

Aus der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Porphyromonas Gingivalis Suppresses Differentiation and
Increases Apoptosis of Osteoblasts from
New Zealand Obese Mice

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Cora Dittmann

aus Ueckermünde

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt in Deutsch	3
2. Abstrakt in Englisch.....	4
3. Eidesstattliche Versicherung	5
4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM).....	6
5. Publikation	7
6. Lebenslauf	14
7. Publikationsliste	15
8. Danksagung.....	16

1. Abstrakt in Deutsch

***Porphyromonas Gingivalis* inhibiert die Differenzierung und fördert die Apoptose von Osteoblasten der New Zealand Obese Maus**

Hintergrund und Zielstellung: Das metabolische Syndrom (metS), ein komplexes Krankheitsbild verschiedener chronischer Erkrankungen, wird häufig im Zusammenhang mit parodontalen Erkrankungen beobachtet. Bei zunehmender Prävalenz von Adipositas sowie assoziierten metabolischen Erkrankungen und deren Folgeerkrankungen, ist die Untersuchung des Zusammenhanges von parodontalen Infektionen und metabolischer Dysfunktion und dessen Auswirkung auf das Knochengewebe daher von besonderer Relevanz. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) auf die Differenzierung primärer Osteoblasten der New Zealand Obese (NZO) Maus, ein Model für das metS, zu untersuchen.

Methoden: Primäre Osteoblasten wurden aus Kalvarien drei Tage alter NZO Mäuse und C57BL/6J Kontrollmäuse gewonnen. Nach der Kultivierung und unter Nutzung der ersten und zweiten Passagen, wurden die Zellen mit *P. gingivalis* infiziert. Die Zellproliferation wurde mittels BrdU Inkorporation untersucht. Analysen des Zellzyklus sowie der frühen und späten Apoptose wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt. Die Zellnekrose wurde über die freigesetzte Lactatdehydrogenase (LDH)-Konzentration ermittelt. Die Genexpression wurde mit Real-Time-PCR (RT-PCR) analysiert.

Ergebnisse: 12 Stunden nach *P. gingivalis*-Stimulation, konnte bei den NZO Osteoblasten, im Vergleich zu normalen Osteoblasten (C57BL/6J), eine signifikant verminderte Proliferation ($p \leq 0.01$) zusammen mit einer erhöhten G₂ Zellzyklusphase beobachtet werden. 3 und 6 Stunden nach der Stimulation, zeigten die NZO Osteoblasten in der durchflusszytometrischen Analyse eine signifikante Steigerung ($p \leq 0.01$) der früh (Annexin-V-positiv) und spät (erhöhte Caspase-3-Aktivität) apoptotischen Zellen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der LDH-Freisetzung festgestellt. Die RT-PCR Daten zeigten eine signifikant unterdrückte Expression ($p \leq 0.01$) von *Kollagen 1*, *Osteocalcin* und *Runt related Transkriptionsfaktor 2 (Runx2)* in NZOs im Vergleich zu normalen Osteoblasten.

Fazit: Im Vergleich zu normalen Osteoblasten verminderte *P. gingivalis* die Proliferation in den NZO Osteoblasten und führte gleichzeitig zu einer verstärkten Apoptose. Auch die unterdrückte Expression von Osteoblastenmarkern bei den NZOs kann zur Pathogenese der Parodontitis bei Patienten mit metS beitragen.

2. Abstrakt in Englisch

***Porphyromonas Gingivalis* Suppresses Differentiation and Increases Apoptosis of Osteoblasts from New Zealand Obese Mice**

Background: The metabolic syndrome (metS), a complex cluster of risk factors for chronic diseases such as cardiovascular disease, is observed to be increasingly associated with periodontal disease. Inflammation induced by periodontal pathogens contribute to the inflammatory processes in patients with MetS. However, the fundamental contribution of periodontal bacteria to periodontal bone loss in MetS patients remains unclear. The aim of the present study is to analyze the effect of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) on differentiation of primary osteoblasts from New Zealand Obese (NZO) mice, a model for MetS, compared to C57BL/6J osteoblasts.

Methods: Primary calvarial osteoblasts, isolated from 3-day-old NZO and control C57BL/6J mice, were stimulated with *P. gingivalis*. Proliferation was quantified by BrdU incorporation. The cell cycle as well as early and late apoptosis were measured by flow cytometry. Gene expression was determined by Real-Time PCR.

Results: 12 hours following *P. gingivalis* stimulation, NZO osteoblasts showed a significantly decreased proliferation ($p \leq 0.01$) with increased G2 cell cycle phase compared to normal osteoblasts. Compared to control cells, flow cytometry analysis demonstrated significant ($p \leq 0.01$) increase of early apoptotic cells by Annexin-V positive and late apoptosis by Caspase-3 activity in NZOs at 3, and 6 hours following stimulation. No significant LDH release was found following *P. gingivalis* stimulation. RT-PCR data showed a significantly suppressed expression ($p \leq 0.01$) of Collagen 1, Osteocalcin and Runt related transcription factor 2 (Runx2) in NZOs compared to normal osteoblasts.

Conclusion: The present data demonstrates that *P. gingivalis* down-regulates proliferation and promotes apoptosis in primary NZO osteoblasts, unlike C57BL/6J osteoblasts. Also, a suppressed osteoblastic marker expression in NZOs may contribute to pathogenesis of periodontitis in patients with metS. These findings indicate a cellular effect of oral bacterial infections on osteoblast differentiation in a MetS model comprising all metabolic factors. Therefore, the present data may provide a cellular link between both disease entities.

3. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Cora Dittmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Porphyromonas Gingivalis* Suppresses Differentiation und Increases Apoptosis of New Zealand Obese Mice“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Cora Dittmann

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Cora Dittmann, Salim Doueiri, Reinhart Kluge, Henrik Dommisch, Timo Gaber, Nicole Pischon: *Porphyromonas Gingivalis* Suppresses Differentiation und Increases Apoptosis of New Zealand Obese Mice, Journal of Periodontology, 2015 May 8:1-17, DOI: 10.1902/jop.2015.150032

Beitrag im Einzelnen:

Ich, Cora Dittmann, habe alle Daten in aufwendiger und langdauernder Laborarbeit innerhalb der letzten 1,5 Jahre experimentell erhoben und eigenständig ausgewertet. Anhand der Daten, habe ich alle Diagramme selbst erstellt und die Publikation allein geschrieben und mit Unterstützung meiner Doktormutter und der Koautoren überarbeitet.

Unterschrift der Doktorandin Cora Dittmann

4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

Journal Citation Reports®



2013 JCR Science Edition

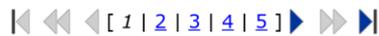
Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: **subject categories DENTISTRY, ORAL SURGERY & MEDICINE** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by:

Journals 1 - 20 (of 83)



Page 1 of 5

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data ⁱ						Eigenfactor® Metrics ^j	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor® Score	Article Influence® Score
<input checked="" type="checkbox"/>	1	DENT MATER	0109-5641	9144	4.160	4.463	0.520	175	6.3	0.01611	1.022
<input checked="" type="checkbox"/>	2	J DENT RES	0022-0345	15426	4.144	4.433	0.677	192	>10.0	0.02239	1.382
<input checked="" type="checkbox"/>	3	J CLIN PERIODONTOL	0303-6979	10183	3.610	4.506	0.753	146	8.8	0.01478	1.184
<input checked="" type="checkbox"/>	4	CLIN ORAL IMPLAN RES	0905-7161	9106	3.123	4.206	0.500	220	6.9	0.01536	1.016
<input checked="" type="checkbox"/>	5	ORAL ONCOL	1368-8375	5836	3.029	3.410	0.692	159	5.4	0.01416	0.934
<input checked="" type="checkbox"/>	6	PERIODONTOL 2000	0906-6713	2746	3.000	3.762	1.500	40	8.8	0.00329	1.044
<input checked="" type="checkbox"/>	7	MOL ORAL MICROBIOL	2041-1006	333	2.841	2.889	0.541	37	2.4	0.00141	0.783
<input checked="" type="checkbox"/>	8	J DENT	0300-5712	5241	2.840	2.916	0.886	175	6.6	0.00930	0.736
<input checked="" type="checkbox"/>	9	CLIN IMPLANT DENT R	1523-0899	1945	2.796	3.713	0.427	96	5.3	0.00474	1.047
<input checked="" type="checkbox"/>	10	J ENDODONT	0099-2399	9977	2.788	3.122	0.370	292	6.2	0.01477	0.586
<input checked="" type="checkbox"/>	11	J CRANIO MAXILL SURG	1010-5182	2618	2.597	2.368	0.285	137	7.1	0.00443	0.544
<input checked="" type="checkbox"/>	12	J PERIODONTOL	0022-3492	12588	2.565	3.083	0.428	208	9.6	0.01492	0.802
<input checked="" type="checkbox"/>	13	CARIES RES	0008-6568	3577	2.500	3.009	0.529	68	9.9	0.00417	0.754
<input checked="" type="checkbox"/>	14	ORAL DIS	1354-523X	2639	2.404	2.473	0.461	89	6.0	0.00611	0.705
<input checked="" type="checkbox"/>	15	CLIN ORAL INVEST	1432-6981	2211	2.285	2.597	0.517	242	4.0	0.00633	0.736
<input checked="" type="checkbox"/>	16	INT ENDOD J	0143-2885	4213	2.273	2.322	0.331	136	7.7	0.00796	0.706
<input checked="" type="checkbox"/>	17	J AM DENT ASSOC	0002-8177	5570	2.238	2.451	0.429	112	>10.0	0.00736	0.782
<input checked="" type="checkbox"/>	18	J PERIODONTAL RES	0022-3484	3512	2.215	2.239	0.464	97	9.6	0.00455	0.553
<input checked="" type="checkbox"/>	19	INT J ORAL SCI	1674-2818	298	2.029	2.320	0.200	40	3.0	0.00137	0.659
<input checked="" type="checkbox"/>	20	EUR J ORAL IMPLANTOL	1756-2406	349	2.017	2.694	0.538	26	3.5	0.00130	0.631

5. Publikation

Dittmann C, Doueiri S, Kluge R, Dommisch H, Gaber T, Pischon N.,
Porphyromonas gingivalis Suppresses Differentiation and Increases Apoptosis of
Osteoblasts From New Zealand Obese Mice.

J Periodontol. 2015 Sep;86(9):1095-102. doi: 10.1902/jop.2015.150032.

Epub 2015 May 8.

<http://dx.doi.org/10.1902/jop.2015.150032>

6. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7. Publikationsliste

Publikation

1. Cora Dittmann, Salim Doueiri, Reinhart Kluge, Henrik Dommisch, Timo Gaber, Nicole Pischon: *Porphyromonas Gingivalis* Suppresses Differentiation and Increases Apoptosis of Osteoblasts from New Zealand Obese Mice, Journal of Periodontology, 2015 May 8:1-17, DOI: 10.1902/jop.2015.150032

Poster Präsentationen

1. Cora Dittmann, Salim Doueiri, Reinhart Kluge, Nicole Pischon: Einfluss von *P. gingivalis* auf die Osteblastendifferenzierung der New Zealand Obese (NZO) Maus. DG PARO Jahrestagung September 2014 in Münster
2. Cora Dittmann, Salim Doueiri, Reinhart Kluge, Henrik Dommisch, Timo Gaber, Nicole Pischon: *Porphyromonas Gingivalis* Suppresses Proliferation and Increases Apoptosis of Osteoblasts from New Zealand Obese Mice. EuroPerio Kongress Juni 2015 in London, UK
3. Salim Doueiri, Cora Dittmann, Reinhart Kluge, Nicole Pischon: Die New Zealand Obese Maus als Parodontitismodell mit metabolischer Dysfunktion. DG PARO Jahrestagung September 2014 in Münster

8. Danksagung

Allen voran möchte ich meiner Doktormutter, Frau PD Dr. Nicole Pischon aus der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin, für die gemeinsame Wahl des Themas und die hervorragende Betreuung und Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit danken.

Mein nächster Dank geht an Dr. Timo Gaber von der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie Charité Berlin für seinen enormen Beitrag beim Erstellen, Bearbeiten und Überarbeiten der Publikation.

Meinem Doktorbruder Samy Doueiri danke ich für die außerordentlich gute und vertrauensvolle Unvergessen bleibt die gemeinsame, unvergessliche und manchmal unendlich scheinende Laborzeit. Diese Arbeit wäre ohne seine Hilfe so nicht möglich gewesen.

Dr. Reinhart Kluge vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke danke ich für sein Vertrauen und die Überlassung der NZO Mäuse.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Verena Kanitz für die Einführung in die experimentelle Medizin.

Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Eltern und meine Familie, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben und mir jederzeit liebevoll zur Seite standen. Ihnen gilt mein besonderer Dank.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund Hannes-Jo bedanken, der mir während der Zeit des Schreibens mit Liebe, Verständnis und Aufheiterung zur Seite stand und mir bei Zweifeln und schwierigen Phasen mit positiven Gedanken weiterhalf.