4 könnte gegebenenfalls einen protektiven Mechanismus erklären, den pathologisch wirkenden MMPs entgegenzuwirken.

S100A6 ist mitverantwortlich für viele molekulare Funktionen im Zusammenhang mit Zellproliferation, Zellzyklus, Zelldifferenzierung und dem Zytoskelett (Donato et al., 2013; Yang et al., 2023). Der Erhalt einer physiologischen Zellhomöostase wäre daher bei einem Expressionsabfall von S100A6 nicht mehr möglich. Ein Gewebeuntergang ist passend für eine schwer ausgeprägte SIP und zeigt sich in einem starken Expressionsabfall. S100A10 erleichtert die Ca^{2+} -Aufnahme, Nozizeption und Zellpolarisation. In Verbindung mit Annexin II bindet S100A10 Kanalproteine sowie Rezeptoren und leitet sie zur Zelloberfläche, was zu einer erhöhten Membranlokalisation und anschließend verstärkter funktioneller Expression dieser Proteine führt (Wang et al., 2018). Auch hier wäre der Abfall von S100A10 mit dem Untergang der Zellhomöostase in SIP in Verbindung zu bringen. Bereits McLachlan und Kollegen (McLachlan et al., 2004) konnten von der S100A10 Expression in entzündeter Pulpa berichten. Sie verglichen Pulpen von Zähnen mit kariösen Läsionen mit denen von gesunden Zähnen. In den kariösen Pulpen konnten erhöhte Expressionsmuster proinflammatorischer Zytokine sowie von S100A8, S100A9, S100A12 und S100A13 festgestellt werden. Lediglich die Expressionsrate für S100A10 blieb unverändert. Vergleichbar sind die beiden Studien nicht. McLachlan und Kollegen untersuchten Proben mit weit vom Pulpagewebe entfernten kariösen Läsionen - also am ehesten um

reversible Pulpitiden, während eigene Untersuchungen Pulpitiden im finalen Stadium beinhalteten.

Unsere Ergebnisse für S100A10 gaben in der AIP einen geringen, nicht signifikanten Abfall an. In der SIP war ein signifikanter Abfall auf das 0,01 – fache auffällig. Am ehesten könnte man die Vermutung aufstellen, dass die abfallenden Expressionswerte für S100A10 mit der Stärke des Entzündungszustandes einhergehen. Der Wert von McLachlan et al. (McLachlan et al., 2004) wäre noch als reversible Pulpitis einzustufen, eine verhältnismäßig milde Pulpitis mit noch relativ normaler Expression von S100A10. Unsere Proben hatten niedrigere AIP-Werte und dann weiter abfallende SIP-Werte. Es könnte von einer kontinuierlichen Abnahme der Expression bei zunehmender Entzündung ausgegangen werden. Ein Verhaltensmuster ähnlich der vorherig genannten S100-Proteinvertreter.

Das Protein S100A13 spielt eine bedeutende Rolle bei der stressinduzierten Freisetzung von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Donato et al., 2013). Die niedrige Expression in der SIP könnte möglicherweise die ausbleibende Regeneration des Gewebes und den damit verbundenen Zelluntergang erklären.

Andere S100-Protein-Gene in der Gruppe der SIP legten gegensätzliche Expressionsmuster zutage. S100A8 zeigte eine schwach signifikante Expressionszunahme. Eine statistisch relevante Expressionszunahme ist für S100A9 nicht feststellbar. Im Vergleich zu den sonst signifikant abfallenden Expressionswerten in der SIP könnte es aber dennoch als konträres Expressionsmuster mit Tendenz zur Zunahme gewertet werden. S100A8 und S100A9 werden von Granulozyten und Monozyten gebildet. Unter normalen Bedingungen erfüllen sie wichtige Aufgaben in der Zellhomöostase. Unter inflammatorischen Bedingungen hingegen werden S100A8 und S100A9 auch extrazellulär exprimiert. Monozyten erkennen diese dann über TLR4 Rezeptoren. S100A8 und S100A9 verstärken die Entzündung nicht nur über autokrine und parakrine Mechanismen sondern wirken auch regulierend. Die Leukozytenanzahl wird stark erhöht. Phagozyten werden von S100A8 und S100A9 angelockten Zytokinen aktiviert (Ehrchen et al., 2009).

Abhängig von der Konfiguration, dem Vorkommen als Heterodimer oder im Einzelnen, variieren die zellulären Funktionen.

Alleine vorkommend wird S100A9 eher in akut entzündeten Geweben vorgefunden, wohingegen S100A8 in chronisch entzündeten Geweben stärker exprimiert wird (Odink et al., 1987).

Als Heterodimer erfüllen S100A8/ S100A9 proinflammatorische (Ometto et al., 2017) aber auch antiinflammatorische Aufgaben (Leclerc und Heizmann, 2011). S100A8 oder S100A9 allein eine konkrete Eigenschaft zuzusprechen ist momentan nicht möglich.

S100A9 wird als regulatorisches Protein für S100A8 beschrieben (Donato et al., 2013). Diese Erkenntnis deckt sich mit den Expressionsmustern in der AIP. Zwar ohne statistische Signifikanz, so legen die numerisch unterschiedlich großen Expressionsraten jedoch nahe, dass S100A9 mit seiner deutlich höheren Expressionszunahme um das 9,07 – fache, tendenziell einen Einfluss auf die Expressionsrate von S100A8 (3,7 – fache) haben könnte.

In der SIP ist S100A8 statistisch nachweisbar erhöht exprimiert, S100A9 lediglich numerisch, aber ähnlich hoch. Hierfür wären zwei Gründe denkbar. Einerseits könnte es sein, dass unter den finalen entzündlichen Bedingungen der SIP S100A8/S100A9 als Heterodimer keine pro- oder antiinflammatorischen Aufgaben auf zellulärer Ebene mehr zu erfüllen. In der SIP würde S100A8 dann unabhängig von S100A9 weiter exprimiert. Möglicherweise leistet nur noch S100A8 einen Beitrag zur Zellhomöostase. Dies wäre auch mit dessen erhöhter Expression in chronischen Entzündungsprozessen zu erklären (Odink et al., 1987). Andererseits wäre eine mögliche Erklärung für das Expressionsmuster von S100A9 in der SIP, dass es nur für einen gewissen Zeitraum stark ansteigt. Der Anstieg von CD43⁺ Granulozyten und CD68⁺ Makrophagen ist auf die ersten 3 bis 9 Stunden in der akuten Pulpitis begrenzt. Dann folgt ein Abfall nach 24 - 72 Stunden (Kawanishi et al., 2004). Aufgrund dieses kurzen Zeitfensters des Anstiegs der Entzündungszellen ist es gut möglich, dass die Vitalexstirpation im Rahmen der endodontischen Behandlung aus molekularbiologischer Sicht zu spät erfolgte. Die mobilen und extrem kurzlebigen Zellen waren zu diesem Zeitpunkt nicht mehr vorhanden. Dies deckt sich mit der Erkenntnis von Odink und Kollegen (Odink et al., 1987). S100A9 wird in akuten Entzündungen und S100A8 in chronischen Prozessen exprimiert. Für die SIP, die weit fortgeschrittene Pulpitis, macht also die Grenzsignifikanz von S100A8 ($p = .05$) und eine Tendenz von S100A9 für erhöhte Expressionswerte durchaus Sinn.

S100A7, S100A11, und S100A16 zeigten keine signifikanten Unterschiede zur HP.

Die fast unveränderte Expressionsrate von S100A7 in der SIP im Vergleich zu HP zeigt, dass wohl auch in der finalen Pulpitis letzte Regenerationsversuche stattfinden. S100A7 scheint eine zentrale wichtige Rolle zu spielen. Aus Dentinmatrixzellen freigesetztes S100A7 bewirkt über RAGE eine Rekrutierung von Dentalen Pulpa Stamm Zellen (DPSC), die die Bildung von Tertiärdentin anregen (Komichi et al., 2019).

In anderen entzündlichen Erkrankungsbildern wie Psoriasis nimmt S100A7 ebenfalls eine zentrale Rolle in der Regulation von entzündlichen Reaktionen und immunologischen Funktionen ein (D'Amico et al., 2016).

S100A8 und S100A14 zeigten signifikant erhöhte Expressionswerte bei SIP. Erhöhte S100A14 Expressionsraten sind bis dato nur aus Tumoren bekannt und publiziert. Erhöhte Expressionsraten, die nicht in Verbindung mit neoplastischen Geschehen stehen, liegen nicht vor. Von besonderem Interesse ist die Verbindung von S100A14 zur Pathogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms. Überexprimiert wirkt S100A14 hier als Tumorsuppressor und führt zu einer Abnahme von MMPs (Basnet et al., 2019). Denkbar wäre, dass die im Rahmen der Pulpitis freigesetzte Menge an MMPs, die in hohen Konzentrationen nachweislich exzessive Gewebeschäden verursacht (Kritikou et al., 2021), durch eine signifikante Expressionszunahme von S100A14 gesenkt wird. In anderen Tumorentitäten hingegen besitzt S100A14 onkogene Eigenschaften. Die Vermutung einer inflammationsregulierenden Eigenschaft in der Pulpitis ist also rein spekulativ. Zudem ist bei der Aussagekraft der Daten zu bedenken, dass mit einer relativen Gen-Expression von 0,0014 in SIP nur geringe Mengen RNA vorlagen. Andererseits ist laut Literatur in Pulpagewebe, einem mesenchymalen-stromalen Gewebetyp, im Vergleich zu epithelialem Gewebe eine geringere Expression zu erwarten (Basnet et al., 2019).

Zu dem ebenfalls untersuchten S100A16 soll eine Beziehung bestehen. Im Zusammenhang mit PEC und gesunder Mundschleimhaut wurde eine membranöse Kollokalisierung beobachtet. Die genauen Interaktionen von S100A14/ S100A16 sind noch unklar. Lediglich eine Überexpression von S100A14 soll für einen Anstieg der S100A16 Proteine sorgen. Es deutet auf einen möglicherweise bestehenden posttranskriptionellen Regulationsmechanismus hin. Im PEC wirkt S100A16 ebenfalls tumorsuppressiv und soll ebenfalls MMPs herunterregulieren (Basnet et al., 2023).

4.2.2 S100-Proteine in AIP

In der AIP Gruppe herrscht ein anderes S100-Expressionsniveau. Sie besteht aus nur 7 Gewebeprobe. Es ist eine relativ höhere Standardabweichung zu verzeichnen. Im Unterschied zur SIP kommt es zu keinen signifikanten Expressionseinbrüchen. Stattdessen bleiben die Werte relativ konstant oder nehmen zu.

Die niedrigsten Expressionswerte in der AIP weichen kaum von den HP Werten ab. Nicht signifikante Schwankungen der Gene S100A1, S100A2, S100A4, S100A6, S100A10, S100A11 und S100A13 betragen das 0,5 – fache bis 1,2 – fache der HP Werte. Die AIP hat noch keinen spürbaren Einfluss auf die Expression. Sie scheint unabhängig vom inflammatorischen Geschehen zu sein. Es ist naheliegend, dass es sich bei A1, A2, A4, A6, A10, A11, A13 um eher generalisiert exprimierte Proteine mit protektiver Aufgabe zur Einhaltung der Zellhomöostase in der menschlichen Pulpa handelt, die bis in die AIP fortgesetzt exprimiert werden können. In der SIP ist dann ein deutlicher Einbruch zu verzeichnen, der bereits mit dem stark fortschreitenden Zelluntergang in Verbindung zu bringen ist.

Das Expressionsniveau steigt für S100A3 um den Faktor 4,5. S100A7, -A8 und -A9 sind erhöht. S100A9 wird sogar 9,07 – fach häufiger repliziert. Keiner der Werte ist signifikant. Auch diese Werte scheinen trotz ihrer numerisch ansteigenden Expressionsniveaus noch relativ unabhängig von entzündlichen Prozessen zu bleiben. Die Pulpagewebehomöostase ist noch weitestgehend im Gleichgewicht.

Besonderes Augenmerk anderer Autoren galt der Expression von S100A7. Dieses zeigt sich in der AIP, wenn auch nicht signifikant, mit einer numerischen Expressionserhöhung um das 2,27 – fache. Das mögliche Regenerationspotential von Pulpagewebe sowie die Tertiärdentinbildung durch Differenzierung von DPSCs ist in der AIP noch deutlich ausgeprägter als in der finalen SIP. Dies zeigt sich im signifikanten Unterschied zwischen dem AIP- und SIP- Expressionswert. Die Ursache ist unklar.

Den Proteinen S100A7, S100A8/S100A9 und dem hier nicht untersuchten S100A12 Protein wird zudem die Abwehr von Infektionen zugeschrieben. Dies liegt an deren Chelatbildung mit den Spurenelementen Zn^{2+} , Cu^{2+} und Mn^{2+} (Hood und Skaar, 2012). Dies sind ebenfalls Ursachen für den Anstieg in AIP.

Mit deutlich höherer Expression präsentieren sich auch die beiden letzten Proteine S100A14 und S100A16. Das Expressionsniveau von S100A14 ist signifikant um den Faktor 4,82 und das von S100A16 um den Faktor 1,85 erhöht.

Das Expressionsverhalten von S100A16 zu beurteilen ist schwierig. Dem ungewöhnlichen S100-Protein mit strukturell bedingten abweichenden Funktionen (Basnet et al., 2023) kann keine Funktion in der Pulpitis zugewiesen werden. Auffällig ist aber, dass von HP zu AIP ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen ist. Zwischen AIP und SIP ist wieder ein signifikanter Abfall beobachtbar. In der SIP gleicht der Wert annähernd der HP. Eventuell ist S100A16 nur am initialen Entzündungsgeschehen beteiligt. Davor und danach wird S100A16 wieder normal exprimiert.

Vergleicht man die AIP mit der SIP, so fallen 8 signifikante Expressionsabfälle vom Übergang AIP in SIP auf. Immerhin 61,5 %, also mehr als die Hälfte der S100-Proteine erfährt eine signifikante Veränderung der Genexpressionen. Dies sind hauptsächlich Werte, die in der AIP nicht auffällig höher oder tiefer als in HP exprimiert werden. Es sind also wahrscheinlich Werte, die in Verbindung mit der generellen Zellregeneration und dem Zellumbau gebracht werden können und der physiologischen Zellhomöostase dienen. Die Werte, die bereits in der AIP erhöht sind, bleiben auch in der SIP erhöht.

Anscheinend werden die meisten S100-Proteine entweder unter physiologischen (61,5%) oder pathologisch, inflammatorischen Pulpazuständen aktiv exprimiert.

4.2.3 Weitere S100-Proteine im Zusammenhang

Die Beteiligung von S100-Proteinen an der Pulpitis ist bis heute so gut wie nicht untersucht. Zu den komplizierten zellulären Prozessen im pulpitischen Gewebe ist wenig bekannt. Ein weiteres Protein, das S100B, welches nicht Teil unserer Untersuchungsreihe war, ist vermehrt in pulpitischer Pulpa auffindbar. S100B ist in Nervenfasern und Nervenbündeln nachweisbar (Dourou et al., 2006). Auch hier sind genaue Mechanismen noch nicht ergründet. Die ausbleibende Immunfärbung extrazellulär, wirft die Frage auf, ob S100B parakrin und/ oder autokrin wirkt. Im Zusammenhang mit anderen inflammatorischen Prozessen wurde S100B als DAMP eingestuft. S100B ist also ein Gefahrenindikator, der intrazellulär durch autokrine und parakrine Interaktionen mit dem Rezeptor für

fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (RAGE) wirkt. RAGE hat eine zentrale Rolle in chronisch entzündlichen Erkrankungen (Sorci et al., 2011). Es könnte in Betracht gezogen werden, dass S100B eine modulierende Wirkung auf den entzündlichen Zustand durch sympathische und parasympathische Nervenfasern ausübt.

Zu S100A12 gibt es zwei Studien zur differentiellen Expression in gesunder und entzündeter Zahnpulpa. Diese hatten kein einheitliches Ergebnis. Khorsani und Kollegen (Khorsani et al., 2018) stellten entgegen ihrer Nullhypothese eine verringerte Genexpression von S100A12 in entzündeter Pulpa fest. Sie kamen zu dem Schluss, dass S100A12 keinen signifikanten Einfluss auf das Entzündungsgeschehen habe.

McLachlan und Kollegen (McLachlan et al., 2004) hingegen konnten in ihrer Studie eine Genexpressionszunahme von S100A12 in entzündlichen Pulpagewebe feststellen. Bei der Betrachtung der zu Hilfe genommen Untersuchungsmethoden fallen Unterschiede auf. Khorsani und Kollegen bestimmten die Expression mittels der qRT-PCR während McLachlan und Kollegen die semiquantitative RT PCR benutzten. Leider hatten sie sonst keine weiteren gemeinsam untersuchten Gene, deren Ergebnisse Aufschluss für die Abweichungen hätten geben können. Ein Vergleich der vorliegenden Daten ist daher schwierig.

In unserer Untersuchung wurde nicht auf S100A12 untersucht. Gemeinsam mit der Studie McLachlan und Kollegen (McLachlan et al., 2004) erfolgte die Untersuchung auf S100A8, S100A9, S100A10, S100A13 und IL-8. Unsere Ergebnisse zu einigen gemeinsam untersuchten Werten stimmen nicht mit denen von McLachlan et. al. überein. Dies sind die Werte S100A10 und S100A13. Wieder gibt McLachlan im Vergleich zur gesunden Probe deutlich angestiegene Expressionsniveaus an. Wir haben, wie Khorsani et. al. (Khorsani et al., 2018), sogar signifikante Abfälle verzeichnen können.

Ein Vergleich ist auch hier schwer herzustellen. McLachlan auf der einen Seite nutzte die Endpoint-PCR mit variierenden Zyklen und einer abschließenden semi-quantitativen Bestimmung mittels Pixelanalyse des Agarose-Gel Bildes. Wir hingegen nutzten eine klassische quantitative Real Time PCR. Bei einer immer gleichen Zyklenzahl (n=40) wurden die Ct Werte für die zu untersuchenden Gene ermittelt. Also ein rein quantitativer Vergleich. Die Real-Time-PCR stellt das deutlich sensitivere Verfahren dar. Eine verlässliche Quantifizierung mittels Endpoint-PCR/Agarosegelbildauswertung, wie bei McLachlan angewandt, ist nicht möglich.

4.2.4 Expressionsmuster von Entzündungsmarkern

Die Werte für IL-8 und Cox-2 entsprachen den Erwartungen, HMGB-1 war hingegen erst auf den zweiten Blick plausibel.

Für die Gene IL-8 und Cox-2 sind in entzündlicher Pulpa Expressionszunahmen zu verzeichnen. Für IL-8 ist die Zunahme eindeutig, in AIP und SIP steigt der Wert signifikant an. Der allgemeine Trend, dass die differentielle Expressionsrate in der AIP höher ist als in der SIP, führt sich hier fort.

Interleukin 8, ein wirksames Chemokin mit ausgeprägter Chemoattraktivität für Neutrophile, trägt zur Regulation von Entzündungen im Pulpagewebe bei. Eine Zunahme der IL-8 Konzentration im Zusammenhang mit der Pulpitis ist bereits mehrfach publiziert (Elsalhy et al., 2013; Zehnder et al., 2003). In niedrigen Konzentration beeinflussen sie reparative Mechanismen positiv, wohingegen sie in hoher Konzentration einen Zelluntergang durch Apoptose fördern (Duncan und Cooper, 2020).

Es findet sich lediglich eine Studie (Dincer et al., 2020), die ebenfalls eine signifikante Zunahme von IL-8 publiziert und zusätzlich eine Korrelation von Schmerzintensitätszunahme und der IL-8 Expressionszunahme aufzählt. Dies ähnelt unserer gewählten Unterteilung in schmerzfreie AIP und schmerzhafte SIP. Demnach hätten die ermittelten Expressionsmuster in unserer AIP Gruppe geringer als in der SIP Gruppe sein müssen. Zusätzlich hätten wir eine größere Streuung der Expressionswerte innerhalb der SIP erwarten können, weil wir von leichter bis starker Schmerzintensität alle Proben in der SIP zusammengefasst hatten. In unserer Studie zeigte sich stattdessen, dass in der AIP ein numerisch höherer Expressionswert als in der SIP vorlag. Dieser Unterschied zwischen AIP und SIP war in unserer Studie aber nicht signifikant nachweisbar. Auch war keine erhöhte Standardabweichung der Mittelwerte feststellbar.

Die unterschiedlichen Ergebnisse scheinen einmal mehr zu bestätigen, dass die präzise Diagnosestellung anhand des klinischen Symptoms Schmerz keinen objektiven Bewertungsstandard bieten kann (Donnermeyer et al., 2023; Lin et al., 2020).

Gemeinsam ist beiden Studien aber eine Expressionszunahme von HP zum entzündlichen Pulpagewebe (AIP und SIP). Wir konnten hier für beide Gruppen signifikante Expressionszunahmen zur HP nachweisen.

Die Cyclooxygenase-2 ist ein zentrales Enzym in der Prostaglandinsynthese. Es spielt eine Schlüsselrolle in Entwicklung und Ausbreitung von Entzündungsreaktionen (Malik et al., 2023). Die Expression ist in gesunder Pulpa gering bis nicht nachweisbar. Unter pulpitischen Bedingungen konnten bereits erhöhte Expressionswerte in menschlicher Pulpa nachgewiesen werden (Chang et al., 2003). Die mRNA Genexpression von Cox-2 ist in SIP und AIP, wie zu erwarten, im Vergleich zur HP erhöht. Beide Werte sind statistisch nicht signifikant und auch untereinander bestehen keine signifikanten Unterschiede.

Die höheren Expressionswerte in der Studie von Chang et al. könnten dadurch zu erklären sein, dass in der in vitro Studie rein pulpitisches Gewebe betrachtet wurde. Unsere entnommenen Pulpagewebe hingegen können gesunde Gewebeanteile und pulpitisches Gewebe besessen haben. Mit der quantitativen Expressionsanalyse haben wir einen Mittelwert, eine niedrigere Expression als im ausschließlich pulpitischen Gewebe erhalten.

Außerdem ist fraglich, ob die Ergebnisse einer in vitro Studie übertragbar auf unsere in vivo Studie sind. Chang et al. betrachteten die Cox-2 Expressionänderungen nach Zugabe von TNF- α und IL-1 α getrennt voneinander. Unsere unveränderten Werte zwischen HP und SIP sowie AIP zeigen, dass in vivo anscheinend auch Faktoren die Expressionsrate von COX-2 hemmen oder sogar verringern können.

HMGB-1 sticht mit seinem Genexpressionsmuster heraus. Die zum HMGB-1 Expressionsniveau publizierten Daten hätten vermuten lassen, dass in SIP und AIP ein erhöhter Expressionswert gemessen würde. Tatsächlich blieb der Spiegel in der AIP annähernd gleich (0,89 – fache) und in der SIP fand ein signifikanter Expressionsabfall (0,41 – fache) statt. Der anfängliche Widerspruch lässt sich einfach erklären. In der Studie von Zhang und Kollegen (Zhang et al., 2014) wurde die HMGB-1 Expression in vitro erforscht. Mittels Lipopolysacchariden (LPS) wurde ein Expressionsanstieg von HMGB-1 provoziert. Nach 12 Stunden war die Expression maximal, um im Anschluss wieder auf das Ausgangsniveau zu sinken. HMGB-1 scheint als Alarmin, als sogenanntes Signalmolekül, eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Immunantwort zu spielen und auf den LPS Reiz kurzfristig stark exprimiert zu werden. Dieser kurze Peak könnte eine Erklärung für die geringfügigen Expressionsunterschiede in der SIP und dem fehlenden Unterschied zu der AIP zu sein. AIP hat also eine höhere Expression als SIP. Die Ursache hierfür könnten die beiden S100A8 und S100A9 sein. Diese werden ebenfalls in der AIP höher als in der SIP exprimiert. Sie binden wie die LPS in pulpitischen Geweben an Toll-like-Rezeptor 4

(TLR4). Darüber wird die Freisetzung von HMGB-1 reguliert. Eine Beeinflussung des Signalwegs durch S100A8 und S100A9 ist also nicht abwegig (Bertheloot und Latz, 2017).

4.3 Fazit und Ausblick

Die Studie ist in den Bereich der Grundlagenforschung einzuordnen. Es war erstmalig möglich eine große Anzahl von S100-Proteinen zusammen in drei verschiedenen Pulpazuständen nachzuweisen. Anders als in vorherigen Publikationen wurde die irreversible Pulpitis in symptomatisch und asymptomatisch unterteilt und gesondert betrachtet. Es konnten signifikante Unterschiede in den Genexpressionsmustern in AIP und SIP im Vergleich zu HP Proben aufgezeigt werden.

Aber auch zwischen AIP zu SIP waren 8 Werte signifikant erniedrigt: S100A1, -A2, -A4, A6, -A7, -A10, -A13 und -A16.

SIP hatte signifikant reduzierte Expressionswerte für S100A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10 und -A13 sowie HMGB-1, während die Werte für S100A8 und -A14 sowie IL-8 signifikant erhöht waren.

Die AIP hingegen hatte signifikante Erhöhungen bei S100A14 und -A16 sowie IL-8. Ähnliche ausgeprägte Reduktionen der Genexpression wie in der SIP-Gruppe konnten in der AIP nicht gefunden werden.

Die signifikanten Expressionsänderungen zeigen, dass weitere Untersuchungen der S100-Proteinexpressionen im Zusammenhang mit der Pulpitis vielversprechend sein könnten. Es gilt die S100-Proteinexpressionmechanismen im Verlauf der Pulpitis genauer zu beleuchten, um deren Beteiligung an den pulpitischen Zuständen besser zu verstehen.

Die weitere wissenschaftliche Aufarbeitung könnte langfristig die Diagnosestellung der Pulpitis erheblich verbessern, die Therapie erleichtern oder sogar neue Therapieansätze etablieren.

Ähnlich der Verwendung von S100-Proteinen als Marker in der Onkologie wäre es denkbar S100-Proteine unterstützend zur Diagnosestellung der Pulpitis einzusetzen. Das ak-

tuell bestehende Problem einer möglichen Diskrepanz zwischen klinischer Diagnosestellung und tatsächlichem histologischen Zustand der Pulpa (Ricucci et al., 2014) könnte gemindert werden. Eine präzise Diagnosestellung zu Therapiebeginn ist entscheidend dafür, ob die Pulpa vital erhalten werden kann oder womöglich eine nicht indizierte Wurzelkanalbehandlung eingeleitet wird. Wurzelkanalbehandlungen sind zwar mit Erfolgsraten von 90 % nach 5 Jahren eine durchaus zuverlässige Behandlungsoption, gehen aber mit einer Reihe verschiedener Nachteile einher (Krastl et al., 2021). Vitalerhaltende Maßnahmen stellen demgegenüber bei einer korrekten Indikationsstellung und Behandlung die kostengünstigere Behandlungsoption mit guten Erfolgsaussichten für den Patienten dar (Krastl et al., 2021).

Vorstellbar wäre ein Chairside-Test mit ausreichend Sensivität und Spezifität, der anhand charakteristischer S100-Proteinvorkommen zwischen reversibler und irreversibler Pulpitis unterscheiden könnte. Eine präzise, therapieleitende Einteilung wäre so möglich. In diesem Zusammenhang wurden bereits Untersuchungen angestellt, ob Zytokine wie Interleukine oder TNF- α als zuverlässige Biomarker agieren könnten. Lediglich eine geringe diagnostische Genauigkeit zur Unterscheidung von gesunder Pulpa und symptomatisch irreversibler Pulpitis konnte ermittelt werden. Keiner der Biomarker ist hingegen geeignet, eine reversible von einer irreversiblen Pulpitis zu unterscheiden (Karrar et al., 2023). Es ist abzuwarten ob S100-Proteine geeigneter sind.

Neben der Diagnosestellung könnten S100-Proteine auch gezielt therapeutisch eingesetzt werden. Die lokale Applikation oder Injektion S100-proteinhaltiger Medikamente auf oder in betreffende pulpitische Areale könnte gezielt die Regeneration fördern. Zukünftig wäre eine Restitutio ad integrum der Pulpa zum Zahnerhalt eventuell denkbar, ohne eine invasive Pulpotomie oder Pulpektomie vornehmen zu müssen.

Alternativ könnten S100-Proteine direkten und indirekten Überkappungsmaterialien beige-mengt werden, sodass eine kontinuierliche Freisetzung an das Pulpagewebe erfolgen könnte. Insbesondere S100-A7 könnte nach jetzigen Wissensstand vielversprechend sein (Komichi et al., 2019).

Die Ergebnisse dieser Studie und der jetzige Wissensstand stimmen zuversichtlich, dass S100-Proteine zukünftig als Markerproteine für die Pulpitis oder zur Pulparegeneration in der zahnärztlichen Therapie eingesetzt werden könnten.

5. Zusammenfassung

Ca^{2+} - bindende S100-Proteine nehmen wichtige Rollen in den Bereichen der angeborenen Immunantwort auf Infektionen und regenerativer Prozesse ein. Die menschliche Zahnpulpa wurde bisher nur spärlich untersucht. Dementsprechend gibt es wenig Erkenntnisse über Vorkommen und Funktion von S100-Proteinen in gesunder und pulpitischer Pulpa.

Ziel der Studie war es, den Nachweis sowie die Untersuchung und den Vergleich der Genexpressionsmuster verschiedener S100-Proteine in gesunder Pulpa, asymptomatischer irreversibler Pulpitis und symptomatischer irreversibler Pulpitis herauszuarbeiten.

Es wurden menschliche Pulpagewebeproben, darunter 15 mit einer klinisch diagnostizierten symptomatischen irreversiblen Pulpitis (SIP), 7 mit einer asymptomatischen irreversiblen Pulpitis (AIP) und 19 mit einer gesunden Pulpa (HP) untersucht. Die relativen S100-Genexpressionslevel von S100A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A7, -A8, -A9, -A10, -A11, -A13, -A14 und -A16 wurden quantitativ mittels der Polymerase-Kettenreaktionstechnik (PCR) untersucht. Eine zusätzliche Untersuchung auf die Entzündungsmarker IL-8, COX-2 und HMGB-1 diente der molekularbiologischen Einordnung des Entzündungszustandes der Pulpa. GAPDH diente als Housekeeping Gen. Die differentiellen Expressionsraten für jedes Zielgen zwischen SIP, AIP und HP wurden statistisch mittels Varianzanalyse und Bonferroni-Post-hoc-Test ausgewertet.

Für die Expressionswerte für S100A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10 und -A13 sowie für HMGB-1 wurden in SIP im Vergleich zu HP signifikant reduzierte Genexpressionsniveaus festgestellt. Die Genexpression von S100A8 und -A14 sowie IL-8 war hingegen signifikant erhöht. In der AIP Gruppe zeigten nur S100A14 und -A16 sowie IL-8 signifikant erhöhte Expressionsniveaus im Vergleich zu HP. Die Genexpression für die anderen Gene war nicht verändert.

Erstmalig konnte ein grober Einblick in die Expressionsmuster der verschiedenen S100-Proteine in der Pulpitis gegeben werden. Die Expressionsmuster in der SIP weisen deutlich größere Unterschiede im Vergleich zur AIP auf. Zahlreiche Expressionsunterschiede legen eine Beteiligung von S100-Proteinen an der Pulpitis nahe. Zukünftig könnten S100-Proteine eine Rolle in der Diagnostik spielen. Als Markerproteine könnten sie anhand cha-

rakteristischer Expressionsmuster eine präzisere Diagnosefindung im klinischen Alltag ermöglichen. Weiter wäre ein gezielter therapeutischer Einsatz von S100-Proteinen zur Einleitung regenerativer Prozesse denkbar.

6. Anhang

Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
 Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde
 Direktor: Prof. Dr. Dr. S. Jepsen

Formblatt zur Gewebespende für molekularbiologische Untersuchungen

Probennummer: _____ Datum der Entnahme: _____

Zahn: _____ Alter des Patienten: _____

Klinische Befunde:

☐ Sens-Probe ()

- o Kältetest normal
- o Kältetest vermindert
- o Kältetest gesteigert

Besonderheiten: _____

☐ Perkussion ()

☐ Palpation ()

☐ Schmerzen (), falls ja, nähere Beschreibung (Art, Qualität, Stärke von 1-10, Dauer, Auslöser, etc.):

☐ Röntgenologischer Befund

- o unauffällig
- o Parodontitis apicalis

Diagnose:

- o Asymptomatische irreversible Pulpitis
- o Symptomatische irreversible Pulpitis
- o Gesunde Pulpa

Besonderheiten bei Probenentnahme:

Abb. 5: Formblatt 1 zur Gewebespende

Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde
Direktor: Prof. Dr. Dr. Søren Jepsen

**Patienteninformation und Einverständniserklärung zur Spende von Geweben für
molekularbiologische Untersuchungen und Zellanzüchtung (Forschung)**
(Version 02-08-2016)

Titel: „In-vitro Untersuchung zur Expression verschiedener S100-Proteine in gesundem und entzündetem humanen Pulpagewebe, sowie in Zelllinien pulpaler Ursprungs mit und ohne Stimulation durch inflammatorische Mediatoren und / oder zahnärztlichen Pulpaukklappungsmaterialien“

Patienteninformation

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie fragen, ob Sie bereit sind, für die nachfolgend beschriebene wissenschaftliche Studie Gewebe (Zahnpulpa oder ganzen Zahn), welches Ihnen im Rahmen ihrer zahnärztlichen Behandlung entfernt werden muss, für Forschungszwecke zur Verfügung zu stellen.

Tagtäglich suchen unzählige Patienten wegen Zahnschmerzen ihren Zahnarzt auf. In einem großen Teil der Fälle wird bei der folgenden Untersuchung eine entzündete Zahnpulpa (im Volksmund häufig auch als „Zahnnerv“ bezeichnet) festgestellt und es erfolgt dann in der Regel eine Wurzelkanalbehandlung oder in manchen Fällen sogar die Entfernung des Zahnes. Während für den Patienten meistens die Schmerzen im Vordergrund stehen, muss der Zahnarzt einschätzen, in wie weit die Zahnpulpa des Patienten entzündet ist und welche Behandlung daher erforderlich ist. Da es verschiedene Stadien der Entzündung einer Zahnpulpa gibt, in denen meist unzählige und komplexe Entzündungsvorgänge ablaufen, kann die Entscheidung zur richtigen Behandlung selbst mit modernen Methoden für den Zahnarzt schwierig sein. Zwar sind solche Entzündungsvorgänge der Zahnpulpa allgemein gut untersucht, aber dennoch nicht bis ins letzte Detail verstanden. Zudem werden durch aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse immer wieder neue Aspekte der Reaktionen des menschlichen Körpers bekannt, die möglicherweise auch Entzündungsvorgänge in der Zahnpulpa betreffen könnten.

Wir führen derzeit in unserem Zentrum eine wissenschaftliche Untersuchung durch, die sich mit den Entzündungsreaktionen der Zahnpulpa beschäftigt. So soll insbesondere das Vorkommen und die Rolle von kleinen, bei Entzündungen und anderen Erkrankungen beteiligten Botenstoffen, den sogenannten „S100-Proteinen“ im gesunden und erkrankten Zahnpulpagewebe erforscht werden. Dafür werden bei der zahnärztlichen Routinebehandlung entnommene Gewebe, die sonst vernichtet würden, im wissenschaftlichen Labor untersucht.

Seite 1 von 2

Abb. 6: Formblatt 2 zur Gewebespende

Für einige Fragestellungen werden davon auch einzelne Zellen am Leben gehalten, vermehrt und weiter untersucht. Da sich die Experimente über einen längeren Zeitraum erstrecken werden und die Zellen nicht so lange in Kultur gehalten werden können, sollen die Zellen zudem durch ein spezielles Einfrierverfahren langzeitstabil aufbewahrt werden.

Ihre Gewebespende für diese wissenschaftliche Studie ist freiwillig. Ihr Gewebe wird also nur dann für die Prüfung einbezogen, wenn Sie dazu schriftlich Ihre Einwilligung erklären. Sofern Sie Ihr Gewebe nicht spenden möchten, entstehen Ihnen dadurch keine Nachteile.

Für die Entfernung der oben genannten Gewebe besteht eine medizinische Indikation und sie wird im Rahmen der routinemäßigen Behandlung durchgeführt. Die Entnahme der Gewebe erfolgt nicht aufgrund der hier dargestellten wissenschaftlichen Untersuchung. Da die Gewebe sonst verworfen würden, beinhaltet die Probenentnahme für Sie kein zusätzliches Risiko. Die Gewebespende ist mit keinen Kosten für Sie verbunden. Sie wird nach der Entnahme anonymisiert weiter verarbeitet, d.h. es kann zu einem späteren Zeitpunkt kein Personenbezug mehr hergestellt werden. So kann auch aus den Ergebnissen nicht erkannt werden, von welcher Person das Gewebe gespendet worden ist. Bei einer Veröffentlichung der Ergebnisse wird aus den Daten nicht hervorgehen, wer an dieser Untersuchung teilgenommen hat. Allerdings ist dadurch Ihre Entscheidung zur Gewebespende auch endgültig, d.h. ein späterer Widerruf Ihrer Einwilligung ist dann nicht mehr möglich.

Einverständniserklärung

Hiermit erkläre ich _____ (Name, Vorname), geb. am _____
mich freiwillig dazu bereit, im Rahmen der Behandlung üblicherweise entfernte:

- ☐ Zähne
☒ Zahnpulpagewebe

für die oben beschriebene Untersuchung und das Anlegen einer Gewebekbank
Forschungszwecken zur Verfügung zu stellen.

Mit meiner Unterschrift erkläre ich, dass ich die Patienteninformation zur wissenschaftlichen „In-vitro“ Untersuchung zur Expression verschiedener S100-Proteine in gesundem und entzündetem humanen Pulpagewebe, sowie in Zelllinien pulpalen Ursprungs mit und ohne Stimulation durch inflammatorische Mediatoren und / oder zahnärztlichen Pulpaüberkappungsmaterialien“ und diese Einwilligungserklärung erhalten habe.

- ☒ Ich wurde für mich ausreichend mündlich und schriftlich über die wissenschaftliche Untersuchung informiert.

Mir ist bekannt, dass die Untersuchungen im Rahmen eines Forschungsprojektes durchgeführt werden, das zum Ziel hat, Entzündungsvorgänge in der Zahnpulpa zu untersuchen. Des

Abb. 7: Formblatt 3 zur Gewebespende

Weiteren wurde ich darüber aufgeklärt, dass an den gespendeten Gewebeprobe(n) immunhistochemische sowie molekularbiologische Analysen durchgeführt werden sollen, die eine Charakterisierung der Immunabwehrlage möglich machen.

Zusätzlich erlaube ich die Anzucht von Zellen aus den gespendeten Gewebeprobe(n). Mit den angezüchteten Zellen sind weitere Untersuchungen zur Produktion von sogenannten S100-Proteinen und deren Beteiligung an Entzündungsreaktionen vorgesehen.

Für die Entfernung der oben genannten Gewebe besteht eine medizinische Indikation und sie wird im Rahmen der routinemäßigen Behandlung durchgeführt. Die Entnahme der Biopsate erfolgt nicht aufgrund des hier dargestellten Forschungsprojektes. Da die Gewebe sonst verworfen würden, beinhaltet die Probenentnahme für mich kein zusätzliches Risiko.

Weiterhin willige ich ein, dass ich über die Ergebnisse der Untersuchung nicht informiert werden kann, da meine Gewebespende in anonymisierter Form weiter verarbeitet wird. Aus diesem Grund kann ich auch zu einem späteren Zeitpunkt meine Einwilligung nicht zurückziehen, da die Gewebespende ohne einen unverhältnismäßig großen Aufwand meiner Person nicht mehr zuzuordnen ist. Das bedeutet auch, dass niemand später aus den Ergebnissen erkennen kann, von welcher Person das Gewebe oder die aus dem Gewebe isolierten Zellen gespendet worden sind.

Alle an der Untersuchung Beteiligten unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht. Die Untersuchung ist für mich mit keinen Kosten verbunden.

Ich bin mir darüber bewusst, dass mir keine Nachteile entstehen, wenn ich diese Einwilligung nicht ausspreche.

Datum..... Ort

Unterschrift des Patienten

Datum..... Ort

Name, Vorname des Arztes.....

Unterschrift des Arztes

Abb. 8: Formblatt 4 zur Gewebespende

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zahnbestandteile: (1) Schmelz (2) Dentin (3) Pulpa (4) Gingiva (5) Alveolarknochen (6) Neurovaskuläres Bündel (7) Odontoblastenfortsätze (8) Odontoblasten (9) Weil'sche Zone (10) Bipolare Zone (11 und 14) Präodontoblasten (12) Fibroblasten (13) Blutgefäße (15) Pericyten (16) DPSC (17) Nervenfaser (A) Die Odontoblasten grenzen an das Dentin und Odontoblastenfortsätze durchziehen das Dentin. Weiter zum Pulpenzentrum liegt die Weil'sche Zone gefolgt von der Bipolaren Zone (B) Unterschiedliche Zellpopulationen in der Zahnpulpa darunter DPSCs, Fibroblasten und Pericyten (modifiziert nach Baranova et al., 2020).	8
Abb. 2: EF-Hand-Motiv: Die E-Helix symbolisiert der Zeigefinger (rot), F-Helix den Daumen (grün) und der gekrümmte Mittelfinger (gelb) den Ca^{2+} -bindenden Loop (modifiziert nach Capozzi et al., 2006).....	14
Abb. 3: S100-Proteinstruktur. Zusammensetzung: alpha-Helix 1-4, 2 verschiedene EF-Hand-Motive, zentraler Scharnierbereich, Amino- (N) und Carboxyterminale- (C) Enden (modifiziert nach Eckert et al., 2004)	15
Abb. 4: Graphisch werden die Ergebnisse der differentiellen Genexpression der AIP (hellgraue Balken) und SIP (dunkelgraue Balken) im Vergleich zur auf Wert 1 normierten HP (verdickte schwarze Linie bei 1,00) in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Standardabweichung wird mittels Fehlerindikatoren und für IL-8 in Klammern angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen HP und AIP sowie HP und SIP sind durch ein Sternchen (*) oberhalb des entsprechenden Balkens gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen AIP und SIP sind durch ein Doppelkreuz (#) oberhalb der Balken kenntlich gemacht (modifiziert nach Jungbluth et al., 2022).	37
Abb. 5: Formblatt 1 zur Gewebespende.....	57
Abb. 6: Formblatt 2 zur Gewebespende.....	58
Abb. 7: Formblatt 3 zur Gewebespende.....	59
Abb. 8: Formblatt 4 zur Gewebespende.....	60

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Pulpagewebeproben mit Informationen zu Diagnose, Geschlecht und Alter der Patienten, ausgeschlossene Proben sind mit einem (*) gekennzeichnet.....	22
Tab. 2: Real-Time-PCR Protokoll	28
Tab. 3: Primer (modifiziert nach Jungbluth et al., 2022).....	29
Tab. 4: Relative Genexpression (Mittelwerte mit Standardabweichung der Mittelwerte [SEM]) in gesunder (HP), asymptomatisch irreversibler Pulpitis (AIP) und symptomatisch irreversibler Pulpitis (SIP) (modifiziert nach Jungbluth et al., 2022).	32
Tab. 5: Differentielle Expression (Mittelwerte mit Standardabweichung der Mittelwerte [SEM] in asymptomatisch irreversibler Pulpitis (AIP) und symptomatisch irreversibler Pulpitis (SIP). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen AIP und HP oder SIP und HP sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet (modifiziert nach Jungbluth et al., 2022).	34

9. Literaturverzeichnis

Abbott P, Yu C. A clinical classification of the status of the pulp and the root canal system. Aust Dent J. 2007; 52: 17-31

Armstrong RA. When to use the Bonferroni correction. Ophthalmic Physiol Opt. 2014; 34: 502-508

Bai Y, Cheng X, Liu X, Guo Q, Wang Z, Fu Y, He W, Yu Q. Transforming growth factor- β 1 promotes early odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via activating AKT, Erk1/2 and p38 MAPK pathways. J Dent Sci. 2023; 18: 87-94

Baranova J, Büchner D, Götz W, Schulze M, Tobiasch E. Tooth Formation: Are the Hardest Tissues of Human Body Hard to Regenerate? Int J Mol Sci. 2020; 21: 4031

Basnet S, Sharma S, Costea DE, Sapkota D. Expression profile and functional role of S100A14 in human cancer. Oncotarget. 2019; 10: 2996

Basnet S, Vallenari EM, Maharjan U, Sharma S, Schreurs O, Sapkota D. An Update on S100A16 in Human Cancer. Biomolecules. 2023; 13: 1070

Beer R, Rateitschak KH, Baumann MA. Farbatlant der Zahnmedizin. 7. Endodontologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1997

Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. Cell Mol Immunol. 2017; 14: 43-64

Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 9: one-way analysis of variance. Crit Care. 2004; 8: 1-7

Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. Nat Rev Cancer. 2015; 15: 96-109

Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109: 365-379

Cai X, Zhang L, Wang X. S100A4 is expressed in human odontoblasts and odontoblast-like cells. *Tissue Cell*. 2022; 79: 101959

Capozzi F, Casadei F, Luchinat C. EF-hand protein dynamics and evolution of calcium signal transduction: an NMR view. *J Biol Inorg Chem*. 2006; 11: 949-962

Careddu R, Duncan HF. A prospective clinical study investigating the effectiveness of partial pulpotomy after relating preoperative symptoms to a new and established classification of pulpitis. *Int Endod J*. 2021; 54: 2156-2172

Chang Y-C, Yang S-F, Huang F-M, Liu C-M, Tai K-W, Hsieh Y-S. Proinflammatory cytokines induce cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human pulp cell cultures. *J Endod*. 2003; 29: 201-204

Charoenpong H, Osathanon T, Pavasant P, Limjeerajarus N, Keawprachum B, Limjeerajarus CN, Cheewinthamrongrod V, Palaga T, Lertchirakarn V, Ritprajak P. Mechanical stress induced S100A7 expression in human dental pulp cells to augment osteoclast differentiation. *Oral Dis*. 2019; 25: 812-821

Chen Q, Guo H, Jiang H, Hu Z, Yang X, Yuan Z, Gao Y, Zhang G, Bai Y. S100A2 induces epithelial–mesenchymal transition and metastasis in pancreatic cancer by coordinating transforming growth factor β signaling in SMAD4-dependent manner. *Cell Death Discov*. 2023; 9: 356

Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod*. 2014; 40: S46-S51

D'Amico F, Skarmoutsou E, Granata M, Trovato C, Rossi GA, Mazzarino MC. S100A7: A rAMPing up AMP molecule in psoriasis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016; 32: 97-104

Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J.* 2011; 22: 3-13

Dincer GA, Erdemir A, Kisa U. Comparison of neurokinin A, substance P, interleukin 8, and matrix metalloproteinase-8 changes in pulp tissue and gingival crevicular fluid samples of healthy and symptomatic irreversible pulpitis teeth. *J Endod.* 2020; 46: 1428-1437

Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, J Weber D, L Geczy C. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med.* 2013; 13: 24-57

Donnermeyer D, Dammaschke T, Lipski M, Schaefer E. Effectiveness of diagnosing pulpitis: A systematic review. *Int Endod J.* 2023; 56: 296-325

Dourou V, Lyroudia K, Karayannopoulou G, Papadimitriou C, Molyvdas I. Comparative evaluation of neural tissue antigens—neurofilament protein (NF), peripherin (PRP), S100B protein (S100B), neuron-specific enolase (NSE) and chromogranin-A (CgA)—in both normal and inflamed human mature dental pulp. *Acta Histochem.* 2006; 108: 343-350

Duncan H, Galler K, Tomson P, Simon S, El-Karim I, Kundzina R, Krastl G, Dammaschke T, Fransson H. European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J.* 2019; 52: 923-934

Duncan HF, Cooper PR. Pulp innate immune defense: translational opportunities. *J Endod.* 2020; 46: 10-18

Eckert RL, Broome A-M, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K. S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2004; 123: 23-33

Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol.* 2009; 86: 557-566

Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J*. 2013; 46: 573-580

Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-time PCR. *Curr Protoc Essent Lab Tech*. 2008: 10.13.11-10.13.34

Gallorini M, Krifka S, Widbiller M, Schröder A, Brochhausen C, Cataldi A, Hiller K-A, Buchalla W, Schweikl H. Distinguished properties of cells isolated from the dentin-pulp interface. *Ann Anat*. 2021; 234: 151628

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011; 3: 711-735

Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15: 13-27

Gonzalez LL, Garrie K, Turner MD. Role of S100 proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020; 1867: 118677

Grabarek Z. Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J Mol Biol*. 2006; 359: 509-525

Heizmann CW. S100 proteins: Diagnostic and prognostic biomarkers in laboratory medicine. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019; 1866: 1197-1206

Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*. 2002; 7: d1356-1368

Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag, 2013

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993; 11: 1026-1030

Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*. 2007; 37: 120-126

Hood MI, Skaar EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10: 525-537

Hoppe T, Kraus D, Novak N, Probstmeier R, Frentzen M, Wenghoefer M, Jepsen S, Winter J. Oral pathogens change proliferation properties of oral tumor cells by affecting gene expression of human defensins. *Tumour Biol*. 2016; 37: 13789-13798

Jungbluth H, Brune L, Lalaouni D, Winter J, Jepsen S. Expression profiling of S100 proteins in healthy and irreversibly inflamed human dental pulps. *J Endod*. 2022; 48: 502-508

Karrar RN, Cushley S, Duncan HF, Lundy FT, Abushouk SA, Clarke M, El-Karim IA. Molecular biomarkers for objective assessment of symptomatic pulpitis: A systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2023; 56: 1160-1177

Kawanishi HN, Kawashima N, Suzuki N, Suda H, Takagi M. Effects of an inducible nitric oxide synthase inhibitor on experimentally induced rat pulpitis. *Eur J Oral Sci*. 2004; 112: 332-337

Kawasaki H, Kretsinger RH. Structural and functional diversity of EF-hand proteins: Evolutionary perspectives. *Protein Sci*. 2017; 26: 1898-1920

Khorasani MMY, Andam-Shahsavari P, Zainodini N, Khoramdelazad H, Nosratabadi R. Association of S100 calcium-binding protein A12, receptor for advanced glycation endproducts, and nuclear factor- κ B expression with inflammation in pulp tissues from tooth caries. *J Investig Clin Dent*. 2018; 9:

Koçkapan C. Curriculum Endodontie. Quintessenz-Verlag, 2003

Komichi S, Takahashi Y, Okamoto M, Ali M, Watanabe M, Huang H, Nakai T, Cooper P, Hayashi M. Protein S100-A7 derived from digested dentin is a critical molecule for dentin pulp regeneration. *Cells*. 2019; 8: 1002

Krastl G, Galler K, Dammaschke T, Schäfer E. Ist die Pulpotomie eine valide Behandlungsoption bei irreversibler Pulpitis. *Dtsch Zahnärztl*. 2021: 76

Kraus D, Glassmann A, Golletz C, Kristiansen G, Winter J, Probstmeier R. Zona pellucida protein 2 (ZP2) is expressed in colon cancer and promotes cell proliferation. *Cancers*. 2021; 13: 1759

Kretsinger RH, Nockolds CE. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem*. 1973; 248: 3313-3326

Kritikou K, Greabu M, Imre M, Miricescu D, Ripszky Totan A, Burcea M, Stanescu-Spinu I-I, Spinu T. ILs and MMPs levels in inflamed human dental pulp: a systematic review. *Molecules*. 2021; 26: 4129

Leclerc E, Heizmann CW. The importance of $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ signaling S100 proteins and RAGE in translational medicine. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011; 3: 1232-1262

Lewit-Bentley A, Rety S. EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 2000; 10: 637-643

Liang H, Li J, Zhang K. Pathogenic role of S100 proteins in psoriasis. *Front Immunol*. 2023; 14: 1191645

Lin J, Redies C. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Dev Genes Evol*. 2012; 222: 369-376

Lin LM, Ricucci D, Saoud TM, Sigurdsson A, Kahler B. Vital pulp therapy of mature permanent teeth with irreversible pulpitis from the perspective of pulp biology. *Aust Endod J.* 2020; 46: 154-166

Liu Y, Zhang R, Xin J, Sun Y, Li J, Wei D, Zhao AZ. Identification of S100A16 as a novel adipogenesis promoting factor in 3T3-L1 cells. *Endocrinology.* 2011; 152: 903-911

Malik S, Kamboj M, Narwal A, Devi A. Immunohistochemical evaluation of cyclooxygenase-2 and mast cell density in periapical lesions. *Int Endod J.* 2023: 980-989

Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 322: 1111-1122

McLachlan JL, Sloan AJ, Smith AJ, Landini G, Cooper PR. S100 and cytokine expression in caries. *Infect Immun.* 2004; 72: 4102-4108

Montero-Melendez T, Perretti M. Gapdh gene expression is modulated by inflammatory arthritis and is not suitable for qPCR normalization. *Inflammation.* 2014; 37: 1059-1069

Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965; 19: 739-744

Nahás-Scocate ACR, de Moraes GFA, Nader HB, Vicente CM, Toma L. Analysis of proteoglycan expression in human dental pulp. *Archives of Oral Biology.* 2018; 90: 67-73

Odink K, Cerletti N, Brügggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature.* 1987; 330: 80-82

Okazaki K, Malek M, Chugal N, Lin LM. Diagnosis of pulpal and periradicular disease. In: Chugal N, Lin LM, Hrsg. *Endodontic Prognosis: Clinical Guide for Optimal Treatment Outcome.* Cham, Schweiz: Springer Nature, 2017: 29-42

Ometto F, Friso L, Astorri D, Botsios C, Raffeiner B, Punzi L, Doria A. Calprotectin in rheumatic diseases. *Exp Biol Med* (Maywood). 2017; 242: 859-873

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001; 29: e45-e45

Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* (Heidelb). 2004; 1: 92-95

Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013; 3: 71

Ren H, Wen Q, Zhao Q, Wang N, Zhao Y. Atlas of human dental pulp cells at multiple spatial and temporal levels based on single-cell sequencing analysis. *Front Physiol*. 2022; 13: 993478

Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF. Correlation between Clinical and Histologic Pulp Diagnoses. *J Endod*. 2014; 40: 1932-1939

Rohde D, Busch M, Volkert A, Ritterhoff J, Katus HA, Peppel K, Most P. Cardiomyocytes, endothelial cells and cardiac fibroblasts: S100A1's triple action in cardiovascular pathophysiology. *Future Cardiol*. 2015; 11: 309-321

Sorci G, Giovannini G, Riuzzi F, Bonifazi P, Zelante T, Zagarella S, Bistoni F, Donato R, Romani L. The danger signal S100B integrates pathogen–and danger–sensing pathways to restrain inflammation. *PLoS Pathog*. 2011; 7: e1001315

Strynadka NC, James MN. Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem*. 1989; 58: 951-998

Tjäderhane L, Paju S. Dentin-Pulp and Periodontal Anatomy and Physiology. In: Ørstavik D, Hrsg. *Essential Endodontology: Prevention and Treatment of Apical Periodontitis*. Hoboken, NJ Wiley-Blackwell, 2020: 11-58

Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal*. 2011; 23: 317-323

Trowbridge HO, Kim S. Pulp development, structure and function. In: Cohen S, Burns RC, Hrsg. *Pathways of the Pulp*. St. Louis: Mosby, 1994: 296-337

Vaseenon S, Weekate K, Srisuwan T, Chattipakorn N, Chattipakorn S. Observation of Inflammation, Oxidative Stress, Mitochondrial Dynamics, and Apoptosis in Dental Pulp Following a Diagnosis of Irreversible Pulpitis. *Eur Endod J*. 2023; 8: 148-155

Veres G, Gibbs RA, Scherer SE, Caskey CT. The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science*. 1987; 237: 415-417

Wang H, Ma D, Zhang X, Xu S, Ning T, Wu B. Comparative proteomic profiling of human dental pulp stem cells and periodontal ligament stem cells under in vitro osteogenic induction. *Arch Oral Biol*. 2018; 89: 9-19

Xiao X, Yang C, Qu S-L, Shao Y-D, Zhou C-Y, Chao R, Huang L, Zhang C. S100 proteins in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2020; 502: 293-304

Yang F, Ma J, Zhu D, Wang Z, Li Y, He X, Zhang G, Kang X. The Role of S100A6 in Human Diseases: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Biomolecules*. 2023; 13: 1139

Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J*. 2007; 52: 4-6

Zehnder M, Delaleu N, Du Y, Bickel M. Cytokine gene expression—part of host defence in pulpitis. *Cytokine*. 2003; 22: 84-88

Zhang X, Jiang H, Gong Q, Fan C, Huang Y, Ling J. Expression of high mobility group box 1 in inflamed dental pulp and its chemotactic effect on dental pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 450: 1547-1552

Zhou Y, Yang W, Kirberger M, Lee HW, Ayalasomayajula G, Yang JJ. Prediction of EF-hand calcium-binding proteins and analysis of bacterial EF-hand proteins. *Proteins*. 2006; 65: 643-655

Zimmer DB, Eubanks JO, Ramakrishnan D, Criscitiello MF. Evolution of the S100 family of calcium sensor proteins. *Cell Calcium*. 2013; 53: 170-179

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Søren Jepsen, Direktor der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel und für die Möglichkeit der Nutzung der Laboratorien, die diese Dissertation erst ermöglicht haben.

Bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. Jochen Winter bedanke ich mich für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die Betreuung bei der Erstellung dieser Dissertation.

Weiterhin möchte ich Herrn OA Dr. Holger Jungbluth für die nette Betreuung und Unterstützung bei der Planung der Versuchsdurchführung, Datenauswertung und des Verfassens der Dissertation danken.

Bei Frau Diana Lalaouni möchte ich mich ebenfalls für die Hilfe bei der Durchführung des praktischen Teils im Labor bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung bei der Probengewinnung bedanken.