

Aus dem Lehrstuhl
für Zahnerhaltung und Parodontologie
Prof. Dr. W. Buchalla
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Transkriptomanalyse humaner Pulpazellen unterschiedlicher
Isolationsregionen nach Kokultivierung mit *Streptococcus mutans***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von Maximilian L. Huber

Aus dem Lehrstuhl
für Zahnerhaltung und Parodontologie
Prof. Dr. W. Buchalla
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Transkriptomanalyse humaner Pulpazellen unterschiedlicher
Isolationsregionen nach Kokultivierung mit *Streptococcus mutans***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von Maximilian L. Huber

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Widbiller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Tobias Ettl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2026

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht.....	2
2.1	Die Pathogenese der Karies.....	2
2.1.1	Die ökologische Plaquehypothese.....	2
2.1.2	Der Biofilm des oralen Mikrobioms	3
2.1.3	Die Rolle von <i>S. mutans</i> als „Leitkeim“ der Karies.....	5
2.1.4	Histologische Einteilungen der Karies	6
2.2	Zusammensetzung und Pathomechanismen der Zahnpulpa	8
2.2.1	Histologische Einteilung der Pulpa	8
2.2.2	Zellen der Pulpa	9
2.2.3	Die kariogene Pulpitis.....	12
2.3	Kokulturmodell <i>S. mutans</i> und DPCs	14
2.4	RNA-Sequenzierung.....	15
2.4.1	<i>Library</i> -Präparation mit dem <i>Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation Reference Guide</i>	15
2.4.2	<i>Next-Generation-Sequenzierung</i> mit dem <i>Illumina® Next Seq™ 2000</i> ..	18
3	Material und Methoden	22
3.1	Verwendete Zellen und Bakterien.....	22
3.2	Verwendete Materialien und Geräte	22
3.3	Verwendete Chemikalien und Medien	26
3.3.1	Inhaltsstoffe der Medien	27
3.3.2	<i>qPCR Primer</i>	28
3.4	Materialien, Geräte und Chemikalien für <i>Library</i> und Sequenzierung	29
3.5	Pakete und Software	29
3.6	Gewinnung und Inkubation der humanen Pulpazellen	31
3.7	Festlegen der experimentellen Gruppen	33
3.8	Anlegen der <i>in vitro</i> Kokultur	34
3.9	Transkriptomanalyse	35
3.9.1	Isolation der RNA humaner Pulpazellen.....	35
3.9.2	Umschreiben in cDNA	35
3.9.3	Qualitätskontrolle: RIN-Wert.....	36
3.9.4	<i>Library</i> -Präparation.....	36
3.9.5	<i>Bulk</i> RNA-Sequenzierung der Proben	36
3.9.6	Bioinformatische Analysen	36
3.9.7	Validierung durch <i>qPCR</i> bei selektierten Proben	40
4	Ergebnisse	41

4.1	Transkriptomanalyse	41
4.1.1	Gemeinsame Daten aller Proben ohne Gonosomen	41
4.1.2	Daten der DPCs und DACs ohne Gonosomen.....	48
4.1.3	Protein-Protein-Interaktionen mittels STRING	72
4.2	qPCR.....	76
5	Diskussion	77
5.1	Zusammenfassung und Arbeitshypothese	77
5.2	Methodische Überlegungen.....	78
5.3	Interpretation und Implikationen	80
5.3.1	Beschreibung wichtiger, hochregulierter DEGs	80
5.3.2	Beschreibung wichtiger, herunterregulierter DEGs.....	83
5.3.3	Beschreibung wichtiger, nichtcodierender DEGs	84
5.4	Ausblick und klinische Relevanz.....	84
	Abbildungsverzeichnis	86
	Tabellenverzeichnis.....	88
	Literaturverzeichnis.....	89
	Erklärung.....	107
	Danksagung	108
	Lebenslauf.....	109

1 Einleitung

Wer schon einmal aufgrund einer akuten, irreversiblen Pulpitis in die Zahnarztpraxis getrieben wurde, stellt sich vielleicht auch die Frage: Brauchen wir überhaupt den lästigen Zahnnerv, der im entzündeten Zustand derartige Schmerzen auslösen kann? Warum riskieren wir eine dicke Backe und schlaflose Nächte, wenn mit moderner Endodontologie und maschinellen Feilensystemen die Wurzelkanalbehandlung zur Routine mit hohen Zahnüberlebensraten geworden ist?

Manch eine Zahnärztin oder –arzt mag erwägen, diese These als Verkaufsstrategie zu nutzen, doch sollte stets ein Blick auf die Fakten geworfen werden. Eine Studie aus den USA von 2022 ergab, dass die durchschnittliche Überlebenszeit von nach Wurzelkanalbehandlung untersuchten Zähnen 11,1 Jahre betrug (1). Zwar kann der Zahn durch ein intaktes Parodontium noch im alltäglichen Gebrauch funktionsfähig sein, wichtige Aufgaben der vitalen Pulpa können aber nicht ersetzt werden. Ohne das interne Reizwahrnehmungssystem des Zahns kommt es zu einem Taktilitätsverlust (2, 3). Dieser Tastsinn schützt den Zahn vor okklusaler Überlastung durch Schmerzreize, die Aktivierung des Mundöffnungsreflexes im Sinne einer Feedbackschleife wird diskutiert (3, 4). Durch die Fehlbelastung kann es zu Rissen und Frakturen am Zahn kommen (5). Der wurzelkanalbehandelte Zahn bietet einer eindringenden Karies weniger Widerstand, was die „Restaurationsspirale“ beschleunigt (2). Diese nötigen Restaurationsarbeiten sind nur möglich, wenn der Patient den Zahnarzt aufsucht. Ohne den Schmerzreiz einer agitierten Pulpa wird der Zahnarztbesuch aber oft auf einen späteren Zeitpunkt verschoben, was den entstandenen Schaden, zum Beispiel im Fall von Karies, vergrößert (2).

Der Fokus vieler Forscher in der Zahnmedizin ist deshalb die Entwicklung neuer Methoden und Medikamente zur Vorbeugung einer Pulpanekrose und zur Pulparegeneration. Bei guter Pflege und Vorsorge können vitale Zähne bis ins hohe Alter *in situ* sein, was steigende Zahlen gesunder Zähne von 65- bis 74-Jährigen zwischen 1997 und 2014 in Deutschland belegen (6). Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zum genaueren Verständnis der Pathogenese der Pulpitis geleistet werden, um Grundlagen für die oben genannten Therapieansätze zu schaffen. Mit Hilfe eines etablierten Kokultursystems wird die klinische Situation simuliert, in der dentale Pulpazellen unmittelbar mit dem kariesassoziierten Bakterium *Streptococcus mutans* konfrontiert sind. Durch das verbesserte Verständnis der Reaktion dieser Zellen auf eindringende Pathogene rücken weitere therapeutische Ansätze anstelle der konventionellen Wurzelkanalbehandlung näher.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Pathogenese der Karies

2.1.1 Die ökologische Plaquehypothese

Zwischen 60 und 90% der Kinder im Schulalter und nahezu alle Erwachsenen weltweit haben eine Karieserfahrung in ihrem Leben (7, 8). Dennoch ist die Karies eine nicht-übertragbare Krankheit (9). Der Grund für ihr ubiquitäres Auftreten liegt in der Komplexität der Pathogenese: Zu Beginn der Kariespathogenese entsteht eine Dysbiose des humanen oralen Mikrobioms, die durch eine Reihe von Faktoren begünstigt wird (10). Zu diesen Faktoren zählen neben häufiger kohlenhydratreicher Substratzufuhr und der Selektion hochkariogener Bakterienspezies in Nischen mit niedrigen Sauerstoffkonzentrationen, die Anfälligkeit des Wirts (10). Diese ist wiederum durch genetische Prädisposition (11), sozioökonomischen Status (12) und unzureichenden Speichelfluss (13) beeinflusst, um nur einige Beispiele zu nennen. Die derzeit am weitesten verbreitete und akzeptierte Theorie zur Kariesentstehung ist die ökologische Plaquehypothese (14, 15). Die folgende Schemazeichnung (s. Abbildung 1) fasst die wichtigsten Faktoren und Inhalte zusammen.

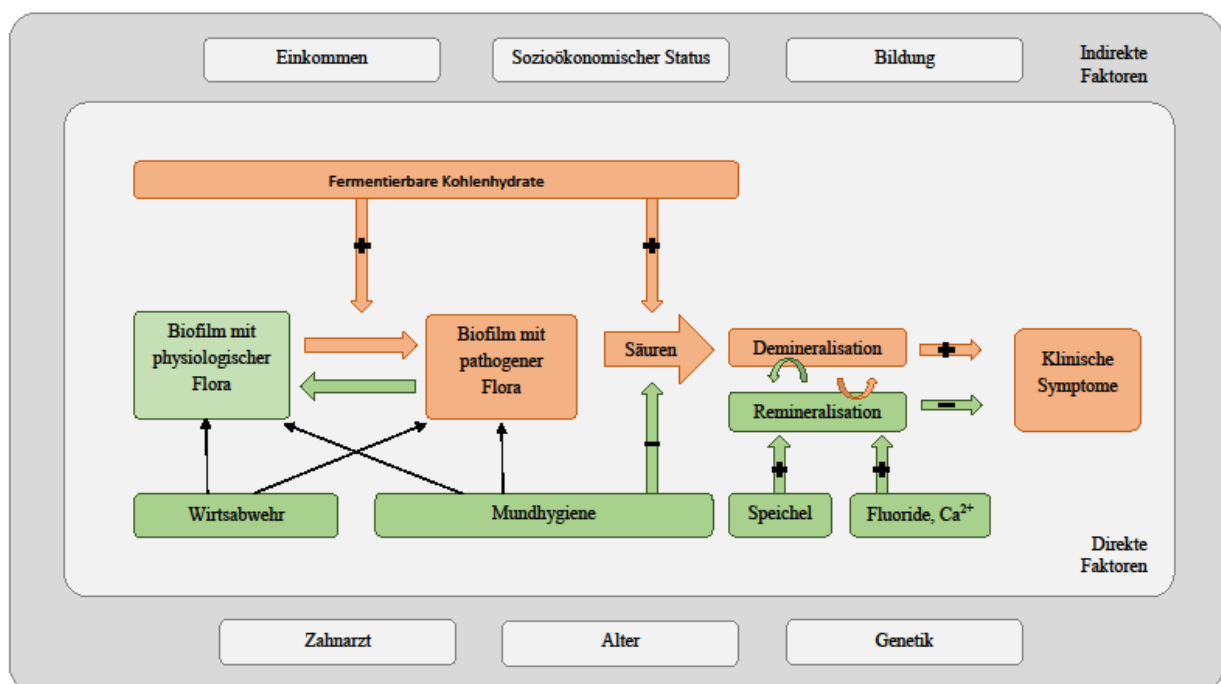


Abbildung 1: Erweiterte Darstellung der ökologischen Plaquehypothese, modifiziert nach (15)

2.1.2 Der Biofilm des oralen Mikrobioms

Der menschliche Mundraum beherbergt eine Vielzahl an Bakterienspezies, mehr als 700 Taxa werden beschrieben, von denen 50-200 pro Individuum anzutreffen sind (16). Die wichtigsten Stämme sind Actinomycetota, Bacteroidota, Bacillota, Fusobacteriota, Pseudomonadota, Saccharibacteria und Spirochaetota (16). Im gesunden Zustand helfen diese Spezies in kommensaler und symbiotischer Weise bei der Feinregulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems oder bauen Nitrate zu für den menschlichen Organismus verwertbaren Produkten ab (17). Es wird vermutet, dass sie die Besiedlung der Mundhöhle durch exogene Erreger durch das Besetzen der Epitheloberfläche und die Sekretion antimikrobieller Substanzen erschweren (17).

Ein Selektionsvorteil für viele Spezies des oralen Mikrobioms ist die Fähigkeit zur koordinierten Bildung eines Biofilmes auf der Zahnoberfläche, der Schutz vor Umwelteinflüssen bietet und eine Adhäsion an der Zahnoberfläche ermöglicht (17). Auf einer gereinigten Zahnoberfläche bildet sich unmittelbar nach Speichelkontakt eine Pellikel, auch tertiäres Schmelzoberhäutchen genannt, die als dünnes Häutchen hauptsächlich aus Proteinen, Lipiden und Makromolekülen wie Kohlenhydraten besteht (18). Diese kann von den Erstbesiedlern, besonders *Streptococcus spp.* und *Actinomyces spp.*, zur Adhäsion an der Zahnoberfläche genutzt werden (19). Die Erstbesiedler bieten wiederum in einem komplexen Zusammenspiel mit den frühen Kolonisatoren wie *Veillonella spp.* die richtigen Substrate und Bedingungen für die Koaggregation mit einer Vielfalt anderer Bakterien, die im gesunden Mikrobiom, als auch im pathologischen Milieu zu finden sind (17, 20). Dabei spielen Bakterien wie *Fusobacterium nucleatum* eine Schlüsselrolle in der Vermittlung zwischen Früh- und Spätbesiedlern (s. Abbildung 2), da sie die Fähigkeit besitzen, mit beiden Arten zu koaggregieren (21).

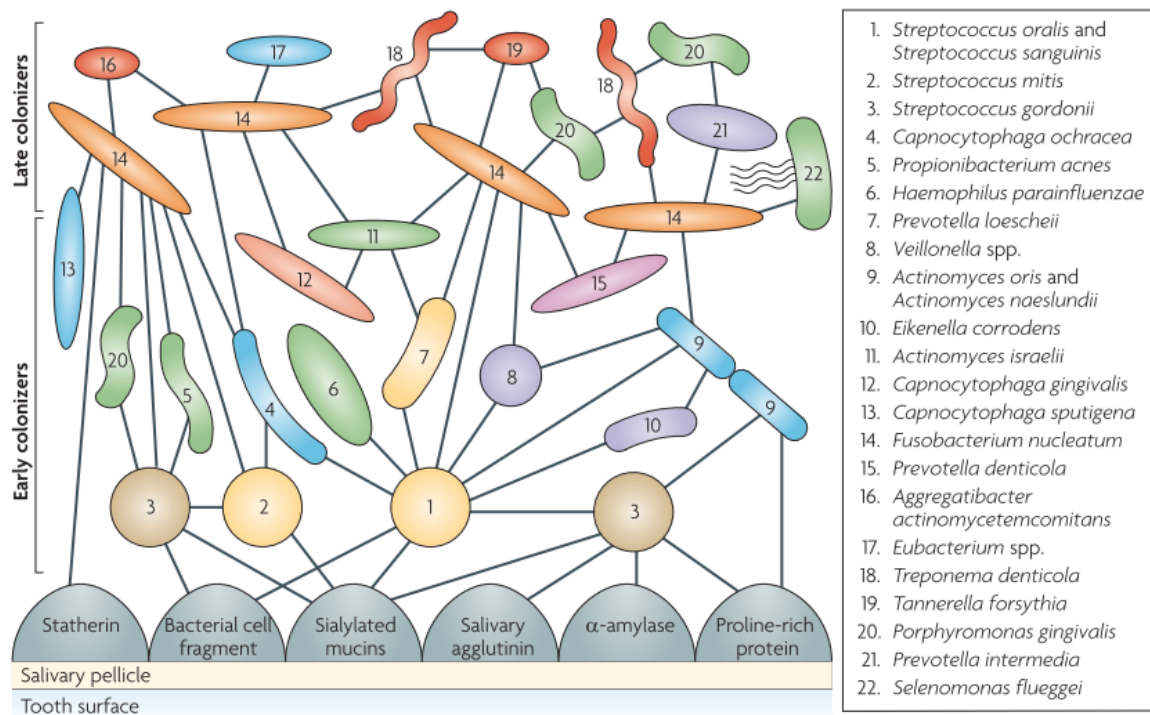


Abbildung 2: Modell der Biofilm-Kolonisation, modifiziert nach Kolenbrander et al. (22). Das Modell verdeutlicht die Interaktion der Erstbesiedler über Fusobakterien mit den Spätbesiedlern.

Bakterien im Biofilm sezernieren eine extrazelluläre Matrix, bestehend aus Polysacchariden, Proteinen und extrazellulärer bakterieller DNA, sowie wirtsspezifischen Molekülen wie Immunglobulinen (23). Der Biofilm erhöht die Resistenz der eingebetteten Spezies gegenüber Antibiotika deutlich (24). Mit zunehmender Zelldichte im reifenden Biofilm variiert das Substratangebot und der Sauerstoffgehalt in verschiedenen Schichten der Plaque stark, was einer Vielzahl von Spezies mit eng gefassten Wachstumsbedingungen das Überleben ermöglicht (25). Die komplexe Kommunikation der diversen Bakterienspezies im Biofilm wird über das *Quorum sensing* reguliert (26). Dabei werden zelldichteabhängige Signalmoleküle sezerniert, um das Heranwachsen des Biofilms zu koordinieren. So werden beispielsweise die Aufnahme von Eisen (27), die Virulenzfaktorproduktion (27) und die Reaktion auf Stress abgestimmt (28, 29).

2.1.3 Die Rolle von *S. mutans* als „Leitkeim“ der Karies

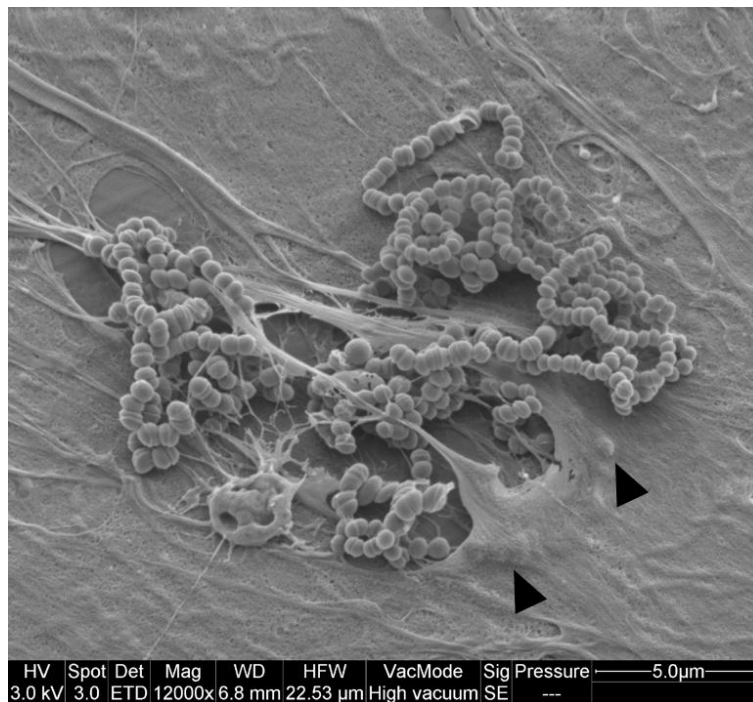


Abbildung 3: *S. mutans* in Kokultur mit Pulpafibroblasten, modifiziert nach (30). Die Bakterien sind auch unter dem Zellrasen zu erkennen (Pfeile).

Beim Übergang vom physiologischen in ein kariesförderndes Biofilmmilieu kommt es zu einer zunehmenden Selektion anaerober säureproduzierender Bakterienspezies und einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Remineralisation und Demineralisation der Zahnhartsubstanz (7, 10). Hierzu soll im Folgenden die Rolle des Erstbesiedlers und „Leitkeim“ der Karies, *Streptococcus mutans* (s. Abbildung 3), genauer beleuchtet werden.

S. mutans ist eines der am häufigsten mit Karies in Verbindung gebrachten grampositiven Bakterien (31). Es gehört zum Phylum der Bacillota (früher Firmicutes) (31). Klinisch wurden erhöhte Mengen an *S. mutans* in Patienten kurz vor Entwicklung einer Karies und in aktiven Läsionen entdeckt (30). Zu den drei wichtigsten Eigenschaften für die Pathogenität des fakultativ anaeroben *S. mutans* im oralen Milieu zählen (i) die Fähigkeit große Mengen extrazellulärer Glucanpolymere zu synthetisieren, die für den Aufbau einer extrazellulären Matrix notwendig sind und (ii) die Fähigkeit, Kohlenhydrate in organische Säuren umzuwandeln (Azidogenität) (31). Das wichtigste Stoffwechselprodukt ist Lactat, welches bei ausreichender Konzentration die Demineralisation anorganischer Zahnhartsubstanzen bewirkt (32). Es können aber auch organische Bestandteile des Zahnes durch Kollagenasen angegriffen werden (33). Zuletzt spielt (iii) die Eigenschaft, auch bei niedrigen pH-Werten zu überleben (Azidurität), eine fundamentale Rolle für die Pathogenität dieses Bakteriums (31). *S. mutans* besitzt als Art der Gattung *Streptococcus* einen sehr konstanten, überlebenswichtigen Anteil

seines Genoms (34). Die Anzahl der überlebenswichtigen Gene, beispielsweise des Metabolismus oder der Speicherung von Erbinformationen, wird mit vermuteten 1083 Genen in der Gattung als vergleichsweise gering eingeschätzt (35). Es finden sich innerhalb dieser Art jedoch verschiedene Stämme (engl. *strains*), die sich in ihrer Virulenz, Azidurität, Adhäsionsfähigkeit und anderen akzessorischen Eigenschaften genetisch unterscheiden (34). Es wird vermutet, dass diese „entbehrlichen Gene“ über horizontalen Gentransfer verbreitet werden (34). Zusätzlich kommt es zu Veränderungen in den Chromosomen, wie Deletionen, Insertionen und Inversionen (36). Aufgrund dieser sich ständig verändernden DNA-Zusammensetzungen spricht man auch vom offenen „Pan-Genom“ des *S. mutans* (35).

2.1.4 Histologische Einteilungen der Karies

Anhand der Eindringtiefe der kariösen Läsion lassen sich die Zahnschmelzkaries und die nach Überschreitung der Schmelz-Dentin-Grenze auftretende Dentinkaries unterscheiden (37). Bei der Zahnschmelzkaries stellen sich unter dem Durchlicht- und Polarisationsmikroskop vier verschiedene Zonen mit Poren unterschiedlicher Anzahl und Größe dar (37). Aufgrund der damit einhergehenden variierenden Lichtstreuung und -brechung lassen sich von der Zahnoberfläche beginnend Oberflächenzone, Läsionskörper, dunkle Zone und transluzente Zone unterscheiden (37). Interessanterweise sind bei einer Schmelzkaries mit intakter Oberfläche kaum Bakterien in Schmelz und Dentin auffindbar, da die Mikroporositäten des Schmelzes für das Eindringen meist nicht ausreichen (37).

Eine ähnliche Einteilung existiert für die bis ins pulpanahe Dentin reichenden kariösen Läsionen bei kavittierter Schmelzoberfläche (s. Abbildung 4) (38). Hier spricht man von pulpafern beginnend von den Zonen der Nekrose (ZN), der Penetration (ZP) und der Demineralisation (ZD), anschließend dem *Dead Tract* (DT), dem sklerotischen Dentin (SD) sowie einem Bereich aus kaum verändertem Dentin und Tertiärdentin (TD) (38).

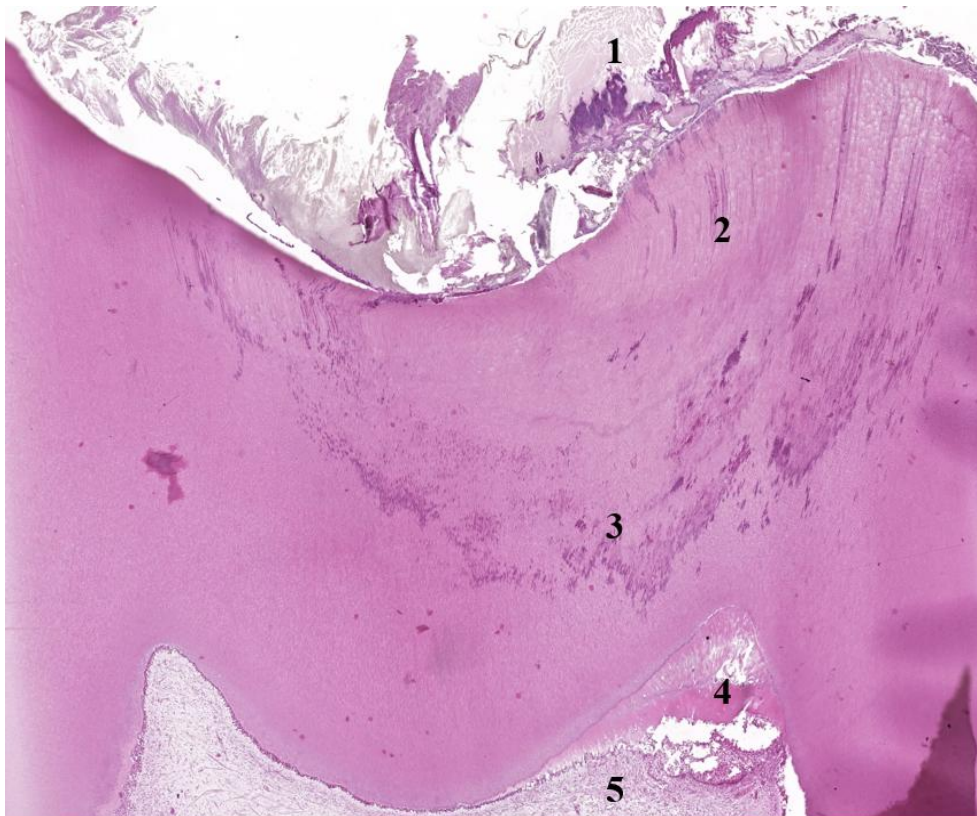


Abbildung 4: Histologischer Schnitt durch Molaren mit tiefer Dentinkaries, HE-Färbung. 1) Zone der Nekrose mit Biofilm und Debris, 2) Zone der Penetration und Demineralisation, 3) Sklerosierte Zone, 4) Tertiärdentin, 5) Pulpa mit Entzündungsinfiltrat. Bild des Forschungslabors des Universitätsklinikums Regensburg, Abteilung Zahnerhaltung und Parodontologie.

Die äußeren beiden Zonen stellen sich klinisch als erweichte Zahnhartsubstanz dar, die vom Biofilm bedeckt und von Bakterien invadiert wird. Dabei besteht ein Zellzahl-Gradient von koronal nach pulpal, mit 1×10^1 bis 1×10^8 pro mg. In diesen Zonen herrscht bereits ein anaerobes Klima, aber die Versorgung mit kohlenhydratreichem Substrat ist nach wie vor gewährleistet. In der Demineralisationszone ist ein ausgeprägter Substrat- und Sauerstoffmangel feststellbar. Dies führt zu einer geringen Bakterienzahl mit reduzierter metabolischer Aktivität (10).

Im *Dead Tract* finden sich durch die Obliteration der Tubuli im sklerotisierten Dentin keine Odontoblastenfortsätze. Dieser Bereich ist sehr durchlässig für Bakterien (37). Das sklerotisierte Dentin, auch transluzente Zone genannt (37), enthält nahezu keine Bakterien, die produzierten Säuren führen aber zu einer Demineralisation von Hydroxylapatit und der Remineralisation in Form von weißlichen Whitlockit-Kristallen (10). Zudem sind hier die Dentintubuli oblitiert, was den Lichtbrechungsindex an den des intertubulären Dentins annähert und damit eine höhere Transluzenz bedingt (37). Vor der Pulpa folgen eine Schicht kaum veränderten Dentins und des Tertiärdentins, das als Reaktion auf den externen Reiz gebildet wurde (38).

An der Schmelz-Dentin-Grenze enden die Dentintubuli, deren Durchmesser und Anzahl zur Pulpa hin zunehmen (14). Mit voranschreitender Läsionstiefe ist anzunehmen, dass es für Bakterien zunehmend einfacher wird, etwa über die größer werdenden Dentintubuli als Leitbahn, einen Zugang zur Pulpa zu erlangen (10). Die Zellen der Pulpa haben hiergegen bereits vor Beginn der Dentinkaries greifende Abwehrmechanismen entwickelt, die im Folgenden genauer beschrieben werden (37).

2.2 Zusammensetzung und Pathomechanismen der Zahnpulpa

2.2.1 Histologische Einteilung der Pulpa

Mit Ausnahme der Blutgefäße stammen die Zellen der Pulpa überwiegend aus der kranialen Neuralleiste, auch Mesoektoderm genannt, ab (39). Von extern nach zentral betrachtet schließen die Zellkörper der Odontoblasten unmittelbar an das Prädentin an (s. Abbildung 5), sie bilden den mehrreihigen, palisadenförmig angeordneten Odontoblastensaum (40). Die Subodontoblasten-Schicht enthält die Höhlzellen, auch Präodontoblasten genannt (40), welche vermutlich als Progenitorzellen für den Ersatz zugrunde gegangener Odontoblasten sorgen (41). Sie differenzieren terminal zu Odontoblasten der zweiten Generation, die Funktionen und Aufgaben der ursprünglichen Odontoblasten übernehmen sollen (40). Die Weil'sche Zone wird als vergleichsweise zellarm beschrieben, sie enthält lediglich Endäste von Nervenfasern und Zytoplasmafortsätze von Fibroblasten (42, 43). Durch die spindelförmigen Zellkerne der nach zentral anschließenden Fibroblasten entsteht der Eindruck zweier Pole, weshalb diese zellkernreiche Zone auch als bipolare Zone bezeichnet wird (44). Es handelt sich dabei um undifferenzierte Ersatzzellen der Pulpa und Fibroblasten (40, 45). Das stark verästelte Nervengeflecht in dieser Zone ist Bestandteil des Raschkow-Plexus (44, 46). Der Pulpakern, also der zentrale Anteil des Pulpagewebes, enthält hauptsächlich Fibroblasten, aber auch geringe Anteile von beispielsweise Endothel-, Nerven-, Stamm-, und Immunzellen (41, 47).

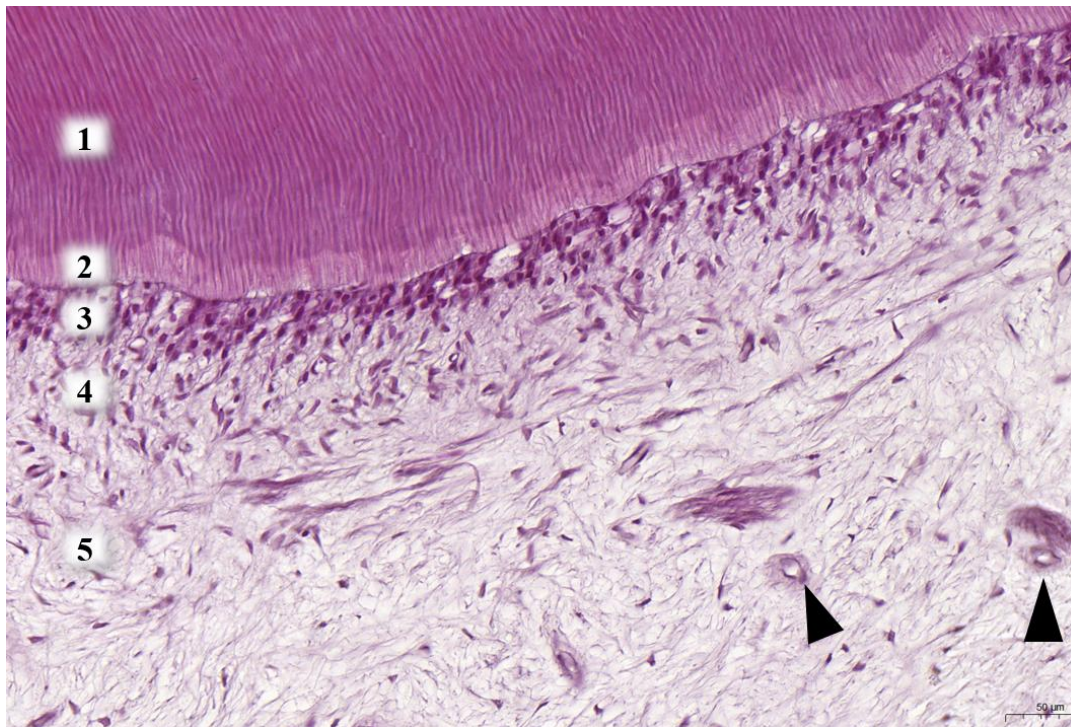


Abbildung 5: Histologischer Schnitt durch einen kariesfreien Molaren, HE-Färbung. 1) Dentin, 2) Prädentin, 3) Odontoblastensaum, 4) Subodontoblastenschicht und Weil'sche Zone, 5) Pulpakern mit Gefäßen (Pfeile). Bild des Forschungslabors des Universitätsklinikums Regensburg, Abteilung Zahnerhaltung und Parodontologie.

2.2.2 Zellen der Pulpa

2.2.2.1 Odontoblasten

Morphologisch sind diese polarisierten Zellen in der Kronenpulpa säulenförmig und besitzen einen exzentrisch basal liegenden, ovalen Nucleus (48). Im physiologischen Zustand sind die postmitotischen Odontoblasten verantwortlich für die Dentinogenese, indem sie extrazelluläre Matrixbestandteile des Prädentins sowie nicht-kollagene Matrixproteine wie Dentinmatrix-Protein 1 (DMP-1) und Dentin-Sialophosphoprotein (DSPP) sezernieren. Diese Komponenten fungieren als Kristallisationskeime für den Beginn der Mineralisation (40, 49). Nach Beendigung der primären Dentinbildung mit etwa 4-8 µm/d gehen die Odontoblasten zur deutlich langsameren Bildung von Sekundärdentin mit etwa 0,5 µm/d über, wofür sie ihren Phänotyp oder ihre Morphologie ändern (50). Mit ihren langen Zellfortsätzen durchdringen sie das Prädentin und enden in den von ihnen gebildeten Tubuli des mineralisierten primären und sekundären Dentins. Durch Proteine des Zytoskeletts, wie die Intermediärfilamente Vimentin und Nestin sowie Mikrotubuli und Aktinfilamente, ist ein Molekültransport bis in diese entfernten Enden möglich. Da es sich bei den Odontoblasten um postmitotische Zellen handelt, nimmt ihre Anzahl im Laufe des Lebens ab, bis nur noch einreihige Zellschichten vorhanden

sind (40). Die Rolle der Odontoblasten in der Schmerzrezeption in Zusammenarbeit mit sensiblen Nervenenden in den Dentintubuli ist Gegenstand aktueller Forschung (40). Studien haben gezeigt, dass Odontoblasten funktionelle thermosensitive *transient receptor potential* (TRP)-Ionenkanäle besitzen, die bei der heiß-kalt-Wahrnehmung der Zähne beteiligt sein könnten (51). Im Rahmen der hydrodynamischen Theorie werden sie aufgrund ihrer Expression von mechanosensitiven Ionenkanälen auch als sensorische Zellen der Schmerzwahrnehmung postuliert (52).

2.2.2.2 Pulpafibroblasten

Die Pulpafibroblasten regulieren die Bildung und Erneuerung der extrazellulären Matrix (ECM) (53). Sie synthetisieren Kollagene und Fibronectin (47) und setzen Matrix-Metalloproteinasen ein, um die ECM abzubauen (54). Die extrazelluläre Matrix der dentalen Pulpa enthält ein verwobenes Fasernetzwerk mit Molekülen wie Kollagen Typ I, Typ III und Fibronectin (40, 53). Sie hat durch die flüssigkeitsbindenden Eigenschaften von Proteoglykanen und Glykoproteinen eine gelatineartige Konsistenz (2). Eine große zelluläre und molekulare Diversität unter den Fibroblasten-Subpopulationen, abhängig vom Entwicklungsstadium, anatomischem Fundort und Gewebe-Mikroumgebung ist feststellbar (47, 53, 55). Ein Beispiel dafür sind die Myofibroblasten, die in einer Studie für ihre Rolle in der Wundheilung der Pulpa hervorgehoben wurden (56). Durch die Sekretion von diversen Wachstumsfaktoren, wie dem *Angiogenic Growth Factor* (AGF) oder dem *Neural Growth Factor* (NGF), wird die Vaskularisierung, die Nozizeption und die zelluläre Regeneration von den Fibroblasten gefördert (57, 58). Sie leisten auch einen Beitrag im angeborenen Immunsystem, so synthetisieren sie nach Kontakt mit Lipoteichonsäure (LTA) grampositiver Bakterien alle Proteine, C1 bis C9, für die Aktivierung des Komplementsystems (59). Die Komplemente C5b bis C9 helfen bei der Opsonierung und bilden zusammen den *Membrane Attack Complex* (MAC), der sich in die Lipidmembran von pathogenen Erregern einlagert, und durch Porenbildung zur Zytolyse führt (60). Interessanterweise ist das Komplement C5a über den von LTA-stimulierten Fibroblasten exprimierten Rezeptor C5aR mitverantwortlich für das sog. *nerve sprouting* im Entzündungsgebiet (58). Die Sensibilisierung dieses Gebiets wird durch die lokale Sekretion des *Brain Derived Neurotropic Factors* (BDNF) als Folge dieser Rezeptor-Ligand-Bindung eingeleitet (58). Die Fibroblasten produzieren zudem proinflammatorische Zytokine, Chemokine und exprimieren *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs) (47). Damit übernehmen sie als Nicht-Immunzellen eine wichtige Rolle in der Antwort auf Inflammation und durch die komplementvermittelte Rekrutierung von dentalen pulpalen

Stammzellen (DPSCs) Einfluss auf die Pulpa-Regeneration (59). Pulpafibroblasten zeigen große phänotypische und morphologische Ähnlichkeiten zu mesenchymalen Stammzellen (MSCs). Die Oberflächenmarker und das in einigen Studien gefundene vergleichbare Differenzierungspotential löst Diskussionen bezüglich der Abgrenzung zwischen den beiden Zelltypen aus (61).

2.2.2.3 Residente Immunzellen

Untersuchungen an gesundem Pulpagewebe dritter Molaren durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) ergab, dass dieses $CD45^+$ Leukozyten mit einem Anteil von etwas unter 1% der Gesamtzellpopulation enthält (62). $CD16^+CD15^+CD14^-$ neutrophile Granulozyten stellten die größte Subpopulation dar, gefolgt von $CD3^+$ T-Zellen, $CD14^+$ Monozyten und dendritischen Zellen (62, 63). In kleinerem Umfang fanden sich auch $CD3^-CD56^+$ natürliche Killerzellen, $CD19^+$ B-Zellen und regulatorische T-Zellen (62). Diese Leukozyten stellen residente Zellen der Immunüberwachung der Pulpa ohne inflammatorische Veränderungen dar (62).

2.2.2.4 Gefäß- und Nervensystem

Die Pulpa enthält ein stark verzweigtes Nerven- und Blutgefäßsystem, das für die Ernährung und Steuerung der pulpalen Zellen essentiell ist (2). Sämtliche externe Stimuli, wie Hitze, Kälte, oder osmotischer Druck, lösen am freigelegten Dentin die Antwort Schmerz aus (40). 70-90% der Nervenaxone sind nach ihrem Eintritt in die Zahnwurzel unmyelinisiert (64). Es wird angenommen, dass der Rest nahezu ausschließlich aus $A\delta$ -Fasern besteht (64). Experimente an Ratten-Molaren zeigten, dass der Großteil der restlichen myelinisierten Axone mit zunehmender Nähe zur koronalen Pulpa seine Myelinscheide verliert und sich verzweigt (40, 65). Zudem wurde dargestellt, dass die meisten elterlichen Axone außerhalb des Zahnes myelinisiert und dicker sind, was für eine schnelle Weiterleitung der Reize an die im Ganglion trigeminale verorteten Zellkörper spricht (66). Es existieren jedoch zusätzlich auch kleine Anteile „echter“ C-Fasern im Pulpakern bis zur zellkernreichen Zone für die dumpfe, langsame, verzögerte Schmerzanwort auf chronische Reize sowie Hitze (40, 67). Die meist dentinnahen $A\delta$ -Fasern für die spitze, schnelle, starke Reaktion auf kurzfristige Stimuli zeigen in den Pulpenhörnern die größte Nervendichte, ihre freien Nervendigungen münden teilweise mit den Odontoblastenfortsätzen in die Dentintubuli (67). Ein Teil der Axone kontrolliert durch die Inhibition der sympathischen Vasokonstriktion und durch ihre Neuropeptide die lokale Vasodilatation als Reaktion auf Schmerzreize (68).

2.2.3 Die kariogene Pulpitis

Der häufigste Grund aller Erkrankungsformen der Pulpa ist eine bakterielle Infektion (2). Für die Entstehung einer Karies sind grampositive Erreger die Hauptverantwortlichen (63). Während bei Caries initialis und media die Anzahl der grampositiven Bakterien überwiegt, finden sich in tieferen Läsionen zunehmend gramnegative anaerobe Bakterien (63). Diese Keime und ihre Stoffwechselprodukte dringen über die Dentintubuli oder eine penetrierende kariöse Läsion in die Zahnpulpa ein (10).

2.2.3.1 Erstkontakt mit den Odontoblasten

Die Odontoblasten sind mit ihren in die Dentintubuli reichenden Fortsätzen die ersten Zellen, auf die Bakterien wie *S. mutans* und ihre Stoffwechselprodukte auf dem Weg zur Pulpa treffen (69). Diese bilden nicht nur als geschlossene Zellschicht und durch die Bildung von tertiärem Dentin eine physikalische Barriere gegen eindringende Mikroorganismen, sondern aktivieren auch das Immunsystem beispielsweise durch die Bindung von Endotoxinen an die von ihnen exprimierten *Toll-Like-Rezeptoren* TLR2 und TLR4 (63, 69). Das für grampositive Bakterien spezifische Signalmolekül LTA, welches über TLR2 auf Odontoblasten und die zentraler gelegenen dentalen Pulpazellen wirkt (30, 69), induziert die Produktion verschiedener Chemo- und Zytokine, wie IL-6 und IL-8 (63). Das Ziel der pulpalen Reaktion ist es, die Gewebshomöostase wiederherzustellen (30). Die Apposition von Tertiärdentin wird nicht nur durch *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) wie LTA stimuliert, sondern auch durch körpereigene Proteine des organischen Anteils des Dentins, wie DSPP und DMP-1 (70, 71). Die inaktiven Formen von Signalmolekülen wie *Transforming Growth Factor- β 1* (TGF- β 1), *Basic Fibroblast Growth Factor* (FGF-2), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), und *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) sind ebenfalls im Dentin vorhanden (72, 73). All diese Proteine werden bei der kariösen Demineralisation aus dem Dentin freigesetzt und fördern die Syntheseaktivität der Odontoblasten (10).

2.2.3.2 Die Immunantwort der Pulpa

Durch die von Odontoblasten und später Fibroblasten sezernierten proinflammatorischen Zytokine und Chemokine, wie beispielweise *Chemokin (C-C-motif) Ligand 2* (CCL2), CCL5, CCL7, *Chemokin (C-X-C-motif) Ligand 8* (CXCL8) und CXCL10, werden Zellen des Immunsystems an den Ort der bakteriellen Invasion gelockt. Große Mengen an neutrophilen Granulozyten, T-Zellen und dendritischen Zellen gehören zu den ersten Vertretern der zellulären Immunabwehr (74, 75). Die neutrophilen Granulozyten können nicht nur Bakterien

die in die Pulpakammer vorgedrungen sind phagozytieren, sie können auch durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und antimikrobieller Proteine (AMPs), wie Lysozym, und verschiedener Kathepsine und Defensine, an der Beseitigung der Pathogene mitwirken (76). Bei der Degranulation dieser Moleküle kommt es zu Kollateralschäden am körpereigenen Gewebe (77). Mit zunehmender Expositionsdauer nimmt die Anzahl von Makrophagen und schließlich B-Zellen zu, späte Stadien der Pulpitis zeigen weiter vom Infektionszentrum entfernte Plasmazellen, als Reaktion der humoralen Immunabwehr auf die andauernde Antigenexposition (74). Eine zentrale Rolle dabei spielen zum Beispiel der *Nuclear Factor κ light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B)-Signalweg, sowie der *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK)-Signalweg (30, 78). Der kanonische NF- κ B-Signalweg wird durch Signalmoleküle wie TNF α und IL-1 hochreguliert (79). Nach seiner Aktivierung wird die Transkription proinflammatorischer Gene gefördert (79). Der p38 MAPK-Signalweg gehört zur Familie der MAPK-Signalwege und ist für die Signaltransduktion von extrazellulärem Stress durch Moleküle wie Lipopolysaccharide (LPS), IL-1 β und TNF α in intrazelluläre entzündungsfördernde Transkriptomveränderungen wichtig (80).

2.2.3.3 Intrapulpaler Druckanstieg und Ischämie

Die inflammationsbedingt erhöhte Gefäßpermeabilität, durch den Verlust der endothelialen Barrierefunktion, kann fatale Folgen für die Pulpa haben, was im Folgenden genauer erläutert wird (81). Aufgrund der rigiden äußeren Begrenzung der Pulpa durch die Zahnhartsubstanzen herrschen hier im Zuge einer Entzündung andere Bedingungen als in anderen Geweben (82). Der erhöhte Flüssigkeitsausstrom aus den Kapillaren erzeugt einen unmittelbaren Druckanstieg in der Pulpakammer (82). Eine Erhöhung des interstitiellen Druckes kann durch den Ausstrom von Flüssigkeit über die Dentintubuli einen positiven Effekt haben, da das Eindringen von bakteriellen Toxinen reduziert werden kann (83). Es besteht jedoch auch die Gefahr, dass durch den Anstieg des intrapulpalen Druckes Venolen kollabieren (2). Bei lokalisierten Infekten ist der Druckanstieg auf das entzündete Areal beschränkt, es wird vermutet, dass durch Drainage über gesundes Pulpagewebe in Blutgefäße und die Öffnung von Shunt-Gefäßen der Druckanstieg abgewendet und ein Heilungsprozess erreicht werden kann (82, 84). Bei einer massiveren Infektion ist durch den Kollaps der abführenden Gefäße eine partielle bis totale Pulpanekrose durch Ischämie und Unterversorgung der Pulpazellen die Folge (82). Wie eine *in-vivo*-Studie an Ratten-Unterkiefermolaren nahelegt, gehen besonders die Odontoblasten schnell zu Grunde, da sie einen sehr hohen Sauerstoffverbrauch haben (85). Der Effekt des lokalen Sauerstoffmangels auf mesenchymale Stammzellen der dentalen Pulpa (DP-MSCs)

wurde bereits intensiv untersucht (86). Solange eine gewisse O₂-Mindestkonzentration nicht unterschritten wird, kommt es zu erhöhter Zellproliferation, Zellmigration, osteogener Differenzierung von Stammzellen, was der Tertiärdentinbildung dient, und der Förderung der Angiogenese durch die Expression des *Hypoxia-Inducible Factor alpha* (HIF1 α) und des *Vascular Endothelial Growth Factor A* (VEGFA) (86). Eine Studie zeigte, dass Hypoxie sowohl in DP-MSCs als auch in humanen dentalen Pulpafibroblasten (HDPFs) die HIF1 α und VEGF-Expression erhöhte (87). HIF1 ist ein dimerer Protein-Komplex, der durch seine Effekte auf die Vaskularisierung besonders in der Ischämie- und Tumorforschung im Fokus steht (88). Eine Überexpression dieses Faktors steht im Verdacht, die Apoptose einiger Zelltypen zu induzieren (88). Im Falle eines Entzündungsgeschehens ist HIF1 auch essentiell für die Aktivierung von Zellen der myeloischen Abstammungslinie wie Monozyten bzw. Makrophagen (89). Für neuere Therapieansätze könnte er auch in der Zahnpulpa interessant sein, um den wie oben beschriebenen Zelltod durch Hypoxie und die Immunantwort zu modifizieren (87, 88).

2.3 Kokulturmodell *S. mutans* und DPCs

Das komplexe Zusammenspiel von Bakterien wie *S. mutans* und Zellen der Zahnpulpa konnte bislang meist nur durch *in-vitro*-Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen oder Antigenen simuliert werden. Um die Reaktionen von *S. mutans* in Kontakt mit DPCs *in vitro* zu untersuchen, wurde ein Kokulturmodell dieser beiden Organismen etabliert (30). Dabei wurde durch den Glukosekatabolismus, die Laktat-, Zytokin- und Wachstumsfaktorproduktion die Funktionalität aller Organismen im Kokultursystem bestätigt. Es wurde festgestellt, dass die Proliferation und Lebensfähigkeit der DPCs durch *S. mutans* beeinflusst wurden, vice versa *S. mutans* Proliferation und Lebensfähigkeit aber nicht von den DPCs (30). In einem anderen Kokultur-Experiment wurde nach Exposition mit LTA, sowie nach Kokultur mit *S. mutans* (ATCC Nr. 31383) und *S. sanguinis* (ATCC Nr. BAA-1455), je 10⁶ vitale Bakterien pro ml für 0 und 30 min, die Ausbildung eines MAC durch Pulpafibroblasten bestätigt (90). Es wurde auch ein *ex-vivo*-Modell etabliert, das die Kokultivierung von vitalen Pulpazellen in präparierten Zahnscheiben mit Bakterien der *S. anginosus*-Gruppe (SAG) möglich machen sollte (91). Dabei wurde nach 8 h Kokultivierung ein Abbau extrazellulärer Matrix, wahrscheinlich durch bakterielle Enzyme, festgestellt. Nach 24 h traten besonders bei *S. anginosus* (39/2/14A) signifikant mehr Zelltode im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe auf (91).

2.4 RNA-Sequenzierung

Next Generation Sequencing (NGS) wird seit einigen Jahren immer häufiger als Analysemethode herangezogen (92). Die simultane Sequenzierung großer Mengen von Nukleotidsträngen hat es in zahlreichen Forschungsfeldern, von der Grundlagenforschung, über die Diagnostik von Krankheiten, bis zur Abschätzung des Therapieansprechens bei Tumoren, ermöglicht, präzisere qualitative und quantitative Analysen des Verhaltens von Zellen vorzunehmen. Dabei werden auch Kosten- und Zeitaufwand zunehmend geringer (93).

Bei der RNA-Sequenzierung wird dabei eine Momentaufnahme des Transkriptoms, das je nach Zelltyp und Umweltsituation anders ausgeprägt ist, aufgenommen. Bei Eukaryoten besteht die Gesamtmenge der RNA größtenteils (> 80%) aus ribosomaler RNA (rRNA), aber auch aus *messenger* RNA (mRNA, ca. 5%), *transfer* RNA (tRNA, ca. 10%) und anderen RNA-Subtypen. Meist steht bei NGS die mRNA im Fokus. Diese ist bei Bakterien oft als Polycistron aus mehreren Genen sehr lang und besitzt im Gegensatz zu eukaryotischer mRNA keine poly(A)-Sequenz am 3'-Ende. Eukaryotische mRNA besitzt neben dem poly(A)-Schwanz am 3'-Ende auch noch eine 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende und ist nach der posttranslationalen Modifikation durchschnittlich 3 kb lang. Der Gehalt an RNA ist in Eukaryoten meist um ein Vielfaches höher als in Bakterienzellen. Quantitativ können durch Vergleiche mit Referenzgenomen und der Zuordnung zu annotierten Genen, das sog. *mapping*, abweichende Genexpressionsmuster erfasst werden. Aber auch qualitativ ist das NGS konventionellen Techniken überlegen: Es können unter anderem die Gensequenz, die Länge der Transkripte und die Position von *Promotern* festgestellt werden (92).

Dass es wichtig ist, noch tiefere Einblicke in die Mechanismen der Zellen zu erhalten, erklärt sich in der phänotypischen Heterogenität von Bakterienzellen: Sogar in Wirtsnischen mit genetisch identischen Zellpopulationen und einheitlichen Umweltbedingungen kann die Reaktion Wirt-Bakterium sehr unterschiedlich ausgeprägt sein, was zu chronischen Infektionen und gemindertem Therapieerfolg führen kann (92).

2.4.1 Library-Präparation mit dem *Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation Reference Guide*

Für das NGS ist zu Beginn eine *Library*-Präparation nötig, um die zu sequenzierenden mRNA-Nukleotidstränge aufzureinigen, zu amplifizieren und für spätere Analysen zu markieren.

Dieser Vorgang wird im Folgenden anhand des „Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation Reference Guide (1000000124518)“ genauer beleuchtet (94).

Im Rahmen dieses Protokolls erfolgt die Isolation von mRNA aus eukaryotischen Zellen mithilfe der poly(A)-Selektion. Nach der Lyse der gepoolten Zellen und der RNA-Isolation werden dazu *RNA Purification Beads* (Illumina®) verwendet. Diese mit Oligo(dT)-Sequenzen beschichteten magnetischen *Beads* binden spezifisch an die poly(A)-Schwänze der mRNA und können mittels Magneten in Position gehalten werden, sodass über mehrere Wasch- und Eluierungsschritte Verunreinigungen wie Salz und rRNA eliminiert werden.

Die gewonnene mRNA wird enzymatisch in ca. 300 bp lange Stücke fragmentiert, und denaturiert. Anschließend werden *Random Primer*, oftmals *Hexamer-Primer*, an die Fragmente gebunden (s. Abbildung 6). Dieser Schritt findet unter Einsatz eines *Fragmentations-Mastermixes* im Thermocycler statt.

Durch die *Hexamer-Primer* kann eine reverse Transkription zur cDNA (Erststrang-Synthese) stattfinden (s. Abbildung 7), was sinnvoll ist, da diese deutlich stabiler als RNA ist. Während der cDNA-Erststrangsynthese verhindert Actinomycin D, ein interkalierendes zytostatisches Antibiotikum, eine fehlerhafte Amplifikation der neu synthetisierten cDNA-Stränge, indem es nur RNA-abhängige DNA-Synthese zulässt.

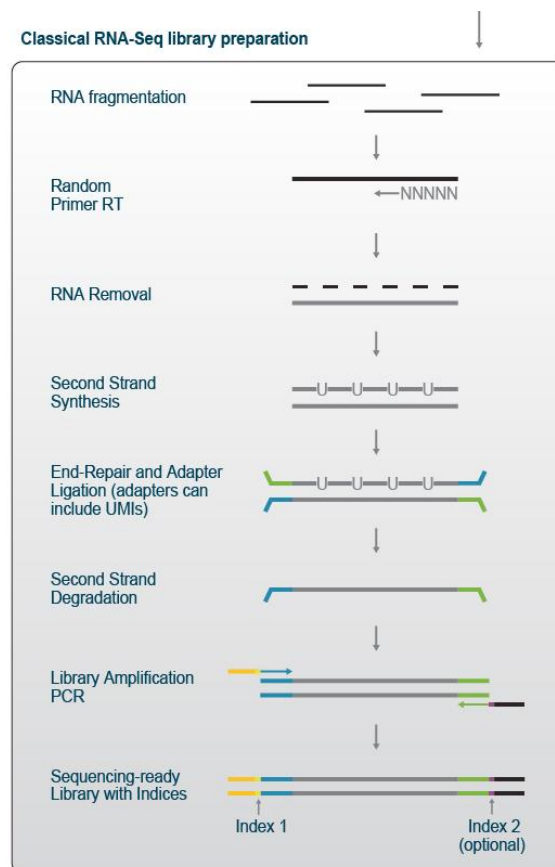


Abbildung 6: Ablauf einer klassischen *Library preparation*, modifiziert nach (95).

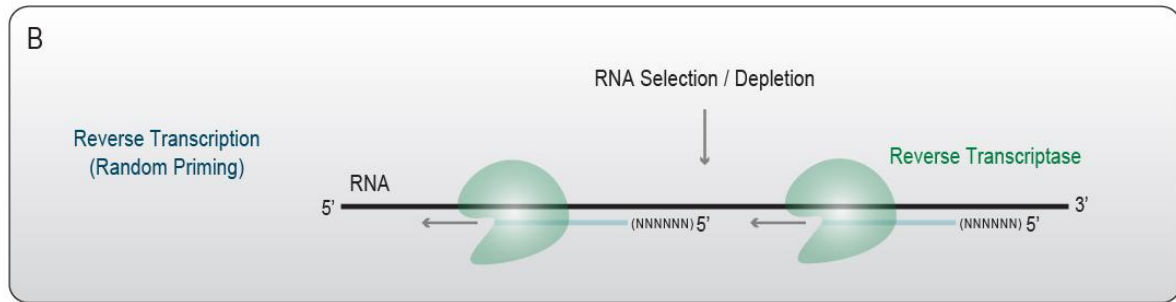


Abbildung 7: Reverse Transkription mit *Random Primern*, modifiziert nach (96).

Danach wird die mRNA durch spezielle Puffer und Hitze abgebaut und der zur erzeugten cDNA komplementäre Strang unter Verwendung von dUTP statt dTTP synthetisiert (Zweitstrang-Synthese, s. Abbildung 6). In den nachfolgenden Schritten kommt es entweder zu einem Uracil-spezifischen Verdau des zweiten Stranges oder zu einer Blockade der Amplifikation aufgrund der fehlenden dUTP-Substratspezifität der verwendeten DNA-Polymerase. Dies bezeichnet man als *stranded RNA-Seq*, bei der es möglich ist, die korrekte Strangorientierung der originären mRNA zu rekonstruieren.

Die Einzelstrang-Überhänge der entstandenen Doppelstränge werden am 5'-Ende mittels DNA-Polymerasen repariert und am 3'-Ende mittels 3'->5'-Exonucleasen entfernt, sodass sog. *Blunt Ends* an beiden Enden der Fragmente entstehen (s. Abbildung 8).

Es folgt eine Fragmentaufreinigung mittels magnetischer *Beads* (Beckmann Coulter™ Agencourt AMPure XP), um Salze und überschüssige Reagenzien zu entfernen.

Anschließend wird an den 3'-Enden der Doppelstränge ein einzelnes Adenin-Nukleotid hinzugefügt. Dadurch wird die Ligation mit den 3'-Thymin-Enden der anzufügenden Pre-Index Anker ermöglicht, während gleichzeitig eine Konkatenation der Nukleotidstränge aufgrund ihrer räumlichen Nähe verhindert wird (s. Abbildung 8).

Nun erfolgt die Ligation der Pre-Index Anker, über die in einer nachfolgenden Polymerasekettenreaktion (PCR) die Index-Adapter Sequenz angefügt wird. Zudem wird der mit dUTP versehene Strang abgebaut. Da sich die bereits ligierten Adapter am 5'- und 3'-Ende der cDNA unterscheiden, kann die Polarität, also ob die ursprüngliche mRNA ein Plus- oder Minusstrang war, bestimmt werden (s. Abbildung 8).

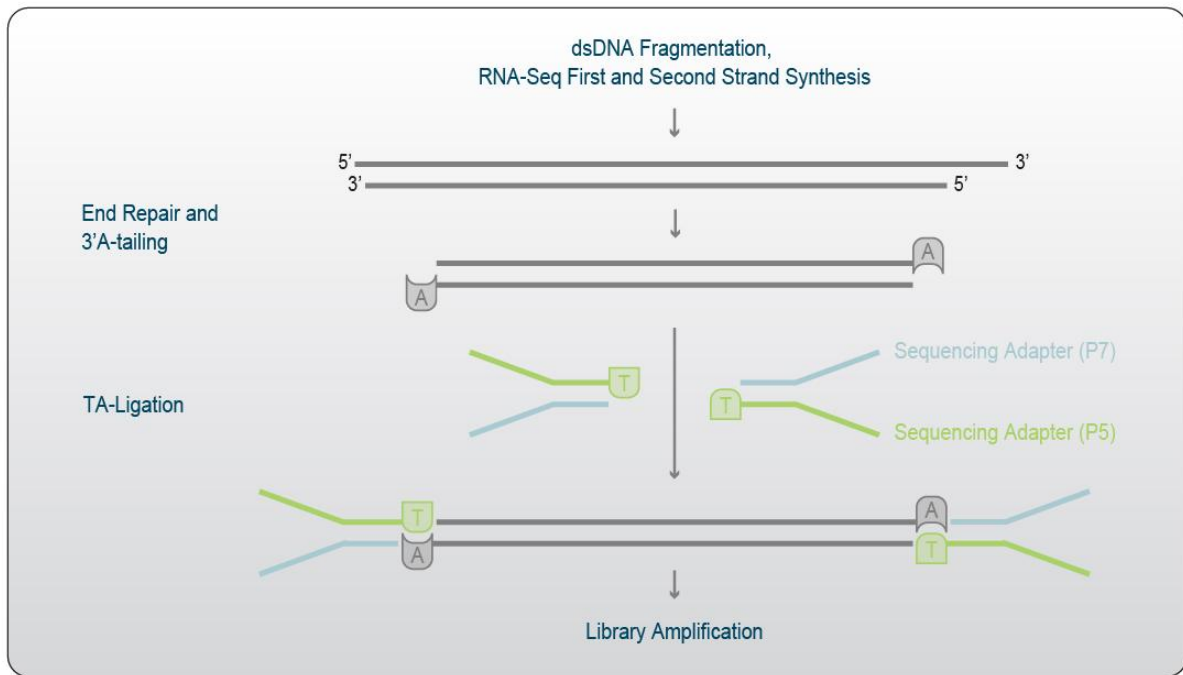


Abbildung 8: Reparatur der Strang-Enden, 3'-Adenylierung und TA-Ligation, modifiziert nach (96).

Es folgt eine Fragmentaufreinigung mittels magnetischer *Beads* (Beckmann Coulter™ Agencourt AMPure XP), um Salze und Reagenzien zu entfernen.

Mittels PCR wird die so präparierte cDNA selektiv amplifiziert. Zusätzlich werden während der Denaturierungsphase der PCR die Index- und *Primer*-Sequenzen für die *Cluster*-Generierung durch Bindung der Pre-Index Anker an beiden Seiten der cDNA angefügt, das sog. *dual indexing*. Diese Indexe ermöglichen es später, an die *Flow cell* zu binden, die Fragmente innerhalb der gepoolten Probe ihren Spendern zuzuordnen und die originäre Strangorientierung der RNA festzustellen, da die Anker spezifisch für die 3'- und 5'-Enden der cDNA sind.

Abschließend wird die *Library* erneut mit AMPure XP Magnet-*Beads* aufgereinigt und eine Qualitätskontrolle hinsichtlich Konzentration, Qualität (RIN-Wert) und Stranglänge der *Library*-Sequenzen durchgeführt (97–99).

2.4.2 Next-Generation-Sequenzierung mit dem Illumina® Next Seq™ 2000

RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) ist eine Methode zur Analyse des zellulären Transkriptomprofils, die Hinweise auf die Genexpression der untersuchten Zellen liefert (100). Dabei wird die mRNA zur Beschreibung der Transkriptionsaktivitäten der Zelle betrachtet, welche sich durch Veränderungen im Stoffwechsel der Zelle, wie z.B. bei der Aktivierung von Entzündungskaskaden, vom Grundtranskriptionsverhalten unterscheiden (92). Bei der *Bulk* RNA-Sequenzierung wird im Gegensatz zur *Single-Cell*-RNA-Sequenzierung das

Transkriptom einer ganzen Probe mit einer großen Zellzahl untersucht. Die Expressionsunterschiede der einzelnen Gene werden dabei statistisch für die gesamte Probe im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ermittelt (100).

Die Proben müssen zunächst stark verdünnt und denaturiert werden, um den sensiblen Sensoren akkurate Mengen *single stranded DNA* (ssDNA) zuzuführen. Beim sog. *Dark-Cycle-Sequencing* wird der T-Überhang der Fragmente übersprungen, da sonst zu geringe Diversitäten im ersten Sequenzierzyklus auftreten, was die Messung ungenauer macht (101). Auf der Oberfläche eines Glasobjektträgers, der *Flow Cell*, binden die äußeren Adapter der Probe an die *Flow Cell* Adapter (102). Die Adapter befinden sich bei *Illumina® Next Seq™ 2000* in *Nanowells*, damit pro Well nur ein cDNA-Fragment amplifiziert wird, was die Signalqualität verbessert (103). Eine *Bridge-Amplifikation* zur Signalverstärkung (ca. 1000-fach) wird durchgeführt und die 5'-3'-DNA enzymatisch entfernt. Dadurch entstehen Regionen mit identischen Nukleotidfragmenten und gleicher Strangorientierung. Dieser Vorgang wird *Cluster-Bildung* genannt (s. Abbildung 9).

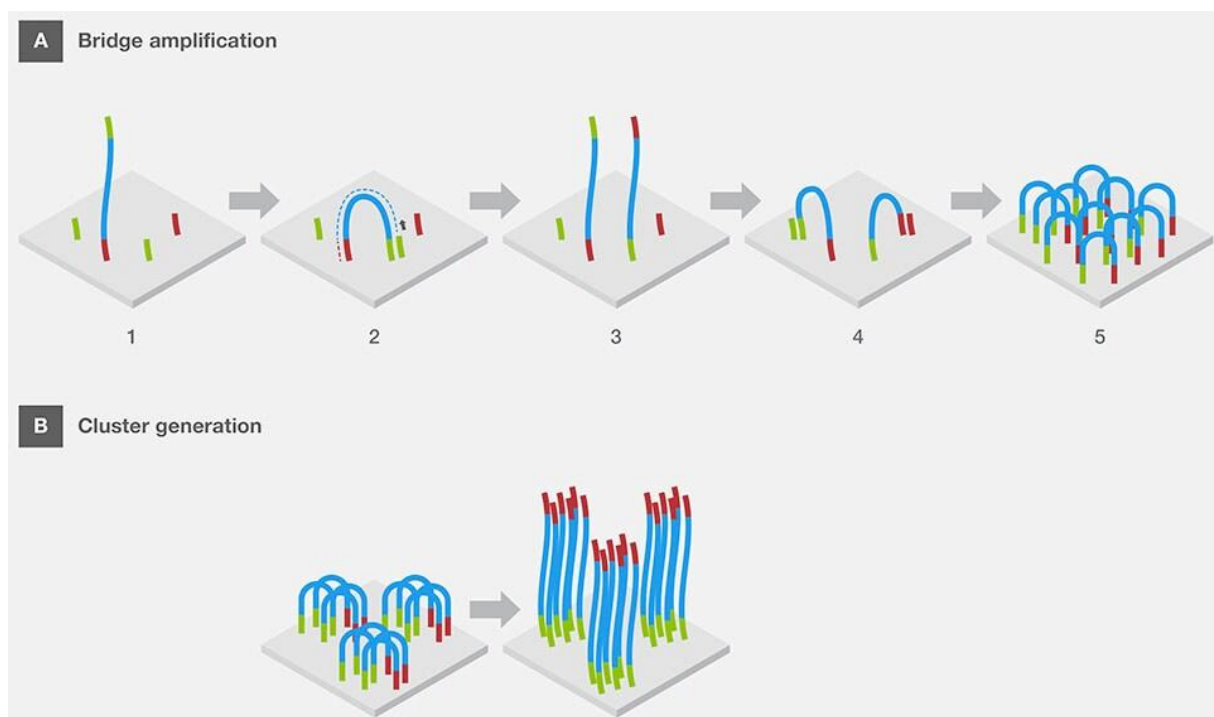


Abbildung 9: Bridge-Amplifikation und Cluster-Bildung, Darstellung aus (104).

Die Sequenzierung durch Strangsynthese ähnelt dem Nukleotid-Anbau bei Polymerasekettenreaktionen, jedoch werden Nukleotide mit Fluoreszenzmarkern verwendet. Dadurch wird bei jedem Nukleotidanbau an allen gebundenen Fragmenten parallel ein Lichtsignal abgegeben, wobei die vier verwendeten Farben den vier Nukleotiden der humanen DNA (A, T, C, G) entsprechen. Der Marker wirkt auch als reversibler Terminator, sodass pro

Fragment nur ein Farbsignal je Nukleotidanbau-Zyklus abgegeben werden kann. Nach jedem Zyklus wird der Farbmarker enzymatisch abgespalten, wodurch das nächste markierte Nukleotid binden kann, bis das Fragment vollständig kopiert ist. Diese Art der Sequenzierung wird als *Sequencing by Synthesis* (SBS) bezeichnet.

Die Software gibt für jedes Signal einen *Confidence*-Wert zur Kontrolle der Messungenaugkeit aus (97–99, 102). Der *Illumina® Next Seq™ 2000* verwendet die sog. *2-Channel SBS Technology* (105). Hierbei werden lediglich Chromophore mit Emissionsmaximum im blauen Wellenlängenbereich für Cytosin und im grünen Wellenlängenbereich für Thymin verwendet (105). Guanin erzeugt kein Lichtsignal, während Adenin ein Mischspektrum zwischen Grün und Blau erzeugt. Dadurch müssen lediglich zwei Bilder mit zwei Farben aufgenommen werden, was den Ablauf effizienter macht (105).

Um die Menge fehlerhaft zugeordneter Sequenzen zu reduzieren, wenn *Samples* verschiedener Proben auf einer *Flow Cell* abgelesen werden, kann die *Paired-End*-Sequenzierung angewendet werden. Damit kann ein verbessertes *Alignment* mit dem Referenzgenom erzielt werden.

Bei *Illumina® Next Seq™ 2000* erfolgt die *Dual-Index-Paired-End*-Sequenzierung mit *Reverse Compliment* (s. Abbildung 10) nach folgendem Ablauf (106):

1. Die 3'-5'-cDNA wird mittels *2-Channel SBS* abgelesen. Diese Sequenz wird als *Read 1* bezeichnet.
2. Der *i7 Index*, der zu *Read 1* gehört, wird ebenfalls mittels *2-Channel SBS* abgelesen, nachdem der *i7 Index Primer* an das Fragment gebunden hat. Dieser Index gibt an, von welchem Spender die Probe stammt.
3. Es folgt eine neue *Bridge*-Amplifikation, bei der der entgegengesetzte Strang, die 5'-3'-cDNA, synthetisiert wird. Der 3'-5'-cDNA-Strang wird abgespalten und ausgewaschen.
4. Der *i5 Index*, der zu *Read 2* gehört, wird mittels *2-Channel SBS* abgelesen, nachdem der *i5 Index Primer* an das Fragment gebunden hat. Durch die vorherige Brückenbildung und Abspaltung der 3'-5'-cDNA ist die Sequenz des *i5 Index* allerdings gegenläufig zur originären Sequenz des *i5 Primers*, weshalb man von *Reverse Compliment* spricht. Dieser *i5 Index* ist immer einem *i7 Index* zugewiesen, um fehlerhaft verbaute einzelne Indexe, das *Index Hopping*, über den zweiten Index zu erkennen und die Fragmente von der Datenverarbeitung auszuschließen. Dies nennt man *Unique Dual Indexing*.
5. Die 5'-3'-cDNA wird mittels *2-Channel SBS* abgelesen. Diese Sequenz wird als *Read 2* bezeichnet.

Dieser zweite *Read* wird zusammen mit *Read 1* verwendet, um die Fragmente zuverlässiger der richtigen Probe zuzuordnen (s. Abbildung 10).

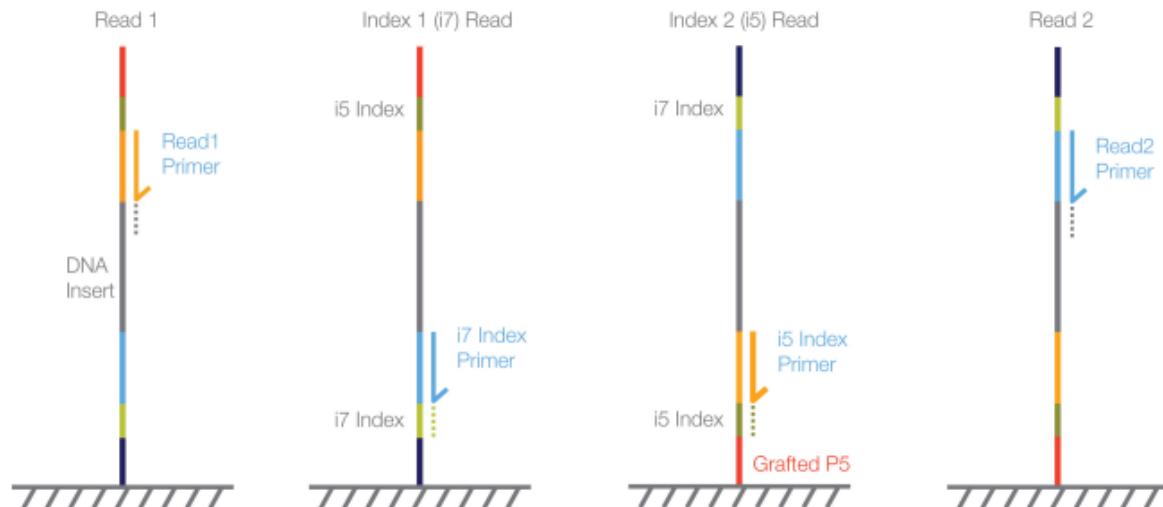


Abbildung 10: Dual Indexing auf einer Paired-End Flow Cell mit Reverse Compliment, Darstellung aus (106).

Trotz verschiedener Kokultur-Ansätze (30, 90, 91) fehlen nach wie vor Informationen über die Änderungen des Transkriptoms der Pulpazellen nach Interaktion mit Bakterien. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Methode der *Bulk* RNA-Sequenzierung herangezogen, um genauere Einblicke zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Zellen und Bakterien

Tabelle 1: Verwendete Bakterien und Zellen

Bezeichnung der Zellen und Bakterien
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175), γ -bestrahlt (25kGy, Cobalt-60- γ -Bestrahler, ohne Erhitzung der Proben)
Humane Pulpazellen zweier unterschiedlicher Isolationsregionen (DACs und DPCs) von n=6 Spendern (s. 3.6)

3.2 Verwendete Materialien und Geräte

Tabelle 2: Verwendete Materialien und Kits

Herstellerbezeichnung	Firma
ANATOMICA Zahnzange nach Büchs	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Cell Counting Slide for TC10™/TC20™ Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Costar® Stripette™ Serological Pipets 5ml	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Combitips® advanced 0,1 -50 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S.® Reloads 20-300µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S.® Standard/Bulk 0,1-5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 3810X, 1.5ml Eppendorf tube	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Skalpell No. 11	Feather® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Cellstar® 12 Well Advanced TC™ Plate	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

Cellstar® 6 Well Advanced TC™ Plate	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® 6 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® Serological Pipets, 2-50ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® TC, 25cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® TC, 75cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® Tube, 15ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® Tube, 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Diamantbohrer	Henry Schein, Inc., Melville, New York, USA
HS Pinzette College	Henry Schein, Inc., Melville, New York, USA
HS Scharfer Löffel Hemingway, oval, klein	Henry Schein, Inc., Melville, New York, USA
Quali-Filterpipettenspitzen, 0,1-1000 µl	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
QIAshredder (250)	Qiagen, Beverly, MA, USA
QuantiTect Rev. Transcription Kit (50)	Qiagen, Beverly, MA, USA
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Beverly, MA, USA
Multiply®-Pro Gefäß 0,2ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Multiply®-Pro Gefäß 0,5ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well-Reaktionsplatte, 0,1 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
MicroAmp™ optische Klebefolie	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
CryoTube™ Vials	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vacuum Filtration "rapid"-Filtermax	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Herstellerbezeichnung	Firma
Kryobehälter Arpege 110	AIR LIQUIDE S.A., Paris, Frankreich
Photometer Ultrospec™ 3300pro	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Rotina 420 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Universal 320	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
APT.line™ C 150 (E2)	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
CB 56	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
BIOMETRA TRIO-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Axio Lab.A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Axio Vert.A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
ZEISS ZEN 3.0 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
ZEISS Axiocam503 color	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Eppendorf Research® Plus 0,1-5000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® Plus 8-Kanal 30-300µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipette® E3x	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sprout™ Mini Centrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA
MR3001	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland
IKAMAG® RET	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br., Deutschland
ESTETICA E50	KaVo Dental GmbH, Biberach a. d. Riß, Deutschland

Kühl-Gefrierkombination	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach a. d. Riß, Deutschland
MediLine LKUexv 1610 Index 24C/001	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach a. d. Riß, Deutschland
BRAND® accu-jet® pro pipette controller	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Quintix® 65-1S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sartorius Basicplus	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sirona T1 Line Winkelstück C 200 L	Sirona Dental Systems GmbH, Wals, Österreich
Gibco™ Lab Armor™ Beads	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HERAfreeze™ HDE Ultratiefkühlschränke	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NanoDrop™ 2000/2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Precision GP 10	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Real-Time-PCR-System QuantStudio 3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Micro Star 17R	VWR International bvba, Leuven, Belgien
StellaAir 1.5 Sirius	ZEFA Laborservice GmbH, Harthausen, Deutschland

3.3 Verwendete Chemikalien und Medien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Medien

Herstellerbezeichnung	Firma
Gibco™ 100 x Antibiotic-Antimycotic	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
MEM α	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Trypsin-EDTA 0,05%	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
2-Mercapthoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fibrinogen aus Rinderplasma	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rnase ZAP™	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DNase I	Qiagen, Beverly, MA, USA
Tryptic soy broth	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Yeast extract	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dimethylsulfoxid, 50ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TaqMan™ Schneller Advanced Master-Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

3.3.1 Inhaltsstoffe der Medien

3.3.1.1 Medium für reine Zellkulturen

- 1 l MEM α + 10% FBS + 1% Penicillin-Streptomycin:
 - 10,2 g MEM α
 - 2,2 g Natriumhydrogencarbonat
 - 100 ml FBS
 - 10 ml Penicillin-Streptomycin
 - Aqua dest.

3.3.1.2 Medium für reine *S. mutans*-Kulturen

- 1 l *Tryptic Soy Broth* (TSB):
 - 30 g *Tryptic Soy Broth*
 - 5 g *Yeast Extract*
 - Aqua dest.

3.3.1.3 Medium für die *S. mutans* Kokultur

- Es handelt sich um das Medium aus 3.3.1.1, aber ohne Penicillin-Streptomycin.

3.3.2 qPCR *Primer*

Alle qPCR *Primer* und *Housekeeper* wurden bei Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA erworben.

Tabelle 5: qPCR *Primer*

Target (Gene Symbol)	Assay-ID	Exon-Boundary	Amplikonlänge (bp)
<i>AK4</i>	Hs00906377_m1	1-2	81
<i>CSF2</i>	Hs00929873_m1	2-3	85
<i>CXCL2</i>	Hs00601975_m1	3-4	100
<i>HILPDA</i>	Hs00203383_m1	1-2	61
<i>IL6</i>	Hs00174131_m1	4-5	95
<i>RAB20</i>	Hs00215134_m1	1-2	59
<i>RASL11B</i>	Hs00225132_m1	2-3	80
<i>TXNIP</i>	Hs00197750_m1	1-2	81

Tabelle 6: qPCR *Housekeeper*

Target (Gene Symbol)	Assay-ID	Exon-Boundary	Amplikonlänge (bp)
<i>ACTB</i>	Hs01060665_g1	2-3	63
<i>GAPDH</i>	Hs02786624_g1	8-8	157

3.4 Materialien, Geräte und Chemikalien für *Library* und Sequenzierung

Sämtliche Materialien, Chemikalien und Geräte für die *Library*-Präparation und *Bulk* RNA-Sequenzierung der Proben wurden vom *NGS-Core* des Leibniz-Instituts für Immuntherapie des Universitätsklinikums Regensburg gestellt und angewendet. Die Aufbereitung der Proben fand gemäß dem Herstellerprotokoll „Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation Reference Guide (1000000124518)“ (94) und den Herstellerangaben und –empfehlungen für *Illumina® Next Seq™ 2000* statt.

3.5 Pakete und Software

Tabelle 7: R Pakete und Software für die Datenauswertung

Name	Quelle
AnnotationDbi (107)	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/AnnotationDbi.html
BiocManager (108)	https://CRAN.R-project.org/package=BiocManager
Bioconductor	https://bioconductor.org/
biomaRt (109)	https://github.com/grimbough/biomaRt
clusterProfiler (110–112)	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html
DESeq2 (113)	https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/DESeq2/inst/doc/DESeq2.html
devtools (114)	https://CRAN.R-project.org/package=devtools
dplyr (115)	https://CRAN.R-project.org/package=dplyr
DT (116)	https://CRAN.R-project.org/package=DT
EnhancedVolcano (117)	https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano
enrichplot (118)	https://yulab-smu.top/biomedical-knowledge-mining-book/
fgsea (119)	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/fgsea.html

futile.logger (120)	https://CRAN.R-project.org/package=futile.logger
gaospecial/ggVennDiagram (121)	https://github.com/gaospecial/ggVennDiagram
ggforce (122)	https://CRAN.R-project.org/package=ggforce
ggplot2 (123)	https://ggplot2.tidyverse.org
ggribes (124)	https://CRAN.R-project.org/package=ggribes
gplots (125)	https://CRAN.R-project.org/package=gplots
GraphPad Prism 10.4.1 (126)	https://www.graphpad.com
grid (127)	https://www.R-project.org/
gridtext (128)	https://CRAN.R-project.org/package=gridtext
limma (129)	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html
magrittr (130)	https://CRAN.R-project.org/package=magrittr
msigdb (131)	https://CRAN.R-project.org/package=msigdb
org.Hs.eg.db (132)	https://bioconductor.org/packages/release/data/annotation/html/org.Hs.eg.db.html
pathview (133)	http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/pathview.html
pheatmap (134)	https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap
R (127)	https://www.R-project.org/
RColorBrewer (135)	https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer
RStudio (136)	https://posit.co/download/rstudio-desktop/
stringr (137)	https://CRAN.R-project.org/package=stringr
tibble (138)	https://CRAN.R-project.org/package=tibble
tidyr (139)	https://CRAN.R-project.org/package=tidyr

tidytree (140)	https://www.amazon.com/ Integration-Manipulation-Visualization-Phylogenetic-Computational-ebook/dp/B0B5NLZR1Z/
tidyverse (141)	https://www.tidyverse.org/
VennDiagram (142)	https://CRAN.R-project.org/package=VennDiagram

3.6 Gewinnung und Inkubation der humanen Pulpazellen

Die Gewinnung der Primärkulturen von humanen Pulpazellen wurde bereits etabliert (143, 144). Für dieses Projekt wurden Zellen desselben humanen Spenders aus zwei Regionen der Zahnpulpa jeweils getrennt isoliert (s. Abbildung 11). Die Zellen des Pulpakerns, die in dieser Arbeit in einer *in vitro* Kokultur zum Einsatz kommen, werden zur Vereinfachung der Bezeichnung später als *dental pulp cells* (DPCs) zusammengefasst. Zellen aus der unmittelbaren Umgebung der Kronenpulpawände repräsentieren die zweite Region, sie werden in diesem *in vitro* Kokulturmodell zusammenfassend als *dentin adherent cells* (DACs) bezeichnet. Als Probenmaterial fanden die intakten, extrahierten dritten Molaren von sechs unter 18-jährigen Spendern, davon drei männlich und drei weiblich, Verwendung. Zum Zeitpunkt der Extraktion war das Wurzelwachstum zu mehr als 50% abgeschlossen, was visuell überprüft wurde. Die Zustimmung der Patienten bzw. ihrer gesetzlichen Vertreter und die des Ethik-Komitees (Fakultät für Medizin, Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland) lagen vor. Die Zähne wurden direkt nach Entnahme in α MEM mit 10% FBS und Antibiotic-Antimycotic überführt und bis zur Verarbeitung bei 4 °C aufbewahrt. Möglichst rasch wurde das verbleibende externe Weichgewebe mit Diamantbohrer und Winkelstück unter Wasserkühlung entfernt, und eine nicht-perforierende Einkerbung auf Höhe der Schmelz-Zementgrenze mit selbigem präpariert. Alle verwendeten Instrumente waren steril. Die Zähne wurden mithilfe einer Extraktionszange in Krone und Wurzel gespalten. Dadurch konnte die Kronenpulpa vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Zahn entfernt werden. Die Pulpa wurde in kleine Stücke zerschnitten und in einer 12-Well-Platte mit MEM α mit 10% FBS, 500 U/ml Penicillin und 0,5 mg/ml Streptomycin bei 5% CO₂ und 37 °C inkubiert, um die DPCs zu kultivieren. Durch das anschließende Kürettieren der Kronenpulpawände mit einem scharfen Löffel und anschließender Inkubation der abgelösten Proben analog zur Kultivierung der DPCs konnten die DACs gewonnen werden. Das Medium in den Wells wurde an Tag 4 bis 6 ausgewechselt und die Zellen nach weiteren 5 Tagen Wachstum in eine T-25 Zellkulturflasche

(25 cm²) überführt (1. Passage). Nach einer weiteren Woche transferierte man die Zellen in eine größere (75 cm²) T-75 Zellkulturflasche (2. Passage) und ließ sie eine weitere Woche expandieren. Die Zellen konnten abschließend mit Trypsin gelöst und als Aliquots von 1×10^6 Zellen/ml in frischem MEM α mit 10% FBS, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 1% Penicillin-Streptomycin (500 U/ml Penicillin und 0,5 mg/ml Streptomycin) auf flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung in den Experimenten gelagert werden (143).

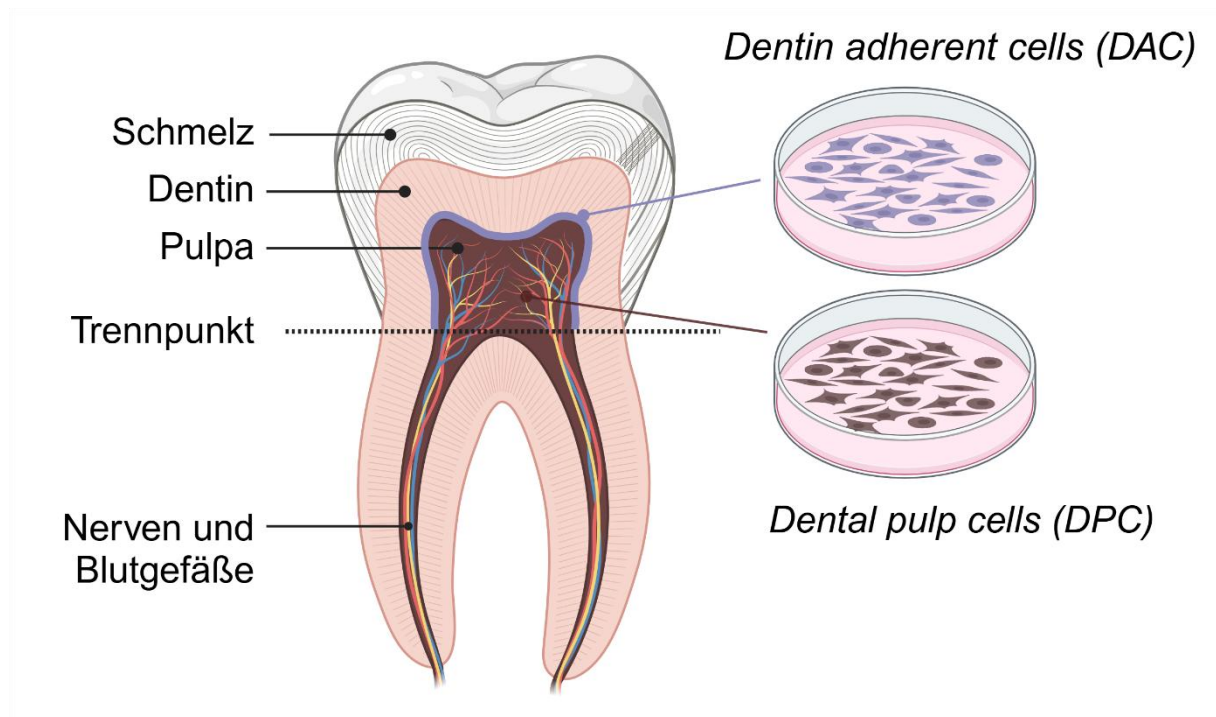


Abbildung 11: Schemazeichnung Zellgewinnung aus extrahierten Molaren, erstellt mit (145, 146).

3.7 Festlegen der experimentellen Gruppen

Zur Benennung der experimentellen Gruppen wurde ein dreigliedriges Nummerierungsschema (X.Y.Z.) angewandt; die erste Stelle beschreibt den Spender (X; n=6), die zweite die Zellen, die an zwei verschiedenen Orten der Pulpa gewonnen wurden (Y; 1=DPC oder 2=DAC), die dritte die Infektion mit *S. mutans* (Z; 1 = Ohne Bakterien, 2 = Zellen + γ -bestrahlte Bakterien (2×10^8 CFU/ml), 3 = Zellen + lebendige Bakterien (2×10^8 CFU/ml)). So sind beispielsweise in Probe 3.2.2 DACs von Spender Nr. 3 bei Infektion mit γ -bestrahlten Bakterien vorhanden.

Tabelle 8: Liste der sechs Spender für die 36 experimentellen Gruppen der RNA-Isolationen

Patient	Alter in Jahren	Biologisches Geschlecht
1	14	männlich
2	16	weiblich
3	16	männlich
4	13	weiblich
5	15	weiblich
6	16	männlich

Die RNA-Isolation fand in drei Durchgängen statt (ISO1-3). Dabei wurden Spender Nr. 1.Y.Z und 2.Y.Z (ISO1), Spender Nr. 3.Y.Z und 4.Y.Z (ISO2) und Spender Nr. 5.Y.Z. und 6.Y.Z (ISO3) gemeinsam isoliert.

3.8 Anlegen der *in vitro* Kokultur

Folgende Parameter wurden vor Beginn festgelegt:

- Die Anfangskonzentration der humanen Zellen beim Aussäen in den 6-Well-Platten beträgt 50.000 Zellen/ml in 4,8 ml MEM α pro Well
- Die Infektion der reinen Zellkulturen mit γ -bestrahltem und lebendigem *S. mutans* erfolgt an Tag 3 nach der Zellaussaat
- Die RNA-Isolation wird nach 6 h in Kokultur durchgeführt

Für die Zellgewinnung wurden pro Probe zwei T-75 Zellkulturflaschen mit je 1×10^6 Zellen in MEM α mit 10% FBS und 1% Penicillin-Streptomycin in Kultur genommen. Nach drei Tagen fand ein Medienwechsel statt. Die Aussaat in 6-Well-Platten fand nach ca. sechs Tagen statt. Mit dem Zellzähler (TC20™) wurde die gewünschte Zellkonzentration im Kokulturmedium eingestellt. Die Zellen wurden auf acht 6-Well-Platten verteilt. Jeder experimentellen Gruppe wurden 3 Wells zugeteilt. Die drei benötigten Kryo-Röhrchen mit den *S. mutans*-Proben (ATCC 25175) wurden am Tag nach der Zellaussaat in Wells aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und gleichmäßig auf zwölf 10 ml-Glasröhrchen mit Tryptic soy broth (TSB) verteilt. Diese wurden anschließend bei 5% CO₂ und 37 °C inkubiert. An Tag 3 nach Zellaussaat in Wells wurden die Zellen unter dem Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy) beurteilt. Danach fand die Infektion der Gruppen X.Y.2 mit γ -bestrahltem *S. mutans* und X.Y.3 mit *S. mutans* in der oben genannten Konzentration (2×10^8 CFU/ml) in frischem Kokulturmedium statt. Um diese Konzentration zu bestimmen, wurde die optische Dichte (OD) der Bakterien in PBS-Puffer mittels Photometer (Ultrospec™ 3300pro) gemessen. Bei Gruppe X.Y.1 war nur ein Medienwechsel nötig. Die Wells wurden abschließend mikroskopisch bezüglich ihrer Zelldichte verglichen.

3.9 Transkriptomanalyse

3.9.1 Isolation der RNA humaner Pulpazellen

Für die RNA-Isolierung wurden die humanen Pulpazellen nach 6 h in Kokultur lysiert und die Lysate der drei Wells jeder Gruppe gepoolt. Die nachfolgenden Schritte wurden durchgehend auf Eis durchgeführt. Die Verarbeitung der Proben erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll des RNeasy® Mini Kits (Qiagen, 74104), mit dem Zusatz einer Shredder-Säule (Qiagen, 79654) unmittelbar nach dem Poolen der Proben (2 min Zentrifugation bei 14000 rpm) zur effizienteren Beseitigung von Zelltrümmern und groben Verunreinigungen sowie einem DNase I (Qiagen, 79254) Verdau gemäß Herstellerprotokoll zur vollständigen Entfernung der gDNA aus den Proben.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde spektralphotometrisch mittels NanoDrop™ 2000 bestimmt. Pro Isolat wurden 5 µl für die Messung des RIN-Wertes bei -80 °C eingefroren.

3.9.2 Umschreiben in cDNA

Für das Umschreiben der RNA in cDNA zur späteren Validierung der Gene mittels qPCR wurde das QuantiTect Reverse Transcription-Kit (Qiagen, 205311) verwendet. Alle Arbeiten und Lagerungen hierfür erfolgten nach dem Auftauen auf Eis. Als *Template*-RNA wurde die zuvor isolierte RNA verwendet, die übrigen nötigen Reagenzien wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, dabei handelte es sich um:

- gDNA-Wipeout-Puffer
- Quantiscript Reverse Transkriptase
- Quantiscript RT-Puffer
- RT-Primer-Mix
- RNase-freies Wasser

Zunächst verdünnte man die RNA, indem man die berechnete Menge RNase-freies Wasser vorlegte und die berechnete Menge RNA zugab. Je Cup kamen 2 µl gDNA-Wipeout-Puffer hinzu, dann wurden die Proben für 2 min bei 42 °C auf dem Heizblock (BIOMETRA TRIO-Thermoblock) erwärmt und sofort in einen Kühlblock gestellt. Der Mastermix wurde nach den Herstellerangaben vorbereitet und in jeden Eppendorf-Cup gegeben. Nun folgte ein vorprogrammiertes Temperaturprogramm im Heizblock, dabei wurden die Proben zuerst

15 min auf 42 °C gehalten, dann 3 min auf 95 °C. Die fertige cDNA wurde für die später stattfindende qPCR bei -80 °C gelagert.

3.9.3 Qualitätskontrolle: RIN-Wert

Mithilfe der TapeStation 4150 (G2992AA, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) und dem RNA ScreenTape (5067-5579, Agilent Technologies) können gemäß dem *Agilent RNA ScreenTape Quick Guide for TapeStation Systems* die Konzentration und der Degradationsgrad der isolierten RNA, anhand des Verhältnisses zwischen 18S und 28S rRNA, bestimmt werden. Am *NGS-Core* des Leibniz-Instituts für Immuntherapie des Universitätsklinikums Regensburg fand dies routinemäßig zu Qualitätskontrollzwecken vor der *Library*-Präparation der Proben statt. Dabei wurden durchwegs Werte von 10 festgestellt, was die höchste Qualität der RNA-Integrität in den Proben belegt.

3.9.4 Library-Präparation

Die *Library*-Präparation wurde am *NGS-Core* des Leibniz-Instituts für Immuntherapie des Universitätsklinikums Regensburg ausgeführt. Die Aufbereitung der Proben fand gemäß dem Herstellerprotokoll „Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation Reference Guide (1000000124518)“ statt (94).

Es kamen ca. 300 ng humane RNA in 25 µL RNase freiem Wasser pro Probe (insgesamt sechs Proben pro Spender) zum Einsatz.

3.9.5 Bulk RNA-Sequenzierung der Proben

Die Sequenzierung erfolgte mit dem *Illumina® Next Seq™ 2000* am *NGS-Core* des Leibniz-Instituts für Immuntherapie (LIT) des Universitätsklinikums Regensburg gemäß den Herstellerangaben. Die RNA-Seq *Libraries* wurden im *Paired-End*-Modus mit einer Leselänge von 59 bp sequenziert, wobei pro Probe 15 Millionen *Reads* angestrebt wurden.

3.9.6 Bioinformatische Analysen

Die erhaltenen Sequenzierdaten wurden bis zur Generierung der *Count*-Tabelle am *NGS-Core* des LIT verarbeitet. Dies beinhaltete das Demultiplexen zur Gewinnung von fastq-Dateien (bcl2fastq), Qualitätskontrolle (FastQC), Entfernung unnötiger Adapter- und Primersequenzen (Cutadapt), Mapping auf das Genom (STAR) sowie Quantifizierung der Sequenzier-*Reads* (featureCounts). Die erhaltenen Daten wurden anschließend in Zusammenarbeit mit unserer

Arbeitsgruppe unter Anleitung von Dr. rer. nat. Sandra Pohl mit Linux-basierten frei verfügbaren, anpassbaren Programmen ausgewertet und statistisch verglichen. Das Experiment wurde mit $n = 6$ verschiedenen Spendern durchgeführt und unabhängig reproduziert. Es fand eine statistische Modellation der Donor-spezifischen Effekte statt, um die interindividuelle Variabilität zu kontrollieren. Zudem wurden die Gonosomen informatisch aus der Analyse ausgeschlossen, um Verzerrungen durch geschlechtsspezifische Unterschiede im Expressionsmuster auszuschließen.

3.9.6.1 Analyse aller Proben ohne Gonosomen

Zu Beginn wurde der Speicherort festgelegt und die benötigten Pakete installiert (*BiocManager*, *EnhancedVolcano*, *org.Hs.eg.db*, *AnnotationDbi*, *biomaRt*, *clusterProfiler*, *org.Hs.eg.db*, *organism (character.only = TRUE)*, *pathview*, *enrichplot*) und die *Libraries* (*DESeq2*, *ggplot2*, *gplots*, *RColorBrewer*, *pheatmap*, *ggridges*, *limma*, *tibble*, *enrichplot*, *clusterProfiler*, *biomaRt*, *AnnotationDbi*, *org.Hs.eg.db*, *EnhancedVolcano*, *magrittr*, *pathview*, *msigdb*, *fgsea*, *dplyr*, *pathview*, *tidyr*, *tidytree*, *DT*, *grid*, *gridtext*, *tidyverse*, *stringr*) geladen. Für die Reduktion des Datensets ohne Gonosomen musste die *Counts*-Datei mit der chromosomalen Information verknüpft werden. Die chromosomale Information wurde aus der gesamten Genliste "genes.gtf" gewonnen. Aus dieser Liste wurden in den folgenden Schritten die ENSG-Nummern, sowie *chr*, *start*, *end* extrahiert und mit der *Counts*-Datei verknüpft. Anschließend konnte diese modifizierte *Counts*-Datei genutzt und alle Regionen mit X- und Y-Chromosom-Lokalisation entfernt werden. Daraufhin wurden die Ensembl-Gen-Nummern ohne Suffix und die Ensembl-Gen-Nummern mit Versionsnummer extrahiert. Es wurde ein tabellarischer *Dataframe* mit *chr*, *start*, *end* und Ensembl *gene ID version* angelegt. Es folgte das Einlesen der *Counts* und die Änderung des Spaltennamens in „ID“. Die zu annotierenden IDs der Datei "counts_all_sorted2.csv" wurden eingelesen und der chromosomalen Position zugeordnet. Anschließend wurden diese annotierten IDs mit den *Counts* verknüpft. Danach konnten die Chromosomen X und Y, Duplikate und *Missings* aus dem Datensatz entfernt werden. Nun wurde die Datei für die weitere Analyse vorbereitet: Aus der Datei "AllData_annotatedCounts_woGono_woPAR.csv" wurden die letzten drei Spalten mit den Chromosomen-Annotationen entfernt, die erste Spalte ebenfalls und der Spaltenname „ID“ wurde zu "ensembl_gene_id" geändert. Anschließend wurde die Datei als "counts_all_sorted_woXYMT.csv" gespeichert. Die *Count*-Matrix mit den sortierten Daten (bac, ctr, gamma) wurde eingelesen und durch das Paket *DESeq2* verarbeitet. Dabei wurden auch die Daten der γ -bestrahlten Bakterien (gamma) mit der Kontrolle (ctr) verglichen. Die

erzeugte DESeq2-Datei enthält Informationen über den *baseMean*, einen Mittelwert der normalisierten *Counts* über alle Proben, den $\log_2\text{FoldChange}$ ($\log_2\text{FC}$) der normalisierten *Counts*, den *lfcSE*, einen Standardfehler-Wert für den $\log_2\text{FC}$ und den p-Wert des Datenpunkts. Nun wurde ein *Dispersion Plot*, sowie ein p-Wert-Histogramms erstellt. Der nächste Teil des Codes diente der Erzeugung eines *MA Plots*. Im Anschluss wurden die *Count* Daten mittels *variance stabilizing transformation* (*vst*) angepasst und die Annotationsfarben definiert. Der Donor-spezifische Effekt wurde korrigiert und ein *Principle Component Analysis (PCA) Plot* mit den Donoreffekt-bereinigten Daten generiert. Nun erfolgte die Darstellung des *PCA Plots* mit Ellipsen und D1 bis D6 mittels *ggplot*. Nachfolgend wurde ein *Box Plot* mit *ggplot* zur Visualisierung der differenziell exprimierten Gene (DEGs) mit $\log_2\text{FC}$ erzeugt. Das Definieren der $\log_2\text{FC}$ -Spannweiten war hierfür nötig. Die *Missings* („NA“) wurden für den $\log_2\text{FC}$ entfernt und die Anzahl der Gene jeder $\log_2\text{FC}$ -Spannweite addiert. Das erzeugte Histogramm gibt die Anzahl der Gene der γ -bestrahlten Bakterien gegen die Kontrolle (gamma gegen ctr) zusammen mit der Anzahl der Gene der lebendigen Bakterien gegen die Kontrolle (bac gegen ctr) an. Die Daten (bac gegen ctr) wurden nun nach ihrem p-Wert ($<0,05$) und ihrem $\log_2\text{FC}$ -Wert ($>1,5$ oder $<-1,5$) in hoch- und herunterreguliert kategorisiert. Selbiges geschah für die Daten von gamma gegen ctr. Nun wurde eine *Heatmap* der normalisierten *Counts* mit $\log_2\text{FC} >1,5$ und $p_{\text{adj}} < 0,05$ mit *pheatmap* erstellt. Die erste *Heatmap* ist für die Darstellung der Donoreffekt korrigierten, nach $\log_2\text{FC}$ sortierten, Top 20 hochregulierten DEGs, die zweite *Heatmap* ist für die Darstellung der Donoreffekt korrigierten, nach $\log_2\text{FC}$ sortierten, Top 20 herunterregulierten DEGs. Im Anschluss wurden die beiden Dateien mit Gen-Symbolen statt ENSG-Nummern versehen. Die *Heatmaps* wurden nach dem festgelegten Farbschema, einer Legende und Donor 1-6 generiert.

3.9.6.2 Daten der DPCs ohne Gonosomen

Zu Beginn wurde wieder der Speicherort festgelegt, die benötigten Pakete installiert (*BiocManager*, *EnhancedVolcano*, *org.Hs.eg.db*, *AnnotationDbi*, *biomaRt*, *clusterProfiler*, *org.Hs.eg.db*, *organism* (*character.only = TRUE*), *pathview*, *enrichplot*) und die *Libraries* (*DESeq2*, *ggplot2*, *gplots*, *RColorBrewer*, *pheatmap*, *ggridges*, *limma*, *tibble*, *enrichplot*, *clusterProfiler*, *biomaRt*, *AnnotationDbi*, *org.Hs.eg.db*, *EnhancedVolcano*, *magrittr*, *pathview*, *msigdb*, *fgsea*, *dplyr*, *pathview*, *tidyr*, *tidytree*, *DT*, *grid*, *gridtext*, *tidyverse*) geladen. Die *Count*-Matrix mit den sortierten Daten (bac, ctr, gamma) wurde eingelesen. Alle Daten wurden durch das Paket *DESeq2* verarbeitet und die Daten der γ -bestrahlten Bakterien (gamma) mit der Kontrolle (ctr) verglichen. Im Anschluss wurden die *Count* Daten mittels *variance*

stabilizing transformation (vst) angepasst und die Annotationsfarben definiert. Die Daten (bac gegen ctr) wurden nun anhand ihres p-Werts ($<0,05$) und ihres $\log_2FC$ -Werts ($>1,5$ oder $<-1,5$) in hoch- und herunterregulierte Gene kategorisiert. Selbiges geschah für die Daten von gamma gegen ctr. Die Zahl der hoch- und herunterregulierten Gene wurde gezählt. Im Folgenden wurden kleine *Heatmaps* der Top 20 Gene im Vergleich bac gegen ctr, sowie gamma gegen ctr mit $\log_2FC > 1,5$ und $p_{adj} < 0,05$ mittels *pheatmap* erstellt. Die gefilterten Daten wurden in den dafür vorgesehenen Dateien hinterlegt. Für die Grafiken wurden die Farben der Darstellung geändert. Danach wurde der *Volcano Plot* mit den DESeq2-Daten für bac gegen ctr und gamma gegen ctr mit *EnhancedVolcano* erstellt. Nun wurden diverse Genset-Anreicherungsanalysen (GSEA) durchgeführt, zunächst die *Gene ontology* (GO) Analyse, dabei wurde auf die Datenbank *org.Hs.eg.db* zugegriffen. Es folgte die Erzeugung der Datei für die Gen-Ontologie-Kategorie „Zelluläres Kompartiment“ (CC), „Molekulare Funktion“ (MF) und „Biologischer Prozess“ (BP) mit *gseGO*. Es wurden die Top 15 Einträge, falls so viele vorhanden waren, nach p_{adj} aus jedem Zweig extrahiert. Die Daten wurden kombiniert und mit *ggplot* dargestellt. Als Nächstes folgte die Genset-Anreicherungsanalyse mit KEGG (*gseKEGG*). Die Gensymbole wurden dafür in Entrez IDs umgewandelt. Mit der zusätzlichen Umwandlung von ALIAS-Namen in Entrez IDs und der Zusammenführung der Daten wurde der Verlust an unübertragbaren Genen reduziert. Der $\log_2FC$ wurde manuell in Excel hinzugefügt. Anschließend konnte *gseKEGG* grafisch durch *ggplot* dargestellt werden. Die Daten wurden aufsteigend nach p_{adj} gefiltert, dann die Top 15 selektiert und im *Dot Plot* abnehmend nach *Normalized Enrichment Score* (NES) sortiert. Aus den KEGG-Daten konnte eine *Pathway*-Ansicht des TNF-Signalweges und des HIF1-Signalweges generiert werden. Nun folgte die GSEA mit MSigDB (*Molecular Signatures Database*). Dafür wurden die DESeq2-Daten geladen, die ENSG-Nummern in Gensymbole konvertiert und Duplikate entfernt. Es wurde eine nach $\log_2FC$ geordnete Genliste erstellt, die *Hallmark* Gensets von MSigDB geladen und dann die GSEA durchgeführt. Es wurden die Top 15 Gene anhand des p_{adj} für den *Dot Plot* verwendet und der *Dot Plot* mit *ggplot* generiert.

3.9.6.3 Daten der DACs ohne Gonosomen

Die informatische Auswertung der Daten der DACs erfolgte analog zu 3.9.6.2.

3.9.6.4 Vergleich DAC und DPC mittels Venn-Diagramm

Für die Gewinnung der Zahlenwerte für das Venn-Diagramm wurde das Datenset auf die signifikant hochregulierten Gene der DACs bzw. DPCs mit $\log_2FC > 1,5$ und $p_{adj} < 0,05$ reduziert. Selbiges erfolgte für die signifikant herunterregulierten Gene mit $\log_2FC < -1,5$ und

$p_{\text{adj}} < 0,05$. Die mit R gewonnenen Zahlenwerte für die DEGs wurden anschließend in PowerPoint 2016 größenskaliert mittels Venn-Diagramm visualisiert.

3.9.6.5 Erstellen der Protein-Protein-Interaktionsanalyse mit STRING

Ein Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk (PPI-Netzwerk) wurde mit der STRING-Datenbank (Version 12.0) erstellt, um mögliche Interaktionen zwischen differentiell exprimierten Genen (DEGs) zu untersuchen. Die Liste der DEGs wurde als Eingabe verwendet und die Interaktionen wurden auf der Grundlage eines minimalen Interaktionsscore-Schwellenwertes von 0,4 (mittleres Konfidenzniveau) analysiert. Dazu wurden Daten aus den Kategorien „Textmining“, „Experimente“, „Datenbanken“, „Koexpression“, „Nachbarschaft“, „Genfusion“ und „Co-Occurrence“ ausgewählt. Das resultierende Netzwerk wurde mit den integrierten Visualisierungstools von STRING dargestellt. Signifikant angereicherte biologische Prozesse wurden dabei auf Basis der *Gene Ontology* (GO) farblich hervorgehoben.

3.9.7 Validierung durch qPCR bei selektierten Proben

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die cDNA mittels TaqMan™ Schneller Advanced Master Mix und dem Real-Time-PCR-System QuantStudio 3 auf Unterschiede in der Expression selektierter Gene (s. Tabelle qPCR *Primer*) in den humanen Probenzellen zur Validierung der berechneten Daten untersucht. Dabei wurden beta-Aktin (Hs01060665_g1) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Hs02786624_g1) als *Housekeeper* eingesetzt. Die cDNA-Konzentration je Reaktionsgemisch betrug 1,25 ng/μl bei 2 μL Probenvolumen, welche durch Verdünnung mit Nuklease-freiem Wasser aus der erzeugten cDNA hergestellt wurde. Jede Probe wurde in Triplikaten vermessen. Mit GraphPad Prism (126) wurde für die DACs und DPCs ein paarweiser Wilcoxon-Test der einzelnen Gene gegen die Kontrollen durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Transkriptomanalyse

4.1.1 Gemeinsame Daten aller Proben ohne Gonosomen

4.1.1.1 *Dispersion Plot*

Die Darstellungen in 4.1.1 dienen der Kontrolle der Qualität der Daten. Der *Dispersion Plot* (s. Abbildung 12) visualisiert die für jedes Gen ermittelte Varianz (Dispersion), die in die Berechnung der normalisierten *Counts* bei DESeq2 miteinfließt. Der Verlauf der Kurve ist nicht linear, da die Varianz mit Zunahme des Mittelwerts der normalisierten *Counts* unterproportional abnimmt. Das Ausmaß der Dispersionen ist ein wichtiger Indikator für die Zuverlässigkeit der Signifikanz der Daten. Die Modelle in DESeq2 berücksichtigen die Dispersion, um die *Counts* besser zu normalisieren und zuverlässigere Ergebnisse zu liefern.

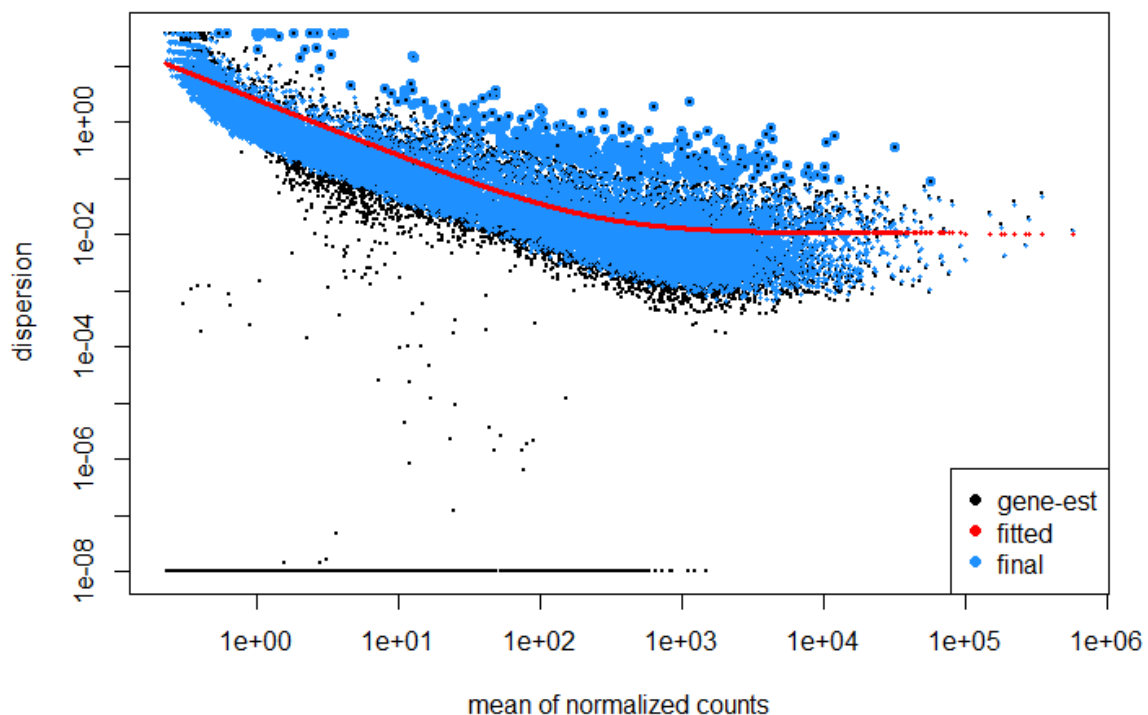


Abbildung 12: *Dispersion Plot* aller Daten nach DESeq2-Analyse. Die Abbildung zeigt die Beziehung zwischen der geschätzten Dispersion (y-Achse) und dem Mittelwert der normalisierten Counts (x-Achse). Schwarze Punkte repräsentieren die Rohschätzungen der Dispersion für jedes Gen, die rote Linie zeigt die angepasste Modellkurve, und die blauen Punkte stehen für die finalen, nach Glättung verwendeten Dispersionswerte.

4.1.1.2 Histogramm der p-Werte

Das Histogramm (s. Abbildung 13) gibt Einblick in die Anzahl der niedrig exprimierten Gene, die von DESeq2 aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Durch das Filtern werden die p-Werte für das multiple Testen angepasst und ein Schwellenwert bestimmt, der die Anzahl der signifikanten p-Werte optimiert. Der Graph zeigt, dass ein Großteil der p-Werte unter dem relevanten p-Wert von 0,05 liegt. Dies deutet auf eine Anzahl Gene hin, die eine genuine Veränderung verglichen mit der Kontrolle aufweisen. Somit sind nach Abzug der technischen Replikate weiterhin eine Anzahl biologischer Replikate der Gene vorhanden. Zudem belegt das Histogramm, dass die Datenqualität gut ist.

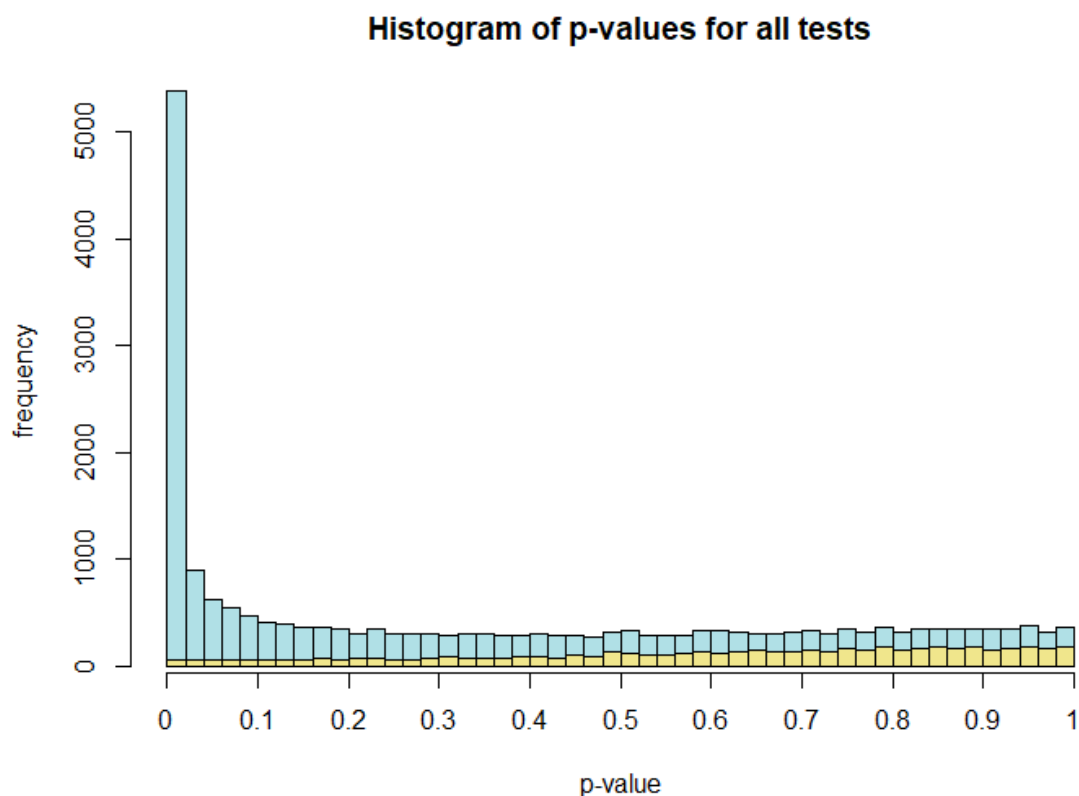


Abbildung 13: Histogramm der p-Werte aller Daten nach DESeq2. Das Histogramm zeigt die Frequenz (y-Achse) der p-Werte (x-Achse) aller Tests nach Filterung in DESeq2 an. In khaki sind die Gene, die aus den weiteren Berechnungen ausgeschlossen werden, in blau die akzeptierten Gene dargestellt. Der Ausschluss-Grenzwert wurde in dieser Auswertung auf zehn *Counts* festgelegt.

4.1.1.3 MA Plot

Der MA Plot der mit *S. mutans* stimulierten Gruppen gegen die Kontrollgruppe (s. Abbildung 14) verdeutlicht, dass viele Gene einen signifikanten p-Wert von $< 0,05$ haben. Einige Gene halten sowohl den Kriterien des p-Wertes und eines hohen $\log_2FC$ stand. Mit Zunahme des Mittelwerts der normalisierten *Counts* sinkt die Anzahl an Genen mit starker Abweichung ihres $\log_2FC$ von den Genen der Kontrollgruppe. Diese sorgen für die große Varianz an $\log_2FC$ -Werten bei niedrigen Mittelwerten der normalisierten *Counts*.

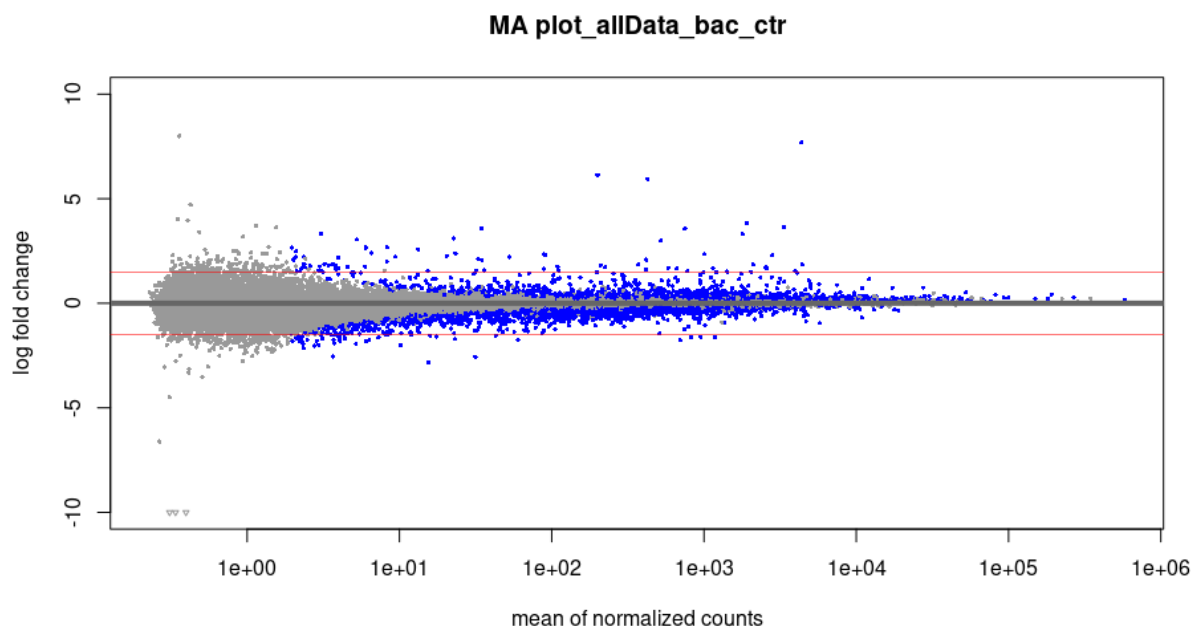


Abbildung 14: MA Plot aller Daten. Diese Grafik zeigt die Verteilung der mittelwertigen normalisierten *Counts* (x-Achse) mit ihrem $\log_2FC$ (y-Achse). Gene mit einem p-Wert von $< 0,05$ werden als blaue Punkte dargestellt, darüber als graue Punkte. Die roten Linien liegen auf den festgelegten $\log_2FC$ -Werten von 1,5 und -1,5. Blaue Punkte über 1,5 oder unter -1,5 sind folglich differenziell exprimierte Gene (DEGs).

4.1.1.4 PCA Plot

Die Stimulation der Zellen mit *S. mutans* führt zu einem dynamischen Wechsel im Transkriptom, wohingegen Proben mit γ -bestrahltem *S. mutans* im PCA-Plot (s. Abbildung 15) keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigen. Es ist keine Gruppierung nach Subpopulation (DAC/DPC) oder Spender ($n = 6$) ersichtlich. Die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) machen zusammen 68% der Gesamtvarianz in den Daten aus, weshalb eine Darstellung in dieser Form aussagekräftig und sinnvoll ist.

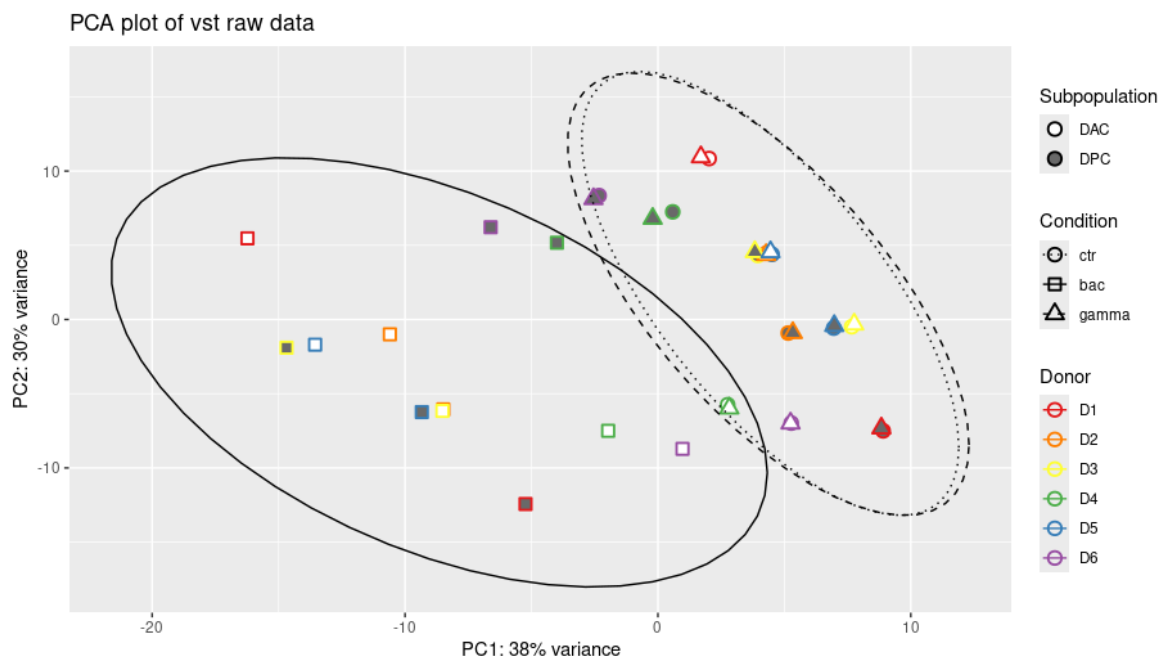


Abbildung 15: PCA Plot (PC1_PC2) der *variance stabilizing* (vst) Daten nach Korrektur des Donoreffektes. Die Punkte verteilen sich auf die Hauptkomponenten PC1 (x-Achse) und PC2 (y-Achse). Die Formen der Datenpunkte geben die Gruppenzugehörigkeit an: Quadrate für die mit vitalem *S. mutans* behandelten Proben (bac), Kreise für die Kontrollgruppen (ctr) und Dreiecke für die mit γ -bestrahltem *S. mutans* behandelten Proben (gamma). Die sie umgebenden Ellipsen verdeutlichen diese Gruppenzugehörigkeit. Die Farbe der Datenpunkte (s. Legende rechts) gibt an, um welchen Spender es sich handelt, und die Füllung dieser Punkte, ob es sich um DACs oder DPCs handelt.

4.1.1.5 Balkendiagramm der Verteilung der Gene nach $\log_2FC$

Dieses Balkendiagramm (s. Abbildung 16) zeigt die Verteilung der Gene nach ihrem $\log_2FC$. Die Abbildung verdeutlicht die höhere Anzahl an Genen mit $\log_2FC > 1,5$ und $\log_2FC < -1,5$ im Vergleich der mit *S. mutans* stimulierten Gruppen gegen die Kontrollgruppe mit der mit γ -bestrahltem *S. mutans* stimulierten Gruppen gegen die Kontrollgruppe. Die Unterschiede in der Anzahl an regulierten Genen weist auf spezifische Effekte der Behandlung hin.

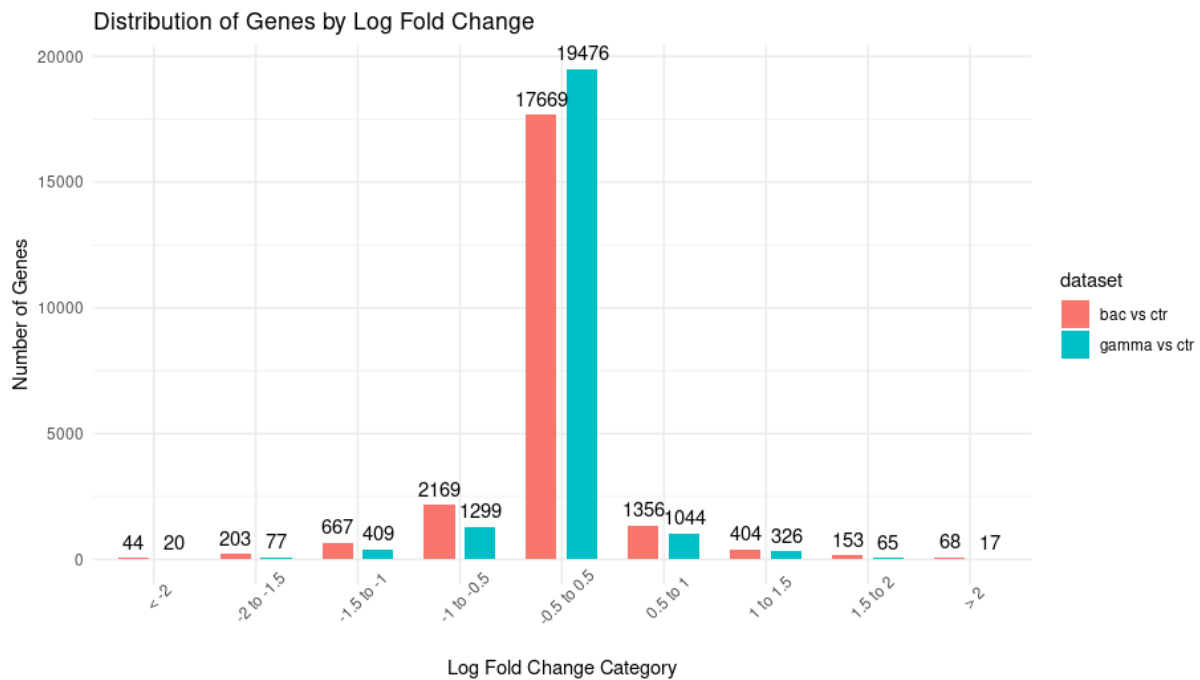


Abbildung 16: Verteilung der Gene nach $\log_2FC$ (Vergleich der Testgruppen). Das Histogramm gibt die Anzahl an Genen (y-Achse) pro $\log_2FC$ -Intervall (x-Achse) wieder. Dabei sind in rot die Daten der mit vitalem *S. mutans* behandelten Proben (bac) gegen die unbehandelten Kontrollen (ctr) und in türkis die mit γ -bestrahltem *S. mutans* behandelten Proben (gamma) gegen die unbehandelten Kontrollen (ctr) zu sehen.

4.1.1.6 Heatmaps der Top 20 hoch- und herunterregulierten Gene

Die *Heatmap* (s. Abbildung 17) zeigt klare Unterschiede zwischen den Gruppen auf, wobei auch geringe Donor-individuelle Unterschiede erkennbar sind. Die Gruppe der mit *S. mutans* behandelten Proben weist einige Gene auf, welche stark differentiell exprimiert sind, wie beispielsweise *DDIT4*, *HILPDA*, *HSPA1B* oder *HSPA1A*.

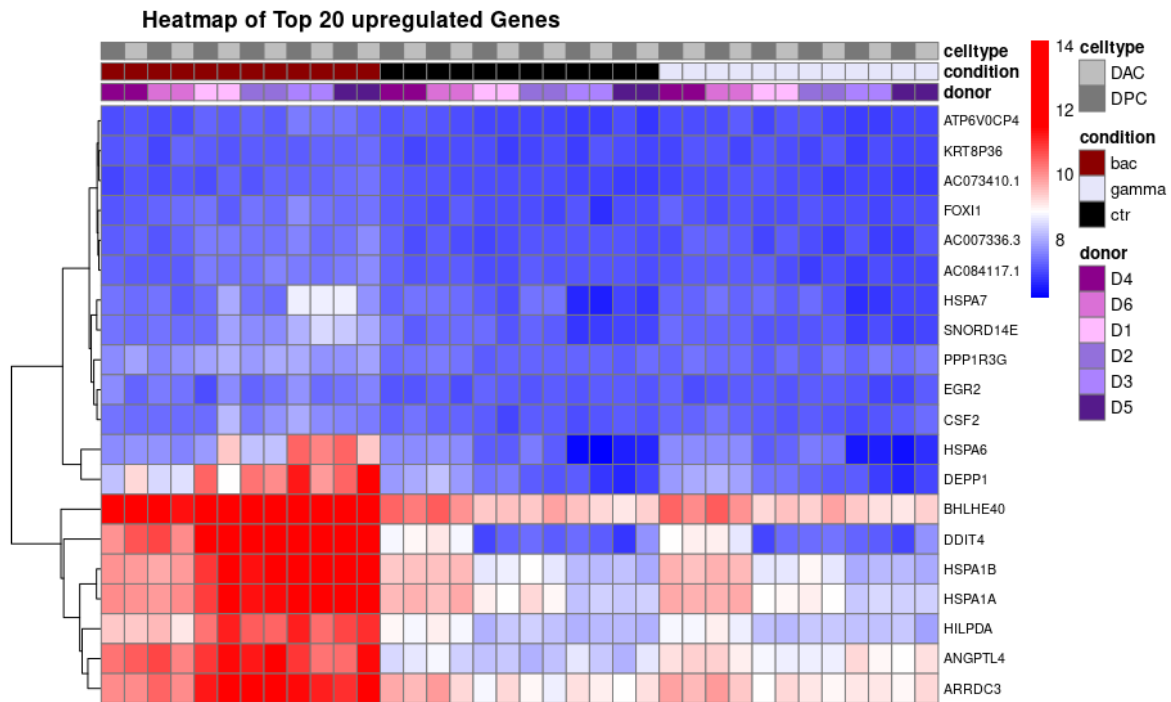


Abbildung 17: *Heatmap* der Top 20 hochregulierten Gene. Die *Heatmap* zeigt die zwanzig am stärksten hochregulierten Gene mit einem $\log_2FC > 1,5$ und einem $p_{adj} < 0,05$. Die Farbskala (rot-weiß-blau, s. Legende rechts) stellt den Unterschied der *Counts* nach Entfernung des Donor-spezifischen Effektes und nach vst-Korrektur dar. In der *Heatmap* findet eine spaltenweise Sortierung der Zellen statt (s. Legende ganz rechts): In dunkel- und hellgrau sind die Zelltypen DAC und DPC alternierend gruppiert, in lila bis rosa die Spender, und in weinrot die bac-Gruppen, in blasslila die gamma-Gruppen und in schwarz die ctr-Gruppen. Die Reihen der *Heatmap* stellen die zwanzig Gene dar. Sie sind links über ein Dendrogramm nach ihrer Ähnlichkeit aufgrund des Distanzmaßes geclustert und rechts mit dem zugehörigen Gen-Symbol versehen.

Diese *Heatmap* (s. Abbildung 18) zeigt gewisse Unterschiede zwischen den Gruppen auf, wobei auch hier Donor-individuelle Unterschiede erkennbar sind. Die herunterregulierten Gene, die hierbei besonders auffallen, sind *TXNIP*, *MT-TQ*, *MT-TL1* und *MT-TT*.

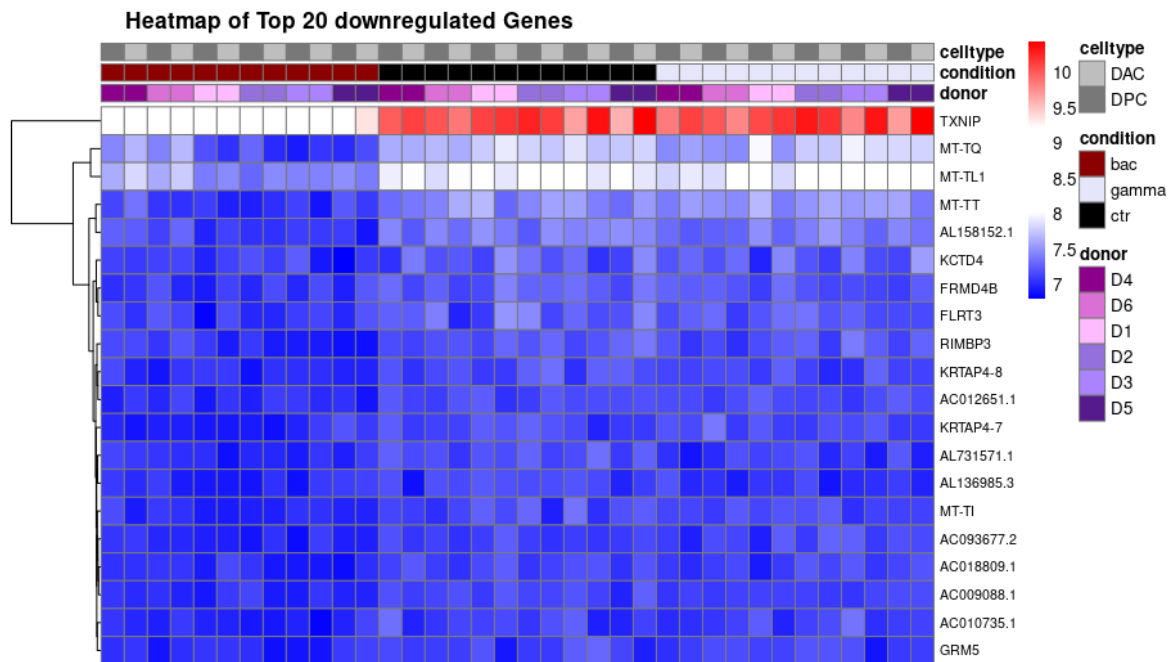


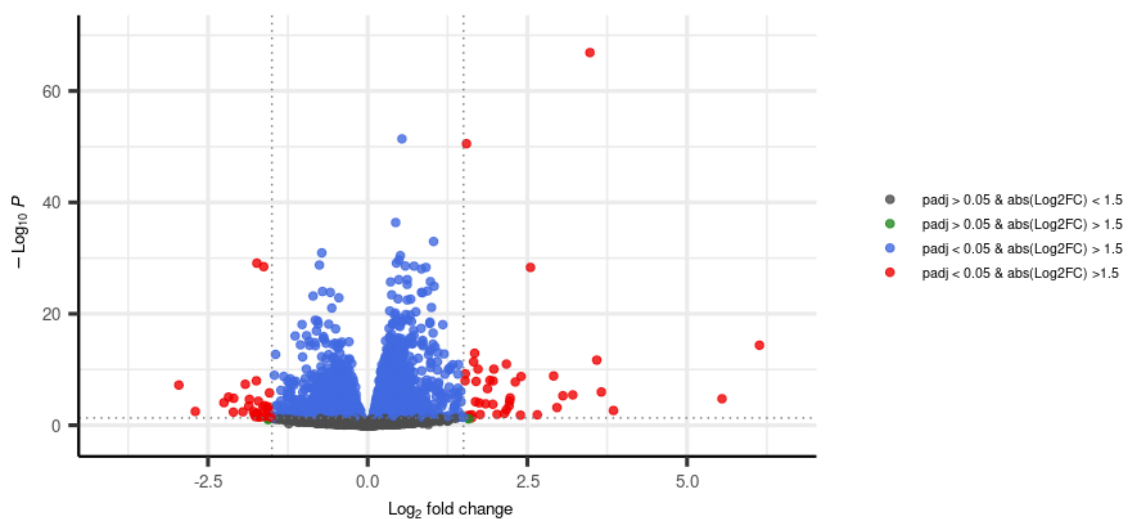
Abbildung 18: *Heatmap* der Top 20 herunterregulierten Gene. Die *Heatmap* zeigt die zwanzig am stärksten herunterregulierten Gene mit einem $\log_2FC < -1,5$ und einem $p_{adj} < 0,05$. Die Farbskala (rot-weiß-blau, s. Legende rechts) stellt den Unterschied der *Counts* nach Entfernung des Donor-spezifischen Effektes und nach vst-Korrektur dar. In der *Heatmap* findet eine spaltenweise Sortierung der Zellen statt (s. Legende ganz rechts): In dunkel- und hellgrau sind die Zelltypen DAC und DPC alternierend gruppiert, in lila bis rosa die Spender, und in weinrot die bac-Gruppen, in blasslila die gamma-Gruppen und in schwarz die ctr-Gruppen. Die Reihen der *Heatmap* stellen die zwanzig Gene dar. Sie sind links über ein Dendrogramm nach ihrer Ähnlichkeit aufgrund des Distanzmaßes geclustert und rechts mit dem zugehörigen Gen-Symbol versehen.

4.1.2 Daten der DPCs und DACs ohne Gonosomen

4.1.2.1 Volcano Plots

In der alleinigen Betrachtung der DPCs, die mit *S. mutans* stimuliert wurden, zeigt der *Volcano Plot* (s. Abbildung 19) erneut, dass die Anzahl der DEGs deutlich erhöht ist. Im Gegensatz dazu sind in der Gruppe, die mit γ -bestrahltem *S. mutans* stimuliert wurden, kaum DEGs zu finden. Hier findet sich lediglich eine große Zahl von Genen die einen angepassten p-Wert $> 0,05$ und einen $\log_2\text{FC} > 1,5$ oder $< -1,5$ haben (grüne Punkte), also hoch exprimiert, statistisch aber nicht signifikant sind.

(a)



(b)

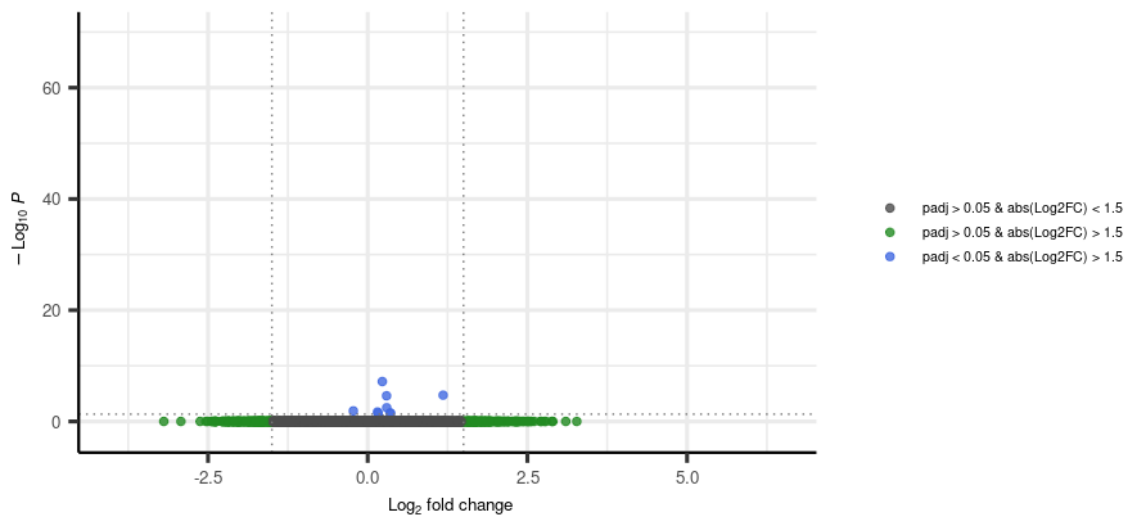
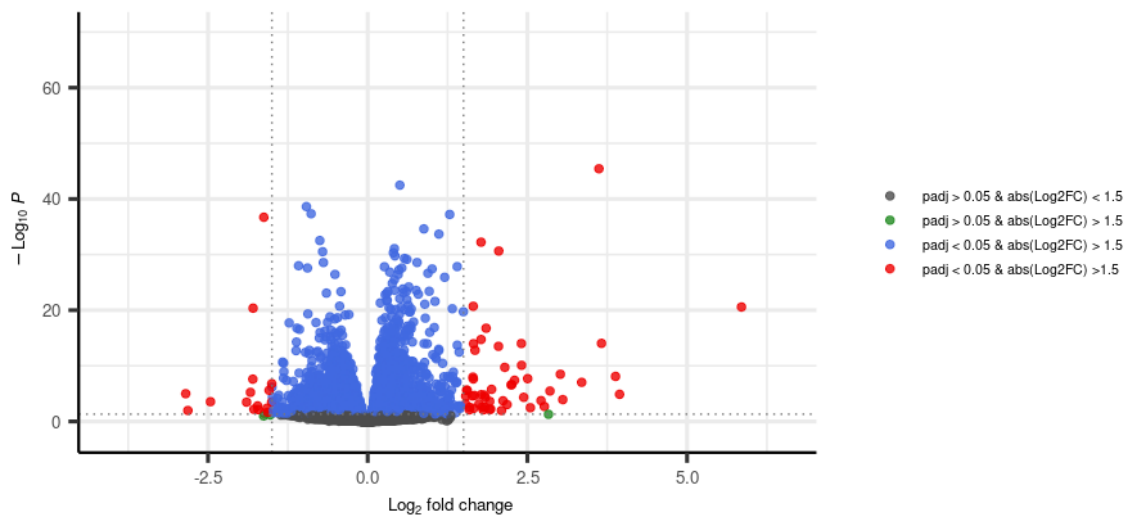


Abbildung 19: *Volcano Plots* der DPCs, (a) *S. mutans* vs. Kontrolle, (b) γ -bestrahlter *S. mutans* vs. Kontrolle. Die Darstellung zeigt die Gene über ihren $\log_2FC$ (x-Achse) gegen den negativen dekadischen Logarithmus ihres angepassten p-Wertes (y-Achse). Rote Punkte stellen dabei DEGs mit angepasstem p-Wert $< 0,05$ und einem $\log_2FC > 1,5$ oder $< -1,5$ dar, graue Punkte Gene mit angepasstem p-Wert $> 0,05$ und einem $\log_2FC < 1,5$ oder $> -1,5$, blaue Punkte Gene mit angepasstem p-Wert $< 0,05$ und einem $\log_2FC < 1,5$ oder $> -1,5$, grüne Punkte Gene mit angepasstem p-Wert $> 0,05$ und einem $\log_2FC > 1,5$ oder $< -1,5$.

Auch bei den DACs zeigt der *Volcano-Plot* (s. Abbildung 20) etliche signifikante, differenziell exprimierte Gene (DEGs) bei den Proben mit *S. mutans* im Gegensatz zu den Proben mit γ -bestrahltem *S. mutans*. Im Vergleich zu dem *Volcano Plot* der DPCs (s. Abbildung 19) ist das Muster der DEGs leicht abweichend, was auf für DACs und DPCs spezifische DEGs und oder eine abweichende Antwort der Zellen auf den Stimulus schließen lässt.

(a)



(b)

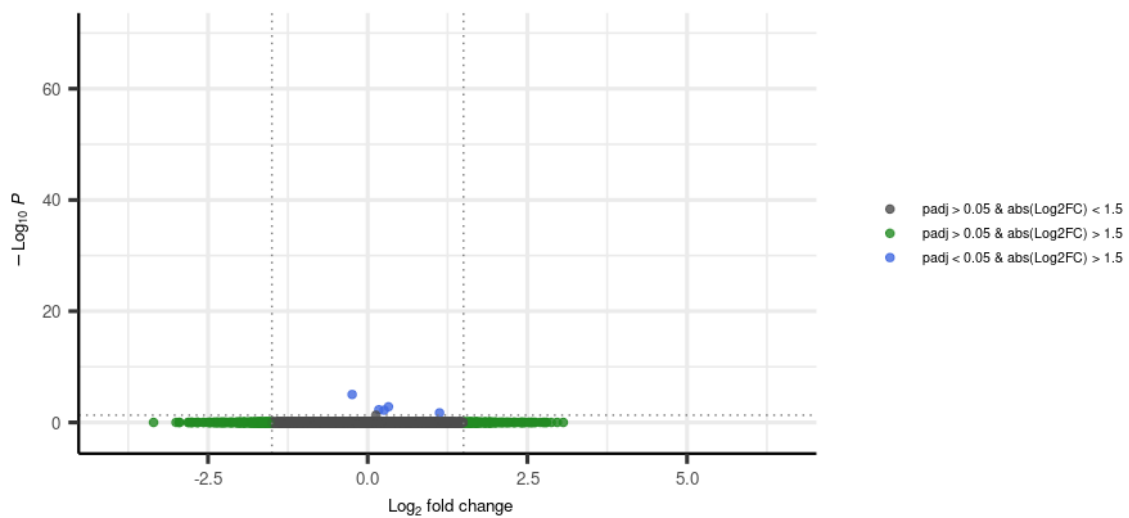


Abbildung 20: Volcano Plots der DACs, (a) *S. mutans* vs. Kontrolle, (b) γ -bestrahlter *S. mutans* vs. Kontrolle. Für Erläuterungen zur Darstellung s. Abbildung 19.

4.1.2.2 Vergleich DPC und DAC mittels Venn-Diagramm

In der isolierten Betrachtung der Zelltypen zeigen sich unterschiedlich ausgeprägte Antworten auf den Stimulus: DPCs und DACs teilen 33 gemeinsame hochregulierte DEGs, besitzen aber auch einen Teil exklusiv regulierter DEGs. Dies sind 9 speziell bei DPCs und 22 speziell bei DACs hochregulierte DEGs (s. Abbildung 21).

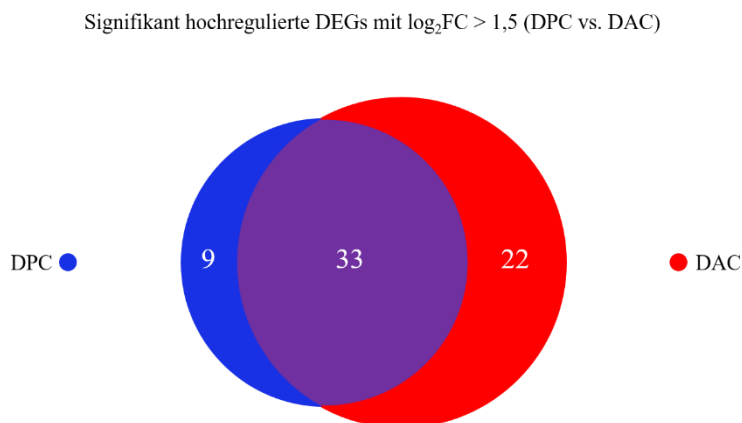


Abbildung 21: Venn Diagramm der hochregulierten DEGs (DPC vs. DAC)

Dies bedeutet jedoch nicht, dass die entsprechenden Gene, die die gewählten Kriterien ($\log_2FC > 1,5$ oder $< -1,5$ und $p_{adj} < 0,05$) nicht erfüllen, keine Veränderung verglichen mit der Kontrolle aufweisen, sie erreichen lediglich den Grenzwert nicht. Zu den wichtigsten DEGs, die exklusiv bei den DPCs hochreguliert sind, zählen *HSPA7*, *SNORD3A*, *FOXI1* und *AK4*. Zu den wichtigsten DEGs, die bei den DPCs und DACs hochreguliert sind, zählen *DDIT4*, *HSPA6*, *DEPP1* und *ANGPTL4*. *CXCL2*, *PTGS2*, *IL6* und *JUNB* zählen zu den wichtigsten DEGs, die exklusiv in DACs hochreguliert sind.

Tabelle 9: Listen der hochregulierten DEGs

Gene, exklusiv in DPC hochreguliert ($\log_2FC > 1,5$ und $p_{adj} < 0,05$)

Ensembl-Gen-ID	Symbol	$\log_2FC$	p_{adj}
ENSG00000225217.1	<i>HSPA7</i>	3,85	2,31E-03
ENSG00000263934.4	<i>SNORD3A</i>	3,06	5,19E-06
ENSG00000168269.9	<i>FOXI1</i>	2,96	6,84E-04
ENSG00000268812.3	<i>LIF-AS2</i>	2,03	1,13E-02
ENSG00000253633.1	<i>AP002852.1</i>	1,76	1,22E-02
ENSG00000139832.4	<i>RAB20</i>	1,70	1,38E-08
ENSG00000129521.13	<i>EGLN3</i>	1,63	4,76E-02
ENSG00000232450.1	<i>RPS2P14</i>	1,58	1,59E-02

ENSG00000162433.14	AK4	1,53	6,03E-10
--------------------	-----	------	----------

Gene, in DPC und DAC hochreguliert ($\log_2FC > 1,5$ und $p_{adj} < 0,05$)

Ensembl-Gen-ID	Symbol	$\log_2FC$	p_{adj}
ENSG00000168209.4	<i>DDIT4</i>	7,69	7,10E-47
ENSG00000173110.7	<i>HSPA6</i>	6,15	1,80E-14
ENSG00000165507.8	<i>DEPP1</i>	5,95	7,42E-29
ENSG00000204388.6	<i>HSPA1B</i>	3,82	3,55E-18
ENSG00000134107.4	<i>BHLHE40</i>	3,64	6,00E-30
ENSG00000167772.11	<i>ANGPTL4</i>	3,55	7,39E-72
ENSG00000204389.9	<i>HSPA1A</i>	3,32	2,20E-16
ENSG00000200879.1	<i>SNORD14E</i>	3,11	3,56E-07
ENSG00000135245.9	<i>HILPDA</i>	2,99	2,34E-22
ENSG00000122877.15	<i>EGR2</i>	2,67	6,44E-08
ENSG00000279030.1	<i>AC007336.3</i>	2,66	1,79E-05
ENSG00000164400.5	<i>CSF2</i>	2,58	1,75E-07
ENSG00000256006.1	<i>AC084117.1</i>	2,40	2,56E-06
ENSG00000219607.3	<i>PPP1R3G</i>	2,39	1,10E-22
ENSG00000113369.8	<i>ARRDC3</i>	2,35	1,70E-19
ENSG00000123095.5	<i>BHLHE41</i>	2,34	2,28E-20
ENSG00000130513.6	<i>GDF15</i>	2,29	1,94E-08
ENSG00000137331.11	<i>IER3</i>	2,29	2,48E-20
ENSG00000176907.4	<i>TCIM</i>	2,25	4,61E-09
ENSG00000004799.7	<i>PK4</i>	2,22	3,38E-10
ENSG00000163734.4	<i>CXCL3</i>	2,22	5,15E-05
ENSG00000247095.2	<i>MIR210HG</i>	2,11	3,13E-25
ENSG00000119938.8	<i>PPP1R3C</i>	2,09	9,84E-19
ENSG00000112715.21	<i>VEGFA</i>	1,85	1,15E-09
ENSG00000148926.9	<i>ADM</i>	1,84	8,11E-11
ENSG00000273284.1	<i>AP001033.2</i>	1,76	2,05E-06
ENSG00000166592.11	<i>RRAD</i>	1,76	8,36E-11

ENSG00000146278.10	<i>PNRC1</i>	1,72	3,65E-17
ENSG00000128342.4	<i>LIF</i>	1,72	3,78E-11
ENSG00000147872.9	<i>PLIN2</i>	1,68	6,48E-32
ENSG00000188483.7	<i>IER5L</i>	1,67	2,78E-12
ENSG00000124216.3	<i>SNAI1</i>	1,66	7,41E-14
ENSG00000183496.5	<i>MEX3B</i>	1,60	3,05E-44

Gene, exklusiv in DAC hochreguliert ($\log_2\text{FC} > 1,5$ und $p_{\text{adj}} < 0,05$)

Ensembl-Gen-ID	Symbol	$\log_2\text{FC}$	p_{adj}
ENSG00000081041.8	<i>CXCL2</i>	2,55	3,40E-03
ENSG00000073756.11	<i>PTGS2</i>	2,26	2,41E-07
ENSG00000136244.11	<i>IL6</i>	2,18	9,21E-04
ENSG00000119508.17	<i>NR4A3</i>	2,12	1,95E-04
ENSG00000170345.9	<i>FOS</i>	1,93	5,96E-03
ENSG00000257298.1	<i>AC008147.2</i>	1,91	2,53E-04
ENSG00000169429.10	<i>CXCL8</i>	1,91	7,85E-03
ENSG00000118503.14	<i>TNFAIP3</i>	1,83	1,85E-05
ENSG00000187479.6	<i>C11orf96</i>	1,81	8,11E-03
ENSG00000006606.8	<i>CCL26</i>	1,79	2,58E-03
ENSG00000116741.7	<i>RGS2</i>	1,78	1,52E-05
ENSG00000123358.19	<i>NR4A1</i>	1,74	6,90E-04
ENSG00000120129.5	<i>DUSP1</i>	1,67	2,20E-05
ENSG00000153234.13	<i>NR4A2</i>	1,66	4,33E-03
ENSG00000171223.5	<i>JUNB</i>	1,65	2,32E-08
ENSG00000165030.3	<i>NFIL3</i>	1,65	1,07E-08
ENSG00000186352.8	<i>ANKRD37</i>	1,64	2,63E-05
ENSG00000152049.6	<i>KCNE4</i>	1,60	2,92E-03
ENSG00000204055.4	<i>AL158151.1</i>	1,59	8,24E-03
ENSG00000059804.15	<i>SLC2A3</i>	1,56	2,68E-06
ENSG00000183691.4	<i>NOG</i>	1,54	2,88E-05
ENSG00000128016.5	<i>ZFP36</i>	1,53	7,50E-04

DPCs und DACs teilen 8 gemeinsame herunterregulierte DEGs, besitzen aber auch einen Teil exklusiv regulierter DEGs. Dies sind 25 speziell bei DPCs und 9 speziell bei DACs herunterregulierte DEGs (s. Abbildung 22).

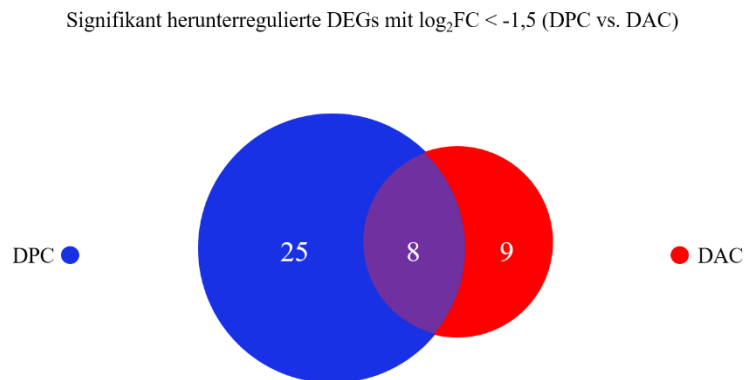


Abbildung 22: Venn Diagramm der herunterregulierten DEGs (DPC vs. DAC)

Zu den wichtigsten DEGs, die exklusiv bei den DPCs herunterreguliert sind, zählen *AC00892.2*, *FLRT3*, *MT-TL1* und *AC005674.2*. Zu den wichtigsten DEGs, die bei den DPCs und DACs herunterreguliert sind, zählen *MT-TT*, *MT-TQ*, *AL158152.1* und *FAM13B*. *KCTD4*, *TSSK6*, *FAM71F2* und *MAP10* zählen zu den wichtigsten DEGs, die exklusiv in DACs herunterreguliert sind.

Tabelle 10: Listen der herunterregulierten DEGs

Gene, exklusiv in DPC herunterreguliert ($\log_2FC > -1,5$ und $p_{adj} < 0,05$)

Ensembl-Gen-ID	Symbol	log ₂ FC	P _{adj}
ENSG00000269688.1	AC008982.2	-2,18	8,96E-06
ENSG00000125848.9	FLRT3	-2,10	4,41E-03
ENSG00000209082.1	MT-TL1	-2,10	1,47E-05
ENSG00000111834.12	RSPH4A	-1,95	3,98E-03
ENSG00000261490.1	AC005674.2	-1,92	4,43E-08
ENSG00000198695.2	MT-ND6	-1,86	3,62E-04
ENSG00000210194.1	MT-TE	-1,85	2,30E-05
ENSG00000198416.9	ZNF658B	-1,79	3,46E-03
ENSG00000212722.7	KRTAP4-9	-1,77	1,18E-02
ENSG00000256973.1	AC053513.1	-1,76	3,01E-02
ENSG00000213976.4	AC010615.1	-1,73	7,74E-03
ENSG00000281392.1	LINC00506	-1,72	7,43E-03

ENSG00000135407.10	<i>AVIL</i>	-1,71	4,77E-05
ENSG00000197837.3	<i>HIST4H4</i>	-1,70	3,37E-02
ENSG00000254363.6	<i>AC011379.2</i>	-1,70	3,13E-02
ENSG00000232303.2	<i>DFFBP1</i>	-1,64	2,79E-02
ENSG00000271698.1	<i>AC233992.2</i>	-1,58	2,15E-02
ENSG00000128045.6	<i>RASL11B</i>	-1,58	7,77E-04
ENSG00000228775.7	<i>WEE2-AS1</i>	-1,56	5,03E-04
ENSG00000213071.11	<i>LPAL2</i>	-1,56	2,93E-03
ENSG00000264112.1	<i>AC015813.1</i>	-1,54	1,58E-06
ENSG00000177692.11	<i>DNAJC28</i>	-1,53	1,09E-02
ENSG00000275549.1	<i>STPG3-AS1</i>	-1,52	3,64E-02
ENSG00000245975.2	<i>AC090515.2</i>	-1,51	1,70E-02
ENSG00000267030.1	<i>AC011498.2</i>	-1,50	1,75E-02

Gene, in DPC und DAC herunterreguliert ($\log_2\text{FC} > -1,5$ und $p_{\text{adj}} < 0,05$)

Ensembl-Gen-ID	Symbol	$\log_2\text{FC}$	p_{adj}
ENSG00000210195.2	<i>MT-TT</i>	-2,83	2,15E-10
ENSG00000210107.1	<i>MT-TQ</i>	-2,56	2,08E-05
ENSG00000269929.1	<i>AL158152.1</i>	-2,02	2,19E-06
ENSG00000265972.5	<i>TXNIP</i>	-1,75	8,72E-30
ENSG00000285796.1	<i>AL162458.1</i>	-1,71	6,35E-10
ENSG00000186594.14	<i>MIR22HG</i>	-1,64	2,32E-19
ENSG00000031003.10	<i>FAM13B</i>	-1,63	5,91E-50
ENSG00000162461.7	<i>SLC25A34</i>	-1,54	4,48E-08

Gene, exklusiv in DAC herunterreguliert ($\log_2\text{FC} > -1,5$ und $p_{\text{adj}} < 0,05$)

Ensembl-Gen-ID	Symbol	$\log_2\text{FC}$	p_{adj}
ENSG00000180332.6	<i>KCTD4</i>	-2,46	2,86E-04
ENSG00000178093.13	<i>TSSK6</i>	-1,90	3,39E-04
ENSG00000205085.11	<i>FAM71F2</i>	-1,84	5,89E-06

ENSG00000183208.12	<i>GDPGP1</i>	-1,72	1,61E-03
ENSG00000215417.12	<i>MIR17HG</i>	-1,72	7,36E-03
ENSG00000183154.1	<i>AC138356.1</i>	-1,62	3,39E-02
ENSG00000260698.1	<i>AL591848.3</i>	-1,58	4,30E-03
ENSG00000236098.1	<i>AC097059.2</i>	-1,56	2,25E-02
ENSG00000212916.4	<i>MAP10</i>	-1,50	1,64E-07

4.1.2.3 Heatmaps der Top 20 hoch- und herunterregulierten DEGs

Die folgenden Grafiken dividieren die Gene nicht mehr in zwischen DACs und DPCs exklusiv und gemeinsam regulierte DEGs, sondern betrachten lediglich die am stärksten regulierten DEGs, unabhängig von möglichen Überlappungen zwischen DPCs und DACs.

Die Top 20 hochregulierten Gene der DPCs nach Stimulation mit *S. mutans* (s. Abbildung 23) sind *DDIT4*, *DEPP1*, *HSPA6*, *HSPA7*, *HSPA1B*, *BHLE40*, *ANGPTL4*, *HSPA1A*, *SNORD3A*, *FOXI1*, *HILPDA*, *SNORD14E*, *BHLHE41*, *PPP1R3G*, *AC007336.3*, *ARRDC3*, *PDK4*, *GDF15*, *CSF2* und *MIR210HG*. Der $\log_2FC$ der Gene der bac-Gruppen übersteigt deutlich den der Gene der gamma-Gruppen.

Die TOP 20 herunterregulierten Gene der DPCs sind *MT-TT*, *MT-TQ*, *AL158152.1*, *AC008982.2*, *FLRT3*, *MT-TL1*, *RSPH4A*, *AC005674.2*, *MT-ND6*, *MT-TE*, *ZNF658B*, *KRTAP4-9*, *AC053513.1*, *MIR22HG*, *TXNIP*, *AC010615.1*, *LINC00506*, *AVIL*, *HIST4H4* und *AC011379.2*. Der $\log_2FC$ der Gene der bac-Gruppen unterschreitet deutlich den der Gene der gamma-Gruppen.

Die TOP 20 hochregulierten Gene der DACs (s. Abbildung 23) sind *DDIT4*, *HSPA6*, *DEPP1*, *SNORD14E*, *HSPA1B*, *BHLHE40*, *ANGPTL4*, *HSPA1A*, *AC007336.3*, *HILPDA*, *EGR2*, *CSF2*, *AC084117.1*, *CXCL2*, *IER3*, *PDK4*, *ARRDC3*, *PPP1R3G*, *GDF15* und *PTGS2*. Der $\log_2FC$ der Gene der bac-Gruppen übersteigt auch hier deutlich den der Gene der gamma-Gruppen.

Die TOP 20 herunterregulierten Gene der DACs sind *MT-TT*, *MT-TQ*, *KCTD4*, *TSSK6*, *FAM71F2*, *AL162458.1*, *TXNIP*, *AL 158152.1*, *GDPGP1*, *MIR17HG*, *FAM13B*, *AC138356.1*, *AL591848.3*, *AC097059.2*, *MIR22HG*, *SLC25A34* und *MAP10*. Der $\log_2FC$ der Gene der bac-Gruppen unterschreitet deutlich den der Gene der gamma-Gruppen.

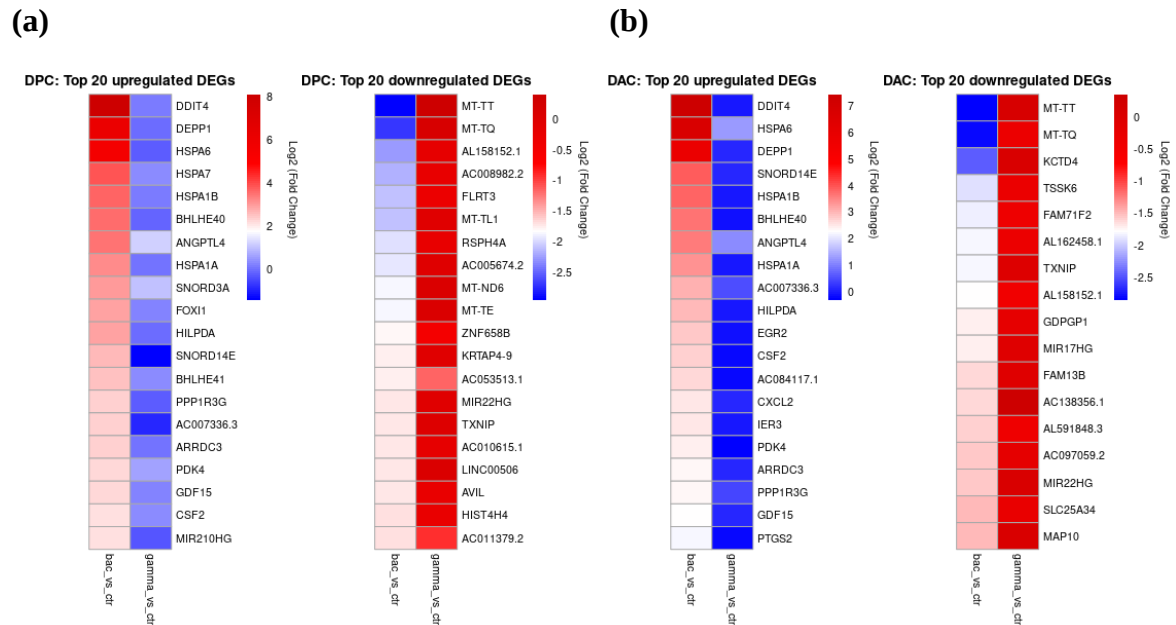


Abbildung 23: Heatmap der Top 20 hochregulierten (links) und herunterregulierten (rechts) Gene der (a) DPCs und (b) DACs mit einem $\log_2FC > 1,5$ bzw. $\log_2FC < -1,5$ und einem $p_{adj} < 0,05$. Die beiden Spalten geben die beiden Testgruppen wieder: Links die mit vitalem *S. mutans* behandelten Proben (bac) gegen die unbehandelten Kontrollen (ctr) und rechts die mit γ -bestrahltem *S. mutans* behandelten Proben (gamma) gegen die unbehandelten Kontrollen (ctr). Die Farbskala (rot-weiß-blau, s. Legende rechts) stellt den $\log_2FC$ nach Entfernung des Donorspezifischen Effektes und nach vst-Korrektur dar.

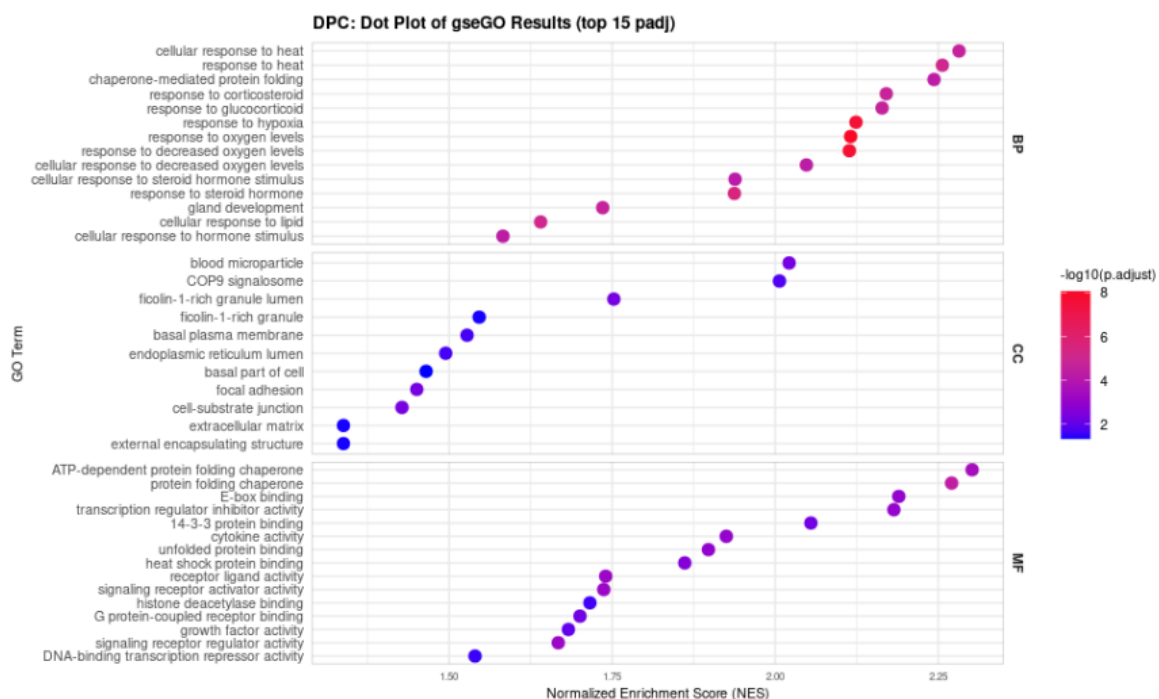
4.1.2.4 GSEA mit gseGO

Die Gen-Ontologien der gseGO-Datenbank sind Überbegriffe, die durch den Zugriff auf Datenbanken und statistische Berechnungen die Zusammenhänge zwischen den vorliegenden Genen aufzeigen sollen. Die Ontologie „biologischer Prozess“ beschreibt die biologische Rolle der untersuchten Gene bei chemischen oder physikalischen Veränderungen wie beispielsweise Apoptose, Transkription oder Signaltransduktion. „Zelluläre Komponente“ beschreibt die Lokalisation des Gens in der Zelle, wie Golgi-Apparat oder Zellwand. „Molekulare Funktion“ beinhaltet die biochemischen Aktivitäten der Gene, zum Beispiel Helikase oder ATPase.

In der Auswertung für die DPCs (s. Abbildung 24) zählen zelluläre Antwort auf Hitze, Antwort auf Hitze, Chaperon-vermittelte Proteinfaltung, Antwort auf Kortikosteroide, Antwort auf Glukokortikoide, Antwort auf Hypoxie und Antwort auf erniedrigte Sauerstofflevel zu den wichtigsten Signalwegen der Ontologie „biologischer Prozess“. Bei „zelluläre Komponente“ sind Blut-Mikropartikel, COP9-Signalosom und Ficolin-1-reiches Granulalumen die wichtigsten Regionen. ATP-abhängige proteinfaltende Chaperone, proteinfaltende Chaperone und E-box Bindung sind die wichtigsten molekularen Funktionen bei den DPCs.

Bei der Genset-Anreicherungsanalyse (GSEA) der DACs (s. Abbildung 24) zählen zelluläre Antwort auf Hitze, negative Regulation des Purinnukleotidstoffwechsels, negative Regulierung des ATP-Stoffwechsels, Antwort auf Hitze, Antwort auf Glukokortikoide, Antwort auf Hypoxie und Reaktion auf verringerten Sauerstoffgehalt zu den wichtigsten *Pathways* der Ontologie „biologischer Prozess“. Bei „zelluläre Komponente“ sind COP9-Signalosom, Blut-Mikropartikel, Aggresom und Ficolin-1-reiches Granulalumen die wichtigsten Regionen. 14-3-3 Protein-Bindung, Zytokin-Aktivität, ATP-abhängige proteinfaltende Chaperone und proteinfaltende Chaperone sind die wichtigsten angereicherten Signalwege bezüglich der molekularen Funktionen.

(a)



(b)

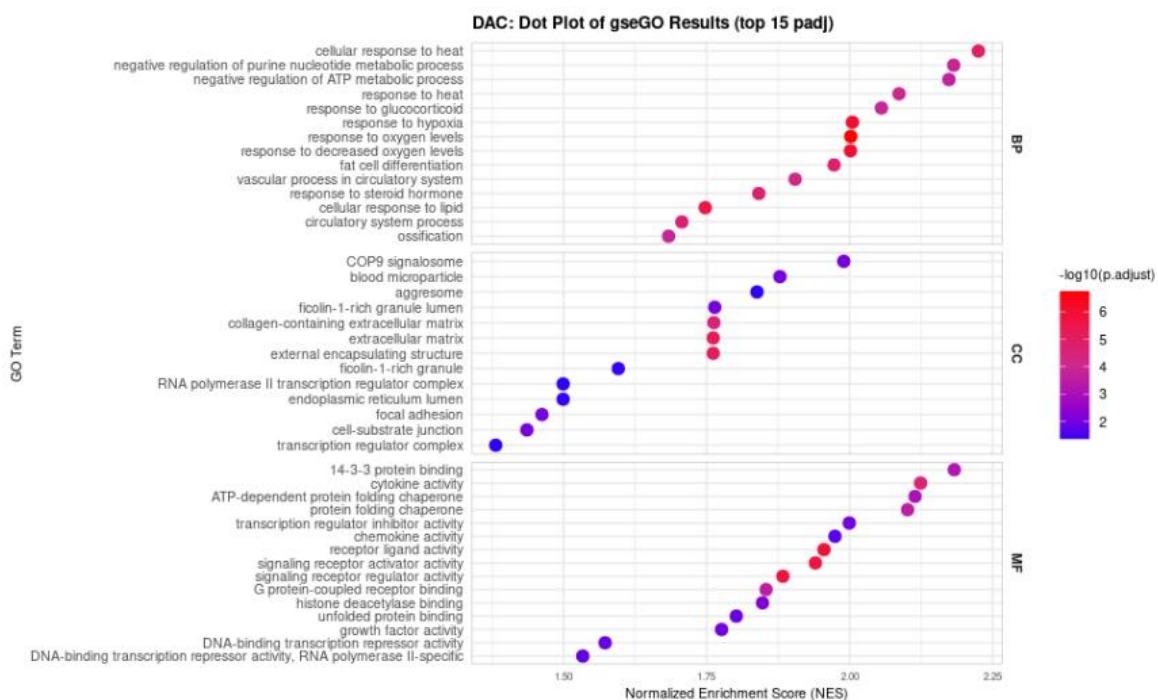


Abbildung 24: Top angereicherte *Pathways* der (a) DPCs und der (b) DACs (gseGO). Die Grafik zeigt verschiedene Gen-Set-Überbegriffe der gseGO-Datenbank (y-Achse), von oben absteigend sortiert nach dem normalisierten Anreicherungs-Score (NES, x-Achse) der Daten zu diesen *GO-Terms*. Die Farben (blau - rot) der Punkte stehen für den negativen dekadischen Logarithmus des angepassten p-Wertes. Bei der GSEA der DPCs über die gseGO-Datenbank lassen sich die dargestellten Signalwege in drei verschiedene Gen-Ontologie-Kategorien

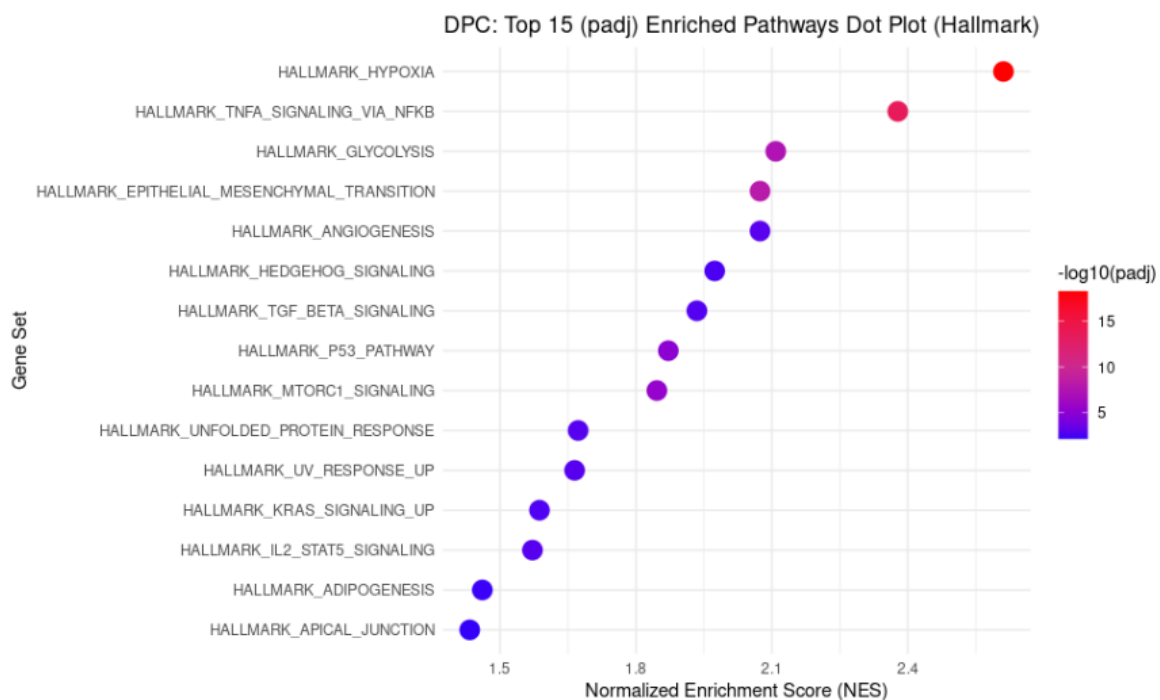
einteilen. Dies sind in der Darstellung von oben nach unten: „biologischer Prozess“ (BP), „zelluläre Komponente“ (CC) und „molekulare Funktion“ (MF).

4.1.2.5 GSEA mit MSigDB

In der GSEA der DPCs über die Datenbank MSigDB (s. Abbildung 25) lassen sich ebenfalls *Pathways*, die mit der Immunantwort und der Hypoxie assoziiert sind, finden. Zu diesen gehören die *Hallmark*-Gensets Hypoxie, TNF α -Signalgebung über NF- κ B, Angiogenese, TGF β -Signalgebung und IL2-STAT5-Signalgebung.

Die GSEA der DACs (s. Abbildung 25) liefert ähnliche Ergebnisse, mit *Pathways* der Immunantwort und der Hypoxie. Zu diesen gehören die *Hallmark*-Gensets Hypoxie, TNF α -Signalgebung über NF κ B, Glykolyse, TGF β -Signalgebung und IL6-JAK-STAT3-Signalgebung.

(a)



(b)

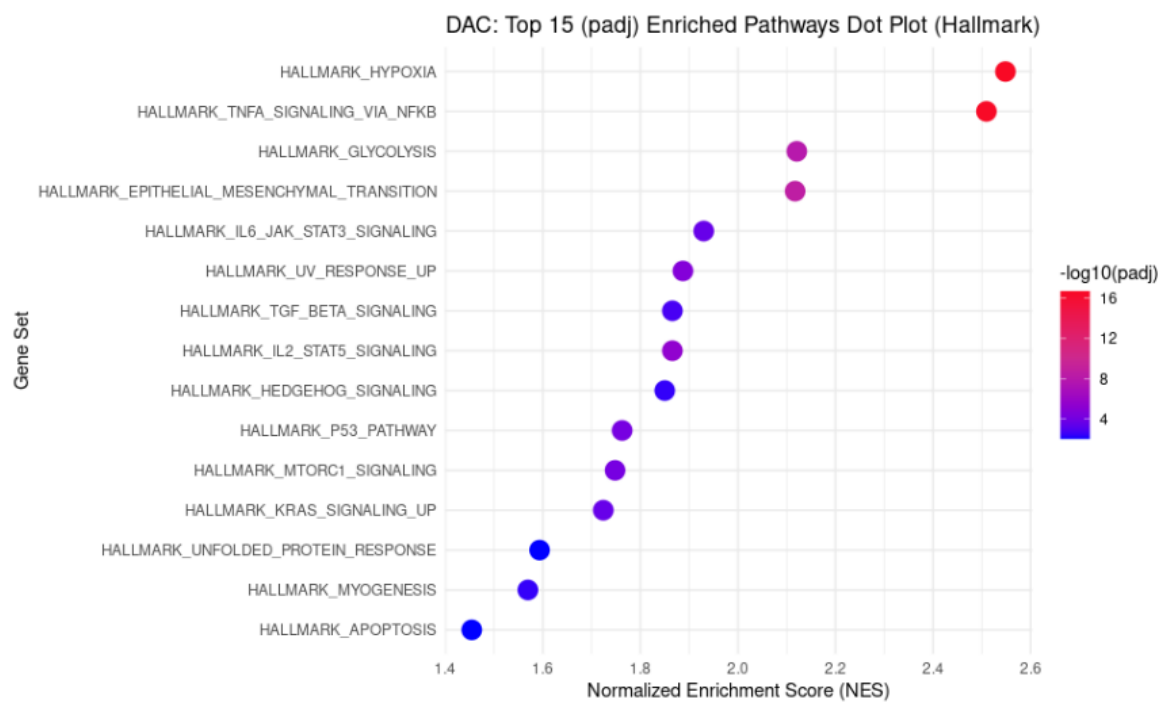


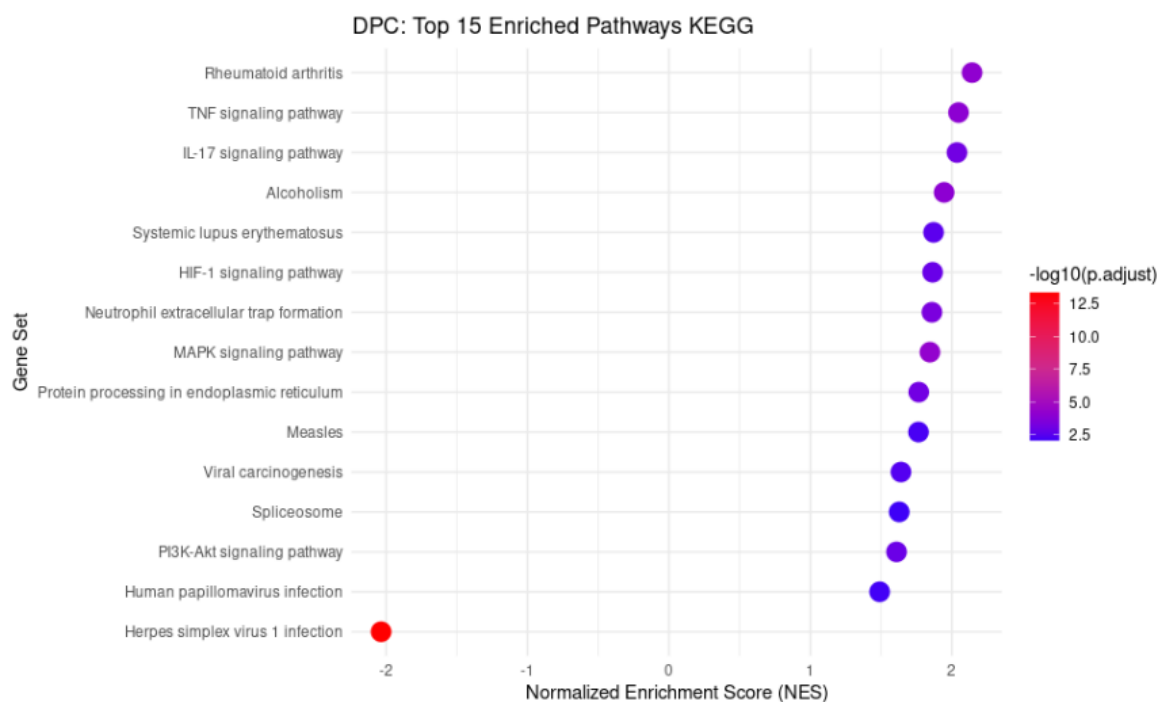
Abbildung 25: Top 15 angereicherte *Pathways* der (a) DPCs und (b) DACs (MSigDB). Die Grafik zeigt verschiedene Gen Set-Überbegriffe der *Molecular Signatures* Datenbank MSigDB (y-Achse) von oben absteigend sortiert nach dem normalisierten Anreicherungs-Score (NES, x-Achse) der Daten zu diesen *Hallmarks*. Die Farben (blau - rot) der Punkte stehen für den negativen dekadischen Logarithmus des angepassten p-Wertes.

4.1.2.6 GSEA mit KEGG

Zu den am stärksten angereicherten *Pathways* in der GSEA der DPCs über die KEGG-Datenbank (s. Abbildung 26) zählen zahlreiche Signalwege, die mit der Immunantwort und Entzündungsprozessen in Verbindung stehen. Dazu gehören unter anderem der TNF-Signalweg, der IL17-Signalweg, der HIF1-Signalweg, die Bildung von neutrophilen extrazellulären Fallen (*Neutrophil Extracellular Trap Formation*) sowie der MAPK-Signalweg. Zudem sind Gene aus Signalwegen im Zusammenhang mit rheumatoider Arthritis, Alkoholismus, systemischem Lupus erythematodes, Masern und weiteren Erkrankungen angereichert. Der Signalweg für Herpes simplex virus 1 Infektion ist bei DACs und DPCs herunterreguliert.

Bei den DACs (s. Abbildung 26) zählen ebenfalls einige Signalwege, die in Zusammenhang mit der Immunantwort und dem Entzündungsgeschehen stehen, wie der IL17, TNF- und der MAPK-Signalweg zu den Top 15. Zudem sind Gene angereichert, die mit Signalwegen für rheumatoide Arthritis, Alkoholismus, Masern und weiteren Erkrankungen in Verbindung stehen.

(a)



(b)

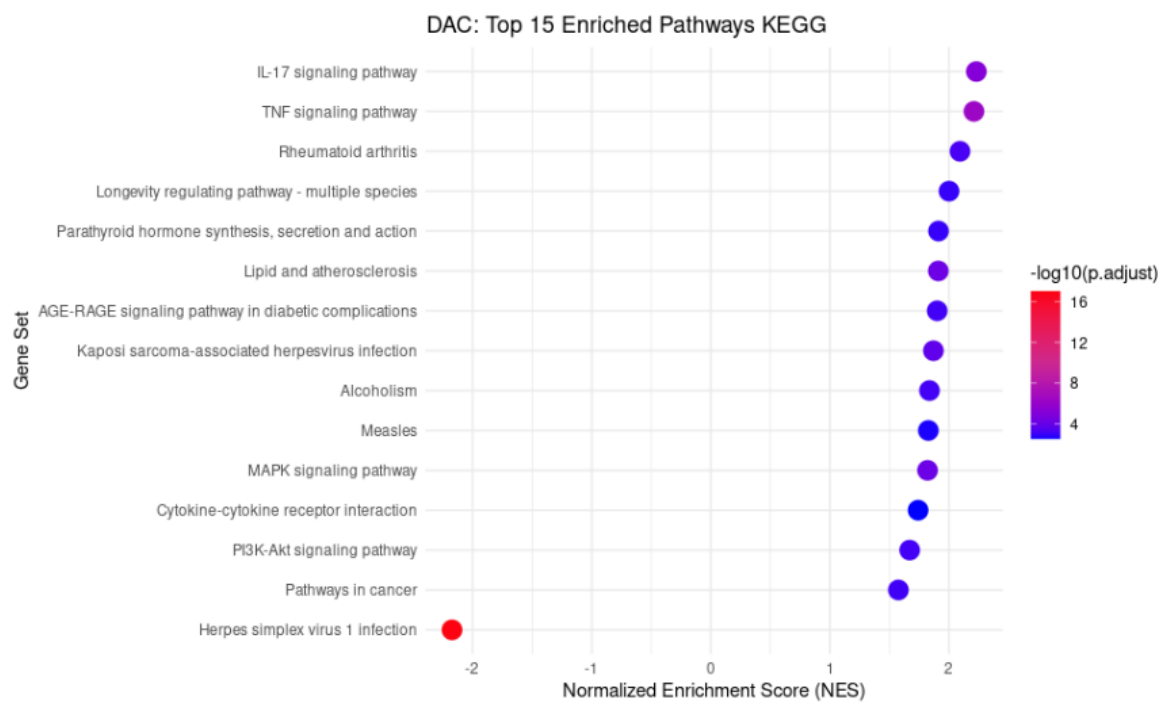
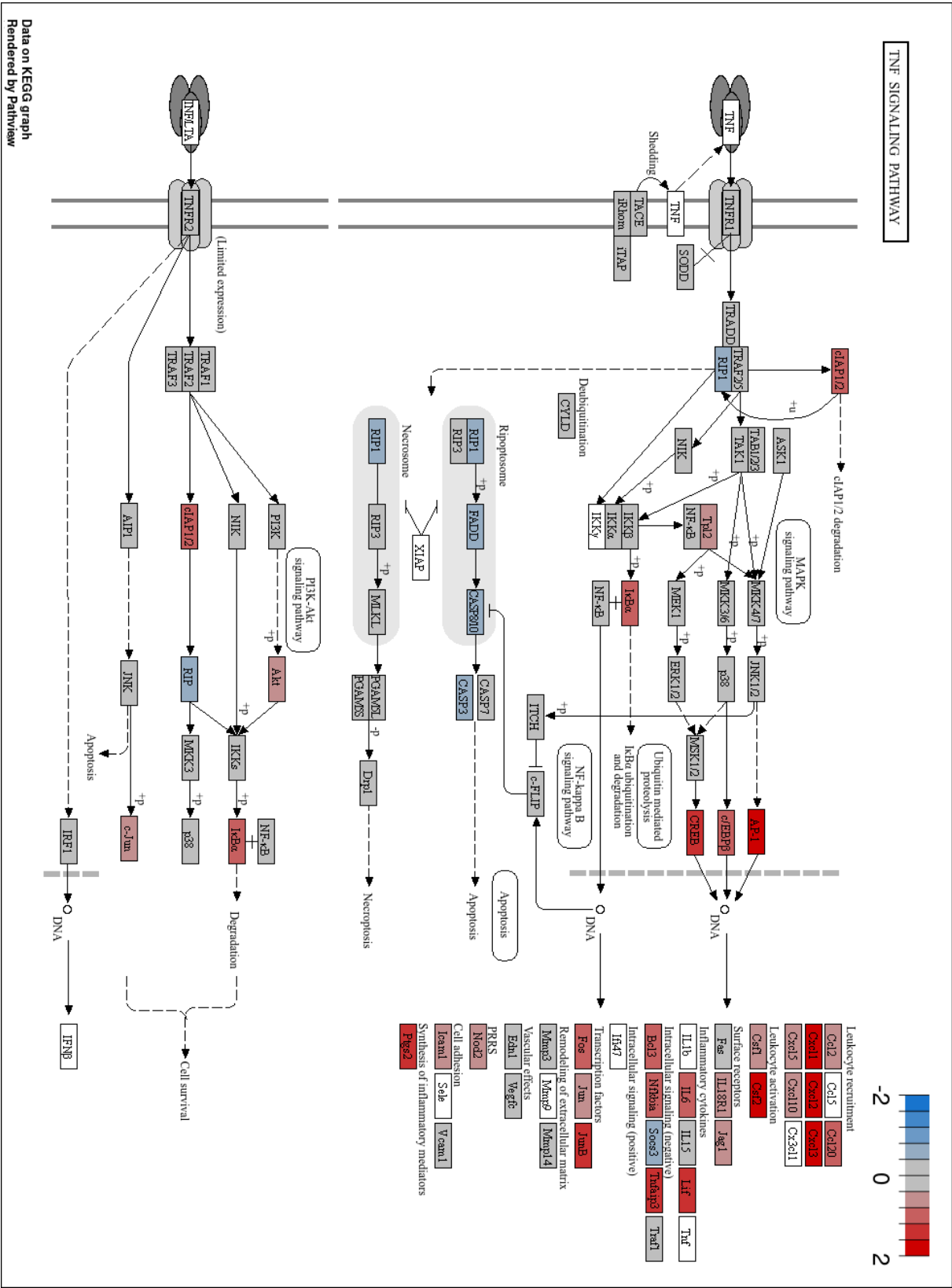


Abbildung 26: Top 15 angereicherte *Pathways* der (a) DPCs und (b) DACs (KEGG). Die Grafik zeigt verschiedene Gen Set-Überbegriffe der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* Datenbank KEGG (y-Achse) von oben absteigend sortiert nach dem normalisierten Anreicherungs-Score (NES, x-Achse) der Daten zu diesen Überbegriffen. Die Farben (blau - rot) der Punkte stehen für den negativen dekadischen Logarithmus des angepassten p-Wertes.

4.1.2.7 Darstellung relevanter Pathways nach KEGG-Analyse

Der Vergleich der hoch- und herunterregulierten Gene in den TNF-Signalwegen der DACs und DPCs (s. Abbildung 27) offenbart viele Gemeinsamkeiten: So zählen die Gene *cIAP1/2*, *AP-1*, *CREB*, *I κ B α* , *CXCL1*, *CXCL2* und *CXCL3*, die für die Leukozyten-Rekrutierung nötig sind, *CSF2*, das Leukozyten aktivieren kann, die inflammatorischen Zytokine IL6 und LIF, das an der negativen intrazellulären Signalgebung beteiligte *TNFAIP3*, die Transkriptionsfaktoren *FOS* und *JUNB*, sowie *PTGS2*, das an der Synthese von Entzündungsmediatoren beteiligt ist, bei beiden Gruppen zu den deutlich hochregulierten Genen. Interessanterweise ist das *Pattern Recognition Receptor* (PRR)-Gen *NoD2* bei den DPCs leicht hoch-, bei den DACs leicht herunterreguliert. Gene, die an der Apoptose beteiligt sind, wie *RIP1*, *FADD* und *CASP3* sind bei DACs und DPCs leicht herunterreguliert.

a)



b)

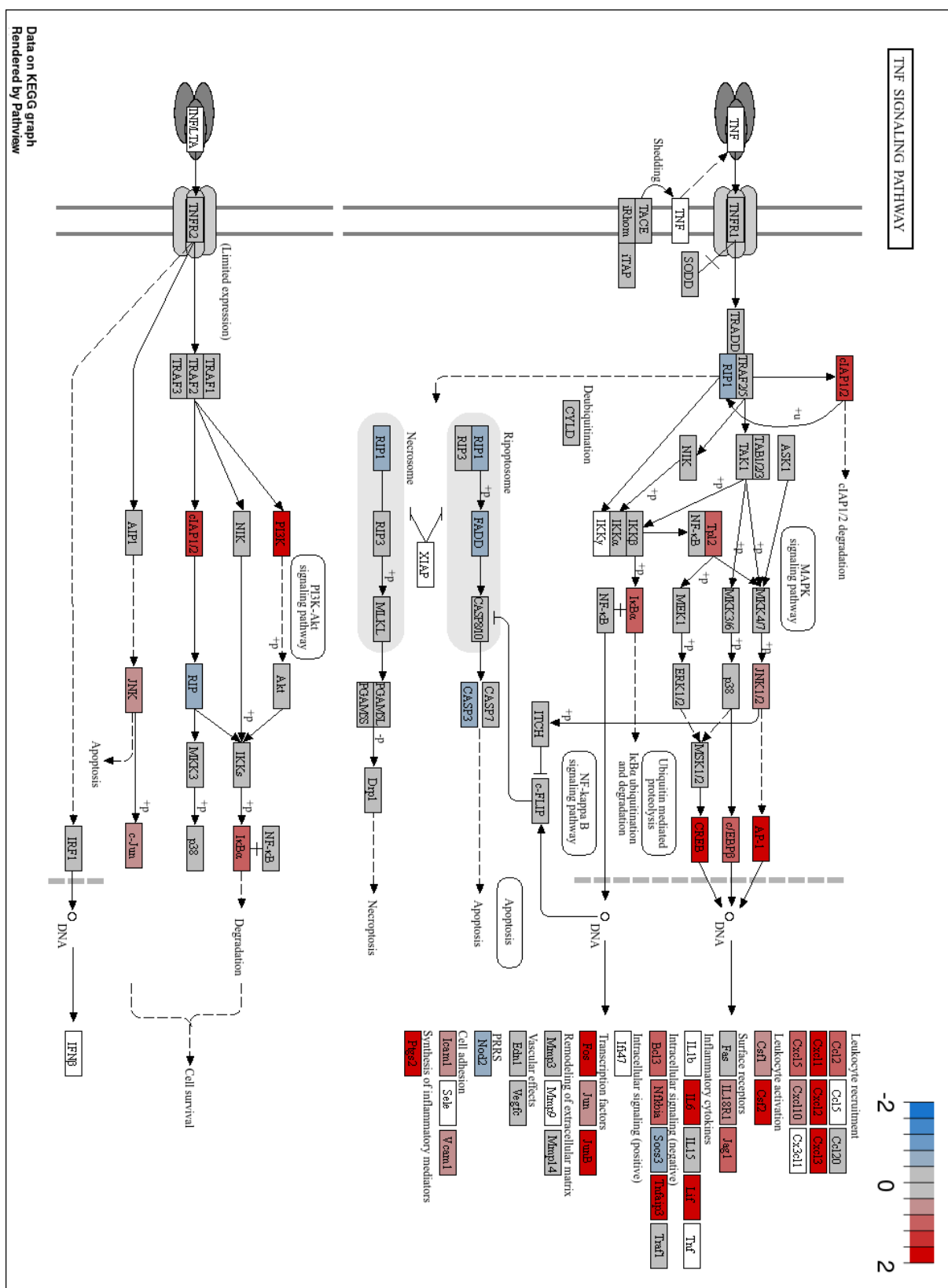
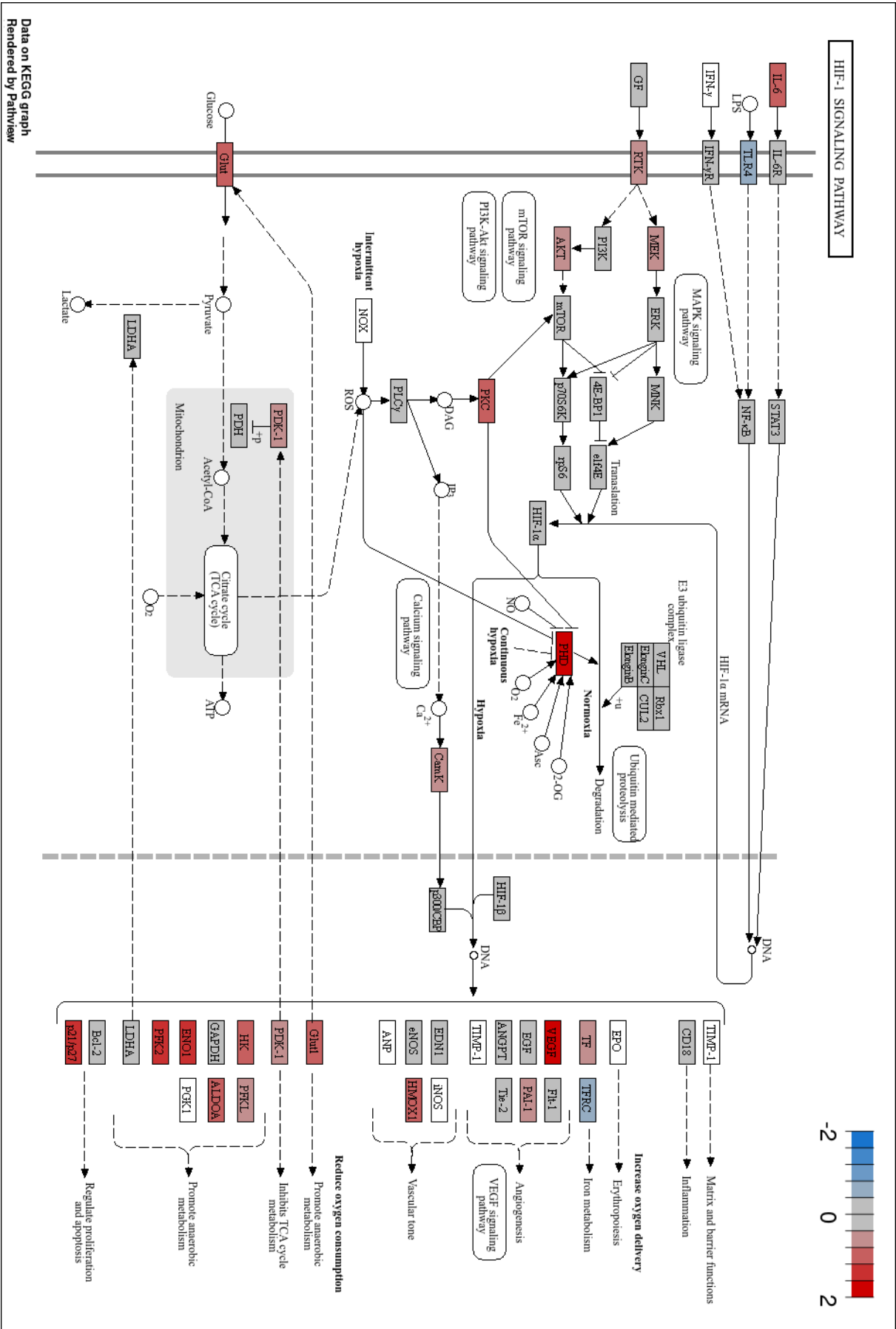


Abbildung 27: Darstellung des TNF-Signalwegs der a) DPCs und b) DACs nach KEGG-Analyse. Die Abbildung gibt identifizierte Gene des TNF-Signalwegs und deren Interaktionen wieder. Die Farbskala von blau nach rot gibt linear den $\log_2FC$ der Gene an, wobei Werte, die den Grenzwert von -2 bzw. 2 überstiegen, auf den maximalen

Farbgrenzwert festgelegt sind. Gene, die in der Grafik farbig hervorgehoben sind, sind folglich hoch- oder herunterreguliert.

Bei der Betrachtung des HIF1-Signalweges (s. Abbildung 28) fallen mehr Unterschiede im Vergleich der DACs und DPCs auf. Die Darstellung verdeutlicht, dass zentrale Schlüsselgene des HIF1-Signalwegs bei beiden Gruppen durch die *S. mutans*-Infektion der Zellen stärker exprimiert werden. Dazu zählt IL6, eines der wichtigsten Interleukine der Immunantwort. Viele hochregulierte Gene stehen im Zusammenhang mit Hypoxie, so auch *PHD*, *VEGF*, welches bei der Angiogenese mitwirkt, *ENO1* und *PFK2*, welche anaeroben Metabolismus fördern und *p21/p27*, zentrale Gene im Zellzyklus und der Apoptose. *TFRC*, welches für den Eisenmetabolismus wichtig ist, ist bei beiden Gruppen geringfügig niedriger exprimiert, TF ist bei den DPCs leicht hoch- bei den DACs leicht herunterreguliert. Ebenso erhöht ist *PI3K*, welches am mTOR-Signalweg beteiligt ist, jedoch nur bei den DACs, bei den DPCs scheint es nicht von der Kontrollgruppe abzuweichen. *PHD* ist hingegen nur bei den DPCs hochreguliert.

a)



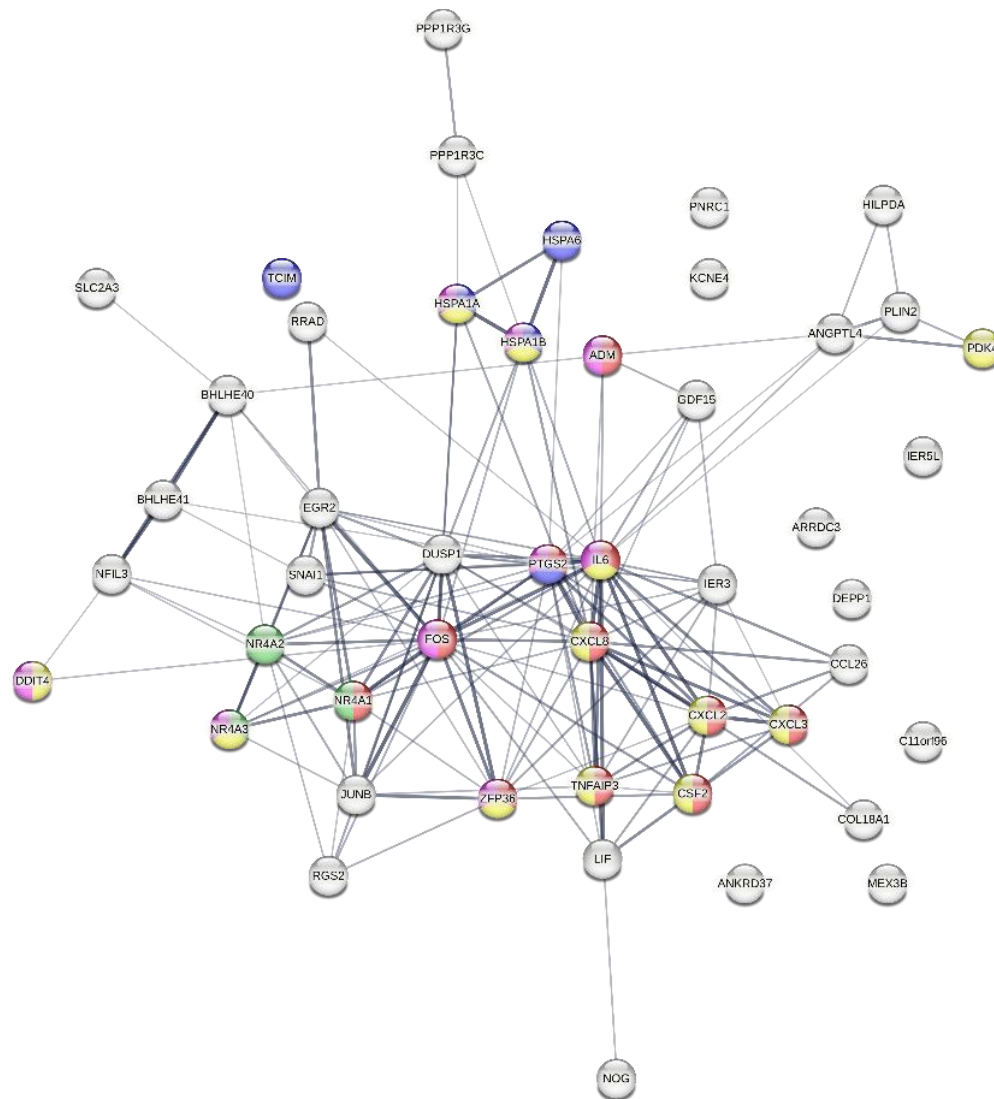
[illegible]

Abbildung 28: Darstellung des HIF1-Signalwegs der a) DPCs und b) DACs nach KEGG-Analyse. Die Abbildung gibt identifizierte Gene des HIF1-Signalwegs und deren Interaktionen wieder. Die Farbskala von blau nach rot gibt linear den $\log_2FC$ der Gene an, wobei Werte, die den Grenzwert von -2 bzw. 2 überstiegen, auf den maximalen Farbgrenzwert festgelegt sind. Gene, die in der Grafik farbig hervorgehoben sind, sind folglich hoch- oder herunterreguliert.

4.1.3 Protein-Protein-Interaktionen mittels STRING

Das dargestellte Netzwerk zeigt die Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) der signifikant differenziell exprimierten Gene der DACs mit einem $\log_2FC > 1,5$ (n=42) (s. Abbildung 29). Es fehlen zehn der 42 DEGs in der Darstellung, da sie nicht in der GO-Datenbank enthalten sind oder für kein Protein codieren, somit sind 32 von 42 Genen als Protein dargestellt. Zentral im Netzwerk befinden sich stark vernetzte Proteine wie IL-6, CXCL8 und FOS, die eine Schlüsselrolle in der untersuchten biologischen Reaktion spielen könnten.

Unter der Gen-Ontologie „biologischer Prozess“ lassen sich bei den DACs folgende Proteine zu bestimmten Überbegriffen zuordnen: IL-6, CXCL2, CXCL3, CXCL8, CSF2, TNFAIP3, ZFP36, FOS, NR4A1, ADM und PTGS2 zu Antwort auf Lipopolysaccharide, PTGS2, TCIM, HSPA1A, HSPA1B und HSPA6 zu zelluläre Antwort auf Hitze, NR4A1, NR4A2 und NR4A3 zu zelluläre Antwort auf *Corticotropin-releasing Hormone* (CRH) Stimulus, HSPA1A, HSPA1B, PDK4, DDIT4, NR4A3, ZFP36, IL6, CXCL2, CXCL3, CXCL8, TNFAIP3 und CSF2 zu zelluläre Antwort auf Lipide und DDIT4, NR4A3, HSPA1A, HSPA1B, ADM, FOS, IL6, PTGS2 und ZFP36 zu Antwort auf Steroidhormone.

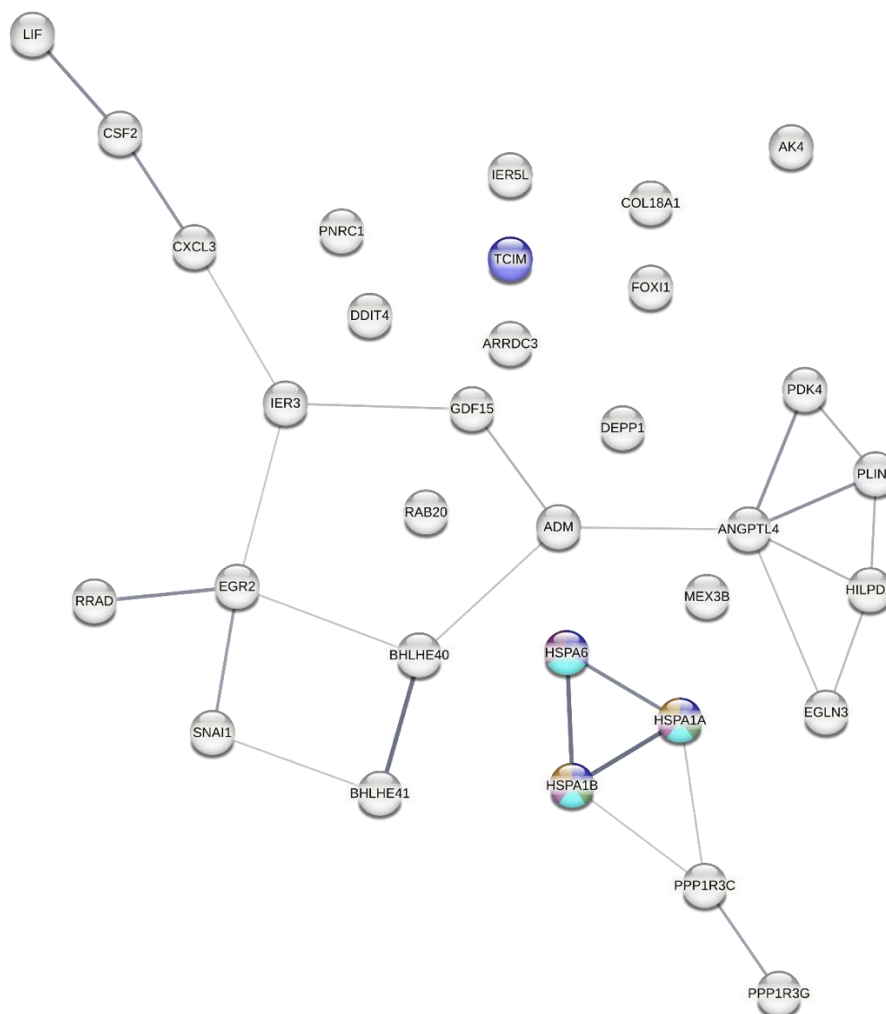


GO-term	Beschreibung	Counts im Netzwerk	Stärke	Signal	FDR
GO:0032496	Anwort auf Lipopolysaccharide	11 von 314	1,16	1,42	6,96E-07
GO:0034605	Zelluläre Antwort auf Hitze	5 von 48	1,63	1,30	9,41E-05
GO:0071376	Zelluläre Antwort auf CRH-Stimulus	3 von 5	2,39	1,27	2,60E-04
GO:0071396	Zelluläre Antwort auf Lipide	12 von 502	0,99	1,14	3,31E-06
GO:0048545	Antwort auf Steroidhormone	9 von 285	1,11	1,14	2,40E-05

Abbildung 29: Protein-Protein-Interaktionen der DEGs der DACs. Die Knoten (*Nodes*) repräsentieren Proteine, während die Verbindungslinien (*Edges*) ihre Interaktionen anzeigen. Die Dicke der Linien korreliert mit der Stärke der experimentell oder bioinformatisch vorhergesagten Interaktion. Farblich hervorgehobene Proteine deuten auf funktionelle *Cluster* oder *Pathway*-Anreicherungen hin, die auf eine gemeinsame regulatorische oder funktionelle Beteiligung hinweisen.

Unter der Gen Ontologie „biologischer Prozess“ lassen sich bei den DPCs (s. Abbildung 30) folgende Proteine zu bestimmten Überbegriffen zuordnen: TCIM, HSPA1A, HSPA1B und HSPA6 zu zelluläre Antwort auf Hitze, HSPA1A und HSPA1B zu positive Regulation der Endoribonuklease-Aktivität und zu positive Regulation des *Nucleotide-binding Oligomerization Domain Containing 2* Signalwegs, HSPA1A, HSPA1B und HSPA6 zu Protein *refolding* und zu Chaperon Cofaktor-abhängiges Protein *refolding*.

Die Protein-Protein-Interaktionen von DPCs und DACs verdeutlichen die Unterschiede zwischen den beiden Zellisolationstypen. Während bei den DACs eine deutlich stärkere Vernetzung mit vielen Genen vorhanden ist, sind bei den DPCs nur 2 kleine *Cluster* und viele Proteine, die gar keine *Edges* aufweisen, festzustellen. Dies deutet auf eine stärkere Antwort der DACs auf den bakteriellen Reiz hin als bei den DPCs.



<i>GO-term</i>	Beschreibung	<i>Counts im Netzwerk</i>	<i>Stärke</i>	<i>Signal</i>	<i>FDR</i>
GO:0034605	Zelluläre Antwort auf Hitze	4 von 48	1,71	0,72	1,24E-02
GO:1902380	Pos. Regulation der Endoribonuklease-Aktivität	2 von 2	2,79	0,62	2,92E-02
GO:0042026	Protein <i>refolding</i>	3 von 25	1,87	0,60	2,92E-02
GO:0051085	Chaperon Cofaktor-abhängiges Protein <i>refolding</i>	3 von 31	1,78	0,59	2,92E-02
GO:0070434	Pos. Regulation des <i>nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i> Signalwegs	2 von 5	2,39	0,58	3,63E-02

Abbildung 30: Protein-Protein-Interaktionen der DEGs der DPCs. Die Knoten (*Nodes*) repräsentieren Proteine, während die Verbindungslinien (*Edges*) ihre Interaktionen anzeigen. Die Dicke der Linien korreliert mit der Stärke der experimentell oder bioinformatisch vorhergesagten Interaktion. Farblich hervorgehobene Proteine deuten auf funktionelle *Cluster* oder *Pathway*-Anreicherungen hin, die auf eine gemeinsame regulatorische oder funktionelle Beteiligung hinweisen.

4.2 qPCR

Die qPCRs belegen, dass bei acht ausgewählten Genen *HILPDA*, *CSF2*, *RAB20*, *AK4*, *CXCL2*, *IL6*, *TXNIP* und *RASL11B* sowohl bei den DACs als auch den DPCs signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den mit *S. mutans* stimulierten Gruppen gegen die mit inaktivierten, γ -bestrahlten *S. mutans* stimulierten vorliegen (s. Abbildung 31). Während *HILPDA*, *CSF2*, *RAB20*, *AK4*, *CXCL2* und *IL6* signifikant hochreguliert sind in der bac-Gruppe gegen die gamma-Gruppe, sind *TXNIP* und *RASL11B* signifikant herunterreguliert in der bac-Gruppe gegen die gamma-Gruppe.

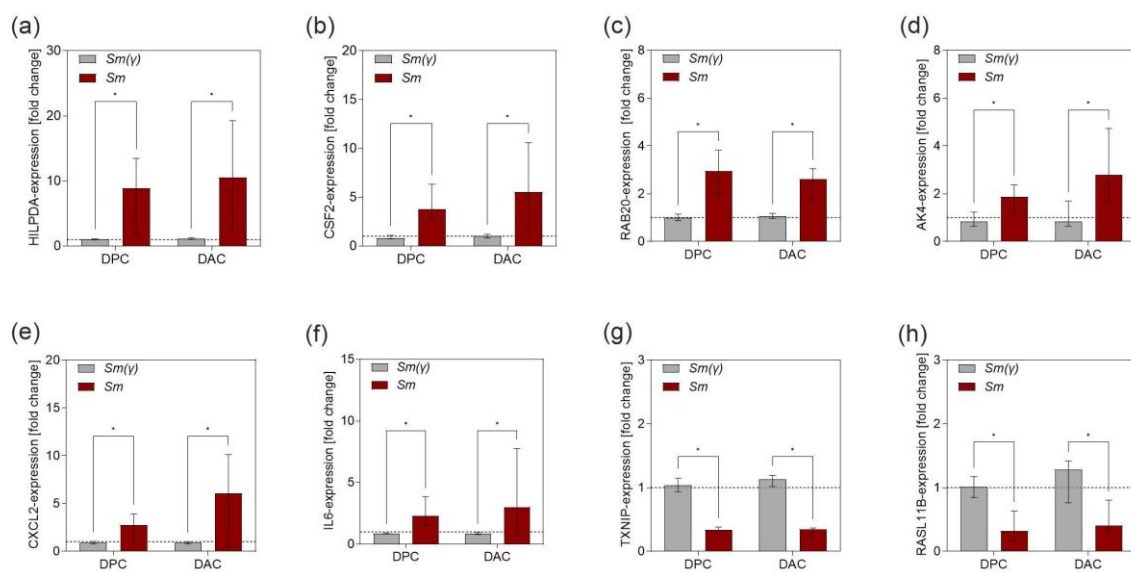


Abbildung 31: Darstellung der qPCR-Ergebnisse pro Gen mit Wilcoxon-Test. Die Gene a) *HILPDA*, b) *CSF-2*, c) *RAB20*, d) *AK4*, e) *CXCL2*, f) *IL6*, g) *TXNIP* und h) *RASL11B* sind nach ihrer Expressionsstärke mittels *Fold change* (y-Achse) aufgetragen. Auf der x-Achse sind die beiden Isolationsregionen DPC (links) und DAC (rechts) dargestellt, der graue Balken entspricht hierbei den Gruppen gamma gegen ctr, der rote bac gegen ctr. Die Höhe der Balken entspricht dem Median der Daten, der Fehlerbalken gibt den Interquartilsabstand an. Die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gemäß paarweisem Wilcoxon-Test. Die gestrichelte Linie entspricht, als Referenz gemäß den unbehandelten Proben, einem *Fold change* von 1.

5 Diskussion

Das Ziel der Arbeit war es, zu ergründen, welche Auswirkungen die Konfrontation dentaler humaner Pulpazellen (DPCs) und humaner Zellen der Pulpa-Dentin-Grenzschicht (DACs) mit *S. mutans* auf ihr Transkriptom hat und dabei Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Reaktion bzw. Signalgebung zu identifizieren.

Die zugrundeliegende Nullhypothese war, dass es keine Unterschiede im Transkriptionsprofil verglichen mit dem Normalzustand und zwischen den beiden Isolationsregionen gibt.

Für diesen Zweck wurde eine *Bulk* RNA-Sequenzierung an humanen Pulpazellen aus dem Kokulturmodell in verschiedenen Varianten durchgeführt (*S. mutans* aktiviert/inaktiviert, Kontrollgruppen ohne Kokultivierung).

5.1 Zusammenfassung und Arbeitshypothese

Wie die Hauptkomponentenanalyse (PCA) (s. Abbildung 15) und die *Volcano-Plots* (s. Abbildung 19, Abbildung 20) aufzeigen, existieren signifikante Unterschiede in der Transkriptionsantwort der Zellen aus den beiden Isolationsregionen (DACs und DPCs) auf den bakteriellen Stimulus. Somit kann die Nullhypothese verworfen werden. Der γ -bestrahlte *S. mutans* hatte dagegen kaum Effekte auf das Genexpressionsprofil der Zellen. Eine genauere Betrachtung der bestrahlten Bakterien bezüglich der Effekte der γ -Strahlung auf ihre Oberflächenstrukturen und Membranbestandteile ist in Zukunft sinnvoll, um Rückschlüsse über die Gründe dieser Inaktivierung ziehen zu können. Es liegt aber der Verdacht nahe, dass für eine zelluläre Antwort vitale bakterielle Erreger nötig sind, die zur Synthese neuer Botenstoffe und Moleküle in Reaktion auf den Kontakt mit den Pulpazellen fähig sind. Eine Studie mit hitzeinaktivierten Bakterien kam, in Bezug auf die CXCL10-Sekretion der Pulpazellen im Kontakt zu Bakterien, zu einem ähnlichen Urteil (147).

Die Analyse der differentiell exprimierten Gene (DEGs) offenbarte eine signifikante Hochregulation entzündungsassoziierter Gene wie *HSPA6* (*Heat Shock Protein A6*), *CXCL2* (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 2*), *IL6* (Interleukin 6), *DDIT4* (auch REDD1 genannt), *DEPP1* (*Decidual Protein Induced By Progesterone 1*) und *HILPDA* (*Hypoxia Inducible Lipid Droplet Associated*). Diese Gene sind zentrale Akteure in Entzündungs- und Stressreaktionen, wie unter 5.3.1. später genauer beschrieben wird. Auffällig ist, dass die DACs insgesamt eine stärkere qualitative und quantitative Hochregulation von DEGs wie *IL6* zeigten (s. Tabelle 9), was auf eine intensivere zelluläre Stressantwort und Aktivierung des erworbenen

Immunsystems hinweist (148). Dies könnte auf die räumliche Nähe der DACs zum Dentin und damit zu potenziell eindringenden Pathogenen in ihrem nativen Umfeld, dem vitalen Zahn, zurückzuführen sein, die auch in diesem *in vitro* Experiment aus den spezifischen Expressionsmustern der Zellen ersichtlich werden. DPCs, die weiter zentral im Pulpagewebe lokalisiert sind, zeigten hingegen eine vermehrte Aktivierung von Genen, die an der Angiogenese und dem immunmodulatorischen *Shift* beteiligt sind, wie *RAB20* und *ANGPTL4* (*Angiopoietin-like 4*). Dies spricht für eine eher vital- und funktionserhaltende Rolle dieser Zellen in der entzündeten Pulpa (s. Tabelle 9).

Die Validität der *Bulk* RNA-Sequenzierungsdaten konnte anhand selektierter Gene mittels qPCR (s. Abbildung 31) überprüft werden. Dies waren *HILPDA*, *CSF2*, *RAB20*, *AK4*, *CXCL2*, *IL6*, *TXNIP* und *RASL11B*.

5.2 Methodische Überlegungen

Die in dieser Arbeit eingesetzte Methode der *Bulk* RNA-Sequenzierung bietet den Vorteil, große Mengen an Transkriptomdaten zu generieren und differenzielle Genexpressionsmuster präzise zu erfassen. Durch die großen Datenmengen der verschiedenen Spender bietet diese Methode statistisch robuste Ergebnisse. Dennoch sind mit diesem Ansatz auch Einschränkungen verbunden. Da die *Bulk* RNA-Sequenzierung keine Einzelzellauflösung bietet, bleibt unsicher, welche Zellsubpopulationen innerhalb der DACs und DPCs für die beobachteten Veränderungen verantwortlich sind. Eine ergänzende *Single-Cell*-RNA-Sequenzierung könnte in zukünftigen Studien eine differenziertere Analyse seltener Zell-Subtypen ermöglichen. Eine abschließende Antwort zur Rolle der Subodontoblasten kann somit nicht gegeben werden. Durch eine Variation der Zahl der eingesetzten Bakterien und Zellen kann auch die transkriptionelle Veränderung anders ausgeprägt sein. Die vorliegenden CFUs und Inkubationszeiten waren das Ergebnis von Vorexperimenten mit der Absicht, eine möglichst starke Zellreaktion hervorzurufen. Diese wurde anhand des IL-6-Spiegels mittels ELISA evaluiert.

Das verwendete Kokulturmodell simuliert die bakterielle Exposition der Pulpazellen unter *in vitro*-Bedingungen. Dabei wurde der vitale und γ -bestrahlte *S. mutans*, als klassischer Vertreter der grampositiven Karieserreger, verwendet, um den Einfluss der bakteriellen Vitalität auf die Zellantwort zu bewerten. Der Vorteil dieses Modells liegt in der einfachen Handhabung und der präzisen Kontrolle der Kulturbedingungen. Eine Limitation ist jedoch, dass es die komplexen *in vivo*-Bedingungen, wie die Interaktion mit dem nicht ortsständigen erworbenen

Immunsystem und anderen Zellen der Pulpa, nicht vollständig abbildet (91). Dazu zählen auch die spezifischen Zell-Zell-Kontakte, wie sie normalerweise im dreidimensionalen Fasernetzwerk der Pulpa vorliegen. Im Gegensatz dazu sind *in vivo*-Modelle oft durch das Gegenteil in ihrer Aussagekraft begrenzt: Zu viele Einflussfaktoren senken die Spezifität der Rückschlüsse, die aus den gewonnenen Daten gezogen werden kann (91). Zudem sind Versuchsaufbauten mit Tieren ethisch komplex und finanziell aufwändig und der Umgang mit absolut keimfreien Testtieren sehr anspruchsvoll (91). In dieser Arbeit wurde der Weg eines *in vitro*-Experimentes gewählt, da der Fokus auf der isolierten Betrachtung der Reaktion der kultivierten pulpalen Zellen mit *S. mutans* lag. Mit den erhobenen Daten als Basislinie lassen sich im Abgleich mit zukünftigen *in vivo*-Studien Rückschlüsse auf zusätzliche Einflussfaktoren ziehen.

Mit Blick auf die experimentellen Bedingungen und verwendeten Medien lässt sich feststellen, dass der Glukoseverbrauch im Zellmedium Auswirkungen auf die Ergebnisse gehabt haben könnte, da ein Mangel an Glukose auch zu Stressreaktionen in den Zellen führt. Jedoch kann der Effekt durch Erkenntnisse aus anderen Arbeiten als minimal betrachtet werden (30).

Der von der Forschungsgruppe etablierte experimentelle Aufbau zur Gewinnung der Transkriptomdaten stellt eine reproduzierbare Methode, als eine Alternative zur sonst häufig angewandten enzymatischen Verdauung und Zellsortierung mittels *Fluorecence-Activated Cell Sorting* (FACS) oder Ähnlichem, dar. Diese Art der Zellgewinnung wird aufgrund der Manipulation des nativen Zellzustands von einigen Forschern zunehmend kritisch gesehen (149). Wichtig für die Aussagekraft der Daten ist auch eine niedrige Zellpassage, wie sie in diesem Versuchsaufbau durch die direkte Zellgewinnung aus den Molaren und möglichst geringfügige Expansion gewährleistet ist (2-3 Passagen). Durch die Isolation der DPCs und DACs aus den gleichen Spendern ist die Vergleichbarkeit der Daten erhöht, zudem ist durch die vergleichsweise große Anzahl an Spendern (n=6) und die Durchführung der Isolation in Triplikaten eine robuste und hohe Aussagekraft gegeben. Die manuelle Trennung des Pulpakerns von der Pulpawand ist zwar reproduzierbar und zuverlässig durchführbar (143), eine gewisse fehlerhafte Extraktion der Zellen der jeweils anderen Isolationsregion ist aber nicht auszuschließen. Da die Analyse der Transkriptomdaten aber zwei für DACs und DPCs differenzierbare Expressionsmuster mit eigenen spezifischen DEGs ergab, ist diese technische Unschärfe als geringfügig zu betrachten.

5.3 Interpretation und Implikationen

Es herrscht nach wie vor geringes Wissen über die Zellen der Subodontoblastenregion, zu denen auch die Höhlzellen zählen. Diese finden sich vermehrt in der von uns definierten Isolationsregion der DACs, eine relevante Differenzierung zu den DPCs.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen in Übereinstimmung mit bestehenden Studien, die die entzündliche Reaktion der Zahnpulpa auf bakterielle Infektionen untersuchen. So bestätigen bereits frühere Untersuchungen, dass *S. mutans* als „Leitkeim“ der Karies eine starke entzündliche Antwort in Pulpazellen induzieren kann (150, 151). Besonders die Aktivierung des HIF1-Signalwegs als Reaktion auf hypoxische bzw. inflammatorische Bedingungen wurde auch in anderen Studien beschrieben (87–89). Der HIF1-Signalweg, der in den DACs und DPCs unterschiedlich reguliert war (s. Abbildung 28), spielt eine zentrale Rolle in der Anpassung der Zellen an hypoxische Bedingungen, wie sie bei einer fortschreitenden Entzündung der Pulpa auftreten.

Ein wesentlicher Unterschied zu früheren Arbeiten ist jedoch die Differenzierung der Genexpressionsmuster zwischen DACs und DPCs. Während DACs, die den Pulpawänden anliegen, eine stärkere Expression proinflammatorischer Marker für die erworbene Immunantwort wie CXCL2 und CXCL8 aufwiesen, zeigten DPCs eine höhere Aktivierung von Genen der angeborenen Immunantwort wie *RAB20* (s. Abbildung 21, Abbildung 23). Diese Unterschiede lassen auf eine positions- oder kompartimentspezifische Anpassung der Pulpazellen an bakterielle Reize schließen (s. Abbildung 15).

5.3.1 Beschreibung wichtiger, hochregulierter DEGs

Beim Isolationsregion-übergreifenden Vergleich der verschiedenen Ergebnisse sind einige Gene wiederkehrend feststellbar. Dabei handelt es sich um *AK4*, *ANGPTL4*, *CSF2*, *CXCL2*, *DDIT4*, *DEPP1*, *HILPDA*, *HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA6*, *IL6*, *PPP1R3G* und *RAB20*. Im Folgenden soll der aktuelle Kenntnisstand über diese Gene aufgezeigt werden.

Die Adenylatkinase 4 (AK4) ist ein Enzym in der mitochondrialen Matrix, das die Homeostase der Zellnukleotide durch den Transfer von Phosphatgruppen, beispielsweise zwischen ATP und ADP, reguliert. Es wird berichtet, dass es an der Aktivierung von proinflammatorischen M1-Makrophagen, aber nicht der der antiinflammatorischen M2-Makrophagen mitwirkt. Zudem reguliert es die Expression der Entzündungsgene *IL1 β* , *IL6*, *TNF α* , *NOS2*, *NOX2* und *HIF1 α* in M1-Makrophagen (152).

Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) vermittelt die Inhibition der Lipoproteinlipase (LPL) Aktivität, was den Triglycerid-Metabolismus beeinflusst. Es scheint einen deutlichen, bidirektionalen Effekt in Entzündungsgeschehen zu besitzen, der einerseits durch eine erhöhte Produktion von ANGPTL4 im inflammierten Gewebe auffällt, aber auch durch die Reduktion der proinflammatorischen Effekte von gesättigten Fettsäuren (153). Die Funktion dieses Gens in der Entzündungsantwort verschiedener Gewebe ist noch nicht ganz erschlossen, da es auch verschiedene posttranslationale Modifikationen des Gens mit verschiedenen Fähigkeiten gibt. Es spielt auch bei der Angiogenese und vaskulären Permeabilität eine Rolle, wobei unsicher ist, ob es pro- oder antiproliferative Effekte auf Gefäße hat (153, 154). Eine Studie berichtet von der erhöhten Produktion von ANGPTL4 in der Nähe hypoxischer Nekrosezonen, was für die proangiogenetischen Eigenschaften spricht (155). Auch in der Kommunikation zwischen Keratinozyten und Endothelzellen konnte über die ANGPTL4-induzierte NO-Produktion mittels einer Integrin/JAK/STAT3-vermittelten Hochregulation der *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) im Epithel von Wunden eine Förderung der Heilungsprozesse bei diabetischen Mäusen festgestellt werden (156).

Der *Colony Stimulating Factor 2* (CSF2), auch GM-CSF genannt, ist ein Zytokin, dass das Wachstum und die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen stimuliert, einschließlich Granulozyten und Makrophagen. Es ist eine zentrale Schnittstelle in der Koordination zwischen angeborener und erworbener Immunantwort, da es von vielen Zelltypen wie Fibroblasten und Endothelzellen, aber auch von T- und B-Zellen sezerniert wird. Dadurch werden beispielsweise Phagozyten zur Entfernung von Pathogenen stimuliert. Eine Überexpression kann jedoch auch zu Zellschädigungen infolge einer überschießenden Immunantwort führen (157).

Auch *CXC Chemokine Ligand 2* (CXCL2) ist ein Chemokin, das Immunzellen wie neutrophile Granulozyten an Entzündungsstellen rekrutiert. Es ist auch bekannt als MIP-2 α oder GRO- β . Es wird beispielsweise bei Anwesenheit von LPS von Mastzellen und Gewebsmakrophagen sezerniert (158). Eine Studie fand heraus, dass die Stimulation mit LTA, einem wichtigen PAMP von *S. mutans*, die CXCL2-Produktion in odontoblasten-ähnlichen Zellen erhöhte, jedoch nicht in Fibroblasten (159). Dies ist auch in dieser Arbeit ersichtlich, CXCL2 findet sich unter den exklusiv hochregulierten DEGs der DACs (s. Tabelle 9), was die Theorie, dass die odontoblasten-ähnlichen Zellen (Höhlzellen) vermehrt unter den DACs zu finden sind, unterstreicht. Die Studie fand auch heraus, dass die Fibroblasten hingegen stärker als die odontoblasten-ähnlichen Zellen auf LPS gramnegativer Bakterien reagierten, etwa mit der

Bildung von CXCL11, das in späteren Stadien der Pulpitis auftritt, was für eine differenzierte Reaktion der Zellen im Pulpakern mit mehr Fibroblasten als in der Peripherie spricht (159).

Das *Damage Inducible Transcript 4* (DDIT4, auch REDD1 genannt) ist ein stressinduziertes Protein, das hemmend am mTOR-Signalweg partizipiert und somit Zellwachstum und Autophagie beeinflusst. Es ist zentral an der Reaktion auf DNA-Schäden und Hypoxie beteiligt. Interessanterweise ist DDIT4 auch an den atrophieauslösenden Effekten von Glukokortikoiden beteiligt. Eine Studie schlägt daher vor, DDIT4-Inhibitoren in Kombination mit Glukokortikoiden einzusetzen, um diese negativen Effekte abzuschwächen (160).

Das *Decidual Protein Induced By Progesterone 1* (DEPP1, auch C10orf10 genannt) ist ein Protein, das durch Fasten und Progesteron induziert wird und die Autophagie über FOXO3 und *Reactive Oxygen Species* (ROS) reguliert. Es ist mit der Genese einer Reihe verschiedener Tumor-Erkrankungen assoziiert. In einer Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass DEPP1 auch durch chronische HIF-Aktivierung am *Remodeling* bei chronischer kardialer Ischämie beteiligt ist (161–163). Durch seine Wirkung als Autophagie-Förderer könnte eine Hemmung dieses Gens somit eventuell den mit der Pulpanekrose verbundenen massiven Zelltod verlangsamen.

Hypoxia Inducible Lipid Droplet Associated (HILPDA) ist ein Hypoxie-induziertes Protein, das mit der Akkumulation von Triglyceriden in intrazellulären Lipidtröpfchen von Makrophagen verknüpft ist und den Lipidstoffwechsel beeinflusst. Dadurch werden diese proinflammatorischen Lipid-Vorläufer vermutlich schlechter verfügbar, wodurch die IL6-Produktion reduziert werden könnte (164). Ein Kokultur-Experiment mit HDPSCs und *E. faecalis* bzw. *P. gingivalis* zeigte, dass HILPDA auch durch Stimulation mit *P. gingivalis* signifikant erhöht war. Die Studie zeigte weiterhin, dass auch eine Reihe anderer Hypoxie-assoziiierter Gene wie *DDIT4* und *HIF1A* angereichert waren, obwohl, wie in unserer Studie, konstant suffiziente Sauerstoff-Konzentrationen vorlagen (165). Dies spricht für eine komplexere Beteiligung von Hypoxie-Genen an der Entzündungsregulation als nur bei reduzierter Sauerstoffsättigung.

Die *Heatshock*-Proteine HSPA1A, HSPA1B und HSPA6 sind Mitglieder der Hsp70-Familie, die als Chaperone bei der Proteinfaltung und dem Schutz vor Stress dienen. Sie sind Hitzeschockproteine, die bei Zellstress exprimiert werden und bei verschiedenen Krebsarten eine Rolle spielen (166–168).

Interleukin 6 (IL-6) ist ein multifunktionelles Zytokin mit pro- als auch antiinflammatorischen Eigenschaften. Es spielt eine zentrale Rolle bei Infektionen und Gewebeschäden und wird von

zahlreichen Zelltypen, unter anderem von Fibroblasten, produziert. Es fördert die Differenzierung und Regulation von B-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen, sowie die Sekretion von Akute-Phase-Proteinen wie dem Lipopolysaccharid-bindenden Protein (LBP). Es erhöht zudem die Gefäßpermeabilität, was bei der Pulpanekrose negative Aspekte hat, wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben. Es ist in der Pulpa durch grampositive Erreger und ihre PAMPs nachweislich hochreguliert. Durch die Induktion von Matrix-Metalloproteinasen verstärkt es vermutlich die Gewebeerstörung bei der Pulpitis und die klinischen Symptome wie Schmerz (169–171). Aufgrund seiner pleiotropen Wirkungen ist eine gezielte Hemmung von IL-6 nicht ohne schwer abschätzbare Folgen - stellt jedoch einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige Forschungsarbeiten dar (172).

PPP1R3G ist eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 1, die mit ihrer katalytischen Untereinheit, der Proteinphosphatase 1 gamma (PP1 γ), durch die Dephosphorylierung der *Receptor-Interacting Protein Kinase 1* (RIPK1) eine Schlüsselfunktion in der Regulation von Entzündungsprozessen und Zelltod übernimmt (173).

RAB20 ist eine GTPase, die an der Phagosomenreifung beteiligt ist und in der Immunantwort eine Rolle spielt. Ein Fehlen von RAB20 führt zu einer eingeschränkten intrazellulären Abtötung von Pathogenen. Zudem ist die Toleranz gegenüber bakteriellen Lipoproteinen durch RAB20 erhöht, was die Fusionierung der Erreger-enthaltenden Phagosomen mit den Lysosomen verbessert (174).

5.3.2 Beschreibung wichtiger, herunterregulierter DEGs

Zu den häufigsten herunterregulierten DEGs im Rahmen dieser Arbeit zählen *FLRT3*, *KCTD4*, *RASL11B* und *TXNIP*.

Fibronectine Leucine Rich Transmembrane Protein 3 (*FLRT3*) ist ein Gen, das an der Zelladhäsion und Signaltransduktion beteiligt ist, insbesondere im Nervensystem. Durch seine Herunterregulierung über TGF- β /SMAD4 wird in kolorektalen Tumoren die Aggressivität des Tumors erhöht (175).

Kalium *Channel Tetramerization Domain Containing 4* (*KCTD4*) ist ein Protein mit BTB/POZ-Domäne, das möglicherweise in die Transkriptionsregulation involviert ist (176). Eine Hochregulation des Gens ist mit Tumor-Metastasierung und der Calcium-Homöostase verbunden, wie eine Studie herausfand (177). Die genauen Funktionen dieses Gen sind weitgehend unverstanden.

RASL11B ist ein Mitglied der RAS-Superfamilie von GTPasen, dessen Funktion noch nicht vollständig verstanden ist. Es wurde bei der Reifung von THP1-Monozyten zu Makrophagen-ähnlichen Zellen entdeckt. Es könnte deshalb eine Aufgabe bei Immunreaktionen haben (178).

Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) spielt eine zentrale Rolle bei zellulärem Stress, Metabolismus und der Apoptose. Es inhibiert die antioxidative und antiapoptotische Wirkung von Thioredoxin. Dass es in unserer Studie herunterreguliert ist, wirft Fragen auf, da TXNIP unter anderem an der Bildung des *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptor Protein-3* (NLRP3) Inflammasoms beteiligt ist, was es als proinflammatorisches Gen charakterisiert (179). Genauere Untersuchungen seiner Funktion im Kontext der humanen dentalen Pulpazellen erscheinen somit sinnvoll.

5.3.3 Beschreibung wichtiger, nichtcodierender DEGs

Einige der wichtigsten DEGs aus der Sequenzierung waren nichtcodierende RNAs. Dies waren insbesondere *SNORD14E*, *AL158152.1*, *MIR22HG*, *MT-TQ* und *MT-TT*. Diese RNAs sind sehr häufig an der transkriptionellen Regulation codierender RNAs beteiligt und bieten somit einen interessanten Ansatz für indirektere Eingriffe in das Entzündungsgeschehen (180).

5.4 Ausblick und klinische Relevanz

Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten wertvolle Einblicke in die Mechanismen der Pulpitis und deren Modulation durch bakterielle Reize. Sie könnten für die Therapie der Pulpitis in zweierlei Weise von Interesse sein:

Der erste Ansatzpunkt ist die Suche nach aussagekräftigen Biomarkern zur korrekten Einteilung einer Pulpitis in reversibel und irreversibel. Dies könnte zur Vitalerhaltung vieler Zahnnerven, die durch ungenauere, klinische Kriterien einer irreversiblen Entzündung zugeordnet und entfernt wurden, beitragen. Die dafür nötige klinische Methodik steckt aber aufgrund des hohen technischen und finanziellen Aufwands, sowie einer fehlenden effizienten *in vivo*-Probeentnahmetechnik, bei der die Pulpa nicht devitalisiert werden darf, noch in den Kinderschuhen (181).

Zweitens könnten die gefundenen DEGs Hinweise auf Gene und Proteine liefern, die als immunmodulierende Zusätze in neuartigen Überkappungsmaterialien die aktuell eingesetzten übertreffen. Die Verwendung der derzeit verfügbaren Zemente wie MTA und Biodentine zeigt zwar höhere klinische Pulpa-Überlebensraten als bei Einsatz von Calcium-Hydroxid (182), aber das Ziel einer vollständigen Regeneration durch funktionsfähiges Pulpagewebe und

unsklerosiertes Dentin ist nach wie vor nicht erreicht. Eine epigenetische Modulation oder Checkpoint-Inhibition, wie wir sie in anderen Bereichen der Medizin, vorallem in der Tumorforschung sehen (183, 184), wäre auch für die Zahnmedizin wünschenswert, um diesem Ziel einen Schritt näher zu kommen (185). Mit Hinblick auf das differenzierbare Transkriptionsprofil der DACs und DPCs sollte sich diese Therapie auf einzelne Zell-Subtypen fokussieren, um Nebenwirkungen zu reduzieren und präzisere Reaktionen zu erzielen. So wäre eine gezielte Modulation des HIF1-Signalwegs denkbar, um Zellschäden zu reduzieren. Gleichzeitig könnte eine gezielte lokale Inhibition proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 die Schwere der Entzündung verringern. Auch der Einsatz von antimikrobiellen Substanzen, die spezifisch auf das Keimspektrum der kariogenen Pulpitis abzielen, könnte den bakteriellen Einfluss auf die Pulpa reduzieren.

Zukünftige Studien sollten den Fokus auf *Single-Cell*-Sequenzierungen zur genaueren Differenzierung der einzelnen Zell-Subtypen legen. *In vivo*-Modelle könnten sich als hilfreich erweisen, um die hier beschriebenen Mechanismen unter physiologischen Bedingungen zu bestätigen. Eine Erweiterung auf andere kariesassoziierte Bakterien, beispielsweise gramnegative *Escherichia coli*, könnte zudem zusätzliche Erkenntnisse über die Pulpareaktion liefern.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erweiterte Darstellung der ökologischen Plaquehypothese, modifiziert nach (19)	2
Abbildung 2: Modell der Biofilm-Kolonisation, modifiziert nach Kolenbrander et al. (26).	4
Abbildung 3: <i>S. mutans</i> in Kokultur mit Pulpafibroblasten, modifiziert nach (34).	5
Abbildung 4: Histologischer Schnitt durch Molaren mit tiefer Dentinkaries, HE-Färbung.	7
Abbildung 5: Histologischer Schnitt durch einen kariesfreien Molaren, HE-Färbung.	9
Abbildung 6: Ablauf einer klassischen <i>Library preparation</i> , modifiziert nach (97).	16
Abbildung 7: Reverse Transkription mit <i>Random Primern</i> , modifiziert nach (98).	17
Abbildung 8: Reparatur der Strang-Enden, 3'-Adenylierung und TA-Ligation, modifiziert nach (98).	18
Abbildung 9: <i>Bridge-Amplifikation</i> und <i>Cluster-Bildung</i> , Darstellung aus (106).	19
Abbildung 10: <i>Dual indexing</i> auf einer <i>paired-end Flow Cell</i> mit <i>Reverse Compliment</i> , Darstellung aus (108). 21	
Abbildung 11: Schemazeichnung Zellgewinnung aus extrahierten Molaren, erstellt mit (147, 148).	32
Abbildung 12: <i>Dispersion Plot</i> aller Daten nach DESeq2-Analyse.	41
Abbildung 13: Histogramm der p-Werte aller Daten nach DESeq2.	42
Abbildung 14: <i>MA Plot</i> aller Daten.	43
Abbildung 15: <i>PCA Plot</i> (PC1_PC2) der <i>variance stabilizing</i> (vst) Daten nach Korrektur des Donoreffektes. . 44	
Abbildung 16: Verteilung der Gene nach $\log_2FC$ (Vergleich der Testgruppen).	45
Abbildung 17: <i>Heatmap</i> der Top 20 hochregulierten Gene.	46
Abbildung 18: <i>Heatmap</i> der Top 20 herunterregulierten Gene.	47
Abbildung 19: <i>Volcano Plots</i> der DPCs, (a) <i>S. mutans</i> vs. Kontrolle, (b) γ -bestrahlter <i>S. mutans</i> vs. Kontrolle. 49	
Abbildung 20: <i>Volcano Plots</i> der DACs, (a) <i>S. mutans</i> vs. Kontrolle, (b) γ -bestrahlter <i>S. mutans</i> vs. Kontrolle. 50	
Abbildung 21: Venn Diagramm der hochregulierten DEGs (DPC vs. DAC).	51
Abbildung 22: Venn Diagramm der herunterregulierten DEGs (DPC vs. DAC)	54
Abbildung 23: <i>Heatmap</i> der Top 20 hochregulierten (links) und herunterregulierten (rechts) Gene der (a) DPCs und (b) DACs mit einem $\log_2FC > 1,5$ bzw. $\log_2FC < -1,5$ und einem $p_{adj} < 0,05$	58
Abbildung 24: Top angereicherte <i>Pathways</i> der (a) DPCs und der (b) DACs (gseGO).	60
Abbildung 25: Top 15 angereicherte <i>Pathways</i> der (a) DPCs und (b) DACs (MSigDB).	62
Abbildung 26: Top 15 angereicherte <i>Pathways</i> der (a) DPCs und (b) DACs (KEGG).	64
Abbildung 27: Darstellung des TNF-Signalwegs der a) DPCs und b) DACs nach KEGG-Analyse.	67
Abbildung 28: Darstellung des HIF1-Signalwegs der a) DPCs und b) DACs nach KEGG-Analyse.	71
Abbildung 29: Protein-Protein-Interaktionen der DEGs der DACs.	73

Abbildung 30: Protein-Protein-Interaktionen der DEGs der DPCs.	75
Abbildung 31: Darstellung der qPCR-Ergebnisse pro Gen mit Wilcoxon-Test.	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Bakterien und Zellen	22
Tabelle 2: Verwendete Materialien und Kits.....	22
Tabelle 3: Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Medien	26
Tabelle 5: qPCR <i>Primer</i>	28
Tabelle 6: qPCR <i>Housekeeper</i>	28
Tabelle 7: R Pakete und Software für die Datenauswertung	29
Tabelle 8: Liste der sechs Spender für die 36 experimentellen Gruppen der RNA-Isolationen.....	33
Tabelle 9: Listen der hochregulierten DEGs	51
Tabelle 10: Listen der herunterregulierten DEGs.....	54

Literaturverzeichnis

1. Thyvalikakath T, LaPradd M, Siddiqui Z, Duncan WD, Eckert G, Medam JK et al. Root Canal Treatment Survival Analysis in National Dental PBRN Practices. *Journal of Dental Research* 2022; 101(11):1328–34. doi: 10.1177/00220345221093936.
2. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Australian Dental Journal* 2007; 52(1 Suppl):S4-16. doi: 10.1111/j.1834-7819.2007.tb00525.x.
3. Awawdeh L, Hemaiddat K, Al-Omari W. Higher Maximal Occlusal Bite Force in Endodontically Treated Teeth Versus Vital Contralateral Counterparts. *J Endod* 2017; 43(6):871–5. doi: 10.1016/j.joen.2016.12.028.
4. Olgart L, Gazelius B, Sundström F. Intradental nerve activity and jaw-opening reflex in response to mechanical deformation of cat teeth. *Acta Physiol Scand* 1988; 133(3):399–406. doi: 10.1111/j.1748-1716.1988.tb08422.x.
5. Patel S, Bhuva B, Bose R. Present status and future directions: vertical root fractures in root filled teeth. *International Endodontic Journal* 2022; 55 Suppl 3(Suppl 3):804–26. doi: 10.1111/iej.13737.
6. Kocher T, Holtfreter B, Pitchika V, Kuhr K, Jordan RA. Entwicklung der Zahn- und Mundgesundheit in Deutschland von 1997 bis 2014. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2021; 64(7):782–92. doi: 10.1007/s00103-021-03345-6.
7. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3:17030. doi: 10.1038/nrdp.2017.30.
8. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ* 2005; 83(9):661–9.
9. Pitts NB, Twetman S, Fisher J, Marsh PD. Understanding dental caries as a non-communicable disease. *Br Dent J* 2021; 231(12):749–53. doi: 10.1038/s41415-021-3775-4.
10. Conrads G, About I. Pathophysiology of Dental Caries. *Monogr Oral Sci* 2018; 27:1–10. doi: 10.1159/000487826.

11. Opal S, Garg S, Jain J, Walia I. Genetic factors affecting dental caries risk. *Australian Dental Journal* 2015; 60(1):2–11. doi: 10.1111/adj.12262.
12. Schwendicke F, Dörfer CE, Schlattmann P, Foster Page L, Thomson WM, Paris S. Socioeconomic inequality and caries: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Dental Research* 2015; 94(1):10–8. doi: 10.1177/0022034514557546.
13. Hay DI. Salivary factors in caries models. *Adv Dent Res* 1995; 9(3):239–43. doi: 10.1177/08959374950090030801.
14. Marshall GW, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent* 1997; 25(6):441–58. doi: 10.1016/s0300-5712(96)00065-6.
15. Paris S, Meyer-Lückel H. Paradigmenwechsel. In: Meyer-Lückel H, Alkilzy M, Hrsg. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis*. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2012. S. 71–5 (ZMK Praxis).
16. Baker JL, Mark Welch JL, Kauffman KM, McLean JS, He X. The oral microbiome: diversity, biogeography and human health. *Nat Rev Microbiol* 2024; 22(2):89–104. doi: 10.1038/s41579-023-00963-6.
17. Valm AM. The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease. *Journal of Molecular Biology* 2019; 431(16):2957–69. doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.016.
18. Chawhuaveang DD, Yu OY, Yin IX, Lam WY-H, Mei ML, Chu C-H. Acquired salivary pellicle and oral diseases: A literature review. *Journal of Dental Sciences* 2021; 16(1):523–9. doi: 10.1016/j.jds.2020.10.007.
19. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73(3):407-50, Table of Contents. doi: 10.1128/MMBR.00014-09.
20. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000 2006; 42:47–79. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x.
21. Jakubovics NS. Intermicrobial Interactions as a Driver for Community Composition and Stratification of Oral Biofilms. *Journal of Molecular Biology* 2015; 427(23):3662–75. doi: 10.1016/j.jmb.2015.09.022.

22. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(7):471–80. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2381>.
23. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song Z, Moser C, Jensen PØ et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 2011; 3(2):55–65. doi: 10.4248/IJOS11026.
24. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019; 8:76. doi: 10.1186/s13756-019-0533-3.
25. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology* 2005; 32 Suppl 6(s6):7–15. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00790.x.
26. Li Z, Nair SK. Quorum sensing: how bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein Sci* 2012; 21(10):1403–17. doi: 10.1002/pro.2132.
27. Wright PP, Ramachandra SS. Quorum Sensing and Quorum Quenching with a Focus on Cariogenic and Periodontopathic Oral Biofilms. *Microorganisms* 2022; 10(9). doi: 10.3390/microorganisms10091783.
28. Nagi M, Chapple ILC, Sharma P, Kuehne SA, Hirschfeld J. Quorum Sensing in Oral Biofilms: Influence on Host Cells. *Microorganisms* 2023; 11(7). doi: 10.3390/microorganisms11071688.
29. Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 2017; 551(7680):313–20. doi: 10.1038/nature24624.
30. Akamp T, Rosendahl A, Galler KM, Wölflick M, Buchalla W, Widbiller M. An in vitro coculture approach to study the interplay between dental pulp cells and *Streptococcus mutans*. *International Endodontic Journal* 2024; 57(2):164–77. doi: 10.1111/iej.13995.
31. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr* 2019; 7(1). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
32. Huis in 't Veld JH, Backer Dirks O. Intracellular polysaccharide metabolism in *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1978; 12(5):243–9. doi: 10.1159/000260340.

33. Jackson RJ, Lim DV, Dao ML. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol* 1997; 34(1):49–54. doi: 10.1007/s002849900143.
34. Waterhouse JC, Russell RRB. Dispensable genes and foreign DNA in *Streptococcus mutans*. *Microbiology (Reading)* 2006; 152(Pt 6):1777–88. doi: 10.1099/mic.0.28647-0.
35. Meng P, Lu C, Zhang Q, Lin J, Chen F. Exploring the Genomic Diversity and Cariogenic Differences of *Streptococcus mutans* Strains Through Pan-Genome and Comparative Genome Analysis. *Curr Microbiol* 2017; 74(10):1200–9. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-017-1305-z>.
36. Bedoya-Correa CM, Rincón Rodríguez RJ, Parada-Sanchez MT. Genomic and phenotypic diversity of *Streptococcus mutans*. *J Oral Biosci* 2019; 61(1):22–31. doi: 10.1016/j.job.2018.11.001.
37. Buchalla W. Histologisches und klinisches Erscheinungsbild der Karies. In: Meyer-Lückel H, Alkilzy M, Hrsg. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis*. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2012. S. 43–69 (ZMK Praxis).
38. Wenz H-J, Hellwig E, Lehmann KM. *Zahnärztliche Propädeutik: Einführung in die Zahnheilkunde*. 14. aktualisierte Auflage. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag; 2019.
39. Cordero DR, Brugmann S, Chu Y, Bajpai R, Jame M, Helms JA. Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development. *Am J Med Genet A* 2011; 155A(2):270–9. doi: 10.1002/ajmg.a.33702.
40. Goldberg M. *The Dental Pulp: Biology Pathology and Regenerative Therapies*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014.
41. 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(1):13–27. doi: 10.1177/154411130401500103.
42. Gotjamanos T. Cellular organization in the subodontoblastic zone of the dental pulp. I. A study of cell-free and cell-rich layers in pulps of adult rat and deciduous monkey teeth. *Arch Oral Biol* 1969; 14(9):1007–10. doi: 10.1016/0003-9969(69)90070-3.
43. Roßgardt J, Heilen LB, Büttner K, Dern-Wieloch J, Vogelsberg J, Staszyk C. The Equine Dental Pulp: Analysis of the Stratigraphic Arrangement of the Equine Dental Pulp in Incisors and Cheek Teeth. *Vet Sci* 2022; 9(11). doi: 10.3390/vetsci9110602.

44. Zahnpulpa. In: Steiniger B, Schwarzbach H, Stachniss V, Hrsg. Mikroskopische Anatomie der Zähne und des Parodonts. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2010.
45. Zhao L, Ito S, Arai A, Udagawa N, Horibe K, Hara M et al. Odontoblast death drives cell-rich zone-derived dental tissue regeneration. *Bone* 2021; 150:116010. doi: 10.1016/j.bone.2021.116010.
46. Couve E, Schmachtenberg O. Schwann Cell Responses and Plasticity in Different Dental Pulp Scenarios. *Front Cell Neurosci* 2018; 12:299. doi: 10.3389/fncel.2018.00299.
47. Álvarez-Vásquez JL, Castañeda-Alvarado CP. Dental Pulp Fibroblast: A Star Cell. *J Endod* 2022; 48(8):1005–19. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239922003417>.
48. Kawashima N, Okiji T. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom (Kyoto)* 2016; 56(4):144–53. doi: 10.1111/cga.12169.
49. Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol* 2012; 57(9):1165–75. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.03.005.
50. Couve E. Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol* 1986; 31(10):643–51. doi: 10.1016/0003-9969(86)90093-2.
51. El Karim IA, Linden GJ, Curtis TM, About I, McGahon MK, Irwin CR et al. Human odontoblasts express functional thermo-sensitive TRP channels: implications for dentin sensitivity. *Pain* 2011; 152(10):2211–23. doi: 10.1016/j.pain.2010.10.016.
52. Magloire H, Couble M-L, Thivichon-Prince B, Maurin J-C, Bleicher F. Odontoblast: a mechano-sensory cell. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009; 312B(5):416–24. doi: 10.1002/jez.b.21264.
53. Balic A, Perver D, Pagella P, Rehrauer H, Stadlinger B, Moor AE et al. Extracellular matrix remodelling in dental pulp tissue of carious human teeth through the prism of single-cell RNA sequencing. *Int J Oral Sci* 2023; 15(1):30. doi: 10.1038/s41368-023-00238-z.
54. Wisithphrom K, Murray PE, Windsor LJ. Interleukin-1 alpha alters the expression of matrix metalloproteinases and collagen degradation by pulp fibroblasts. *J Endod* 2006; 32(3):186–92. doi: 10.1016/j.joen.2005.10.055.

55. Gu N, Wang Y, Sun G, Zou H, Yang N, Sun X et al. Exploring wound management in dental pulp: Utilizing single-cell RNA sequencing for global transcriptomic analysis in healthy and inflamed pulpal tissues. *Int Wound J* 2024; 21(3):e14804. doi: 10.1111/iwj.14804.
56. Edanami N, Yoshiba N, Ohkura N, Takeuchi R, Tohma A, Noiri Y et al. Characterization of Dental Pulp Myofibroblasts in Rat Molars after Pulpotomy. *J Endod* 2017; 43(7):1116–21. doi: 10.1016/j.joen.2017.02.018.
57. Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol* 2008; 53(1):9–13. doi: 10.1016/j.archoralbio.2007.07.001.
58. Chmielewsky F, About I, Chung S-H. Pulp Fibroblasts Control Nerve Regeneration through Complement Activation. *Journal of Dental Research* 2016; 95(8):913–22. doi: 10.1177/0022034516643065.
59. Chmielewsky F, Jeanneau C, Laurent P, About I. Pulp fibroblasts synthesize functional complement proteins involved in initiating dentin-pulp regeneration. *Am J Pathol* 2014; 184(7):1991–2000. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.04.003.
60. Chmielewsky F, Jeanneau C, Dejou J, About I. Sources of dentin-pulp regeneration signals and their modulation by the local microenvironment. *J Endod* 2014; 40(4 Suppl):S19-25. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.012.
61. Denu RA, Nemcek S, Bloom DD, Goodrich AD, Kim J, Mosher DF et al. Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. *Acta Haematol* 2016; 136(2):85–97. doi: 10.1159/000445096.
62. Gaudin A, Renard E, Hill M, Bouchet-Delbos L, Bienvenu-Louvet G, Farges J-C et al. Phenotypic analysis of immunocompetent cells in healthy human dental pulp. *J Endod* 2015; 41(5):621–7. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.005.
63. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci* 2021; 22(3). doi: 10.3390/ijms22031480.
64. Hildebrand C, Fried K, Tuisku F, Johansson CS. Teeth and tooth nerves. *Prog Neurobiol* 1995; 45(3):165–222. doi: 10.1016/0301-0082(94)00045-j.

65. Paik SK, Lee DS, Kim JY, Bae JY, Cho YS, Ahn DK et al. Quantitative ultrastructural analysis of the neurofilament 200-positive axons in the rat dental pulp. *J Endod* 2010; 36(10):1638–42. doi: 10.1016/j.joen.2010.05.005.
66. Paik SK, Park KP, Lee SK, Ma SK, Cho YS, Kim YK et al. Light and electron microscopic analysis of the somata and parent axons innervating the rat upper molar and lower incisor pulp. *Neuroscience* 2009; 162(4):1279–86. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452209009580>.
67. Bender IB. Pulpal pain diagnosis--a review. *J Endod* 2000; 26(3):175–9. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009923990560951X>.
68. Olgart L. Neural Control of Pulpal Blood Flow. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1996; 7(2):159–71. doi: 10.1177/10454411960070020401.
69. Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham T-TT, Darveau RP, Dale BA. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22(1):5–13. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00310.x.
70. Butler WT, Bhowm M, Brunn JC, D'Souza RN, Farach-Carson MC, Happonen RP et al. Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-kDal dentin sialoprotein (DSP). *Matrix* 1992; 12(5):343–51. doi: 10.1016/s0934-8832(11)80030-2.
71. Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* 1995; 39(1):169–79.
72. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res* 1990; 5(7):717–23. doi: 10.1002/jbmr.5650050708.
73. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol* 2000; 45(11):1013–6. doi: 10.1016/s0003-9969(00)00075-3.
74. Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, Sakai H. Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. *Arch Oral Biol* 1995; 40(7):609–14. doi: 10.1016/0003-9969(95)00024-j.
75. Renard E, Gaudin A, Bienvenu G, Amiaud J, Farges JC, Cuturi MC et al. Immune Cells and Molecular Networks in Experimentally Induced Pulpitis. *Journal of Dental Research* 2016; 95(2):196–205. doi: 10.1177/0022034515612086.

76. Holder MJ, Wright HJ, Couve E, Milward MR, Cooper PR. Neutrophil Extracellular Traps Exert Potential Cytotoxic and Proinflammatory Effects in the Dental Pulp. *J Endod* 2019; 45(5):513-520.e3. doi: 10.1016/j.joen.2019.02.014.
77. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* 2011; 12(11):1035–44. doi: 10.1038/ni.2109.
78. Carrouel F, Staquet M-J, Keller J-F, Baudouin C, Msika P, Bleicher F et al. Lipopolysaccharide-binding protein inhibits toll-like receptor 2 activation by lipoteichoic acid in human odontoblast-like cells. *J Endod* 2013; 39(8):1008–14. doi: 10.1016/j.joen.2013.04.020.
79. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(6):a001651. doi: 10.1101/cshperspect.a001651.
80. Yeung YT, Aziz F, Guerrero-Castilla A, Arguelles S. Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. *Curr Pharm Des* 2018; 24(14):1449–84. doi: 10.2174/1381612824666180327165604.
81. Hellenthal KEM, Brabenec L, Wagner N-M. Regulation and Dysregulation of Endothelial Permeability during Systemic Inflammation. *Cells* 2022; 11(12). doi: 10.3390/cells11121935.
82. Heyeraas KJ, Berggreen E. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10(3):328–36. doi: 10.1177/10454411990100030501.
83. Matthews B, Vongsavan N. Interactions between neural and hydrodynamic mechanisms in dentine and pulp. *Arch Oral Biol* 1994; 39 Suppl:87S-95S. doi: 10.1016/0003-9969(94)90193-7.
84. Kim S, Dörscher-Kim JE, Liu M, Grayson A. Functional alterations in pulpal microcirculation in response to various dental procedures and materials. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88 Suppl 1:65–71.
85. Yu CY, Boyd NM, Cringle SJ, Alder VA, Yu DY. Oxygen distribution and consumption in rat lower incisor pulp. *Arch Oral Biol* 2002; 47(7):529–36. doi: 10.1016/s0003-9969(02)00036-5.

86. Ma M. Role of Hypoxia in Mesenchymal Stem Cells from Dental Pulp: Influence, Mechanism and Application. *Cell Biochem Biophys* 2024; 82(2):535–47. doi: 10.1007/s12013-024-01274-0.
87. Aranha AM, Zhang Z, Neiva KG, Costa CA, Hebling J, Nör JE. Hypoxia Enhances the Angiogenic Potential of Human Dental Pulp Cells. *J Endod* 2010; 36(10):1633–7. doi: 10.1016/j.joen.2010.05.013.
88. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med* 2007; 80(2):51–60.
89. Oda T, Hirota K, Nishi K, Takabuchi S, Oda S, Yamada H et al. Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2006; 291(1):C104-C113. doi: 10.1152/ajpcell.00614.2005.
90. Jeanneau C, Rufas P, Rombouts C, Giraud T, Dejou J, About I. Can Pulp Fibroblasts Kill Cariogenic Bacteria? Role of Complement Activation. *Journal of Dental Research* 2015; 94(12):1765–72. doi: 10.1177/0022034515611074.
91. Roberts JL, Maillard J-Y, Waddington RJ, Denyer SP, Lynch CD, Sloan AJ. Development of an ex vivo coculture system to model pulpal infection by *Streptococcus anginosus* group bacteria. *J Endod* 2013; 39(1):49–56. doi: 10.1016/j.joen.2012.09.005.
92. Westermann AJ, Vogel J. Cross-species RNA-seq for deciphering host-microbe interactions. *Nat Rev Genet* 2021; 22(6):361–78. doi: 10.1038/s41576-021-00326-y.
93. Wolf J, Lapp T, Reinhard T, Agostini H, Schlunck G, Lange C. Webbasierte Genexpressionsanalysen – auf dem Weg zur molekularen Entschlüsselung gesunder und erkrankter Augengewebe. *Ophthalmologie* 2022; 119(9):929–36. doi: 10.1007/s00347-022-01592-9.
94. Illumina. Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation Reference Guide (1000000124518) [Stand: 27.03.2024]. Verfügbar unter: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/illumina_prep/RNA/illumina-stranded-mrna-reference-guide-1000000124518-02.pdf.
95. Lexogen. RNA LEXICON Chapter #1 – Introduction to Next-Generation RNA Sequencing. Lexogen 05.05.2021 [Stand: 03.04.2024]. Verfügbar unter: <https://www.lexogen.com/rna-lexicon-introduction-to-next-generation-rna-sequencing/>.

96. Lexogen. RNA LEXICON Chapter #7 – RNA-Seq Library Preparation: Molecular Biology Basics. Lexogen 23.08.2021 [Stand: 03.04.2024]. Verfügbar unter: <https://www.lexogen.com/rna-lexicon-rna-seq-library-preparation-molecular-biology-basics/>.
97. Stranded Versus Non-Stranded RNA-Seq | Azenta Life Sciences; 2024 [Stand: 12.02.2024]. Verfügbar unter: <https://www.azenta.com/blog/stranded-versus-non-stranded-rna-seq>.
98. Lexogen. RNA LEXICON Chapter #1 – Introduction to Next-Generation RNA Sequencing. Lexogen 05.05.2021 [Stand: 12.02.2024]. Verfügbar unter: <https://www.lexogen.com/rna-lexicon-introduction-to-next-generation-rna-sequencing/>.
99. Illumina. illumina-stranded-mrna-data-sheet-470-2020-002-deu [Stand: 12.02.2024]. Verfügbar unter: <https://sapac.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/illumina-stranded-mrna-data-sheet-470-2020-002-translations/illumina-stranded-mrna-data-sheet-470-2020-002-deu.pdf>.
100. Olsen TK, Baryawno N. Introduction to Single-Cell RNA Sequencing. Curr Protoc Mol Biol 2018; 122(1):e57. doi: 10.1002/cpmb.57.
101. Illumina. illumina-stranded-rna-t-overhang-tech-note-470-2020-010 [Stand: 25.11.2024]. Verfügbar unter: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-stranded-rna-t-overhang-tech-note-470-2020-010/illumina-stranded-rna-t-overhang-tech-note-470-2020-010.pdf>.
102. Illumina. Illumina Sequencing Technology [Stand: 12.02.2024]. Verfügbar unter: https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf.
103. NextSeq 1000 & 2000 System Specifications | Output, run time, & more; 2024 [Stand: 25.11.2024]. Verfügbar unter: <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq-1000-2000/specifications.html>.
104. Next-Generation Sequencing Illumina Workflow–4 Key Steps | Thermo Fisher Scientific - DE; 2024 [Stand: 28.11.2024]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/next-generation-sequencing/illumina-workflow.html>.

105. Illumina. Illumina CMOS Chip and One-Channel SBS Chemistry [Stand: 25.11.2024]. Verfügbar unter: <https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/techspotlights/cmos-tech-note-770-2013-054.pdf>.
106. Illumina. Indexed Sequencing Overview Guide (15057455) [Stand: 28.11.2024]. Verfügbar unter: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/indexed-sequencing-overview-guide-15057455-08.pdf.
107. Pagès H, Carlson M, Falcon S, Li N. AnnotationDbi: Manipulation of SQLite-based Annotations 2023 [Stand: 03.12.2024]. Verfügbar unter: <https://bioconductor.org/packages/AnnotationDbi>.
108. Morgan M RM. BiocManager: Access the Bioconductor Project Package Repository [Stand: 03.12.2024]. Verfügbar unter: <https://CRAN.R-project.org/package=BiocManager>.
109. Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc* 2009; 4(8):1184–91. doi: 10.1038/nprot.2009.97.
110. Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation (Camb)* 2021; 2(3):100141. doi: 10.1016/j.xinn.2021.100141.
111. Xu S, Hu E, Cai Y, Xie Z, Luo X, Zhan L et al. Using clusterProfiler to characterize multiomics data. *Nat Protoc* 2024; 19(11):3292–320. doi: 10.1038/s41596-024-01020-z.
112. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 2012; 16(5):284–7. doi: 10.1089/omi.2011.0118.
113. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014; 15(12):550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
114. Hadley Wickham, Jim Hester, Winston Chang, Jennifer Bryan. devtools: Tools to Make Developing R Packages Easier [Stand: 03.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/devtools/devtools.pdf>.

115. Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D. dplyr: A Grammar of Data Manipulation 2023 [Stand: 03.12.2024]. Verfügbar unter: <https://dplyr.tidyverse.org/>.
116. Yihui Xie, Joe Cheng, Xianying Tan. DT: A Wrapper of the JavaScript Library 'DataTables' [Stand: 03.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/DT/DT.pdf>.
117. Blighe K, Rana S, Lewis M. EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with Bioconductor 2018. doi: 10.18129/B9.BIOC.ENHANCEDVOLCANO.
118. Yu G. enrichplot: Visualization of Functional Enrichment Result: R package version 1.24.4 2024. Verfügbar unter: <https://yulab-smu.top/biomedical-knowledge-mining-book/>.
119. Korotkevich G, Sukhov V, Budin N, Shpak B, Artyomov MN, Sergushichev A. Fast gene set enrichment analysis. bioRxiv 2016:60012. Verfügbar unter: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/060012v3>.
120. Rowe BLY. futile.logger: A Logging Utility for R: R package version 1.4.3 2016 [Stand: 10.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/futile.logger/futile.logger.pdf>.
121. Gao C-H, Chen C, Akyol T, Dusa A, Yu G, Cao B et al. ggVennDiagram: Intuitive Venn diagram software extended. Imeta 2024; 3(1):e177. doi: 10.1002/imt2.177.
122. Pedersen TL. ggforce: Accelerating 'ggplot2': R package version 0.4.2; 2016 [Stand: 10.12.2024]. Verfügbar unter: <https://CRAN.R-project.org/package=ggforce>.
123. Wickham H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. Second edition. Cham: Springer international publishing; 2016. (Use R!). Verfügbar unter: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=4546676>.
124. Wilke C. ggribes: Ridgeline Plots in 'ggplot2': R package version 0.5.6 2024 [Stand: 10.12.2024]. Verfügbar unter: <https://CRAN.R-project.org/package=ggribes>.
125. Gregory R. Warnes, Ben Bolker, Lodewijk Bonebakker, Robert Gentleman, Wolfgang Huber, Andy Liaw et al. gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data: R package version 3.2.0 [Stand: 10.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/gplots/gplots.pdf>.
126. GraphPad Prism. Boston, Massachusetts, USA: GraphPad Software. Verfügbar unter: www.graphpad.com.

127. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2024 [Stand: 10.12.2024]. Verfügbar unter: <https://www.R-project.org/>.
128. Claus O. Wilke, Brenton M. Wiernik. gridtext: Improved Text Rendering Support for 'Grid' Graphics: R package version 0.1.5 2022 [Stand: 10.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/gridtext/gridtext.pdf>.
129. Ritchie ME, Phipson B, Di Wu, Hu Y, Law CW, Shi W et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(7):e47. doi: 10.1093/nar/gkv007.
130. Stefan Milton Bache, Hadley Wickham. magrittr: A Forward-Pipe Operator for R: R package version 2.0.3 [Stand: 10.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/magrittr/magrittr.pdf>.
131. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles: R package version 7.5.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(43):15545–50 [Stand: 10.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/msigdb/msigdb.pdf>.
132. Marc Carlson. org.Hs.eg.db: R package version 3.19.1 2017. doi: 10.18129/B9.BIOC.ORG.HS.EG.DB.
133. Luo W, Brouwer C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics* 2013; 29(14):1830–1. doi: 10.1093/bioinformatics/btt285.
134. Kolde R. pheatmap: Pretty Heatmaps: R package version 1.0.12 2019 [Stand: 13.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/pheatmap.pdf>.
135. Neuwirth E. RColorBrewer: ColorBrewer Palettes: R package version 1.1-3 2022 [Stand: 13.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/RColorBrewer/RColorBrewer.pdf>.
136. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA, USA: Posit Software, PBC; 2024. Verfügbar unter: <http://www.posit.co/>.

137. Wickham H. stringr: Simple, Consistent Wrappers for Common String Operations: R package version 1.5.1 2023 [Stand: 13.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/stringr/stringr.pdf>.
138. Kirill Müller, Hadley Wickham. tibble: Simple Data Frames: R package version 3.2.1 2023 [Stand: 13.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/tibble/tibble.pdf>.
139. Hadley Wickham, Davis Vaughan, Maximilian Girlich. tidyr: Tidy Messy Data: R package version 1.3.1 2024 [Stand: 13.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/tidyr/tidyr.pdf>.
140. Yu G. Data Integration, Manipulation and Visualization of Phylogenetic Trees. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC; 2022.
141. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan L, François R et al. Welcome to the Tidyverse. JOSS 2019; 4(43):1686. doi: 10.21105/joss.01686.
142. Chen H. VennDiagram: Generate High-Resolution Venn and Euler Plots: R package version 1.7.3:2022 [Stand: 13.12.2024]. Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/VennDiagram/VennDiagram.pdf>.
143. Widbiller M, Bucchi C, Rosendahl A, Spanier G, Buchalla W, Galler KM. Isolation of primary odontoblasts: Expectations and limitations. Aust Endod J 2019; 45(3):378–87. doi: 10.1111/aej.12335.
144. Bucchi C, Ohlsson E, Anta JM de, Woelflick M, Galler K, Manzanares-Cespedes MC et al. Human Amnion Epithelial Cells: A Potential Cell Source for Pulp Regeneration? Int J Mol Sci 2022; 23(5). doi: 10.3390/ijms23052830.
145. Servier Medical Art. Tooth - Servier Medical Art; 2023 [Stand: 15.02.2025]. Verfügbar unter: https://smart.servier.com/smart_image/tooth/.
146. Scientific Image and Illustration Software | BioRender. Verfügbar unter: <https://www.biorender.com/>.
147. Adachi T, Nakanishi T, Yumoto H, Hirao K, Takahashi K, Mukai K et al. Caries-related bacteria and cytokines induce CXCL10 in dental pulp. Journal of Dental Research 2007; 86(12):1217–22. doi: 10.1177/154405910708601215.

148. Pohl S, Akamp T, Smeda M, Uderhardt S, Besold D, Krastl G et al. Understanding dental pulp inflammation: from signaling to structure. *Front. Immunol.* 2024; 15. doi: 10.3389/fimmu.2024.1474466.
149. Ducret M, Fabre H, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N et al. Manufacturing of dental pulp cell-based products from human third molars: current strategies and future investigations. *Front Physiol* 2015; 6:213. doi: 10.3389/fphys.2015.00213.
150. Paterson RC, Pountney SK. Pulp response to *Streptococcus mutans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987; 64(3):339–47. doi: 10.1016/0030-4220(87)90015-6.
151. Maisonneuve E, Chevrier J, Dubus M, Varin J, Sergheraert J, Gangloff SC et al. Infection of Human Dental Pulp Stromal Cells by *Streptococcus mutans*: Shedding Light on Bacteria Pathogenicity and Pulp Inflammation. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8:785. doi: 10.3389/fcell.2020.00785.
152. Chin W-Y, He C-Y, Chow TW, Yu Q-Y, Lai L-C, Miaw S-C. Adenylate Kinase 4 Promotes Inflammatory Gene Expression via Hif1 α and AMPK in Macrophages. *Front Immunol* 2021; 12:630318. doi: 10.3389/fimmu.2021.630318.
153. Zuo Y, He Z, Chen Y, Dai L. Dual role of ANGPTL4 in inflammation. *Inflamm Res* 2023; 72(6):1303–13. doi: 10.1007/s00011-023-01753-9.
154. Fernández-Hernando C, Suárez Y. ANGPTL4: a multifunctional protein involved in metabolism and vascular homeostasis. *Curr Opin Hematol* 2020; 27(3):206–13. doi: 10.1097/MOH.0000000000000580.
155. Le Jan S, Amy C, Cazes A, Monnot C, Lamandé N, Favier J et al. Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2003; 162(5):1521–8. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64285-X.
156. Chong HC, Chan JSK, Goh CQ, Gounko NV, Luo B, Wang X et al. Angiopoietin-like 4 stimulates STAT3-mediated iNOS expression and enhances angiogenesis to accelerate wound healing in diabetic mice. *Mol Ther* 2014; 22(9):1593–604. doi: 10.1038/mt.2014.102.
157. Ingelfinger F, Feo D de, Becher B. GM-CSF: Master regulator of the T cell-phagocyte interface during inflammation. *Semin Immunol* 2021; 54:101518. doi: 10.1016/j.smim.2021.101518.

158. Filippo K de, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, van Rooijen N, Hartmann K et al. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* 2013; 121(24):4930–7. Verfügbar unter: <https://ashpublications.org/blood/article/121/24/4930/31645/Mast-cell-and-macrophage-chemokines-CXCL1-CXCL2>.
159. Staquet M-J, Durand SH, Colomb E, Roméas A, Vincent C, Bleicher F et al. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. *Journal of Dental Research* 2008; 87(3):256–61. doi: 10.1177/154405910808700304.
160. Zhidkova EM, Lylova ES, Grigoreva DD, Kirsanov KI, Osipova AV, Kulikov EP et al. Nutritional Sensor REDD1 in Cancer and Inflammation: Friend or Foe? *Int J Mol Sci* 2022; 23(17). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36077083/>.
161. Qiu X, Pan T, Kuang T, Shen Y, Zheng Y, Geng H et al. DEPP1: A prognostic biomarker linked to stroma-rich and immunosuppressive microenvironment, promoting oxaliplatin resistance in gastric cancer. *Oncology reports* 2025; 54(1). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40376989/>.
162. Wyant GA, Jiang Q, Singh M, Qayyum S, Levrero C, Maron BA et al. Induction of DEPP1 by HIF Mediates Multiple Hallmarks of Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation* 2024; 150(10):770–86. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38881449/>.
163. Salcher S, Hermann M, Kiechl-Kohlendorfer U, Ausserlechner MJ, Obexer P. C10ORF10/DEPP-mediated ROS accumulation is a critical modulator of FOXO3-induced autophagy. *Mol Cancer* 2017; 16(1):95. doi: 10.1186/s12943-017-0661-4.
164. van Dierendonck XAMH, Vrieling F, Smeehuijzen L, Deng L, Boogaard JP, Croes C-A et al. Triglyceride breakdown from lipid droplets regulates the inflammatory response in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; 119(12):e2114739119. doi: 10.1073/pnas.2114739119.
165. Zhang W, Xu T, Li X, Zhang Y, Zou X, Chen F et al. Single-cell atlas of dental pulp stem cells exposed to the oral bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Enterococcus faecalis*. *Front Cell Dev Biol* 2023; 11:1166934. doi: 10.3389/fcell.2023.1166934.
166. He X, Deng B, Zhang C, Zhang G, Yang F, Zhu D et al. HSPA1A inhibits pyroptosis and neuroinflammation after spinal cord injury via DUSP1 inhibition of the MAPK signaling pathway. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 2025; 31(1):53. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39924492/>.

167. He Y, Luo J, Zhang G, Jin Y, Wang N, Lu J et al. Single-cell profiling of human CD127⁺ innate lymphoid cells reveals diverse immune phenotypes in hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2022; 76(4):1013–29. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35243668/>.
168. Song B, Shen S, Fu S, Fu J. HSPA6 and its role in cancers and other diseases. *Mol Biol Rep* 2022; 49(11):10565–77. doi: 10.1007/s11033-022-07641-5.
169. Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis* 2012; 18(3):236–43. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01867.x.
170. Farges J-C, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ et al. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm* 2015; 2015:230251. doi: 10.1155/2015/230251.
171. Wisithphrom K, Windsor LJ. The effects of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6, and transforming growth factor- β 1 on pulp fibroblast mediated collagen degradation. *J Endod* 2006; 32(9):853–61. doi: 10.1016/j.joen.2006.03.017.
172. Uciechowski P, Dempke WCM. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology* 2020; 98(3):131–7. doi: 10.1159/000505099.
173. Du J, Xiang Y, Liu H, Liu S, Kumar A, Xing C et al. RIPK1 dephosphorylation and kinase activation by PPP1R3G/PP1 γ promote apoptosis and necroptosis. *Nat Commun* 2021; 12(1):7067. doi: 10.1038/s41467-021-27367-5.
174. Zhao S, Xi D, Cai J, Chen W, Xiang J, Peng N et al. Rab20 is critical for bacterial lipoprotein tolerization-enhanced bactericidal activity in macrophages during bacterial infection. *Sci China Life Sci* 2020; 63(3):401–9. doi: 10.1007/s11427-019-9527-3.
175. Yang M, Li D, Jiang Z, Li C, Ji S, Sun J et al. TGF- β -Induced FLRT3 Attenuation Is Essential for Cancer-Associated Fibroblast-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer. *Molecular cancer research : MCR* 2022; 20(8):1247–59. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35560224/>.
176. Liu Z, Xiang Y, Sun G. The KCTD family of proteins: structure, function, disease relevance. *Cell Biosci* 2013; 3(1):45. doi: 10.1186/2045-3701-3-45.
177. Zheng C, Yu X, Xu T, Liu Z, Jiang Z, Xu J et al. KCTD4 interacts with CLIC1 to disrupt calcium homeostasis and promote metastasis in esophageal cancer. *Acta Pharm Sin B* 2023; 13(10):4217–33. doi: 10.1016/j.apsb.2023.07.013.

178. Stolle K, Schnoor M, Fuellen G, Spitzer M, Cullen P, Lorkowski S. Cloning, genomic organization, and tissue-specific expression of the RASL11B gene. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1769(7-8):514–24. Verfügbar unter:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167478107001030>.
179. Choi E-H, Park S-J. TXNIP: A key protein in the cellular stress response pathway and a potential therapeutic target. *Exp Mol Med* 2023; 55(7):1348–56. doi: 10.1038/s12276-023-01019-8.
180. Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, Bressan J, Martínez JA, Martí A. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *FASEB J* 2015; 29(9):3595–611. doi: 10.1096/fj.14-260323.
181. Zehnder M, Belibasakis GN. A critical analysis of research methods to study clinical molecular biomarkers in Endodontic research. *International Endodontic Journal* 2022; 55 Suppl 1(Suppl 1):37–45. doi: 10.1111/iej.13647.
182. Widbiller M, Lindner SR, Buchalla W, Eidt A, Hiller K-A, Schmalz G et al. Three-dimensional culture of dental pulp stem cells in direct contact to tricalcium silicate cements. *Clin Oral Investig* 2016; 20(2):237–46. doi: 10.1007/s00784-015-1515-3.
183. Borgeaud M, Sandoval J, Obeid M, Banna G, Michielin O, Addeo A et al. Novel targets for immune-checkpoint inhibition in cancer. *Cancer Treat Rev* 2023; 120:102614. doi: 10.1016/j.ctrv.2023.102614.
184. Sun L, Zhang H, Gao P. Metabolic reprogramming and epigenetic modifications on the path to cancer. *Protein Cell* 2022; 13(12):877–919. doi: 10.1007/s13238-021-00846-7.
185. Liu Y, Gan L, Cui D-X, Yu S-H, Pan Y, Zheng L-W et al. Epigenetic regulation of dental pulp stem cells and its potential in regenerative endodontics. *World J Stem Cells* 2021; 13(11):1647–66. doi: 10.4252/wjsc.v13.i11.1647.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias Widbiller, für die Anleitung und Überlassung des Themas, sowie meiner Betreuerin Dr. Sandra Pohl, ohne deren unermüdlichen Einsatz und Überblick diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Diese Promotionsarbeit war für mich ein großartiger Einblick in die Forschungstätigkeit, bei der ich in verschiedensten Bereichen meinen Horizont erweitern durfte.

Den Mitarbeitenden des Forschungslabores der Abteilung Zahnerhaltung und Parodontologie des Universitätsklinikums Regensburg, Andreas Rosendahl, Melanie Wölflick und Lea Schreiber, danke ich für ihre Zeit, Mühe und die Geduld, die sie mir und diesem Projekt gegenüber gezeigt haben.

Ich danke den Mitarbeitern des Leibniz-Instituts für Immuntherapie des Universitätsklinikums Regensburg, insbesondere Nicholas Strieder, Claudia Gebhard und Ute Ackermann, für die Verarbeitung der Proben im *NGS Core* ihrer Einrichtung.

Ich möchte auch meiner Partnerin Judith Haase, die mich immer wieder motiviert hat, weiterzumachen, meinen Dank aussprechen. Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, Dr. Markus Huber und Caroline Huber, die mich während meiner akademischen Laufbahn finanziell und moralisch unterstützt haben, meine Verbundenheit ausdrücken.

Lebenslauf

BERUFSERFAHRUNG

02/2025 - vrs. 02/2026

Assistenz Zahnarzt

Zahnarztpraxis Dr. Maximilian Ohneis & Kollegen [Abensberg, Deutschland]

03/2024 - 01/2025

Assistenz Zahnarzt

Abt. Zahnerhaltung und Parodontologie des UKR [Regensburg, Deutschland]

03/2023

Dreiwöchige Famulatur

Mitarbeit in der zahnärztlichen Einheit des Kressbronn-Toril-Education-Programms

[Davao City, Philippinen]

08/2018 - 02/2023

Mehrere Praktika und Mitarbeit im Zahntechniklabor

Zahnarztpraxis Dr. Huber [Bärndorf, Deutschland]

2017 - 2019

Zwei einwöchige Praktika

Zahntechniklabor Schmidt [Bogen, Deutschland]

AUSBILDUNG

10/2018 - 11/2023

Zahnmedizin-Studium

Universität Regensburg [Regensburg, Deutschland]

09/2010 - 07/2018

Abschluss mit Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Veit-Höser-Gymnasium [Bogen, Deutschland]