

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
MUND- KIEFER- GESICHTSCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. DR. THORSTEN E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

BUTYRATE STIMULATES THE EARLY PROCESS OF THE OSTEOGENIC
DIFFERENTIATION BUT INHIBITS THE BIOMINERALIZATION IN
DENTAL FOLLICLE CELLS (DFCs)

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johannes Drees

2013

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
MUND- KIEFER- GESICHTSCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. DR. THORSTEN REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

BUTYRATE STIMULATES THE EARLY PROCESS OF THE OSTEOGENIC
DIFFERENTIATION BUT INHIBITS THE BIOMINERALIZATION IN
DENTAL FOLLICLE CELLS (DFCs)

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johannes Drees

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thorsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Christian Morscheck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Peter Proff

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2013

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Material und Methoden	3
Ergebnisse	3
Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting – FACS)	3
Proliferation	4
Alkalische Phosphatase-Aktivität & Alizarin-Quantifizierung	5
Quantitative Real-Time-RT-PCR.....	7
Diskussion	7
Zusammenfassung.....	11
Literaturverzeichnis	12
Originalpublikation	15
Abstract	15
Introduction	16
Materials and methods	17
Results	19
Discussion.....	23
References	25
Danksagung	27
Lebenslauf	28

Einleitung

Studien in den USA haben ergeben, dass in den Jahren 1988–1994 mindestens 35 % der Einwohner im Alter von 30 Jahren und älter von einer Parodontitis betroffen waren [1]. Im Jahre 2009/2010 waren es bereits 47 % [2]. Es handelt sich demnach um eine der häufigsten Erkrankungen des menschlichen Zahnhalteapparates, mit zunehmender Prävalenz aufgrund des demografischen Wandels und steigender Lebenserwartung.

Das Krankheitsbild der Parodontitis, welche in unserer Gesellschaft die Hauptursache für Zahnverlust darstellt, wird durch eine bakterielle Infektion des Zahnhalteapparats verursacht. Diese Infektion entsteht bei unzureichender Mundhygiene durch eine Ansammlung bakterieller Plaque auf den Zahnoberflächen. Wird diese Plaque nicht durch mechanische Reinigung entfernt, kommt es nach einer anfänglichen Entzündung der Gingiva zur Einwanderung von Bakterien in den Parodontalspalt. Daraus resultierend folgt eine Immunreaktion des Körpers, welche durch chronische Stimulation zu einem Verlust an Knochensubstanz führt. Dies kann zum vollständigen Verlust der betroffenen Zähne führen [3,4].

Diese Immunreaktion wird unter anderem durch bakterielle Virulenzfaktoren wie Lipopolysaccharide (LPS), kurzkettige Fettsäuren (SCFA) und Proteasen, aber auch durch immunmodulatorische Moleküle wie Interleukine ausgelöst und führt unter anderem zur Aktivierung von Monozyten, Lymphozyten und polymorphkernigen Granulozyten [5]. Als kurzkettige Fettsäure ist Butyrat (Natriumbutyrat, NaB) ein sehr wichtiger Vertreter dieser Virulenzfaktoren. Dabei handelt es sich um ein Stoffwechselprodukt der bakteriellen Fermentierung. Zahlreiche Bakterienstämme, darunter *Porphyromonas*, *Prevotella* und *Fusobacterium* nutzen diesen anaeroben Prozess der Energiegewinnung und geben dabei Butyrat in millimolarer Konzentration ab [6]. Bekannt ist, dass Butyrat eine relevante Rolle bei der Ätiologie parodontaler Erkrankungen spielt [7]. Untersuchungen ergaben, dass Butyrat sowohl in dentaler Plaque [8] als auch in sulkulärer Flüssigkeit vorkommt und dass eine positive Korrelation zwischen Butyrat-Konzentration und Ausprägung einer parodontalen Erkrankung besteht [6]. Weitere Studien haben gezeigt, dass Butyrat einen inhibitorischen Effekt auf die Proteinsynthese und die Progression des Zellzyklus bei menschlichen Pulpafibroblasten [9], B- und T-Zellen [10] sowie Darmkrebszellen besitzt [11]. Auch kann es konzentrationsabhängig eine Stimulierung [12] oder Inhibierung [13] der osteogenen Differenzierung bei menschlichen Osteoblasten und ROS17/2.8 (rat osteosarcoma) Zellen

bewirken. Archer et al. zeigten anhand menschlicher Darmkrebszellen, dass Butyrat über die Inhibierung der Histon-Deacetylasen (HDACs) einen Einfluss auf die Expression bestimmter Gene nimmt, welche Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren [14,15].

Bislang wurden diverse Studien über die Auswirkung von Butyrat auf unterschiedliche Zelltypen durchgeführt. Einsichten auf die Auswirkung von Butyrat auf primäre dentale Stammzellen, wie dentale Follikelzellen (DFCs), liegen jedoch bislang nicht vor.

Der dentale Follikel ist ein den Zahnkeim umgebendes Bindegewebssäckchen ektomesenchymalen Ursprungs. Er spielt eine tragende Rolle bei der Entwicklung und dem Durchbruch des Zahnes in die Mundhöhle [16]. Aus dem dentalen Follikel isolierte DFCs konnten positiv auf Marker wie STRO-1, CD13, CD44 und CD73 getestet werden. Dabei handelt es sich um Marker, welche oftmals von Stammzellen, und Vorläuferzellen mit osteogenem Differenzierungspotential exprimiert werden [17–19]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich DFCs in unterschiedliche Zelltypen differenzieren lassen. Darunter Neuronen, Adipozyten, Zementoblasten-/Osteoblasten-ähnliche und dem parodontalen Ligament ähnliche Zelltypen [20,21]. Daneben besitzen DFCs auch einzigartige Eigenschaften, welche sie von mesenchymalen Stammzellen unterscheiden. Zum Beispiel ist die Stärke der osteogenen Differenzierung abhängig von der Steifheit der extrazellulären Matrix. Dabei unterstützt eine weiche Matrix die Differenzierung von DFCs besser als eine steife Matrix [22].

Bei der klassischen Parodontitistherapie wird versucht die Progredienz der Erkrankung zu unterbinden. Dabei kommt es jedoch nicht zu einer *restitutio ad integrum*, so dass ein neuer, regenerativer Ansatz sinnvoll erscheint [23–25]. Fortschritte im Verständnis von dentalen Stammzellen sowie der Modulation von Immunantworten [26] deuten auf eine mögliche Relevanz von DFCs für einen Ansatz in der regenerativen Zelltherapie hin. Im Vergleich zu anderen Zellen des Zahnhalteapparats, wie gingivale Fibroblasten, werden DFCs entwicklungs- und lokalisationsbedingt nur selten bakteriellen Virulenzfaktoren wie Butyrat ausgesetzt. Zudem wurde in einer vorhergehenden Untersuchung festgestellt, dass DFCs im Gegensatz zu parodontalen Ligamentfibroblasten (PDL-Fibroblasten) auf bakterielle Stimulanzen wie LPS unterschiedlich reagieren.

So wurde erwiesen, dass nach der Zugabe von *Porphyromonas gingivalis* LPS zu DFCs nur eine sehr leichte Erhöhung bei der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-8 (Interleukin-8), IL-1 β und IL-6 zu verzeichnen war [27]. Da bislang keine Daten bezüglich der Reaktion von DFCs

nach Stimulation mit Butyrat vorliegen, wurden in dieser Arbeit die Proliferation sowie die osteogene Differenzierung von DFCs unter Einfluss dieses bakteriellen Metaboliten untersucht.

Material und Methoden

In dieser Studie wurde unter Zuhilfenahme von Zellkulturen der Einfluss von Butyrat auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von dentalen Follikelzellen *in vitro* untersucht. Dabei wurde das Proliferationsverhalten mithilfe von Proteinmengenbestimmungen und Viabilitätstests analysiert. Das osteogene Differenzierungsverhalten wurde anhand der alkalischen Phosphatase, der Quantifizierung der Biomineralisierung und Expression bekannter osteogener Marker untersucht. Detaillierte Informationen zu den angewandten Methoden und Materialien können der anhängenden Originalpublikation entnommen werden.

Ergebnisse

Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting – FACS)

Eine FACS-Analyse wurde durchgeführt, um die aus impaktierten Weisheitszähnen isolierten dentalen Follikelzellen zu identifizieren und auf ihren Stammzellcharakter hin zu untersuchen. Dabei wurden bekannte Stammzellmarker wie Nestin, CD105 und CD44 überprüft. Die Analysen zeigten, dass die isolierten und hier verwendeten Zellen positiv für oben genannte Marker waren (Abb. 1).

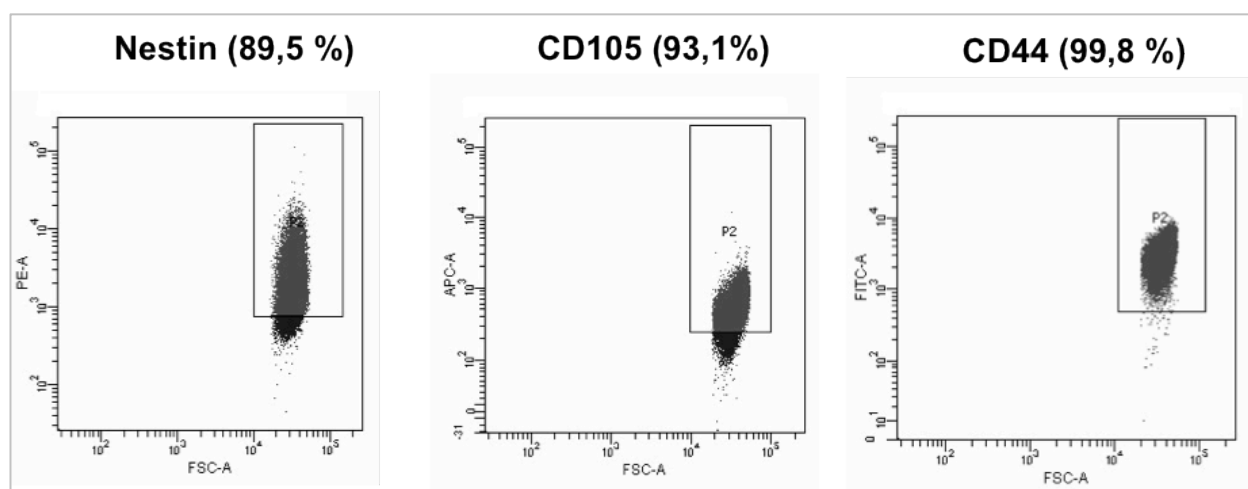


Abbildung 1 Die FACS-Analyse der verwendeten DFCs zeigt, dass die Zellen für die Stammzellmarker Nestin, CD105 und CD44 positiv sind

Proliferation

Die Proliferationsrate der DFCs unter Einfluss von Butyrat wurde jeweils nach 24 und 72 Stunden durch Bestimmung der Proteinmenge ermittelt. Diese wurde mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA) quantifiziert. Bei Konzentrationen bis 2 mM konnte kein signifikanter Einfluss auf die Zellproliferation festgestellt werden. Bei Konzentrationen ab 20 mM konnte jedoch ein inhibitorischer Effekt auf die Proliferation beobachtet werden. Nach einer 72-stündigen Behandlung mit 200 mM Butyrat waren nur noch ca. 10 % der Zellen adhären und vital. Die Konzentration, bei der nur noch 50 % der Zellen vital waren (LC50), lag zwischen 100 mM und 200 mM (Abb. 2). Diese Werte konnten durch eine Überprüfung mittels WST-1-Vitalitätsassay (water-soluble tetrazolium salt) bestätigt werden (Abb. 3).

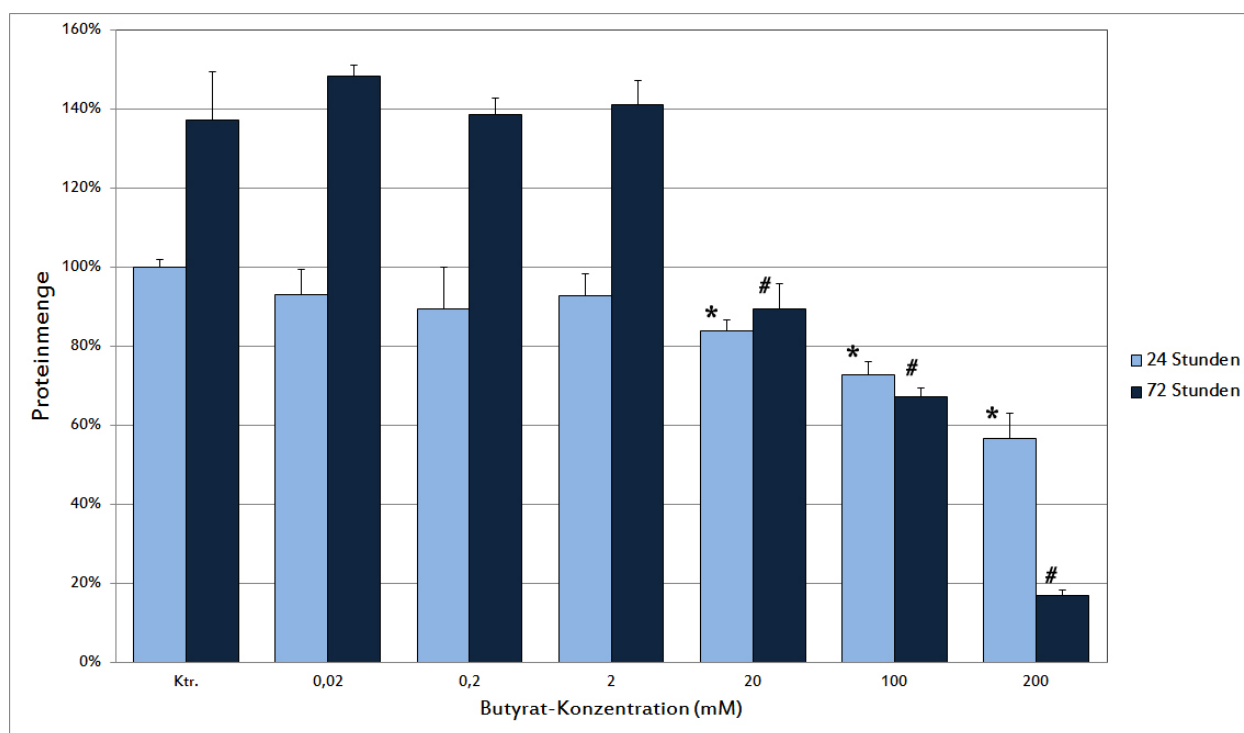


Abbildung 2 BCA-Test nach 24 und 72 Stunden. Ein antiproliferativer Effekt konnte bei Konzentrationen über 2 mM beobachtet werden. Angaben als Mittelwerte mit Standardabweichung (Statistik mit ANOVA, n=3, *p<0,05 / #p<0,05)

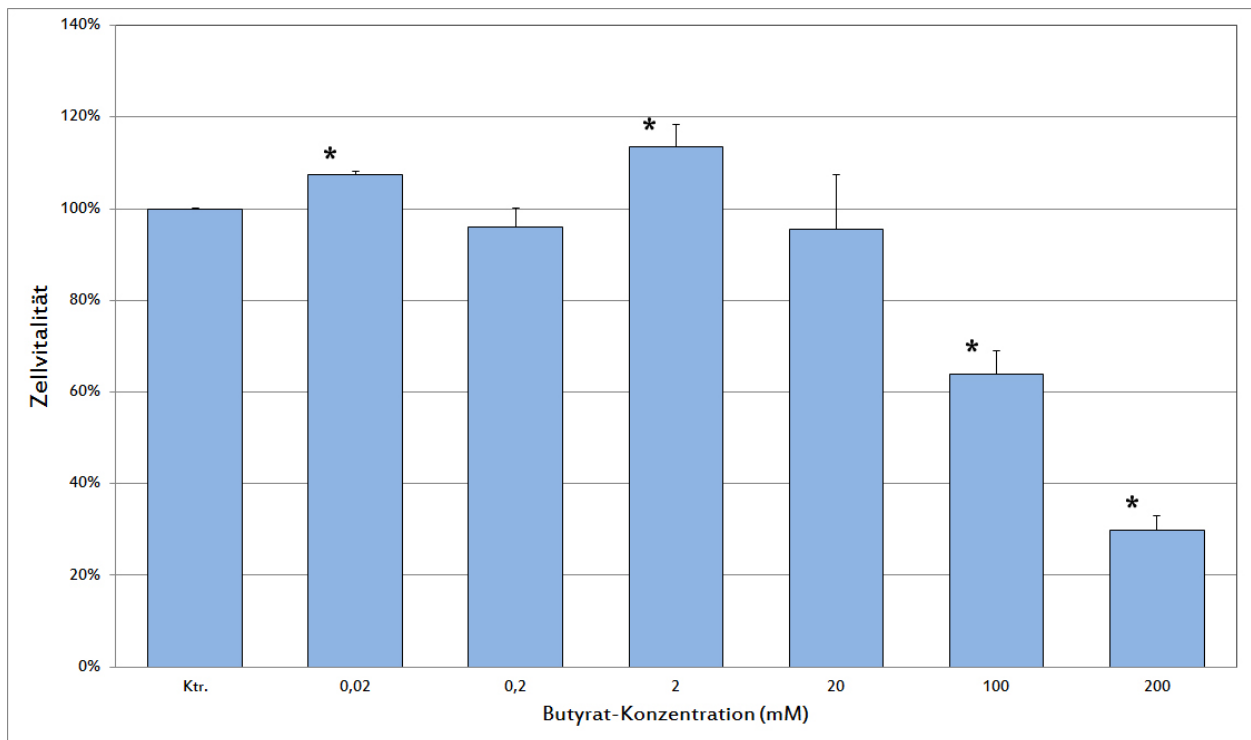


Abbildung 3 WST-1-Test nach 24 Stunden. Auch hier konnte eine LC50 zwischen 100 mM und 200 mM beobachtet werden. Angaben als Mittelwerte mit Standardabweichung (Statistik mit ANOVA, n=3, *p<0,05)

Alkalische Phosphatase-Aktivität & Alizarin-Quantifizierung

Die osteogene Differenzierung der DFCs wurde mit einer Konzentration von 0,2 mM Butyrat durchgeführt um toxische Effekte auf die Zellen auszuschließen. Als Marker für den Fortschritt der osteogenen Differenzierung wurden die Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase (ALP) und die Menge des durch Alizarin gefärbten Kalziums ermittelt. Nach 7 Tagen konnte in den mit Butyrat behandelten Zellen ein leichter Rückgang der ALP-Aktivität gegenüber den Positivkontrollen beobachtet werden, welcher allerdings nicht signifikant war. Nach 14 Tagen konnte jedoch ein signifikanter Anstieg der ALP-Aktivität gegenüber den unbehandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 4).

Bei der Messung der Kalziumakkumulation nach 21 Tagen konnte in den osteogen differenzierten Proben ein deutlicher Anstieg der Kalzium-Konzentrationen beobachtet werden. Dieser war in den mit Butyrat behandelten Proben signifikant geringer als in den unbehandelten Proben (Abb. 5).

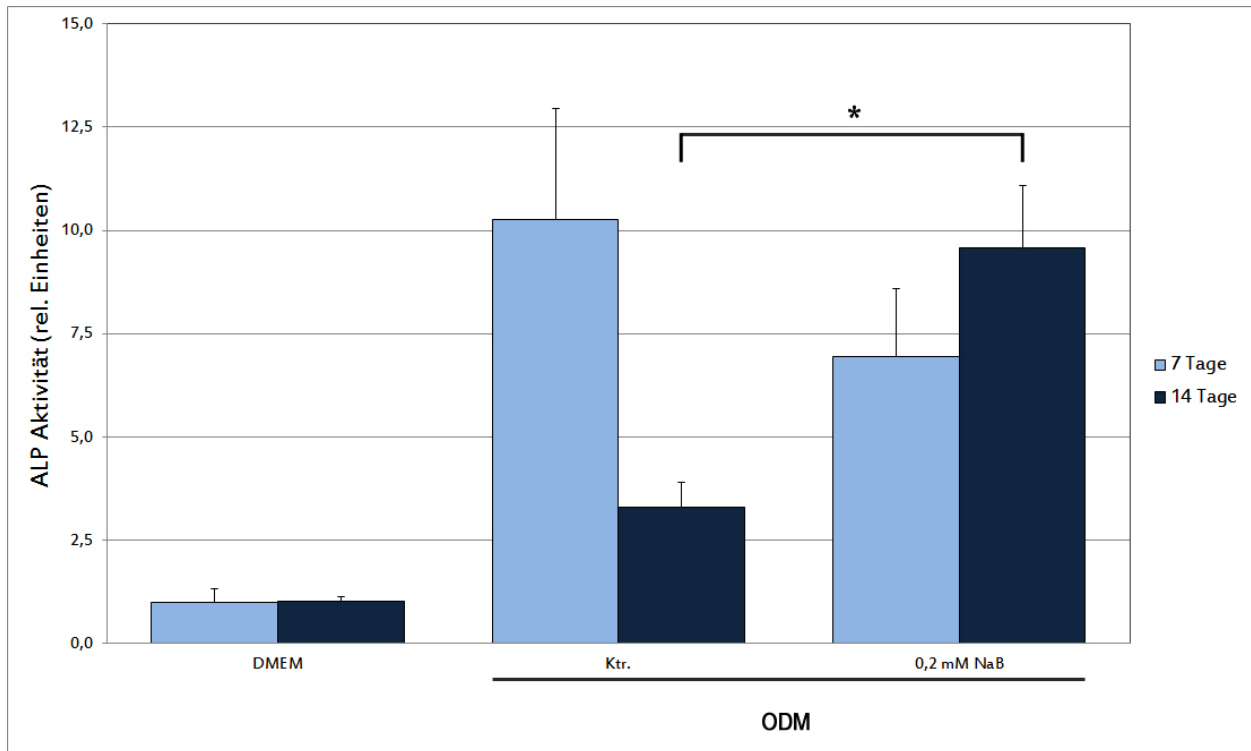


Abbildung 4 Bestimmung der ALP-Aktivität nach 7 und 14 Tagen osteogener Differenzierung in osteogenem Differenzierungsmedium (ODM). Nach anfänglichem Anstieg der ALP-Aktivität konnte bei der Positiv-Kontrolle nach 14 Tagen ein Rückgang beobachtet werden. Bei den behandelten Proben kam es dagegen nach 14 Tagen zu einem starken Anstieg der Aktivität. Angaben als Mittelwerte mit Standardabweichung (Statistik mit ANOVA, $n=3$, $*p<0,05$)

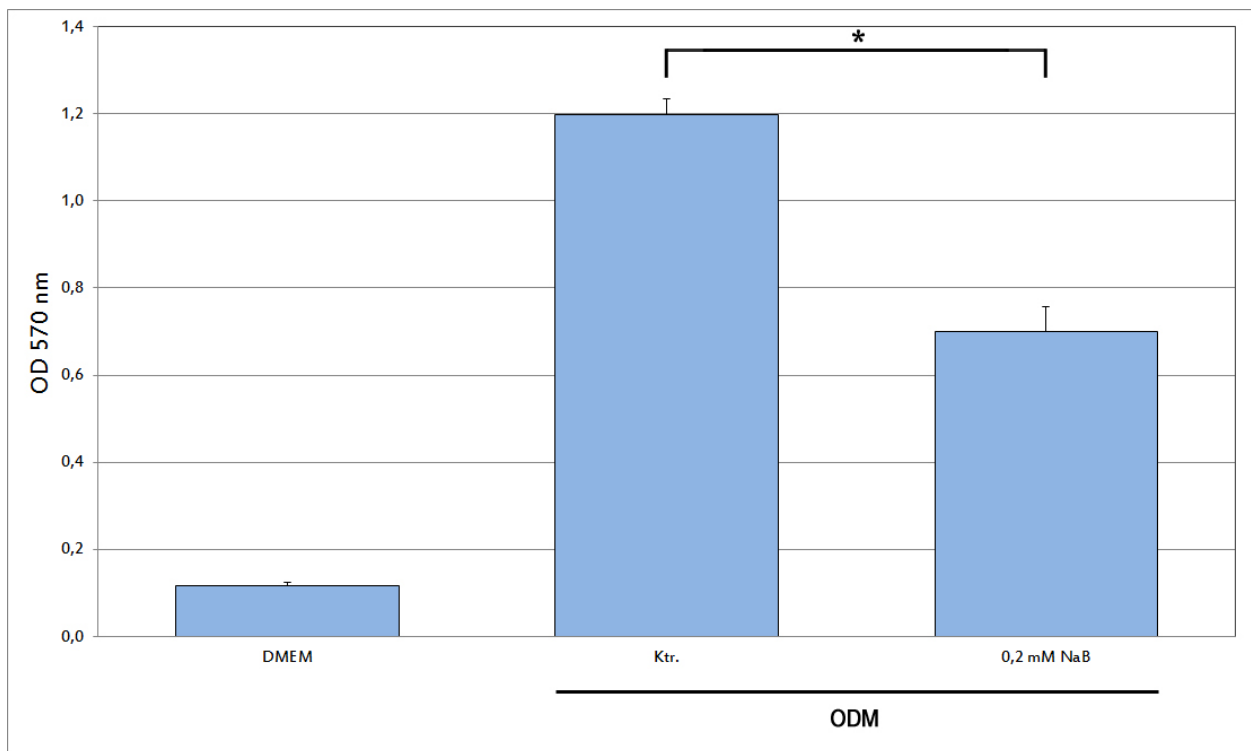


Abbildung 5 Alizarin-Quantifizierung nach 21 Tagen der osteogenen Differenzierung in osteogenem Differenzierungsmedium (ODM). Die behandelten Proben weisen eine signifikant niedrigere Mineralisierung auf. Angaben als Mittelwerte mit Standardabweichung (Statistik mit ANOVA, $n=4$, $*p<0,05$)

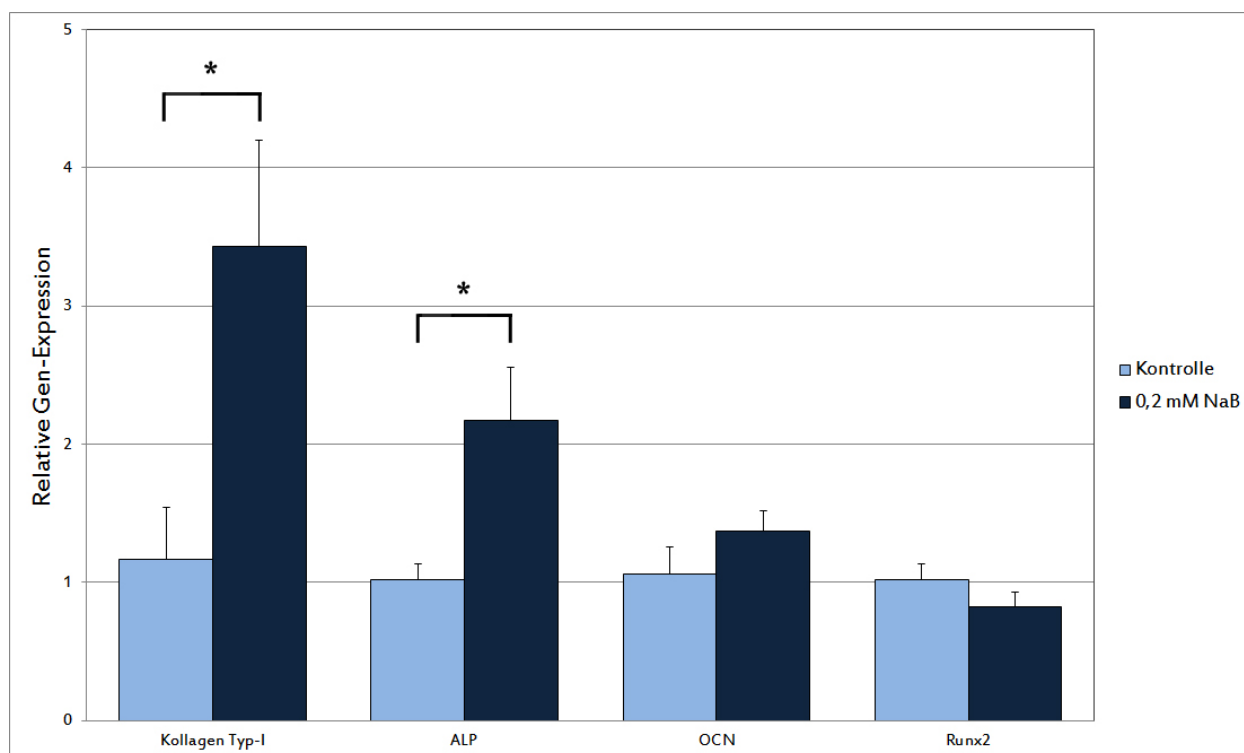


Abbildung 6 qRT-PCR nach 7 Tagen osteogener Differenzierung in osteogenem Differenzierungsmedium (ODM). Die frühen osteogenen Marker Kollagen Typ-1 und ALP waren signifikant hochreguliert. Die wichtigen Mineralisierungsmarker Osteocalcin und Runx2 wurden dagegen nicht von Butyrat beeinflusst. Angaben als Mittelwerte mit Standardabweichung (Statistik mit ANOVA, $n=3$, $*p<0,05$)

Quantitative Real-Time-RT-PCR

Mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) wurde die Regulation verschiedener osteogener Markergene nach 7 Tagen Behandlung gemessen. Signifikante Änderungen konnten bei der Expression der Markergene ALP und Kollagen Typ 1 beobachtet werden. Diese waren bei den behandelten Zellen deutlich erhöht. Bei den Markern Osteocalcin und Runx2 kam es zu keiner signifikanten Zu- oder Abnahme der Expression (Abb. 6).

Diskussion

Stammzellen des dentalen Follikels haben in den letzten Jahren wiederholt interessante Ergebnisse in Bezug auf regenerative Therapieansätze gezeigt. Mittlerweile konnten mehrere Stammzellpopulationen identifiziert und klassifiziert werden. Darunter Stammzellen der Pulpa (DPSC) [28], des parodontalen Ligaments (PDLC) [29], der apikalen Papille (SCAP) [30] und ausgefallener Milchzähne (SHED) [31]. Eine weitere Stammzellpopulation, die DFCs, weisen typische Charakteristika multipotenter Zellen mit osteogenem Differenzierungspotential auf, wie

zum Beispiel die Expression von Nestin, Notch-1 und STRO-1 [20,21]. Auch besitzen sie die Fähigkeit, sich in unterschiedlichste Zelltypen zu differenzieren.

Untersuchungen haben gezeigt, dass der bakterielle Metabolit Butyrat starke immunologische Reaktionen hervorruft sowie ätiologische Relevanz bei parodontalen Erkrankungen besitzt [4,5]. Auch wurde festgestellt, dass Butyrat einer der Hauptbestandteile von dentaler Plaque und Sulkusflüssigkeit ist und dort in Konzentrationen von etwa 0,2 mM bis 2,8 mM vorliegt [6]. Interessanterweise konnte auch ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung einer parodontalen Erkrankung und der vorliegenden Butyrat-Konzentration nachgewiesen werden [8]. Als starker Inhibitor (HDI) der Histon-Deacetylasen (HDACs) kann Butyrat Einfluss auf die Expression wichtiger Gene nehmen, welche an der Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt sind. Dabei kommt es zu einer Hyperacetylierung von Lysinresten am n-terminalen Ende von Histon-Proteinen innerhalb der Nukleosomen. Eine Hyperacetylierung dieser bewirkt eine Verschiebung der Ladung, so dass sich die Bindung der DNA an der Histonstruktur lockert. Dadurch werden diese Abschnitte leichter zugänglich für Transkriptionsfaktoren, was sich wiederum in einer Steigerung der Expression der entsprechenden Gene ausdrückt [14,15].

In den Versuchen zur Proliferation konnte gezeigt werden, dass DFCs erst ab einer Konzentration von etwa 20 mM (LC50 von 100 mM nach 72 Stunden) in ihrem Wachstum gehemmt werden. Damit sind sie widerstandsfähiger gegenüber Butyrat als andere untersuchte Zelltypen. Eine Studie konnte beispielsweise zeigen, dass Butyrat ab einer Konzentration von 1 mM einen deutlichen zytotoxischen Effekt auf PDL-Fibroblasten ausübt [32]. Studien mit gingivalen Epithelzellen, Hautepithelzellen, dentalen Pulpafibroblasten sowie porcinen Mallassez-Epithelresten zeigten schon bei Konzentrationen von 1 mM, 1 mM, 4 mM und 16 mM eine jeweils 50%ige Abnahme der Proliferationsrate [9,33,34].

Eine mögliche Erklärung für diese erhöhte Resistenz von DFCs gegenüber Butyrat könnte in der Lokalisation und dem niedrigen Differenzierungsgrad der Zellen liegen. Beispielsweise sind gingivale Epithelzellen und PDL-Fibroblasten deutlich stärker differenziert als DFCs. Auch sind diese Zelltypen in unmittelbarer Umgebung von Bakterien und deren Virulenzfaktoren lokalisiert. Daher könnten ihr geringer Differenzierungsgrad und ihre von oralen Bakterien isolierte Lokalisation DFCs weniger empfänglich für die Einflüsse von bakteriellen Molekülen wie Butyrat machen.

Im Vergleich zur Proliferation nimmt Butyrat schon bei sehr niedrigen Konzentrationen (0,2 mM) Einfluss auf die osteogene Differenzierung von DFCs. Durch Bestimmung der ALP-Aktivität,

Kalziumpräzipitation und der Messung bekannter osteogener Marker wie ALP, Kollagen Typ-1, Runx2 und Osteocalcin wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Butyrat auf die osteogene Differenzierung gemessen. Die enzymatische Aktivität von ALP ist eine wichtige Voraussetzung für die Biomineralisierung und durch die Bildung von Hydroxylapatit-Kristallen ein wichtiger Indikator für die osteogene Differenzierung [35]. Kollagen Typ-1 ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix und dient als Grundlage für die Bildung von Hydroxylapatit [36].

Als weitere Marker für die Beurteilung der osteogenen Differenzierung wurden zusätzlich Osteocalcin und Runx2 evaluiert. Bei Osteocalcin handelt es sich um das häufigste nichtkollagene Protein während der Knochenentstehung. Es macht zirka 1–2 % der extrazellulären Matrix im sich entwickelnden Knochen aus und ist aufgrund seiner Bindungsaffinität zu Ca^{2+} -Ionen ein starker Inhibitor der Mineralisierung [37,38].

Bei Runx2 handelt es sich um ein Protein, welches einen essentiellen Faktor bei der Heranreifung von Chondrozyten darstellt. Dadurch fördert es direkt die Knochenentstehung via enchondraler Ossifikation. Runx2 wird insbesondere während der Knochenformation exprimiert und bleibt auch im weiteren Verlauf der osteogenen Differenzierung aktiv [39,40].

Die Expression früher osteogener Marker wie Kollagen Typ-1 und ALP war nach 7 Tagen Differenzierung signifikant erhöht, während die späten Differenzierungsmarker Osteocalcin und Runx2 unverändert blieben. Die Arbeitsgruppe um Morozumi fand heraus, dass Butyrat (1 mM) die osteogene Differenzierung von ROS17/2.8 Zellen durch eine verminderte Expression von Runx2, Osterix, Dlx5, Msx2 und ALP inhibiert [13]. Dagegen berichten Katono et al. jedoch von einer durch Butyrat induzierten Stimulierung der Biomineralisierung bei menschlichen Osteoblasten [12]. Interessanterweise erhöhte Butyrat in einer anderen Studie die ALP-Aktivität bei murinen prä-osteoblastischen Zellen, während dies bei reifen murinen Osteoblasten nicht der Fall war [41]. Die Ergebnisse dieser Studien weisen darauf hin, dass die Wirkung von Butyrat auf die osteogene Differenzierung in Abhängigkeit zur Konzentration und der Art der damit in Kontakt kommenden Zelltypen steht. In der vorliegenden Studie wurde die Biomineralisierung inhibiert, während die ALP-Aktivität zunahm.

In der Literatur werden unterschiedliche Wirkungsweisen von HDIs auf die Mineralisierung diskutiert. Unter anderem wird eine Induktion der Matrix-Mineralisierung bei Anwendung von HDIs mit dem Anstieg von Runx2 assoziiert [42,43].

Auch wurde berichtet, dass eine BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) induzierte, posttranslationale Acetylierung von Runx2 zu einer Inhibierung des Smurf1-vermittelten Abbaus (Ubiquitinierung) führt. Dadurch kommt es zu einer Anreicherung von Runx2, welche wiederum zu einer verstärkten osteogenen Differenzierung und Knochenformation führt [44]. In der Arbeit von Morozumi et al. [13] kam es bei ähnlich hohen Butyrat-Konzentrationen (0,1 mM) zu einer Reduzierung der Mineralisierung ohne eine Änderung der Runx2 Expression. Bei hohen Konzentrationen (1 mM) kam es jedoch zu einer Induktion von Runx2. Bei anderen Versuchen an hDPSCs mit dem HDI Trichostatin A (TSA) kam es trotz Zunahme der Mineralisierung zu keiner Veränderung der Runx2 Expression [45]. Diese unterschiedlichen Effekte von Butyrat und anderen HDIs lassen eine gewisse Varianz zwischen Mineralisierung und Runx2-Expression, je nach HDI-Konzentration, vermuten. Sie geben allerdings keinen Aufschluss darüber, welche Faktoren tatsächlich die Änderung der Mineralisierungsrate unter HDI-Einfluss bewirken.

In dieser Arbeit kam es zu keiner signifikanten Expressionsänderung der osteogenen Marker Osteocalcin und Runx2. Eine Regulierung der Mineralisierung über die direkte Einflussnahme auf die Expression dieser Marker ist daher bei der angewandten Konzentration nicht zu belegen.

Um die zugrunde liegenden Ursachen und molekularen Mechanismen für diese Effekte besser zu verstehen, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Insgesamt kann jedoch gesagt werden, dass DFCs eine erhöhte Resistenz gegenüber dem anti-proliferativen Effekt von Butyrat aufweisen als andere untersuchte Zelltypen. Dabei stimulierte eine niedrige Butyrat-Konzentration die ALP-Aktivität und die Expression von Kollagen Typ-1, wohingegen die Biomineralisation inhibiert wurde. Die Lokalisation und der Differenzierungsgrad der DFCs sollten als mögliche Ursache in Betracht gezogen werden. Auch könnte der Effekt auf die Mineralisierung in Abhängigkeit zur verwendeten Konzentration stehen. Um die genauen Hintergründe für diese Effekte zu eruieren, bedarf es jedoch weiterführender Untersuchungen.

Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt eine der Besonderheiten dentaler Stammzellen im Vergleich zu ausdifferenzierten Körperzellen auf – nämlich die andersartige zelluläre Reaktion auf die Stimulation mit immunologisch aktiven Substanzen. Ähnliche Eigenschaften konnten auch in Versuchen mit LPS aufgezeigt werden [27]. Relevanter wird dieses Thema auch vor dem Hintergrund, dass Stammzellen immunmodulatorische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. So können diese durch die Regulation von Th17 Zellen Einfluss auf die Immunantwort nehmen, was eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen spielen könnte [46]. Daher ist es derzeit

Aufgabe der Wissenschaft vor allem ein grundlegendes Verständnis für die vielseitige Interaktion zwischen Immunsystem, Stammzellen und auslösenden Krankheitserregern zu bekommen. Ohne ein umfangreiches Verständnis wie sich die einzelnen Bestandteile in einem derart komplexen System verhalten, ist eine klinische Anwendung nur schwer zu erreichen.

Zusammenfassung

Dentale Stammzellen, insbesondere DFCs als Vorläuferzellen der parodontalen Gewebestrukturen, bieten aussichtsreiche Perspektiven für regenerative Therapieansätze in der Zahnmedizin. Während einer Parodontitis wird der bakterielle Metabolit Butyrat oft in millimolaren Konzentrationen vorgefunden. Dabei besitzt Butyrat als Inhibitor der Histon-Deacetylasen Einfluss auf zelluläre Vorgänge wie Proliferation und Apoptose und kann Zellen des Immunsystems stimulieren.

Diese Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Butyrat auf das Proliferations- und osteogene Differenzierungsverhalten von DFCs. Dabei wurde die Zellproliferation mittels BCA- und WST-1-Test untersucht. Die osteogene Differenzierung wurde durch Messung der ALP-Aktivität, Alizarinfärbung und qRT-PCR evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass Butyrat-Konzentrationen ab 20 mM einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation und Viabilität der Zellen ausüben. Bei niedrigeren Konzentrationen stimulierte Butyrat die ALP-Aktivität sowie die Genexpression von Kollagen Typ 1. Demgegenüber inhibierte Butyrat die Biom mineralisierung, zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Runx2 und Osteocalcin.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass DFCs im Gegensatz zu anderen Zelltypen eine erhöhte Resistenz gegenüber Butyrat besitzen und dass Butyrat die osteogene Differenzierung in der anfänglichen Phase fördert, im späteren Verlauf jedoch die Biom mineralisierung hemmt.

Literaturverzeichnis

- [1] Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol* 1999;70:13–29.
- [2] Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* 2012;91:914–20.
- [3] Papapanou PN. Epidemiology of periodontal diseases: an update. *J Int Acad Periodontol* 1999;1:110–6.
- [4] Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996;1:821–78.
- [5] Graves DT, Jiang Y, Genco C. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Curr Opin Infect Dis* 2000;13:227–32.
- [6] Niederman R, Buyle-Bodin Y, Lu B-Y, Robinson P, Naleway C. Short-chain Carboxylic Acid Concentration in Human Gingival Crevicular Fluid. *Journal of Dental Research* 1997;76:575–9.
- [7] Tonetti M, Eftimiadi C, Damiani G, Buffa P, Buffa D, Botta GA. Short chain fatty acids present in periodontal pockets may play a role in human periodontal diseases. *J Periodont Res* 1987;22:190–1.
- [8] Singer RE, Buckner BA. Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. *Infection and Immunity* 1981;32:458.
- [9] Ho Y-C, Chang Y-C. Effects of a bacterial lipid byproduct on human pulp fibroblasts in vitro. *J Endod* 2007;33:437–41.
- [10] Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K. Volatile Fatty Acids, Metabolic By-products of Periodontopathic Bacteria, Inhibit Lymphocyte Proliferation and Cytokine Production. *Journal of Dental Research* 1995;74:1367–73.
- [11] Gamet L, Daviaud D, Denis-Pouxviel C, Remesy C, Murat JC. Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int J Cancer* 1992;52:286–9.
- [12] Katono T, Kawato T, Tanabe N, Suzuki N, Iida T, Morozumi A, et al. Sodium butyrate stimulates mineralized nodule formation and osteoprotegerin expression by human osteoblasts. *Arch Oral Biol* 2008;53:903–9.
- [13] Morozumi A. High concentration of sodium butyrate suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation in ROS17/2.8 cells. *Journal of Oral Science* 2011;53:509–16.
- [14] De Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003;370:737–49.
- [15] Archer SY, Johnson J, Kim H-J, Ma Q, Mou H, Daesety V, et al. The histone deacetylase inhibitor butyrate downregulates cyclin B1 gene expression via a p21/WAF-1-dependent mechanism in human colon cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G696–703.
- [16] Cahill DR, Marks SC Jr. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol* 1980;9:189–200.

- [17] Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 1994;84:4164–73.
- [18] Young HE, Steele TA, Bray RA, Detmer K, Blake LW, Lucas PW, et al. Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56, and MHC class-I. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;221:63–71.
- [19] Jo Y-Y, Lee H-J, Kook S-Y, Choung H-W, Park J-Y, Chung J-H, et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng* 2007;13:767–73.
- [20] Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res* 2008;87:767–71.
- [21] Morsczeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, et al. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int* 2005;29:567–75.
- [22] Viale-Bouroncle S, Völlner F, Möhl C, Küpper K, Brockhoff G, Reichert TE, et al. Soft matrix supports osteogenic differentiation of human dental follicle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;410:587–92.
- [23] Darby I. Non-surgical management of periodontal disease. *Aust Dent J* 2009;54 Suppl 1:S86–95.
- [24] Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morsczeck C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci* 2010;52:541–52.
- [25] Estrela C, Alencar AHG de, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J* 2011;22:91–8.
- [26] Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110:3499–506.
- [27] Morsczeck CO, Drees J, Gosau M. Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* but not from *Porphyromonas gingivalis* induce pro-inflammatory cytokines and alkaline phosphatase in dental follicle cells. *Arch Oral Biol* 2012;57:1595–601.
- [28] Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;81:531–5.
- [29] Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149–55.
- [30] Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth -A Pilot Study. *J Endod* 2008;34:166–71.
- [31] Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:5807–12.
- [32] Kim T-I, Han J-E, Jung H-M, Oh J-H, Woo KM. Analysis of histone deacetylase inhibitor-induced responses in human periodontal ligament fibroblasts. *Biotechnology Letters* 2012.
- [33] Tsuda H, Ochiai K, Suzuki N, Otsuka K. Butyrate, a bacterial metabolite, induces apoptosis and autophagic cell death in gingival epithelial cells. *J Periodont Res* 2010;45:626–34.

- [34] Pöllänen MT, Overman DO, Salonen JI. Bacterial metabolites sodium butyrate and propionate inhibit epithelial cell growth in vitro. *J Periodont Res* 1997;32:326–34.
- [35] Anderson HC. Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 1989;60:320–30.
- [36] Boskey AL. Mineral-matrix interactions in bone and cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 1992;244–74.
- [37] Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1976;73:1447.
- [38] Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 1989;69:990–1047.
- [39] Javed A, Barnes GL, Jasanya BO, Stein JL, Gerstenfeld L, Lian JB, et al. runt Homology Domain Transcription Factors (Runx, Cbfa, and AML) Mediate Repression of the Bone Sialoprotein Promoter: Evidence for Promoter Context-Dependent Activity of Cbfa Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 2001;21:2891–905.
- [40] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747–54.
- [41] Iwami K, Moriyama T. Effects of short chain fatty acid, sodium butyrate, on osteoblastic cells and osteoclastic cells. *Int J Biochem* 1993;25:1631–5.
- [42] Xu S, De Veirman K, Evans H, Santini GC, Vande Broek I, Leleu X, et al. Effect of the HDAC inhibitor vorinostat on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro and bone formation in vivo. *Acta Pharmacol Sin* 2013;34:699–709.
- [43] Schroeder TM, Kahler RA, Li X, Westendorf JJ. Histone deacetylase 3 interacts with *runx2* to repress the osteocalcin promoter and regulate osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2004;279:41998–2007.
- [44] Jeon E-J, Lee K-Y, Choi N-S, Lee M-H, Kim H-N, Jin Y-H, et al. Bone Morphogenetic Protein-2 Stimulates Runx2 Acetylation. *J Biol Chem* 2006;281:16502–11.
- [45] Jin H, Park J-Y, Choi H, Choung P-H. HDAC Inhibitor Trichostatin A Promotes Proliferation and Odontoblast Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *Tissue Engineering Part A* 2013;19:613–24.
- [46] Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther* 2010;1:5.

Originalpublikation

Butyrate stimulates the early process of the osteogenic differentiation but inhibits the biomineralization in dental follicle cells (DFCs)

Johannes Drees¹, Oliver Felthaus¹, Martin Gosau¹ and Christian Morsczeck¹

(1) Department of Cranio-Maxillofacial Surgery, University Hospital Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany

Published in: *Odontology*

Publishing date: 9. July 2013 (online)

DOI 10.1007/s10266-013-0117-2

Abstract

Dental stem cells, especially dental follicle cells (DFCs) as precursor cells for the periodontium have interesting prospects for regenerative dentistry. During periodontitis, butyrate as a bacterial metabolite and inflammatory agent is often found in millimolar concentrations in periodontal pockets. This study evaluates the effects of butyrate on the proliferation and osteogenic differentiation of DFCs. We assessed cell viability/proliferation (BCA assay) and osteogenic differentiation (ALP activity, alizarin staining and RT PCR) of DFCs in vitro after butyrate supplementation. Butyrate concentrations of 20 mM or higher are toxic for DFCs. At a non-toxic concentration, butyrate promotes the expression of alkaline phosphatase and collagen type-1 but inhibits the formation of calcified nodules and the induction of RUNX2 and osteocalcin under osteogenic differentiation conditions. In conclusion, DFCs are resistant to physiological high concentrations of butyrate. Butyrate facilitates the osteogenic differentiation of DFCs in early stages but inhibits calcification at later stages of the differentiation process.

Keywords: Dental follicle cells, Butyrate, Osteogenic differentiation, Alkaline phosphatase, Proliferation

Introduction

Periodontitis is a bacterial infection of the connective tissue surrounding the dental root and the main cause for tooth loss [1]. After the initial infiltration of bacteria into the periodontal pocket, an immunological response is triggered by the presence of virulence factors such as carboxylic acids, lipopolysaccharides (LPS), proteases and other immune-modulatory molecules such as interleukins. The response, mediated by mono- and lymphocytes, leads to an irreversible loss of periodontal tissue [2]. One important virulence factor is butyrate (butyric acid), a member of the short-chain carboxylic acid family. Butyric acid is a major metabolic product of Gram-negative periodontopathic bacteria such as *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Fusobacterium* and is released in millimolar concentrations. It is known to play an important role in the etiology of periodontal diseases [3]. Butyrate is commonly found in dental plaque [4] and gingival crevicular fluid in a concentration correlated to the severity of the periodontal infection [5]. Several studies have shown that butyrate exhibits anti-proliferative properties on human pulp fibroblasts [6], B- and T-cells [7] and colon cancer cells [8]. It can also suppress [9] or stimulate [10] osteoblastic differentiation in a dose-dependent manner. Butyrate alters the expression of genes responsible for growth arrest, differentiation, and apoptosis by inhibiting the histone deacetylase in many different cell lines [11, 12]. Current research on this topic shows varying results depending on cell type; however, no research has been done on dental stem/progenitor cells such as dental follicle cells (DFCs).

DFCs have multi-potent differentiation capabilities and could be promising for future clinical approaches in the treatment of periodontal diseases. The dental follicle is a loose connective tissue of ectomesenchymal origin surrounding the developing tooth germ. It plays an important role in tooth development and its eruption process [13]. DFCs express typical mesenchymal stem cell markers such as STRO-1, CD13, CD44, and CD73, and they are capable to differentiate into neural-, adipocyte-, periodontal ligament-, and cementoblast/ osteoblast-like tissue cells [14, 15]. However, DFCs also have unique characteristics different from mesenchymal stem cells, for example a soft matrix but not a rigid matrix supports the osteogenic differentiation of these cells [16].

Since a conventional treatment only inhibits the progression of periodontitis, a therapy is highly welcome, which supports the regeneration of the periodontium [17–19]. The progress in dental

stem cell research discovered their ability to modulate the immune response [20]. This effect combined with their multi-potent differentiation potential makes DFCs an interesting source for cellular therapies of periodontal tissues.

In contrast to other oral cell types such as gingival fibroblasts, DFCs are only little exposed to bacterial stimuli such as butyrate. Moreover, our previous study has shown that DFCs responded differently to the exposure of LPS than other oral cell types (e.g. PDL fibroblasts) [21]. However, the reaction of DFCs on treatment with butyrate (sodium butyrate: NaB) is still unknown. Therefore, this study investigated the viability/proliferation and the osteogenic differentiation of DFCs after treatment with NaB.

Materials and methods

Cell culture

The DFCs were isolated previously [21]. Briefly, the attached dental follicle was separated from the developing root of an impacted third molar [15] with the informed consent of the patient. The follicle was separated from the tooth, the dental papilla tissue was discarded, and the cells were minced and digested in a solution of 0.1 U/ml collagenase type I and 1 U/ml dispase (Roche, Mannheim, Germany) for 1 h at 37 °C. Plastic adherent spindle-like cells (Fig. 1a) were cultured in MesenchymStem Medium (PAA, Pasching, Austria) until confluence, before being passaged and seeded at a density of 5000 cells/cm². Medium changes occurred every two to three days. For osteogenic differentiation, the StemPro Osteogenic Differentiation Kit (Invitrogen, Darmstadt, Germany) was used. For experiments, cells were used between the passages 4–6.

DFCs were analyzed for stem cell-associated markers with flow cytometry for characterization of anti-CD105-APC (1/10 dilution) (130-094-926, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), anti-CD44-FITC (1/10 dilution) (130-095-195, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and anti-nestin-PE (1/21 dilution) (IC1259A, R&D systems, Minneapolis, MN USA). Single-cell suspensions of DFCs were incubated with monoclonal antibodies for 45 min at 4 °C, washed once in PBS with 2 nM EDTA and 0.5 % BSA. For intracellular staining (nestin) DFCs were permeabilized with 0.5 % saponin and 0.5 % BSA for 15 min and washed once in PBS with 2 nM EDTA and 0.5 % BSA before staining with anti-nestin antibody. Immunoglobulin G (IgG) isotype-matched control (Miltenyi Biotec) was used as negative control. Flow cytometry analyses

were done using the FACS Canto II (Becton–Dickinson, Heidelberg, Germany). Isolated DFCs express markers CD105, CD44, and nestin (Fig. 1b).

BCA protein assay (cell viability/proliferation)

A BCA protein assay (ThermoScientific, Massachusetts, USA) was used to determine the amount of protein in the wells, which corresponds to the amount of vital adhering cells. Cells were seeded at a density of 5000 cells/cm² in a 48-well plate and given 24 h to adhere before being treated with varying concentrations of NaB (Sigma Aldrich, Munich, Germany). After 24 and 72 h, the cells were washed with PBS and lysed with 25 µl of 0.1 % Triton-X 100. 200 µl of the BCA reagent was added and plates were incubated at 37 °C for 30 min. Subsequently the protein concentration was measured at 540 nm.

WST-1 assay (cell viability)

The WST-1 assay (Roche, Mannheim, Germany) was applied to determine the amount of viable cells. The cells were seeded at a density of 5000 cells/cm² in a 96-well plate and given 24 h to adhere. They were then exposed to different concentrations of NaB. After 24 h, the WST-1 reagent was added to the cells according to the manufacturer's manual and incubated for 4 h before being evaluated in a spectrophotometer at 450 nm.

Osteogenic differentiation

DFCs were seeded at 5000 cells/cm² in cell culture dishes as described above. At sub confluence, the medium was changed and an osteogenic differentiation medium (StemPro Ost. Diff. Kit, Invitrogen, Darmstadt, Germany), supplemented with or without 0.2 mM NaB was used.

For the alkaline phosphatase (ALP) activity quantification (day 7 and day 14 of differentiation), DFCs were washed with PBS and then lysed in 40 µl of Triton-X 100. 15 µl of the lysate was used for DNA concentration measurement, which was done with the quantIT dsDNA Kit (Invitrogen, Darmstadt, Germany) according to manufacturer's protocol. The remaining 25 µl was used to measure ALP concentration by adding 25 µl alkaline buffer (Sigma Aldrich) and 42 µl phosphatase substrate (Sigma Aldrich). After 30 min of incubating the experiment at 37 °C, the reaction was stopped by adding 42 µl of 0.3 M NaOH and the optical density was measured at 405 nm. The DNA quantification results were used to correlate the individual ALP activity to the amount of cells in each well.

DFCs at day 21 of differentiation were used for alizarin red staining. Cells were washed with PBS, fixed with 70 % acetone and stained with alizarin red. The formation of calcified nodules was analyzed under a microscope. For quantitative analysis, the alizarin staining was lysed with cetylpyridinium-chloride-mono-hydrate and the optical density was measured at 570 nm.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

mRNA was isolated after 7 days of osteogenic differentiation to assess changes in the expression of known osteogenic markers. The cells were cultured for differentiation as described above. After 7 days, RNA was isolated with the RNEasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocols. The subsequent reverse transcription of 1 µg RNA into cDNA was done using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

qRT-PCR reactions were performed using the LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I Kit or the LightCycler® TaqMan® Master (Roche, Mannheim, Germany). The LightCycler 2.0 was used for thermocycling. Primers are listed in Table 1. The expression of the housekeeper gene GAPDH was used as reference for measurements. The $\Delta\Delta C_t$ calculation method was applied to evaluate the relative quantity of gene expression.

Results

FACS analysis showed that the isolated cells (Fig. 1a) were positive for CD105, CD44, and nestin (Fig. 1b).

The cell proliferation under the influence of butyrate was measured after 24 and 72 h. No significant decrease of cell proliferation was determined at concentrations up to 2 mM (Fig. 2). However, the number of adhering cells was significantly decreased at concentrations of 20 mM and higher. After 72 h, only 10 % of cells survived at 200 mM of NaB. The estimated lethal concentration 50 (LC50) was between 100 and 200 mM (Fig. 2).

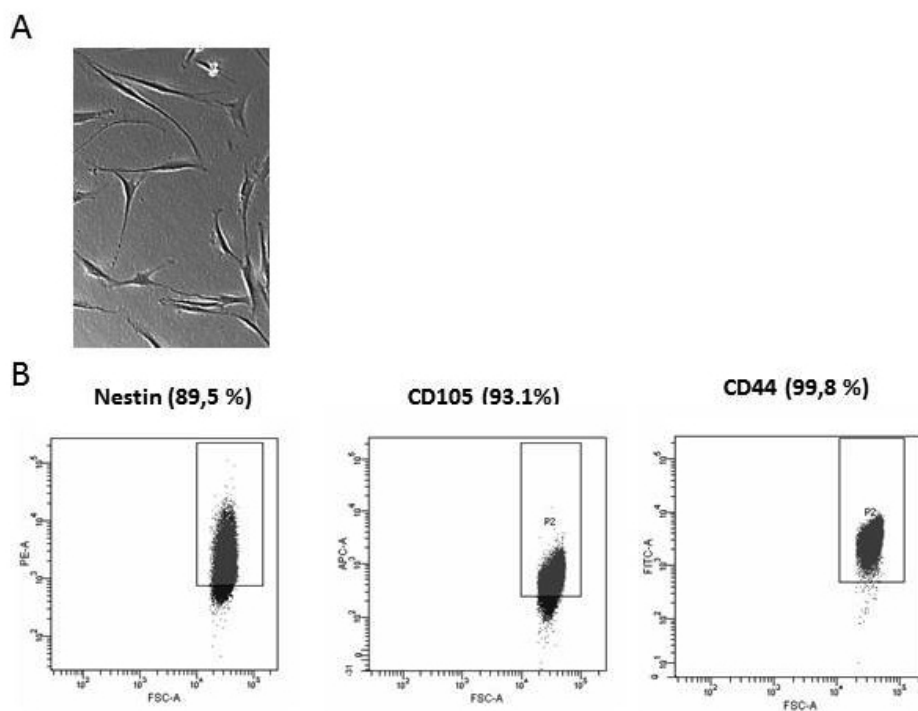


Fig. 1 a DFCs in cell culture; b Flow cytometry analyses of DFCs. Cultured DFCs were positive for cell-surface markers CD 105, CD44, and nestin. The percentage of positive cells is indicated

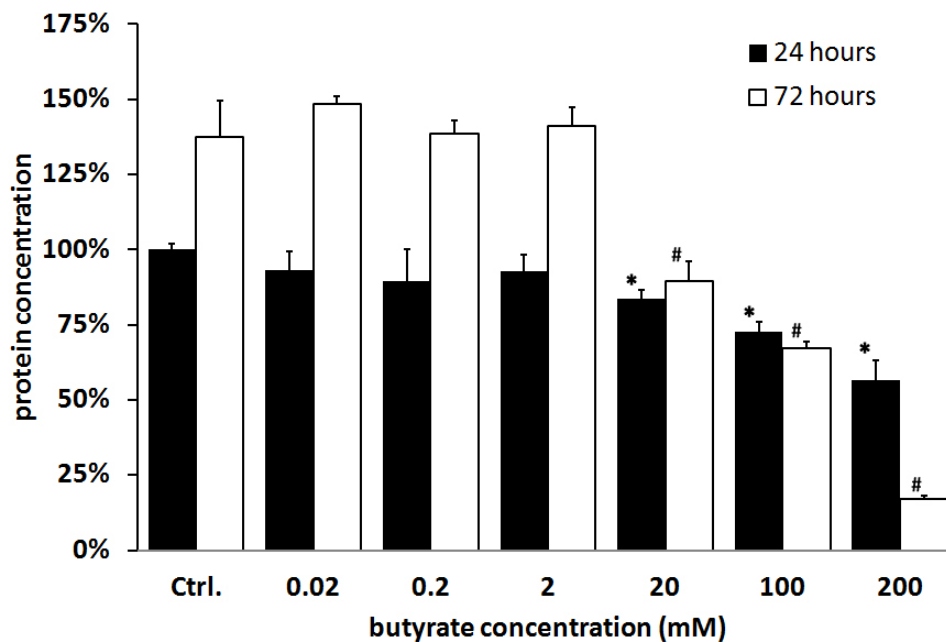


Fig. 2 Cell viability/proliferation of DFCs after stimulation with NaB. The cells were cultured for 24 or 72 h in DMEM without (Ctrl.) and with NaB concentrations ranging from 0.02 to 200 mM. Data is normalized to the protein concentration of the control group after 24 h. All values are means with standard deviation. Statistics were done with ANOVA (n = 3). *p < 0.05 compared to 24 h control group. #p < 0.05 compared to 72 h control group.

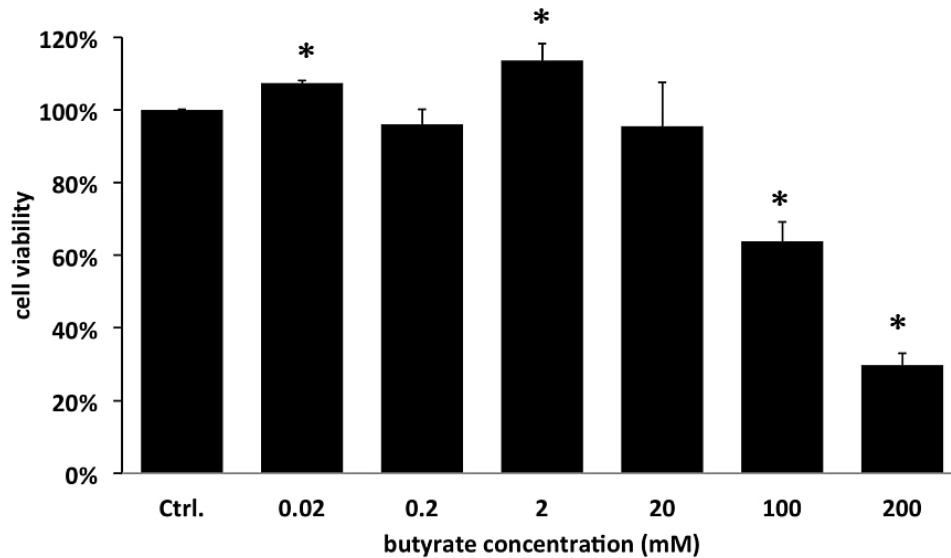


Fig. 3 Cell viability of DFCs after stimulation with NaB. The cells were cultured for 24 h in DMEM without (Ctrl.) and with NaB concentrations ranging from 0.02 to 200 mM. Data is normalized to the control group. All values are means with standard deviation. Statistics were done with ANOVA (n = 3). *p < 0.05

Our results with the BCA assay were confirmed with a WST1 assay (Fig. 3).

For the osteogenic differentiation experiments, the osteogenic differentiation medium was supplemented with a NaB concentration of 0.2 mM to avoid any toxic effects of NaB on DFCs. After 7 days, ALP activity in the treated cells was slightly but not significantly decreased as compared to the positive control group. However, the ALP activity in NaB-treated cells was significantly increased after 14 days, if compared with the osteogenic differentiation group without NaB (Fig. 4). After 21 days of differentiation, a calcium accumulation was detectable after alizarin red staining in the positive controls and treated cells; however, the mineralization was significantly diminished in the group with NaB-treated DFCs (Fig. 5). The qRT-PCR after 7 days of NaB treatment showed significant changes for the expression of ALP and collagen type-1. However, the expression of Osteocalcin and Runx2 was not induced (Fig. 6).

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR

Target gene	Forward primer	Reverse Primer	Accession no.
Collagen type-1	5'-TGCTGGCAAAGAAGGCGGCA-3'	5'-ACCAGGAGCCCCCTCACGTC-3'	NM_000088
ALP	5'-CAACCCTGGGGAGGAGAC-3'	5'-GCATTGGTGTGTACGTCTTG-3'	NM_000478
OCN	5'-TGAGAGCCCTCACACTCCTC-3'	5'-ACCTTTGCTGGACTCTGCAC-3'	NM_199173
Runx2	5'-CACCATGTCAGCAAAACTTCTT-3'	5'-TCACGTCGCTCATTTTGC-3'	NM_001015051
GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	NM_002046

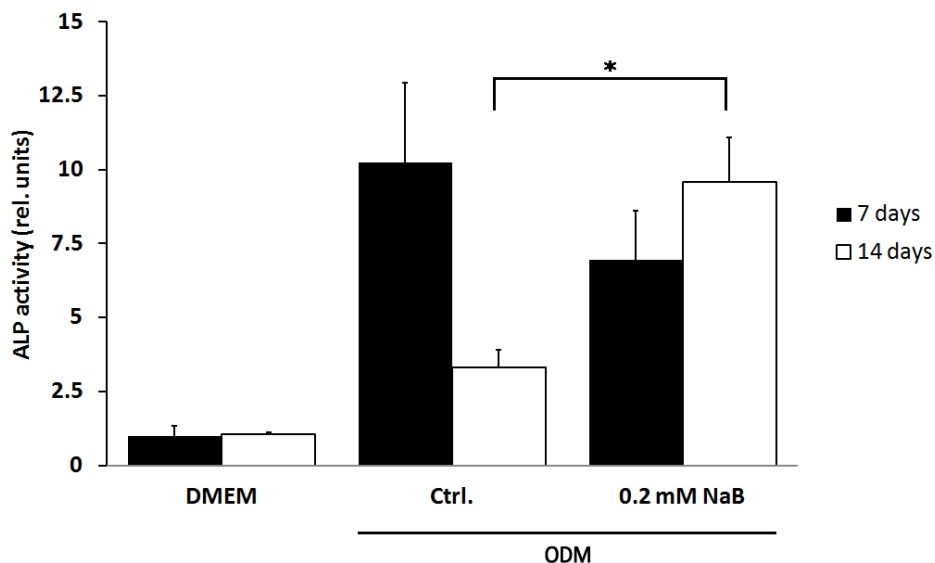


Fig. 4 ALP activity assessed after 7 and 14 days of culture in standard (DMEM) or osteogenic differentiation medium (ODM). ALP activity was measured with a pNPP-based assay and calibrated against the ALP activity of DFCs in untreated standard medium after 7 days of differentiation. All values are means with standard deviation. Statistics were done with ANOVA ($n = 3$, $*p < 0.05$)

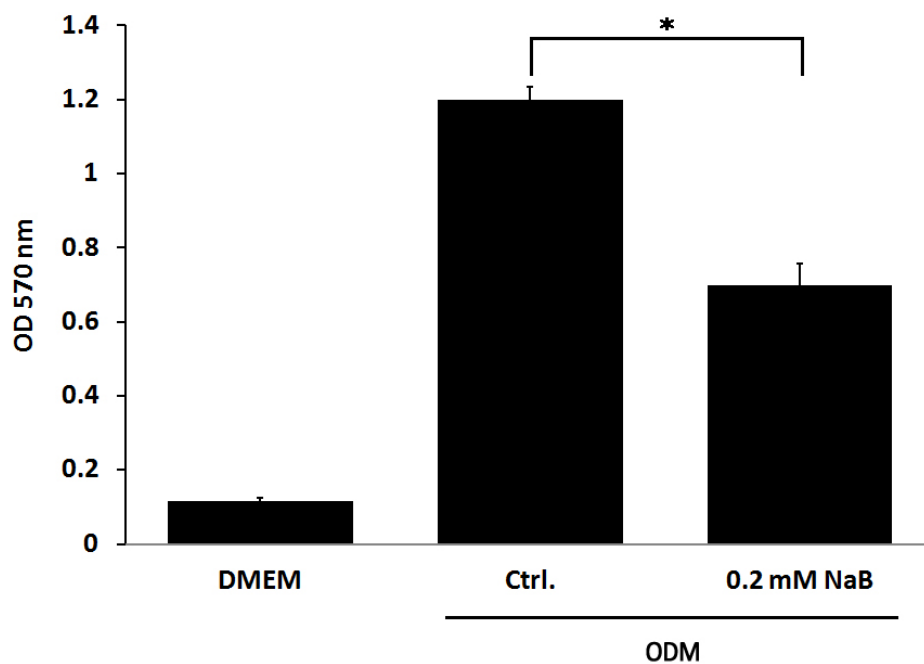


Fig. 5 Alizarin red staining was performed after 21 days to assess biomineralization. DFCs were cultured in a standard cell culture medium (DMEM) and an osteogenic differentiation medium (ODM), as well as in an ODM medium supplemented with 0.2 mM NaB. Values are normalized to the untreated cells in ODM. All values are means with standard deviation. Statistics were done with ANOVA ($n = 4$, $*p < 0.05$)

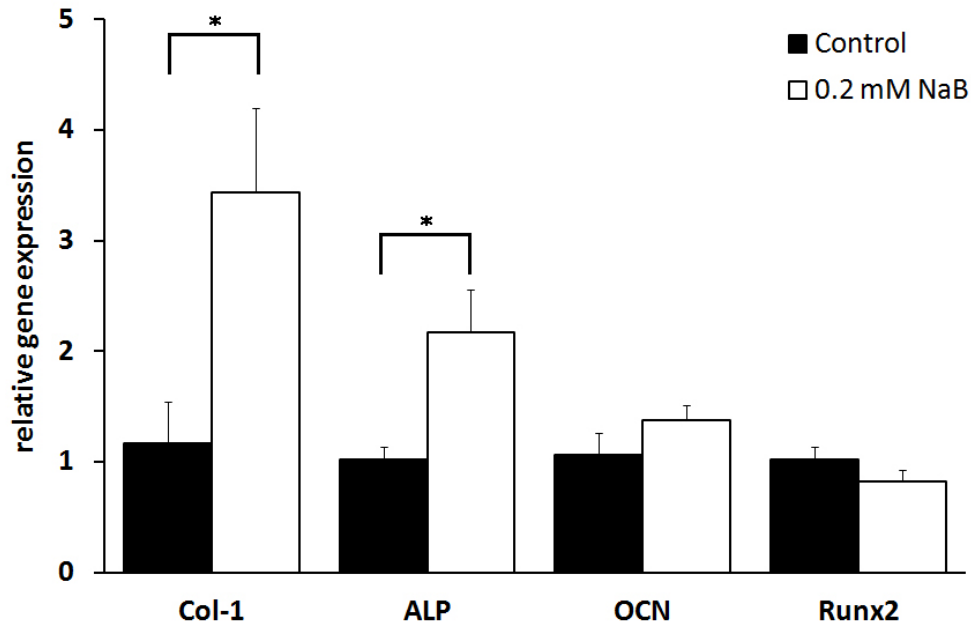


Fig. 6 Quantitative real-time RT-PCR was performed after 7 days in osteogenic differentiation medium with treated (0.2 mM NaB) and untreated cells. Gene expression was calibrated to the cells in standard cell culture medium (Ctrl.). All values are means with standard deviation. Measurements were performed in triplicates. Statistics were done with ANOVA ($n = 3$, $*p < 0.05$)

Discussion

We analyzed the cell proliferation rate and the osteogenic differentiation of DFCs in this study to evaluate the impact of NaB on cellular therapies with DFCs. NaB is a major component of dental plaque and dental crevicular fluid with concentrations ranging from 0.2 to 2.8 mM [4, 5]. It is also an inhibitor of the histone deacetylases (HDACs), influencing genes responsible for proliferation, apoptosis, and differentiation [11, 12]. In our viability/proliferation assays, we found that NaB starts to affect proliferation rates at a concentration of 20 mM with an LC50 of more than 100 mM after 72 h. However, our data suggest also that DFCs are more resistant to NaB than other cell types. In a study with periodontal ligament fibroblasts, the cell proliferation rate was severely inhibited at a concentration of 1 mM NaB [22]. Studies on gingival epithelial cells, skin epithelial cells, porcine epithelial rests of Malassez, and dental pulp fibroblasts showed a 50 % decrease of cell growth rates at concentrations of 1, 1, 4, and 16 mM, respectively [6, 23, 24]. One explanation for the resistance of DFCs could be the location (niche) and the highly undifferentiated state of DFCs. For example, gingival epithelial cells and periodontal ligament cells have a more differentiated state and they are located in close vicinity to oral bacteria. This could make them more sensitive to the administration of NaB.

In contrast to the proliferation of DFCs, NaB affects the osteogenic differentiation of DFCs at low concentrations. We determined the ALP activity, the mineralization and the expression of known osteogenic differentiation markers such as collagen type-1 (COL-1), Runx2, and Osteocalcin (OCN). The enzymatic activity of ALP is important for the crystallization of hydroxyapatite, and it is therefore a decisive factor for the osteoblastic differentiation [25]. We found that 0.2 mM NaB induces the ALP activity after 14 days of differentiation while the mineralization was inhibited after 21 days of differentiation. The gene expression of early differentiation markers such as collagen type-1, and ALP was significantly up-regulated after 1 week of differentiation, while the expression of late markers OCN and Runx2 were constitutively expressed. Morozumi et al. [9] found that NaB inhibits osteoblastic differentiation and nodule formation by down-regulation of Runx2, Osterix, Dlx5, Msx2, and ALP activity in ROS17/2.8 cells. However, Katono et al. [10] reported that NaB stimulated osteogenic differentiation of osteoblasts. Interestingly, NaB increases also the ALP activity in preosteoblastic cells but not in mature osteoblastic cells [26]. Results of these studies suggest that the influence of NaB on the osteogenic differentiation depends on the concentration and on the type of the osteogenic precursor cells. In our study, the biomineralization of DFCs was decreased while ALP activity was increased. This could be due to the failed induction of OCN and Runx2 as important factors for the biomineralization. However, further studies on molecular mechanisms are required to explain the effect of NaB on DFCs.

In conclusion, DFCs can withstand higher NaB concentrations than other oral cell types of previous studies. Interestingly, a low NaB concentration stimulates the ALP activity and COL-1 expression during osteogenic differentiation, but inhibits the biomineralization. The natural location and the undifferentiated state of DFCs could be an explanation for this result, but further studies are required to prove this hypothesis.

Acknowledgments

We thank Anja Reck for technical assistance.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

References

1. Papapanou PN. Epidemiology of periodontal diseases: an update. *J Int Acad Periodontol.* 1999;1:110-6.
2. Graves DT, Jiang Y, Genco C. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Curr Opin Infect Dis.* 2000;13:227-32.
3. Tonetti M, Eftimiadi C, Damiani G, Buffa P, Buffa D, Botta GA. Short chain fatty acids present in periodontal pockets may play a role in human periodontal diseases. *J Periodont Res.* 1987;22:190-1.
4. Singer RE, Buckner BA. Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. *Infect Immun.* 1981;32:458.
5. Niederman R, Buyle-Bodin Y, Lu B-Y, Robinson P, Naleway C. Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. *J Dent Res.* 1997;76:575-9.
6. Ho Y-C, Chang Y-C. Effects of a bacterial lipid byproduct on human pulp fibroblasts in vitro. *J Endod.* 2007;33:437-41.
7. Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K. Volatile fatty acids. metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production. *J Dent Res.* 1995;74:1367-73.
8. Gamet L, Daviaud D, Denis-Pouxviel C, Remesy C, Murat JC. Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int J Cancer.* 1992;52:286-9.
9. Morozumi A. High concentration of sodium butyrate suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation in ROS17/2.8 cells. *J Oral Sci.* 2011;53:509-16.
10. Katono T, Kawato T, Tanabe N, Suzuki N, Iida T, Morozumi A, et al. Sodium butyrate stimulates mineralized nodule formation and osteoprotegerin expression by human osteoblasts. *Arch Oral Biol.* 2008;53:903-9.
11. De Ruijter AJM, Van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Van Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* 2003;370:737-49.
12. Archer SY, Johnson J, Kim H-J, Ma Q, Mou H, Daesety V, et al. The histone deacetylase inhibitor butyrate downregulates cyclin B1 gene expression via a p21/WAF-1-dependent mechanism in human colon cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289:G696-703.
13. Cahill DR, Marks SC Jr. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol.* 1980;9:189-200.
14. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res.* 2008;87:767-71.
15. Morsczeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, et al. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int.* 2005;29:567-75.

16. Viale-Bouroncle S, Völlner F, Möhl C, Küpper K, Brockhoff G, Reichert TE, et al. Soft matrix supports osteogenic differentiation of human dental follicle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;410:587–92.
17. Darby I. Non-surgical management of periodontal disease. *Aust Dent J.* 2009;54(Suppl 1):S86–95.
18. Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morsczeck C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci.* 2010;52:541–52.
19. Estrela C, de Alencar AHG, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J.* 2011;22:91–8.
20. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007;110:3499–506.
21. Morsczeck CO, Drees J, Gosau M. Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* but not from *Porphyromonas gingivalis* induce pro-inflammatory cytokines and alkaline phosphatase in dental follicle cells. *Arch Oral Biol.* 2012;57(12):1591–1601.
22. Kim T-I, Han J-E, Jung H-M, Oh J-H, Woo KM. Analysis of histone deacetylase inhibitor-induced responses in human periodontal ligament fibroblasts. *Biotechnol Lett.* 2013;35:129–133.
23. Tsuda H, Ochiai K, Suzuki N, Otsuka K. Butyrate, a bacterial metabolite, induces apoptosis and autophagic cell death in gingival epithelial cells. *J Periodont Res.* 2010;45:626–34.
24. Pöllänen MT, Overman DO, Salonen JI. Bacterial metabolites sodium butyrate and propionate inhibit epithelial cell growth in vitro. *J Periodont Res.* 1997;32:326–34.
25. Anderson HC. Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest.* 1989;60:320–30.
26. Iwami K, Moriyama T. Effects of short chain fatty acid, sodium butyrate, on osteoblastic cells and osteoclastic cells. *Int J Biochem.* 1993;25:1631–5.

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer, Priv.-Doz. Dr. Christian Morszeck für die Überlassung des Themas und die sehr gute und intensive Betreuung bedanken. Er stand mir mit seinem Fachwissen stets zur Seite und ermöglichte mir den ersten Einblick in die Welt der Wissenschaft.

Des Weiteren möchte ich Oliver Felthaus für seine Hilfe danken, der mir stets mit Rat, Tat und Humor zur Seite stand. Ohne seine umfangreichen Einweisungen in das Laborleben wäre wohl so mancher Versuch misslungen.

Auch geht ein Dank an Sandra Viale-Bouroncle und Anja Reck für ihre Hilfe im Labor.

Ein spezieller Dank gilt auch meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mich stets unterstützt und gefördert haben.

Zum Schluss noch ein Wort des Dankes an meine treuen Wegbegleiter Philipp, Philipp und Martin, welche mich in den fünf anstrengenden aber unvergesslichen Studienjahren begleitet haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name **Johannes Drees**
 Geburtsdatum **22. April 1984**
 Geburtsort **Gießen**

Berufliche Laufbahn

seit 04/13 **Assistenz Zahnarzt / Wiss. Mitarbeiter**
 Abt. f. Zahnerhaltung & Präventivzahnmedizin (Prof. Paris)
 Charité Universitätsmedizin Berlin

09/12 – 04/13 **Vorbereitungsassistent**
 Zahnarztpraxis Petra Wagner, Berlin

Ausbildung

04/07 – 06/12 **Zahnmedizinstudium**
 Universität Regensburg

06/03 **Abitur**
 Gesamtschule Gießen-Ost

Wissenschaftliche Arbeiten

2013 Drees J, Felthaus O, Gosau M, Morszeck C: „Butyrate stimulates the early process of the osteogenic differentiation but inhibits the biomineralization in dental follicle cells (DFCs)“
 Odontology. 2013 Jul 9. (DOI 10.1007/s10266-013-0117-2)

2012 Morszeck CO, Drees J, Gosau M: „Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* but not from *Porphyromonas gingivalis* induce pro-inflammatory cytokines and alkaline phosphatase in dental follicle cells, Arch Oral Biol. 57(12); 1595-1601; 2012

01/12 Postervortrag auf der 44. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung der DGZMK (AfG)
 „Einfluss von bakteriellen Endotoxinen auf Vitalität und Differenzierung von dentalen Follikelzellen“