

# Transmission and Scanning Electron Microscopic Analysis of Mineralized Loci Formed by Human Periodontal Ligament Cells *in Vitro*

## Transmissions- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Mineralisierungsknoten humaner Parodontalligamentzellen: Eine *In-vitro*-Studie

Efthimia K. Basdra, Gerda Komposch<sup>1</sup>

**Abstract:** Fibroblasts isolated from human periodontal ligament (PDL) were cultured under a medium supplemented with ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate and dexamethasone. The cultures were assessed for their ability to elaborate a mineralized matrix.

Cell cultures stained positive when analyzed for alkaline phosphatase activity throughout the culture period. After about 3 weeks in culture, the cells produced a calcified matrix. Light microscopy showed formation of clusters of different shapes and sizes. Von Kossa staining revealed mineral deposits as amorphous brown-black precipitates. Transmission electron microscopy showed cells in multilayers and mineralized formations in close association with a dense network of collagen fibers. Scanning electron microscopy revealed smooth formations rising over the cultures with an abundant fiber matrix.

We conclude that human PDL fibroblasts can be induced to form a mineralized matrix which shares features with bone mineralized matrix but most likely represents a more immature type of *in vitro* mineralization. Moreover, the present study further supports the osteoblastic potential of these cells.

**Key Words:** Human PDL-fibroblasts · Matrix mineralization · Osteoblastic phenotype · Alkaline phosphatase

<sup>1</sup>Department of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, School of Dental Medicine, University of Heidelberg, Germany.

Dedicated to Prof. Dr. Emil Witt on the Occasion of his 65th Birthday.

Submitted: 10 Mar 1998.  
Accepted: 18 Oct 1998.

**Zusammenfassung:** Fibroblasten des humanen Parodontalligaments (PDL) wurden in einem Medium, das mit Vitamin C,  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason angereichert war, kultiviert. Diese Kulturen wurden auf ihre Fähigkeit zur Bildung einer mineralisierten Matrix hin untersucht.

In diesen Zellkulturen verlief der Nachweis der alkalischen Phosphatase während des gesamten Kulturzeitraums positiv. Nach einem Kulturzeitraum von etwa drei Wochen produzierten die Zellen eine kalzifizierte Matrix. Lichtmikroskopisch war die Bildung von Zellklustern (Zellaggregaten) unterschiedlicher Gestalt und Größe sichtbar. Die Von-Kossa-Färbung ließ mineralisierte Ablagerungen in Form amorpher braun-schwarzer Präzipitate erkennen. Die Transmissionselektronenmikroskopie zeigte eine mehrschichtige Anordnung der Zellen und bestätigte mineralisierte Ablagerungen, die in enger Verbindung mit einem dichten Netzwerk aus Kollagenfasern standen. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung verdeutlichte, daß die Kulturen mit Ablagerungen überschichtet waren, die auf die Gegenwart einer faserartigen Matrix hindeuteten.

Die Befunde lassen den Schluß zu, daß in humanen PDL-Fibroblasten die Bildung einer mineralisierten Matrix induziert werden kann, die Charakteristika der mineralisierten Matrix von Knochen aufweist, aber weitestgehend eine eher unreife Form der *In-vitro*-Mineralisation darstellt. Darüber hinaus bestätigt die vorliegende Untersuchung das Potential dieser Zellen, Charakteristika von Osteoblasten zu realisieren.

**Schlüsselwörter:** Humane PDL-Fibroblasten · Matrixmineralisation · Osteoblastärer Phänotyp · Alkalische Phosphatase

The periodontal ligament (PDL), the connective tissue interface between tooth and bone, is a pluripotent tissue fulfilling several functions. The principal cells found in the PDL are fibroblasts. Although they look alike microscopically, it is now being recognized that tissues may contain functionally heterogeneous subpopulations of fibroblasts [29]. Increased cementum formation either with age or after injury has been associated with fibroblasts [8, 25]. Continuous physiologic or orthodontically-induced alveolar bone remodeling suggests that precursor osteoblastic cells reside in PDL tissues [23, 24]. *In-vitro* studies on the biochemical properties of PDL fibroblasts have demonstrated that these cells bear and maintain in culture osteoblast-like characteristics [6, 22]. These include their responsiveness to osteotropic hormones such as  $1\alpha,25$ -dihydroxy vitamin  $D_3$ , high levels of alkaline phosphatase activity, production of bone-associated noncollagenous proteins (i. e., osteocalcin).

In a recent article Alliot-Licht et al. [1] provide new information on the phenotypic expression of human PDL fibroblasts, which they claim to be comparable to that of osteoblastic cells. They postulate that "human PDL fibroblasts may be influenced by the presence of hydroxyapatite to undergo transient dedifferentiation prior to redifferentiating into osteoblasts". Since a specific function of osteoblasts is to elaborate a mineralized matrix, the osteogenic potential of human PDL cells has also been assessed. *In-vitro* mineralization has been described for osteoblasts from cell lines [26] and from primary cultures [3, 9, 19, 20, 27, 28]. For PDL fibroblasts the ability of *in-vitro* mineralization has been demonstrated under the presence of ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate and dexamethasone [6, 22]. It has been suggested, though, that the mineralized nodules formed by PDL fibroblasts differ from the nodules laid down by mature osteoblasts [11].

This study describes the ultrastructural morphological features of the mineralized nodules elaborated *in-vitro* by human PDL fibroblasts. Periodontal ligament cell cultures were induced to form mineralized loci which were further examined by light microscopy as well as by transmission and scanning electron microscopy.

## Materials and Methods

PDL fibroblasts were obtained from the roots of healthy extracted 3rd molars. Biopsies were placed onto 35 mm culture dishes with 1 ml culture medium. The culture medium was Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO BRL, Paisley, Scotland) supplemented with 1% antibiotics (penicillin G, streptomycin, amphotericin B, GIBCO BRL, Grand Island, N. Y., USA) and 10% fetal calf serum (FCS, Biochrom, Seromed, Berlin, Germany). Incubations were performed in a humid environment of 5%  $CO_2$ /95% air at 37 °C. Outgrowth of the cells was first observed after about 10 days in culture. PDL fibroblasts exhibited strong positive immunofluorescence against vimentin (not shown). Cell subcultures proceeded by trypsin-EDTA digestion, washing, and replanting.

Following trypsin digestion of the primary cultures, cells were seeded onto 35 mm culture dishes at a density of  $3 \times 10^5$

Das Parodontalligament (PDL), die bindegewebige Grenzfläche zwischen Zahn und Knochen, ist ein pluripotentes Gewebe, das mehrere Funktionen ausübt. Der vorherrschende Zelltyp im Parodontalligament sind Fibroblasten. Obwohl sie, mikroskopisch betrachtet, ähnlich aussehen, ist heute erwiesen, daß dieses Gewebe aus funktionell unterschiedlichen Subpopulationen von Fibroblasten besteht [29]. Eine erhöhte Zementbildung, die mit fortschreitendem Alter oder nach einer Verletzung beobachtet wurde, wurde mit den Fibroblasten in Zusammenhang gebracht [8, 25]. Dauerhafte physiologische oder kieferorthopädisch induzierte Umbauprozesse im Alveolar-knochen legen nahe, daß sich im PDL-Gewebe Vorläufer der osteoblastären Zellen befinden [23, 24]. *In-vitro*-Untersuchungen und die biochemischen Eigenschaften von PDL-Fibroblasten haben gezeigt, daß diese Zellen in Kultur osteoblastenähnliche Eigenschaften aufweisen und beibehalten [6, 22]. Dies bedeutet, daß sie auf osteotropische Hormone, wie zum Beispiel  $1\alpha,25$ -Dihydroxivitamin  $D_3$ , reagieren können, eine hohe alkalische Phosphataseaktivität besitzen und zur Produktion von knochenassoziierten, nicht kollagenhaltigen Proteinen, wie Osteocalcin, fähig sind.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit publizierten Alliot-Licht et al. [1] neue Erkenntnisse zur phänotypischen Expression von humanen PDL-Fibroblasten, die nach Meinung der Autoren mit der Expression von osteoblastären Zellen vergleichbar sind. Sie postulieren, daß „humane PDL-Fibroblasten durch die Anwesenheit von Hydroxylapatit beeinflusst werden können, um eine vorübergehende Dedifferenzierungsphase zu durchlaufen, ehe sie wieder zu Osteoblasten differenzieren“. Da eine spezifische Funktion der Osteoblasten in der Bildung einer mineralisierten Matrix besteht, wurde das osteogenetische Potential der humanen PDL-Fibroblasten ebenfalls bestimmt. Eine *In-vitro*-Mineralisierung wurde für Osteoblastenzelllinien [9] ebenso beschrieben wie für Primärkulturen von Osteoblasten [3, 9, 19, 20, 27, 28]. Für PDL-Fibroblasten wurde die Fähigkeit einer *In-vitro*-Mineralisation in Gegenwart von Vitamin C,  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason [6, 22] beschrieben. Man vermutet aber, daß die von den PDL-Fibroblasten gebildeten Mineralisierungsknoten sich von denen reifer Osteoblasten unterscheiden [16].

Diese Studie beschreibt die ultrastrukturellen und morphologischen Eigenschaften von Mineralisierungsknoten, die unter *In-vitro*-Bedingungen von humanen PDL-Fibroblasten gebildet wurden. In Zellkulturen des Parodontalligaments wurde die Bildung mineralisierter Knoten induziert, und diese wurden durch Licht-, Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie weiter charakterisiert.

## Material und Methode

PDL-Fibroblasten wurden von den Wurzeln gesunder extrahierter Weisheitszähne gewonnen. Die Biopsien wurden auf den Boden von Kulturschalen mit 3,5 cm Durchmesser in Form kleiner Explantate aufgefropft und zur Gewährleistung der Gewebeadhäsion mit nur 1 ml Kulturmedium versehen. Als Kulturmedium diente DME-Medium (DMEM, GIBCO BRL, Paisley, Schottland), das 10% fötales Kälberserum (FCS, Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) enthielt und

cells per dish and cultured in DMEM containing 10% FCS, 1% antibiotics and supplemented with 50 mg/ml ascorbic acid (Roth 3525, Karlsruhe, Germany), 10 mM sodium  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma G9891, St. Louis, MO, USA) and 10<sup>-7</sup> M dexamethasone [30] (stock solution in ethanol; Sigma D1756, St. Louis, MO, USA) or in control medium containing DMEM, FCS, antibiotics, and 0.1% ethanol. The cells were fed every 3 days, and between the 3rd and 4th week in culture, the cells were fixed with methanol and stained by the Von Kossa method for light microscopy as follows: the cell cultures were covered with a 5% silver nitrate solution at room temperature for 10 to 60 minutes. After washing the cell cultures with distilled water, a solution of 1% pyrogallol was added to the cultures for 2 to 3 minutes at room temperature. After a 2nd washing with distilled water the cultures were fixed at room temperature with a 5% solution of sodium sulfate. Following thorough washing with distilled water the cell cultures were air-dried and observed under a phase contrast microscope. The specimens for TEM studies were fixed for 1 hour in glutaric aldehyde (1% in PBS) at room temperature, washed with distilled water and postfixed with osmium tetroxide (2% OsO<sub>4</sub>) with potassium ferricyanide (K<sub>3</sub>Fe[CN]<sub>6</sub>) 1 : 1 for 1 hour. Contrasting followed with uranyl acetate (MgUAc, 1.5%) for 30 minutes at room temperature. After another washing the specimens were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in eponpropylene oxide (1 : 1) Finally, ultra thin sections were stained once more with uranyl acetate/lead citrate to visualize the mineral nodules by electron microscopic examination.

For the SEM studies, 4 or 5 glass cover slips were added to the culture dishes prior to seeding the cells. Following the above described tissue culture conditions, the cells were fixed with 3% glutaric aldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 1 hour. After washing with Sorensen's phosphate buffer (pH 7.3), the specimens were dehydrated in a graded series of ethanol. Following the critical-point drying using the Balzers system (Balzers Union Critical Point Dryer CPD 030), the specimens were mounted on SEM studs and coated with 30 to 40 nm gold in a Balzers Union SCD 020 apparatus. Specimens were examined at 20 kV using an AMRAY 1810 microscope.

Localization of ALP in PDL fibroblasts cultured with "mineralization" medium was also studied by fixing cells in neutral buffered formalin and washing them in distilled water. ALP was demonstrated by incubation with sodium- $\alpha$ -naphthol phosphate as a substrate in the presence of Fast Red Violet LB salt as described elsewhere [6].

mit 1% Antibiotika (Penicillin G, Streptomycin, Amphotericin B, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) angereichert war. Die Kulturen wurden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator in Gegenwart von 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO<sub>2</sub> und bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Das Auswachsen von Zellen aus den Explantaten konnte in der Regel nach einem Kulturzeitraum von etwa zehn Tagen beobachtet werden. PDL-Fibroblasten zeigten eine starke Expression des Intermediärfilaments Vimentin in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF, nicht gezeigt). Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen in Gegenwart von Trypsin-EDTA unterkultiviert, das heißt, nach der Trypsin-EDTA-Behandlung mit PBS gewaschen und dann erneut ausplattiert.

Die Zellen passagierter Primärkulturen wurden in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro Schale (3,5 cm) ausplattiert und in DME-Medium, das als zusätzliche Stoffe Vitamin C (50 mg/ml) (Roth 3525, Karlsruhe, Deutschland), Natrium- $\beta$ -Glycerophosphat (10 mM) (Sigma G9891, St. Louis, MO, USA) und Dexamethason (10<sup>-7</sup>) (Ausgangslösung in Ethanol; Sigma D1756, St. Louis, MO, USA) [30] enthielt oder in Kontrollmedium, bestehend aus DME-Medium, das 0,1% Ethanol enthielt, kultiviert. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt, und zwischen der dritten und vierten Woche in Kultur wurden die Zellen mit Methanol fixiert und danach die Von-Kossa-Färbung für die lichtmikroskopische Auswertung wie folgt durchgeführt: Die Kulturen wurden mit einer Silbernitratlösung (5%) bedeckt und bei Raumtemperatur für zehn bis 60 Minuten inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und danach mit einer Pyrogallollösung (1%) für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Waschung mit destilliertem Wasser wurden die Kulturen mit einer Natriumsulfatlösung (5%) bei Raumtemperatur fixiert und nach abschließender Waschung luftgetrocknet und dann unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgewertet. Die Proben für die TEM-Untersuchungen wurden für eine Stunde in Glutaraldehyd (1%) (in PBS) bei Raumtemperatur fixiert, mit destilliertem Wasser gewaschen und danach mit Osmiumtetroxid (2%) (OsO<sub>4</sub>) und Kaliumeisencyanid (K<sub>3</sub>Fe[CN]<sub>6</sub>), Mischungsverhältnis 1 : 1, für eine Stunde nachfixiert. Danach erfolgte die Kontrastierung mit Uranylacetat (1,5%) (MgUAc) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneuter Waschung wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und in Eponpropylenoxid (Mischungsverhältnis 1 : 1) eingebettet. Die angefertigten Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat/Bleicitrat gefärbt, um die Mineralisierungsknoten im Elektronenmikroskop nachweisen zu können.

Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurden vor der Aussaat der Zellen vier bis fünf Deckgläschen in die Kulturschalen gegeben. Nach den oben beschriebenen Zellkulturbedingungen wurden die Zellen in Glutaraldehyd (3%) in Natriumcacodylatpuffer (0,1 M) (pH 7,4) für eine Stunde fixiert, in Sorensen-Phosphatpuffer (pH 7,3) gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Im Anschluß an die Kritischpunkttrocknung (Balzers Union Critical Point Dryer CPD 030) wurden die Proben auf Probenteller geklebt und besputtered, das heißt mit einer Goldschicht von 30 bis 40 nm überzogen (Balzers Union SCD 020), und

## Results

The cells reached confluency after about 5 days. During the whole culture period the PDL cell cultures exhibited positive ALP staining. After 2 weeks in culture under supplemented mineralization medium, cells exhibited high metabolic activity, producing a rich extracellular matrix. The cells started to form distinct clusters (Figure 1A) which grew into larger formations. At that time Von Kossa staining was still negative. After 3 weeks, cell-cultures exhibited many of those clusters of various shapes and sizes. Von Kossa staining revealed mineral deposits as amorphous brown-black precipitates (Figure 1B) and extremely strong alkaline phosphatase activity of the clusters was observed (Figure 1C). Transmission electron microscopy revealed that the PDL cells formed a mineralized matrix sharing many of the properties of bone mineralized nodules. The nodules formed by the PDL cells consisted of cells with the morphological characteristics of fibroblasts in multilayer formations and of mineralized matrix. The cells exhibited well-developed Golgi sacs, abundant rough endoplasmic reticulum and numerous mitochondria, suggesting high biosynthetic activity (Figure 2). Junctional complexes were observed between the cells. Mineral deposits were present in close association with cross-banded collagen fibers. Needle-like structures deposited

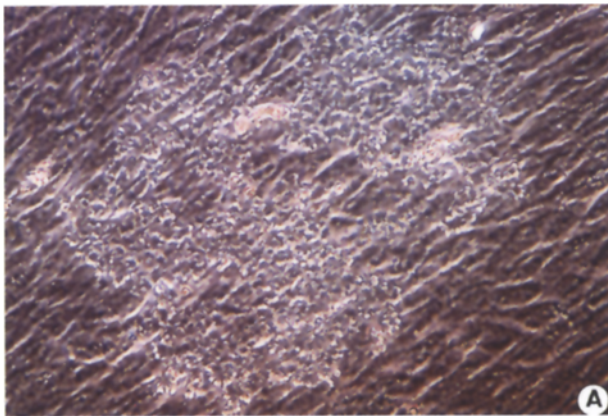


Figure 1A – Abbildung 1A

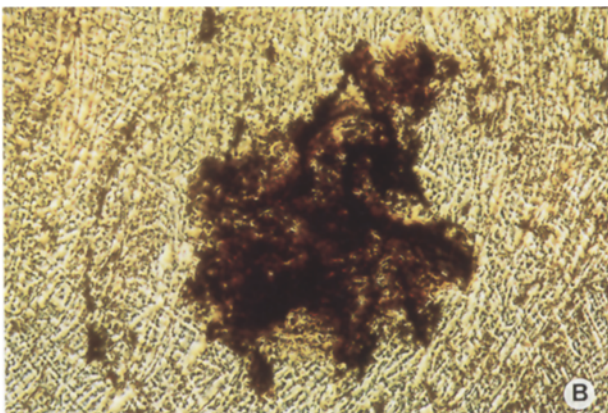


Figure 1B – Abbildung 1B

konnten anschließend im Rasterelektronenmikroskop ausgewertet werden (AMRAY 1810).

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase in PDL-Fibroblastenkulturen nach Inkubation mit Mineralisierungsmedium wurde ebenfalls untersucht. Hierfür wurden die Zellen in gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in destilliertem Wasser gewaschen. Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgte durch Inkubation mit dem Substrat Natrium- $\alpha$ -Naphtholphosphat in Gegenwart des Farbstoffs „Fast Red Violet LB“-Salz (Übersicht bei [6]).

## Ergebnisse

Nach etwa fünf Tagen erreichten die Zellen Konfluenz, das heißt, sie bildeten einen geschlossenen Zellrasen. Während des gesamten Kulturzeitraums zeigten die PDL-Zellkulturen eine positive alkalische Phosphatasereaktion. Im Mineralisationsmedium entwickelten die Zellen nach zwei Wochen eine hohe metabolische Aktivität, die sich darin äußerte, daß die Zellen große Mengen extrazellulärer Matrix bildeten. Die Zellen begannen Kluster zu formen, das heißt, in dicht gedrängten Aggregaten zu wachsen (Abbildung 1A), die mit zunehmender Kulturzeit an Zahl zunahm. Zu diesem Zeitpunkt war die Von-Kossa-Färbung noch negativ. Nach drei Wochen waren in den Zellkulturen zahlreiche dieser Kluster mit unterschiedlicher Gestalt und Größe nachweisbar, und es ließen sich mit Hilfe der Von-Kossa-Färbung mineralische Ablagerungen in Form braun-schwarzer Präzipitate darstellen (Abbildung 1B). Darüber hinaus konnte in diesen Klustern

*Figures 1A to 1C. A) Phase contrast microscopic observation of the nodules formed by the PDL cells (original  $\times 100$ ). B) Von Kossa staining of the nodules formed by PDL cells in the 3rd week in culture (original  $\times 100$ ). C) Very strong ALP staining of the PDL nodules (original  $\times 160$ ).*

*Abbildungen 1A bis 1C. A) Phasenkontrastaufnahme von PDL-Zell-Knoten (Original  $\times 100$ ). B) Von-Kossa-Färbung von PDL-Zell-Knoten in der dritten Kulturwoche (Original  $\times 100$ ). C) Sehr starke alkalische Phosphatase-Färbung der PDL-Knoten (Original  $\times 160$ ).*

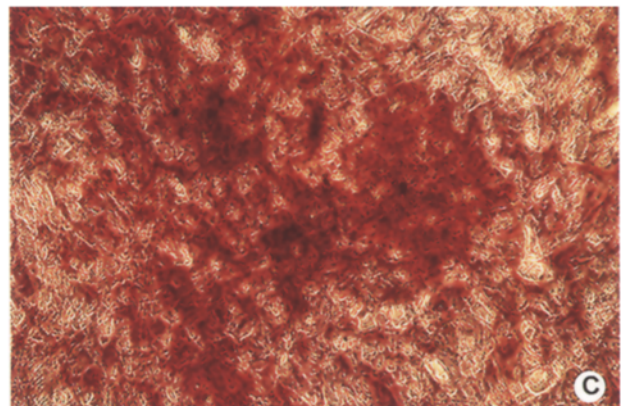
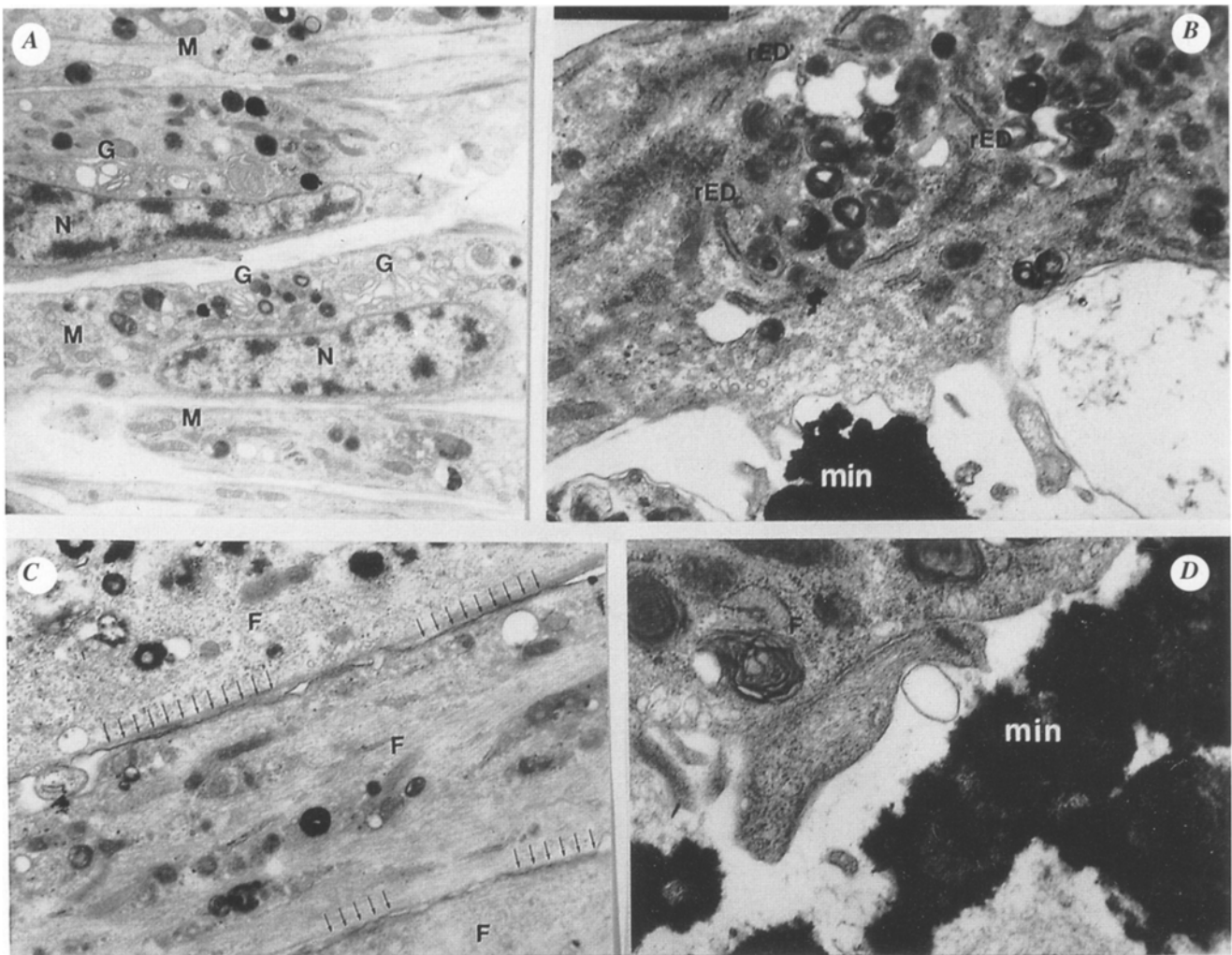


Figure 1C – Abbildung 1C

in a filamentous substrate were observed, as well as vesicular structures with a characteristic trilaminar membrane, possibly representing matrix vesicles (Figure 3).

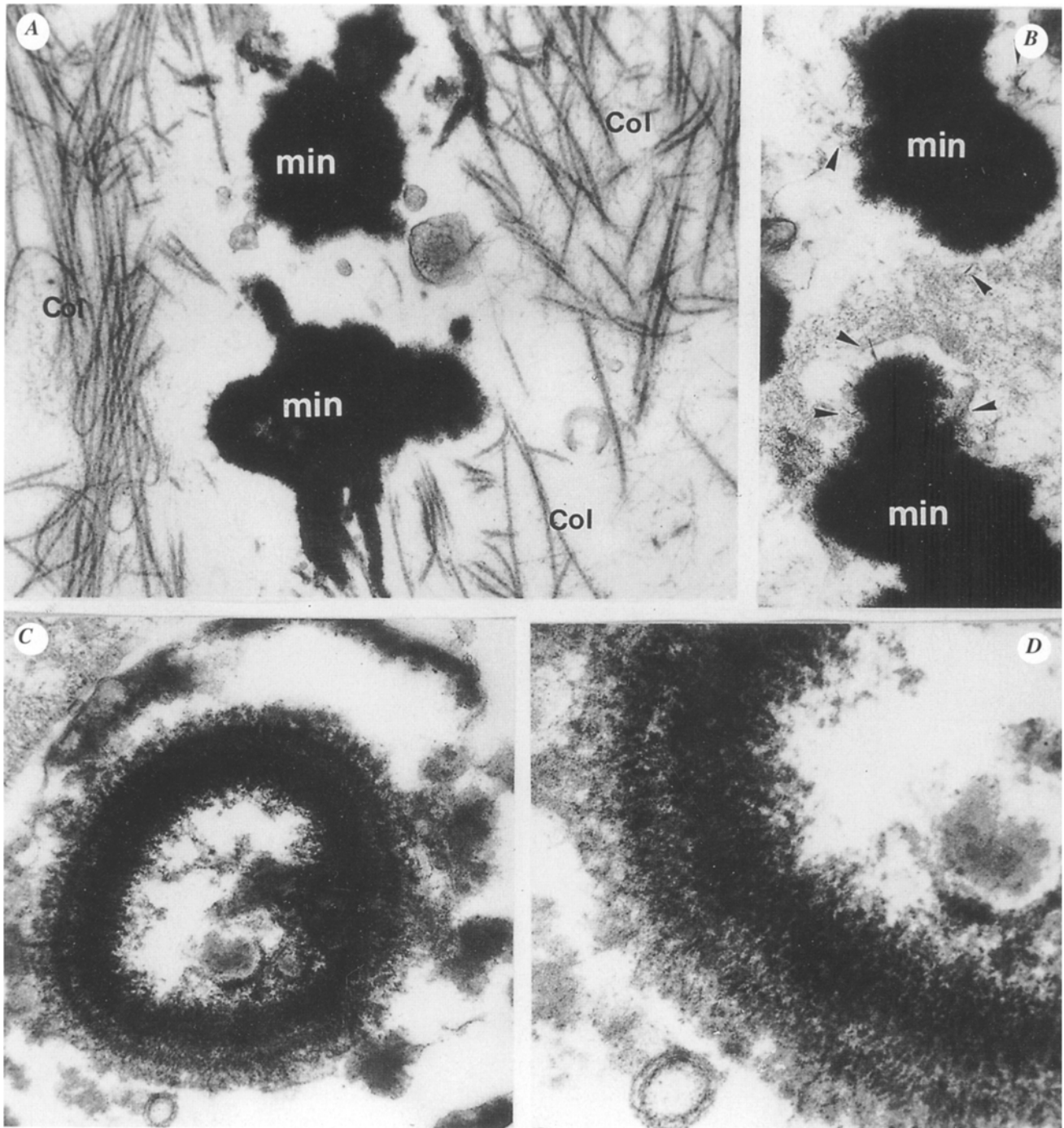
Scanning electron microscopy revealed formations with a smooth surface raised above the surface of the culture. At higher magnifications the formations were seen to consist of multilayered cells. These cells had a fusiform fibroblastic appearance, and deep in the nodule a filament-rich structure was observed (Figure 4).

stern eine extrem starke alkalische Phosphataseaktivität beobachtet werden (Abbildung 1C). Die Transmissionselektronenmikroskopie verdeutlichte, daß die PDL-Zellen eine mineralisierte Matrix bildeten, die eine Vielzahl von Eigenschaften der Knochenmineralisationsknoten aufwies. Diese Knoten, die von den PDL-Zellen gebildet wurden, bestanden aus Zellen mit den morphologischen Charakteristika von Fibroblasten, die übereinanderliegend (pseudogeschichtet) wuchsen, und aus mineralisierter Matrix. Die Zellen enthielten gut entwickelte Golgi-Vesikel sowie rauhes endoplasmatisches



Figures 2A to 2D. Transmission electron microscopy of mineralization areas of PDL cultures. The cells forming the nodules were in close contact with each other, exhibited well-developed Golgi sacs and mitochondria (A) (original  $\times 16,500$ ) and high amounts of numerous rough endoplasmic reticulum (B) (original  $\times 19,000$ ). Between the cells junctional complexes were observed (arrows), (C) (original  $\times 18,000$ ). In close proximity to the cells a mineralized front was seen (D) (original  $\times 19,800$ ) (rED = rough endoplasmic reticulum; G = Golgi; M = mitochondria; min = mineralization; N = nucleus; F = fibroblast).

Abbildungen 2A bis 2D. Transmissionselektronenmikroskopie von Mineralisierungsbereichen in PDL-Kulturen. Die Zellen, die die Knoten formen, stehen in enger Verbindung und zeigen gut ausgebildete Golgi-Vesikel und Mitochondrien (A) (Original  $\times 16\ 500$ ) und enthalten viel rauhes endoplasmatisches Retikulum (B) (Original  $\times 19\ 000$ ). Zwischen den Zellen sind Verbindungskomplexe sichtbar (Pfeile, C) (Original  $\times 18\ 000$ ). In direkter Nachbarschaft der Zellen ist eine Mineralisationsfront zu sehen (D) (Original  $\times 19\ 800$ ) (rED = rauhes endoplasmatisches Retikulum; G = Golgi-Vesikel; M = Mitochondrien; min = Mineralisation; N = Nukleus; F = Fibroblast).



Figures 3A to 3D. Transmission electron microscopy of mineralization areas of PDL cultures. Mineral deposits were in close association with striated collagen fibers (arrows) (A) (original  $\times 31,000$ ). Needle-like crystals (arrows) were deposited at the mineralization sites (B) (original  $\times 42,900$ ). Matrix vesicles formed among collagen fibers (C) (original  $\times 55,000$ ). Higher magnification (D) of a matrix vesicle with the characteristic trilaminar membrane (original  $\times 125,000$ ) (min = mineralization; Col = collagen fibers).

Abbildungen 3A bis 3D. Transmissionselektronenmikroskopie von Mineralisierungsbereichen von PDL-Kulturen. Mineralablagerungen sind in direkter Nachbarschaft mit kreuzgebündelten Kollagenfasern (Pfeile) (A) (Original  $\times 31\ 000$ ). Nadelähnliche Kristalle (Pfeile), abgelagert in den Mineralisationsbereichen (B) (Original  $\times 42\ 900$ ), Matrixvesikel zwischen Kollagenfasern (C) (Original  $\times 55\ 000$ ). Höhere Vergrößerung (D) eines Matrixvesikels mit charakteristischer trilaminärer Membran (Original  $\times 125\ 000$ ) (min = Mineralisierung; Col = Kollagenfasern)

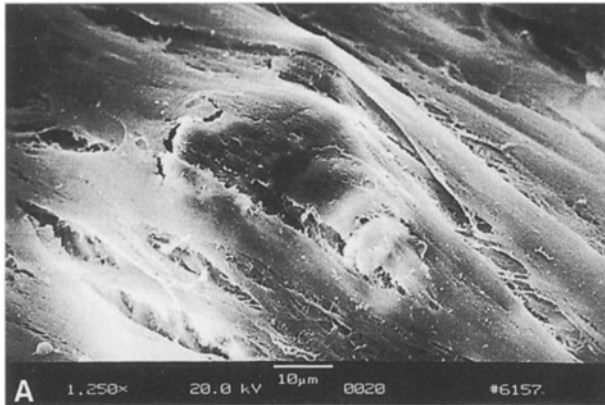


Figure 4A – Abbildung 4A

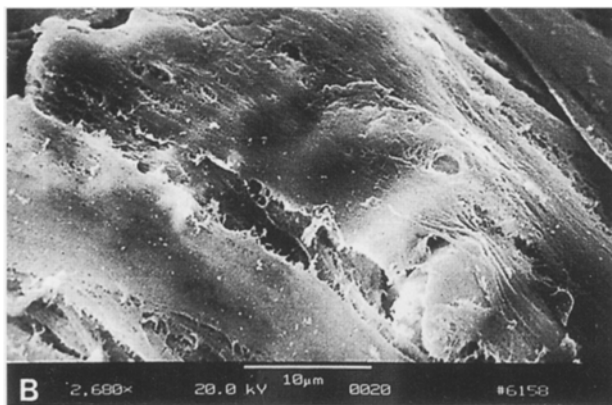


Figure 4B – Abbildung 4B

## Discussion

It has been reported that fibroblasts isolated from human periodontium have biological properties of osteoblastic cells. These include initiation *in-vitro* of mineral deposition under the presence of ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate, and dexamethasone [6, 22]. The present study further supports the osteoblastic potential of these cells and demonstrates that matrix mineralization *in-vitro* proceeds in a similar manner as in bone. The observed mineralization process cannot be related to non-specific phosphate precipitation, firstly because the Von Kossa staining became gradually positive after more than 3 weeks in culture, and secondly because gingival fibroblasts cultured under exactly the same conditions and time period showed no mineralization [7]. The PDL fibroblasts cultured under a supplemented medium formed mineralized nodules sharing many of the described characteristics of *in vivo* bone formation [10, 12, 32]. The ultrastructure of the cells within the nodule formed by PDL fibroblasts showed well defined Golgi sacs, a rough endoplasmic reticulum, mitochondria and many junctional complexes, and thus appears similar to the ultrastructure of the cells within the nodules formed by mature osteoblasts. The mineral deposits were in close association with striated collagen fibers. Extracellular

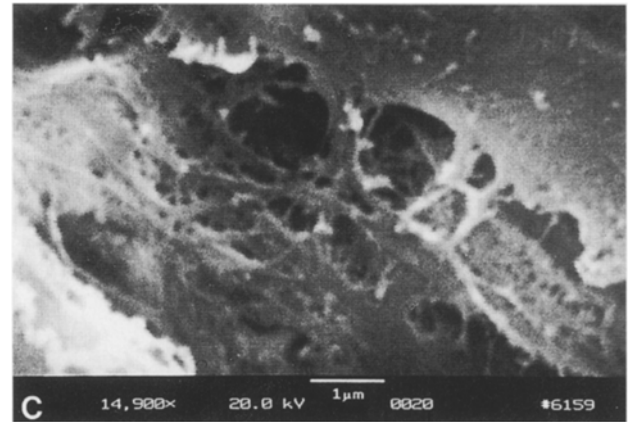


Figure 4C – Abbildung 4C

Figures 4A to 4C. Scanning electron microscopy of the mineral nodules formed by PDL cells. Smooth formations raised above the surface of the culture plate consisted of flat cells placed one above the other to form multilayers (A) (original  $\times 1,250$ ). Higher magnification revealed a network of fibers between the cells (B) (original  $\times 2,680$ ). A dense filamentous matrix appeared in the deeper parts of the nodule (C) (original  $\times 14,900$ ).

Abbildungen 4A bis 4C. Rasteriekronenmikroskopie von Mineralisierungsknoten in PDL-Zellkulturen. Die leichten Auflagerungen auf dem Boden der Kulturschale bestehen aus flachen aufeinanderliegenden Zellen, die mehrere Schichten ausbilden (A) (Original  $\times 1\ 250$ ). Die höhere Vergrößerung verdeutlicht ein Netzwerk von Fibrillen zwischen den Zellen (B) (Original  $\times 2\ 680$ ). Eine dichte filamentöse Matrix erscheint in den tieferen Regionen des Knotens (C) (Original  $\times 14\ 900$ ).

tisches Retikulum und zahlreiche Mitochondrien, die eine hohe Biosyntheseaktivität der Zellen belegten (Abbildung 2). Außerdem konnten Zell-Zell-Adhäsionskomplexe nachgewiesen werden, und in unmittelbarer Nähe von kreuzgebündelten Kollagenfasern konnten Mineralablagerungen beobachtet werden. Nadelartige Strukturen, eingebettet in ein filamentöses Substrat, waren ebenso sichtbar wie vesikuläre Strukturen mit einer charakteristischen trilaminären Membran, die möglicherweise auf die Anwesenheit von Matrixvesikeln schließen lassen (Abbildung 3).

Die Rasterelektronenmikroskopie verdeutlichte die Ausbildung von Strukturen mit einer glatten Oberfläche, die auf der Oberfläche der Kultur lagen. Bei höheren Vergrößerungen wurde deutlich, daß diese Formationen aus mehrschichtigen Zellen bestanden, die eine fusiforme, fibroblastenähnliche Gestalt aufwiesen. Im Zentrum des Knotens konnte eine filamentreiche Struktur beobachtet werden (Abbildung 4).

## Diskussion

Es ist bekannt, daß Fibroblasten des humanen Parodontalligaments biologische Eigenschaften osteoblastärer Zellen besitzen. Diese umfassen die Ablagerung von Mineralien unter *In-vitro*-Bedingungen in Gegenwart von Vitamin C,  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason, die als Zusätze dem Kul-

matrix vesicles were also observed which exhibited the characteristic trilaminar membrane. Moreover, the increased alkaline phosphatase activity of the PDL nodules is similarly observed in nodules formed by osteoblasts [16]. A marked distinction between the *in-vitro* PDL nodules and those formed by cells isolated from mouse calvaria was in the morphology of the cells within the nodule. The cells in PDL nodules exhibited the same fibroblast morphology (spindle-like form with polarized nucleus) in all layers, and no cuboidal cells were observed at the surface of the nodule as seen in nodules formed by osteoblasts [9, 19]. Maturation of the nodules and positive Von Kossa staining was observed between the 3rd and 4th week in culture. Cells isolated from rat calvaria exhibit mature nodules at about day 11 [19] or 12 [13, 14]. This delay observed in PDL cells may be associated with the nature of the PDL fibroblasts. Although it has been demonstrated both biochemically and immunohistochemically [1, 6, 20, 22, 26, 27] that PDL fibroblasts possess *in-vitro* the phenotypes typical of osteoblastic cells, it seems that PDL cells most likely belong to Inducible Osteoprogenitor Cells (IOPC) [17, 18, 21]. These are more immature forms of Determined Osteoprogenitor Cells (DOPC) and may be found in soft connective tissues [31]. They can be induced to further differentiate or mature into DOPCs which in turn will ultimately develop into an osteogenic cell. It is likely that PDL cells lose *in vitro* the essential cell-cell or cell-matrix interactions that eventually lead to further differentiation. In contrast, cells isolated from rat calvaria constitute virtually mature osteoblastic cells which bear not only biochemical but also morphological characteristics of osteoblasts. Based on the morphological characteristics of the mineralization nodules, Cho et al. [11] assumed that the mineralized nodules formed by PDL cells may represent another type of mineralized tissue, possibly acellular cementum. In our laboratory we have observed matrix mineralization of PDL cells in the presence of ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate alone. This mineralization procedure was much more slower than that observed when the same cells were cultured in the presence of dexamethasone. Moreover, the nodules appeared in small numbers and were also associated with high cell densities and multilayer formations (data not shown).

Based on these results we conclude that the nodules formed by PDL cells represent immature mineralized nodules formed by immature osteoprogenitor cells. These cells have the potential to further differentiate into osteoblasts and/or cementoblasts under certain conditions probably associated with the different functions fulfilled by the PDL. Results presented by Lin et al. [15] have indicated that rat PDL cells differentiate into osteoblasts during socket healing after tooth extraction. Wound healing might be one of the inducing situations for PDL cell differentiation. Physiologic or induced mechanical forces might also play a decisive role in the differentiation process. Yamaguchi et al. [33] have impressively demonstrated inhibition of ALP activity in response to tension-force, suggesting that tension-force may affect PDL metabolism.

We also have recently shown that PDL cells respond to mechanical stimulation by changes which might affect the differentiation status of these cells [4, 5, 7]. In conclusion, the ability of human PDL fibroblasts to produce a mineralized matrix

in medium zugesetzt wurden [6, 22]. Die vorliegende Arbeit unterstützt die bisherigen Befunde des osteoblastären Potentials dieser Zellen und veranschaulicht, daß die Matrixmineralisation unter *In-vitro*-Bedingungen in ähnlicher Weise abläuft wie im Knochen. Der beobachtete Mineralisierungsprozeß ist nicht auf unspezifische Phosphatablagerungen zurückzuführen. Dies wird dadurch verdeutlicht, daß die Von-Kossa-Färbung nach mehr als drei Wochen in zunehmendem Maße positiv ausfiel und daß Gingivafibroblasten, die unter denselben Kulturbedingungen kultiviert wurden, nach dem gleichen Kulturzeitraum keinerlei Mineralisierung zeigten [6]. Die PDL-Fibroblasten, die in Gegenwart der oben beschriebenen Mediumzusätze kultiviert wurden, bildeten Mineralisierungsknoten, die viele Charakteristika der Knochenbildung, die für *In-vivo*-Bedingungen beschrieben wurden, aufwiesen [10, 12, 32]. Die Ultrastruktur dieser Zellen innerhalb des Knotens, die von den PDL-Fibroblasten gebildet wurden, zeigte gut ausgeprägte Golgi-Apparate, rauhes endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, zahlreiche Zell-Zell-Verbindungskomplexe und erscheint daher ähnlich der Ultrastruktur von Zellen innerhalb der Knoten, die von differenzierten Osteoblasten gebildet wurden. Die Mineralablagerungen befanden sich in direkter Nachbarschaft von gestreiften Kollagenfasern. Extrazelluläre Matrixvesikel mit charakteristischer trilaminärer Membran konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten die Knoten aus PDL-Zellen eine ähnlich hohe alkalische Phosphataseaktivität wie Knoten, die von Osteoblasten gebildet wurden [16]. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Knoten, die unter *In-vitro*-Bedingungen von PDL-Zellen gebildet wurden, und solchen, die von Mauszellen der Schädelkalotte gebildet wurden, bestand in der Morphologie der Zellen innerhalb des Knotens. Die Zellen in PDL-Knoten zeigten in allen Schichten die gleiche Fibroblastenmorphologie, das heißt spindelförmige Gestalt mit polarisiertem Zellkern. Dagegen waren keine kuboiden Zellen an der Oberfläche der Knoten sichtbar, wie sie in Knoten von Osteoblasten auftreten [9, 19]. Die Differenzierung der Knoten und eine positive Von-Kossa-Färbung waren während der dritten und vierten Woche in Kultur sichtbar. Im Gegensatz dazu zeigen Zellen der Rattenschädelkalotte differenzierte Knoten bereits nach etwa elf [19] oder zwölf [13, 14] Tagen. Diese Verzögerung, die bei den PDL-Zellen beobachtet wurde, ist möglicherweise auf die biologischen Eigenschaften von PDL-Fibroblasten zurückzuführen. Obwohl auf biochemischer Ebene und immunhistochemisch gezeigt werden konnte, daß PDL-Fibroblasten unter *In-vitro*-Bedingungen in der Lage sind, den Phänotyp osteoblastärer Zellen zu realisieren [1, 6, 20, 22, 26, 27], scheint es offensichtlich zu sein, daß PDL-Zellen zu den induzierbaren Osteoprogenitorzellen (IOPC) zählen [17, 18, 21]. Diese stellen noch eine unreife Form von Zellen dar, die zu Osteoprogenitorzellen differenzieren können (DOPC), und sind möglicherweise in weichem Bindegewebe lokalisiert [31]. Sie können zu einer weiteren Differenzierung induziert werden, unter anderem zu DOPC-Zellen, die sich letzten Endes zu osteogenen Zellen weiterentwickeln können. Es scheint offensichtlich zu sein, daß PDL-Zellen unter *In-vitro*-Bedingungen essentielle Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen verlieren, die ihnen offensichtlich eine weitere Differenzierung ermöglichen. Die Zellen der Rattenschädelkalotte stellen hingegen nahezu reife osteoblastäre Zellen dar, die



with similarities to the ultrastructural properties of bone further substantiates the osteoblastic phenotype of the isolated cells and their differentiation potential. Future investigations should focus on identifying the factors (chemical or physical entities) contributing to this differentiation process *in vivo*. Furthermore, mineralization of PDL fibroblasts offers an *in-vitro* model for studying early forms of mineralization.

nicht nur die biochemischen, sondern auch die morphologischen Charakteristika aufweisen. Auf der Grundlage der morphologischen Charakteristika der Mineralisierungsknoten zogen Cho et al. [11] den Schluß, daß die Mineralisierungsknoten der PDL-Zellen einen anderen Typ von mineralisiertem Gewebe darstellen, das heißt möglicherweise azellulären Zement. In unserem Labor haben wir bei PDL-Zellen eine Matrixmineralisation beobachtet, die lediglich auf der Zugabe von Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat zum Medium beruhte. Dieser Mineralisierungsablauf verlief wesentlich langsamer als der in Gegenwart von Dexamethason. Darüber hinaus erschienen die Knoten in geringer Zahl und waren zudem nur bei hohen Zelldichten und Mehrschichtigkeit sichtbar.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse schließen wir, daß die von PDL-Zellen gebildeten Knoten unreife Mineralisierungsknoten darstellen, die von unreifen Osteoprogenitorzellen gebildet werden. Diese Zellen besitzen das Potential, sich unter bestimmten Bedingungen zu Osteoblasten und/oder Zementoblasten weiter zu differenzieren. Diese Fähigkeiten sind wahrscheinlich mit den unterschiedlichen Funktionen, die das Parodontalligament besitzt, verbunden. Ergebnisse von Lin et al. [15] haben gezeigt, daß Ratten-PDL-Zellen während der Heilung der Alveole nach Zahnextraktion zu Osteoblasten differenzieren können. Die Wundheilung scheint daher eine der induzierenden Situationen für die PDL-Zell-Differenzierung zu sein. Physiologische oder induzierte mechanische Kräfte scheinen ebenfalls eine entscheidende Rolle in diesem Differenzierungsprozeß zu spielen. Yamaguchi et al. [33] konnten eindrucksvoll zeigen, daß die Inhibition der alkalischen Phosphataseaktivität eine Antwort auf Zugkräfte ist, was nahelegt, daß Zugkräfte den Metabolismus der PDL-Zellen beeinflussen.

Auch wir haben kürzlich nachweisen können, daß PDL-Zellen auf mechanische Stimulation mit solchen Veränderungen reagieren, die möglicherweise den Differenzierungsstatus dieser Zellen beeinflussen [4, 5, 7]. In der Zusammenfassung der Befunde wird deutlich, daß humane PDL-Fibroblasten zur Produktion einer mineralisierten Matrix fähig sind, die Ähnlichkeiten zu den ultrastrukturellen Eigenschaften von Knochen aufweist. Dies untermauert den osteoblastären Phänotyp und das Differenzierungspotential dieser Zellen. Weitere Untersuchungen sollen sich auf die Identifizierung biochemischer Faktoren oder physikalischer Eigenschaften konzentrieren, die im Rahmen des Differenzierungsprozesses *in vivo* eine Rolle spielen. Darüber hinaus stellt die Mineralisierung von PDL-Fibroblasten unter *In-vitro*-Bedingungen ein Modell dar, frühe Stadien der Mineralisierung zu untersuchen.

References

1. Alliot-Licht B, De Lange GI, Gregoire M. Effects of hydroxyapatite particles on periodontal fibroblast-like cell behavior. *J Periodontol* 1997;68:158-65.
2. Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, et al. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodontol* 1991;62:499-503.
3. Aubin JE, Heersche JNM, Merrilees MJ, et al. Isolation of bone cell clones with difference in growth, hormone responses, and extracellular matrix production. *J Cell Biol* 1982;92:452-61.
4. Basdra EK, Kohl A, Komposch G. Mechanical stretching of periodontal ligament fibroblasts - a study on cytoskeletal involvement. *J Orofac Orthop* 1996;57:24-30.
5. Basdra EK, Komposch G, Huber LA, et al. Mechanically stretched periodontal ligament fibroblasts: Identifying elements of the mechanotransduction cascade. In: Davidovitch Z, ed. *Biological mechanisms of tooth eruption and replacement by implants*. Birmingham Alabama: EBSCO Media, 1996:41-9.
6. Basdra EK, Komposch G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. *Eur J Orthod* 1997;19:615-21.
7. Basdra EK, Papavassiliou AG, Huber LA. Rab and rho GTPases are involved in specific response of periodontal ligament fibroblasts to mechanical stretching. *Biochim Biophys Acta* 1995;1268:209-13.
8. Beertsen W, Everts V. Formation of acellular root cementum in relation to dental and non-dental hard tissues in the rat. *J Dent Res* 1990;1669-73.
9. Bellows CG, JE Aubin, JNM Heersche, et al. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 1986;38:143-54.
10. Bhargava U, Bar-Lev M, Bellows CG, et al. Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated rat calvaria cells. *Bone* 1988;9:155-63.
11. Cho MJog, Matsuda N, Lin WL, et al. In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. *Calcif Tissue Int* 1992;50:459-67.
12. Escarot-Charrier B, Shepard N, Charette G, et al. Mineralization in osteoblast cultures: A light and electron microscopic study. *Bone* 1988;9:147-54.
13. Gerstenfeld LC, Chipman SD, Glowaski J, et al. Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev Biol* 1987;122:49-60.
14. Gerstenfeld LC, Chipman SD, Kelly CM, et al. Collagen expression, ultrastructural assembly and mineralization in cultures of chicken embryo osteoblasts. *J Cell Biol* 1988;106:979-89.
15. Lin WL, McCulloch CA, Cho MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec* 1994;240:492-506.
16. Luben RA, Wong GL, Cohn DV. Biochemical characterization with parathormone and calcitonin of isolated cells: provisional identification of osteoclasts and osteoblasts. *Endocrinology* 1976;99:526-34.
17. McCulloch CAG, AH Melcher. Continuous labelling of the periodontal ligament of mice. *J Periodont Res* 1982;18:231-41.
18. McCulloch CAG, Melcher AH. Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *Am J Anat* 1983;167:43-58.
19. Nefussi JR, Boy-Lefevre ML, Boulekbache H, et al. Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion. *Differentiation* 1985;29:160-8.
20. Nojima N, Kobayashi M, Shionone M, et al. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Period Res* 1990;25:179-85.
21. Owen ME. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system: *Bone Mineral Res* 1985;1-25.
22. Piche JE, Carnes EDL, Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J Dent Res* 1989;68:761-7.
23. Roberts WE, Morey ER. Proliferation and differentiation sequence of osteoblast histogenesis under physiologic conditions in rat periodontal ligament. *Am J Anat* 1985;174:105-18.
24. Roberts WE, Wood HB, Chambers DW, et al. Vascularly oriented differentiation gradient of osteoblast precursor cells in rat periodontal ligament: Implications for osteoblast histogenesis and periodontal bone loss. *J Periodont Res* 1987;22:461-7.
25. Schroeder HE. *Oral structural biology*. Stuttgart: Thieme, 1991.
26. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, et al. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1988;67:66-70.
27. Somerman MJ, Young MA, Foster RA, et al. Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Arch Oral Biol* 1990;35:241-7.
28. Sudo HA, Kodama HA, Amagai Y. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 1983;96:191-8.
29. Ten Cate AR. *Oral histology, development, structure, and function*. 4th edn. St Louis: Mosby, 1994:276-312.
30. Tenebaum HC, Heersche JNM. Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro. *Calcif Tissue Int* 1982;34:76-9.
31. Urist MR, Delange RJ, Finerman GAM. Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 1983;220:680-6.
32. Weinger JM, Holtrop ME. An ultrastructural study of bone cells: The occurrence of microtubules, microfilaments and tight junctions. *Calcif Tissue Res* 1973;14:15-29.
33. Yamaguchi M, Shimizu N, Shibata Y, et al. Effects of different magnitudes of tension-force on alkaline phosphatase activity in periodontal ligament cells. *J Dent Res* 1996;75:889-94.

Address for Correspondence: Dr. Efthimia K. Basdra,  
Poliklinik für Kieferorthopädie der Universität,  
Im Neuenheimer Feld 400,  
D-69120 Heidelberg,  
Fon (+49/6221) 56-6565, Fax -5753.