

ABSTRACT

Bevarelse af sundt pulpavæv og forebyggelse af apikal parodontitis står centralt i faget endodonti. Selv om pulpa er i stand til at komme sig efter skade eller kraftig irritation, har behandling af eksponeret pulpavæv traditionelt været uforudsigelig. Fremkomsten af nye biomaterialer til pulpaoverkapning har sammen med forøget indsigt i pulpabiologi og regenerative processer ført til ny optimisme vedrørende behandling af eksponeret pulpavæv; men vores viden om cellulær regulering af inflammation og heling i pulpa er stadig mangelfuld. Epigenetisk modulering af de molekyler, der indpakker DNA-molekylet, og virkningen af ikke-kodende RNA har vist sig at stå centralt i flere nøgleprocesser inden for vital pulpabehandling, herunder reproduktion af stamceller og regulering af mineraliserede vævs udvikling og heling. Terapeutisk anvendelse af farmakologiske hæmmere af epigenetiske processer, som fx DNA-metyltransferaser og histondeacetylaser, har fremmet helingsprocesser i pulpacellepopulationer. Denne artikel fokuserer på en analyse af betydningen af epigenetiske modifikationer for kontrol af pulpacellefænotyper og på mulighederne for at anvende epigenetiske modifikationer som led i en behandlingsstrategi.

EMNEORD Histone deacetylases | DNA methylation | non-coding RNA | histone modification | dental pulp | biomaterials



Korrespondanceansvarlig sidsteforfatter:
H.F. DUNCAN
Hal.Duncan@dental.tcd.ie

Regenerativ endodonti. Epigenetisk modulering af pulpaceller

YUKAKO YAMAUCHI, postdoc in pulp biology, ph.d., Division of Restorative Dentistry & Periodontology, Dublin Dental University Hospital, Trinity College Dublin, University of Dublin, Ireland

MICHAELA KEARNEY, bachelor in genetics, ph.d.-student, Division of Restorative Dentistry & Periodontology, Dublin Dental University Hospital, Trinity College Dublin, University of Dublin, Ireland

HENRY FERGUS DUNCAN, assistant professor, consultant in Endodontics, ph.d., Division of Restorative Dentistry & Periodontology, Dublin Dental University Hospital, Trinity College Dublin, University of Dublin, Ireland

► Accepteret til publikation den 8. januar 2020.

Tandlægebladet 2020:124:xxx-xxx

Pulpa er et dynamisk bindevæv, som under normale omstændigheder er pakket ind i mineraliseret dentin og emalje. Odontoblasterne befinder sig perifert i pulpa og er ansvarlige for dannelse af primær dentin under tanddannelsen og senere i livet for den langsomme dannelse af sekundær dentin. Dertil kommer, at odontoblasterne spiller en beskyttende rolle i pulpa, idet de kan opregulere aktiviteten og danne tertiær dentin i dentintubuli, hvis pulpa udfordres af traumer, kemikalier eller mikroorganismer (1). Dette hjælper til at afskærme den udefra kommende irritation; men hvis stimulus persisterer, kan forsvarsmekanismerne ikke følge med, og der opstår progredierende alvorlig inflammation (2), odontoblastdød, irreversibel pulpitis og ultimativt pulpanekrose. Hvis inflammationsprocessen ikke er for fremskreden, er pulpa dog stadig i stand til at hele og overleve, hvis irritamentet fjernes, og der lægges en forseglende restaurering (3). Døde odontoblaste kan faktisk erstattes af nye odontoblast-lignende celler, som differentierer fra progenitorceller (stamceller) i pulpa gennem en kompleks proces ved navn reparativ dentinogenese (4). Operativ carierterapi har til formål at kontrollere udvikling af caries og pulpitis; men traditionelt set har man anset behandling af profund caries og fremskreden pulpitis for uforudsigelig, og

rodkanalbehandling har derfor været den indicerede behandling (5). Ved rodkanalbehandling bevarer patienten sin tand; men fjernelse af alt irreversibelt beskadiget pulpavæv er en destruktiv og teknisk vanskelig terapiform (5), som fjerner pulpas naturlige funktioner som perception, immunforsvar og heling og medfører forøget risiko for fraktur eller tab af tanden (6). Megen opmærksomhed har derfor været rettet mod nye strategier til at modulere den pulpale inflammation ved fremskreden pulpitis (5,7,8) eller stimulere nydannelse af pulpavæv (9), som kan efterligne det oprindelige pulpapentin-kompleks.

Epigenetik og pulpa

Heling eller regeneration af pulpa-dentin-komplekset indebærer en række intimt forbundne biologiske processer såsom rekruttering af stamceller/progenitorceller, differentiering, mineralisering og fremme af andre vævsreaktioner som angiogenese og neurogenese (10,11). En række hæmmere og fremmere af disse cellereaktioner, herunder epigenetiske modulatorer, er af betydning for pulpaheling (12). Epigenetiske modifikationer af DNA-associerede histonproteiner ændrer kromatinets struktur og regulerer dermed genekspressionen (13). Endvidere er epigenetiske modifikationer som DNA-metylering og histonacetylering attraktive mål for farmakologisk hæmning, som kan udnyttes i regenerativ behandling generelt (14-16) og i relation til pulpa (17) (Fig. 1). Formålet med denne oversigt er at diskutere den rolle, epigenetiske modifikationer i pulpaceller (herunder stamceller) spiller i relation til sygdom og regeneration, samt at vurdere mulighederne for at anvende denne viden inden for odontologisk diagnostik og behandling.

OVERSIGT

DNA-metylering

Mekanisme

DNA-metylering indebærer overførsel af en metylgruppe til en cytosinbase i DNA ved hjælp af DNA-metyltransferaser (DNMT), hvorved den omdannes til 5-metylcytosin (18). Denne modifikation fører til blokering af målgenet, enten ved at forhindre, at DNA-bindende proteiner (fx transskriptionsfaktorer) får adgang til DNA, eller ved at det metylerede DNA bindes til metyl-CpG-bindende domæneproteiner (MBD). MBD aktiverer dernæst kofaktorer som histondeacetylasen og andre kromatinremodellerende proteiner, som undertrykker transskriptionen (19). DNA-metylering anses for at være en stabil epigenetisk mekanisme, da metyleringsmønstret opretholdes i hele cellens levetid og også nedarves til dattercellerne (20). DNA-metylering er derfor af afgørende betydning for, hvilken fænotype cellen udvikler. Metyleringsmønstret fastlægges under celledifferentieringen og forbliver uændret, så afvigende udvikling af celler og væv kan undgås (21).

Pulpaforskning

DNA-metylering spiller en central rolle i inflammations- og helingsprocesser, og erfaringer fra andre områder har nu også smittet af på forskningen inden for regenerativ endodonti. Inflammation kan fx ændre metyleringsstatus, idet genet for ►

Væsentligste forkortelser

Angivet i den rækkefølge, de fremkommer i teksten

DNMT – DNA-metyltransferase

MBD – Metyl-CpG-bindende domæneproteiner

TET2 – Ten-eleven translocation

PSC – Pulpastamceller

KMSC – Knoglemarvsstamceller

PTEN – Fosfatase- og tensinhomolog

DNMTi – DNMT-inhibitor

FDA – Food and Drug Administration

HDAC – Histon-deacetylase

HDACi – HDAC-inhibitor

TSA – Trichostatin A

ncRNA – Ikke-kodende RNA

siRNA – Små interferering RNA

miRNA – MikroRNA

lncRNA – Lange ikke-kodende RNA

Epigenetiske influence in tooth development and repair

- DNA methylation catalysed by DNA methyltransferase enzymes.
- Histone acetylation (transcriptionally active) and deacetylation (transcriptionally repressive) controlled by HDAC and HAT enzymes.
- These epigenetic modifications regulate gene expression by altering chromatin conformation.
- Epigenetics regulation is critical to several cellular processes in dental development (primary dentine) and repair (tertiary dentine), including stem cell fate, inflammation, angiogenesis and mineralisation.
- DNA methylation and HDAC inhibitors have demonstrated therapeutic potential in vital pulp repair processes by inducing mineralisation, cell migration and dentine matrix component release.

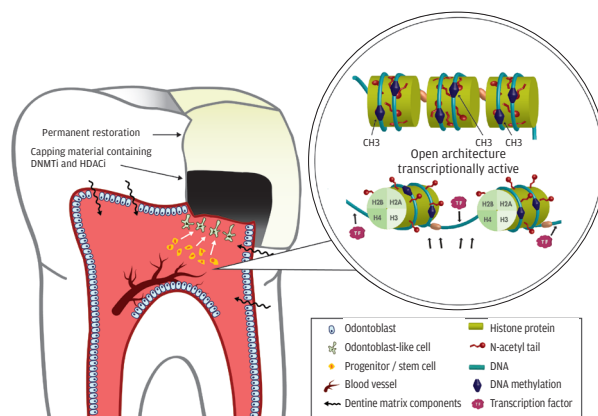


Fig. 1. Schematisk illustration af epigenetiske modifikations potentielle rolle i styring af udvikling og heling inden for pulpa-dentin-komplekset.

Fig. 1. Schematic illustration of the potential influence of epigenetic modifications in orchestrating development and repair within the dentine-pulp complex.

interferon gamma (*IFN- γ*) er umetyleret eller kun delvis metyleret i 93 % af tilfælde med inflammatorisk pulpavæv, mens genet er totalt metyleret i 44 % af tilfælde med normalt væv (22). Det er for nylig påvist, at *ten-eleven translocation 2* (*TET2*), en metylylcytosindioxygenase, som fremmer DNA-demetylering, spiller en rolle i reguleringen af inflammation i pulpa. I en *in vitro*-model med dyrkning af humane pulpaceller fremmer *TET2* lipopoly-sakkarid-induceret inflammation via regulering af *MyD88* hydroxymetylering, hvilket åbner mulighed for yderligere udforskning af betydningen af epigenetisk regulering ved pulpitis (23).

Der forskes også ivrigt i, hvilken rolle DNA-metylering spiller for modning og differentiering af pulpastamceller (PSC). Stamceller fra knoglemarv og pulpa er af mesenkymal oprindelse og har en række fælles egenskaber som fx evnen til kontinuerligt at proliferere og differentiere til mange forskellige fænotyper. Ved analyse af metyleringsmønstre i hele genomet i knoglemarvsstamceller (KMSC) fandt man højere grad af CpG-metylering i KMSC, som var påvirket til at undergå osteogen differentiering, end i KMSC, som ikke var tilsvarende påvirket. De metylerede gener var desuden involveret i mesenkymal udvikling, mesenkymal celledifferentiering, stamcelledifferentiering og udvikling af det skeletale system (24). I betragtning af lighederne mellem osteogenese og odontogenese kunne man forestille sig tilsvarende metyleringsmønstre i PSC under tanddannelsen, og for nylig har man påvist, at metyleringsstatus for fosfatase- og tensinhomolog (*PTEN*) i PSC er ansvarlig for, at PSC har større osteogent og odontogent potentiale end KMSC. *PTEN*-metylering er opreguleret i KMSC sammenlignet med PSC, og metyleringsstatus reguleres af *DNMT3B*. Reduktion af *DNMT3B* i transplanterede KMSC stimulerede dem i øvrigt til at danne pulpa-dentin-lignende komplekser (25). Desuden har man ved genomsekventering fundet, at metyleringsprofilen for tre distinkte odontogene stamceller, bl.a. PSC, er relateret til deres osteogene potentiale (26).

Potentiale

På grund af den rolle, DNA-metylering spiller i reparative og inflammatoriske processer i pulpa, forventes det, at *DNMT* kan udnyttes i terapeutisk sammenhæng (Fig. 1). *DNMT*-inhibitoren (*DNMTi*) 5-Aza-2-deoxycytidin, som er godkendt af Food and Drug Administration (FDA) i USA, er grundigt undersøgt for regenerativt potentiale. Især har man undersøgt ekspresion af gener, der relaterer til mineralisation og odontogenese, fx dentin-sialofosfoprotein, dentin-matrix-protein-1, osterix og *RUNX2*, som alle opreguleres og giver anledning til forøget dannelse af calcificerende noduli, når *DNMTi* er til stede (27). Disse fund giver mulighed for udvikling af *DNMTi*-baserede dentalmaterialer, som ved lokal applikation kan danne grundlag for regenerativ endodontisk behandling. Da der som nævnt er forskel på metyleringsmønstret i normalt og inflammatorisk pulpavæv, er der også mulighed for at anvende forskellige metylerede gener som biomarkører i diagnostik af pulpitis. For nylig har man påvist, at aktivering af den pro-inflammatoriske *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (*NF- κ B*) reguleres af metyleringsstatus for *Smad6*, som i den metylerede form hæmmer aktivering af *NF- κ B* (28).

Den mulige anvendelse af DNA-metylering til diagnostik og regenerativ terapi inden for endodontien er et nyt, men lovende forskningsområde. Fremtidig forskning inden for emnet bør fokusere på effekten af *DNMTi*-baserede behandlinger *in vivo* med henblik på at udvikle diagnostiske og regenerative værktøjer.

Modificering af histoner

Histoner er proteiner, der pakker DNA-molekylet sammen som kromatin i cellekernen. Epigenetisk regulering af disse proteiner påvirker kromatinstrukturen og ændrer genekspressionen. Histoner kan modificeres på mange måder: acetylering, metylering, fosforylering, ubiquitinering og SUMOylering. Inden for odontologien har der især været fokuseret på acetylering.

Histonacetylering

Mekanisme

Histonacetylering er en dynamisk proces, der styres af to modsatte enzym-systemer i cellekernen, histon-deacetylasen (*HDAC*) og histon-acetyltransferasen. Histonacetylering fører til en mere åben kromatinstruktur, som giver transkriptionsfaktorer og kofaktorer adgang til cellens DNA, og dette fører til forøget genekspression (13) (Fig. 1). Denne øgede transkription giver anledning til en række cellulære forandringer, som kan være relevante for pulpal regeneration, da de påvirker cellernes differentiering, proliferation og aldring og dermed også bl.a. angiogenese, neurogenese og mineralisering (14-16).

Pulpaforskning

I studier af dannelse og regeneration af knoglevæv har man påvist *HDAC* (med forskellige isoformer som *HDAC-4* og *HDAC-6*), som er vigtige regulatorer af osteoblasters differentiering og modning (29,30). På grund af lighederne mellem knogle- og tandvæv (fx osteoblaste og odontoblaste) (31,32), har man set *HDAC* som mulige dirigenter af celleudvikling og -differentiering inden for regenerativ endodonti (33,34). Faktisk bliver nogle af *HDAC*-isoformerne kraftigt udtrykt i humane odontoblaste (35), og regulering af *HDAC* har medført accelereret cellemigration og mineralisering i pulpaceller fra mennesker og gnavere og forøget dannelse af dentinogenese-relaterede proteiner som dentin matrix protein-1 og matrixmetalloproteinaser (35-39).

Potentiale

En væsentlig årsag til den omfattende interesse for *HDAC* er, at det er relativt let at hæmme dem farmakologisk (40). Man kender flere *HDAC*-hæmmere (*HDACi*), hvoraf nogle (fx trichostatin A, TSA) hæmmer alle isoformer, mens andre er mere specifikt rettet mod enkelte isoformer. De er gennemprøvet i mange studier, især inden for cancer- og inflammationsforskning, og der pågår også kliniske studier (15,41). *HDACi* har positive virkninger på regenerative processer i pulpaceller fra mennesker og gnavere, idet de opregulerer odontoblast-associerede gener og fremmer mineralisering. Resultaterne er opnået ved lave koncentrationer af *HDACi*, hvorved uønskede bivirkninger, som ses ved højere doser, undgås (17,36,38,39) (Fig. 1). Dette understreger vigtigheden af epigenetisk kontrol

ved regenerative processer. HDACi fremmer stamcellers reproduktion og ekspansion, men kan også afhængigt af dosis reducere proliferation og stimulere differentiering (41,42). HDACi kan fremme cellers omprogrammering og dermed forbedre resultaterne af terapeutisk kloning (somatic-cell nuclear transfer) og induktion af pluripotente stamceller (43). Inden for den odontologiske forskning har man vist, at TSA kan fremme differentiering af odontoblaste i pulpacellekulturer og accelerere differentiering af odontoblaste under tanddannelsen (37).

HDACi har flere egenskaber, som gør dem velegnede til brug ved regenerativ endodontisk behandling. Tilførsel af stamceller er en forudsætning for regenerativ terapi, og uanset om stamcellerne kommer fra restpulpa eller tilføres udefra, har HDACi en positiv effekt på dem. HDACi bidrager også til mineralisering og andre processer, som er nødvendige for dental regeneration, og de synes velegnede til klinisk anvendelse i fremtiden.

Ikke-kodende RNA

Mekanisme

Ikke-kodende RNA (Non-coding RNA, ncRNA) er en samlebetegnelse for alle de RNA-molekyler, der ikke oversættes til protein, fx small interfering RNA (siRNA), mikroRNA (miRNA),

klinisk perspektiv

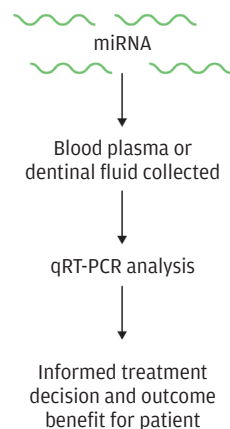
Fremskridt inden for udvikling af dentale biomaterialer har sammen med konceptet minimalt invasiv tandpleje ført til øget interesse for at skabe pålidelige behandlinger, der sigter på at bevare levende pulpavæv. Vores viden om de genetiske og epigenetiske mekanismer, der kontrollerer pulpas mineralisation, inflammation og regeneration, er dog stadig mangelfuld. Epigenetiske modifikationer har vist sig at spille en central rolle i flere af de processer, der kontrollerer regenerationen, og måske rummer de nøglen til næste generation af biomaterialer, der er rettet mod cellulære processer.

lange ncRNA (lncRNA) med flere. Tilsammen udgør de en større mængde end mRNA, der som bekendt koder for proteiner (44). Såvel siRNA som miRNA hæmmer genekspression ved at interagere med RNA-induced silencing complex og omdanne det til et mRNA med en sekvens, der er komplementær til det aktuelle siRNA eller miRNA. Derefter spaltes mRNA af ar- ▶

Skematisk diagram over mulig anvendelse af miRNA i behandling af pulpitis

A. DIAGNOSIS

Dental clinic 'chairside' analysis of miRNA as a biomarker:
- Level/severity of pulpitis
- Expression of pro-reparative miRNA



B. TARGETED DENTAL TREATMENT

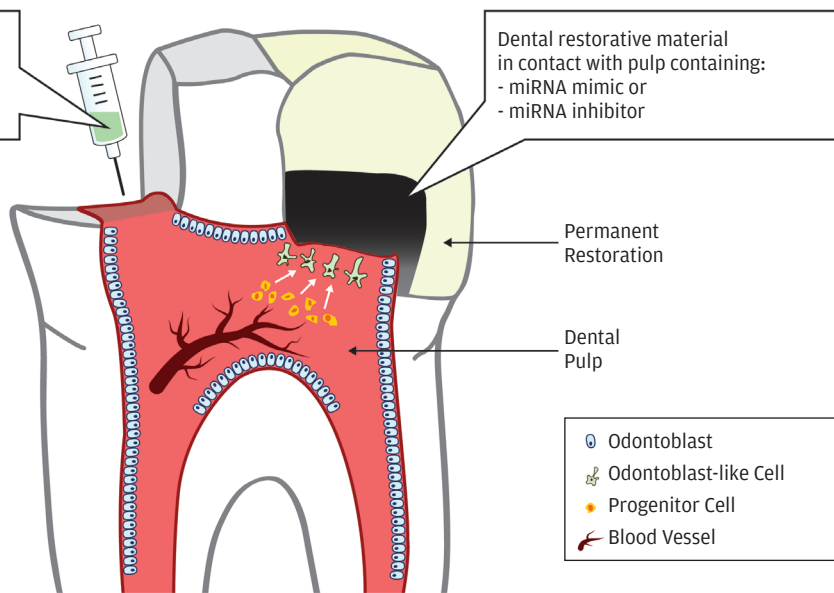


Fig. 2. A. Diagnostik. Udvikling af næste generation af klinisk anvendelige analyseteknikker til pålidelig identifikation af inflammationsrelateret miRNA i pulpablod. **B.** Måltrettet terapi. Anvendelse af miRNA-hæmmere eller -efterlignere til stimulation og fremme af helingsprocesser i pulpa. Figur fra Kearney et al. 2018 Epigenetic Approaches to the Treatment of Dental Pulp Inflammation and Repair: Opportunities and Obstacles. *Frontiers in Genetics* 7:9:311
Fig. 2. A. Diagnosis. Development of next-generation dental 'chairside' analytic techniques to reliably identify inflammatory associated miRNA in pulpal blood. **B.** Targeted therapy. Use of miRNA inhibitors or mimics to stimulate and augment dental pulpal repair processes. Figure from Kearney et al. 2018 Epigenetic Approaches to the Treatment of Dental Pulp Inflammation and Repair: Opportunities and Obstacles. *Frontiers in Genetics* 7:9:311

gonaute 2, som er den katalytiske komponent i RISC. lncRNA (> 200 nukleotider) udgør den største familie af ncRNA transkripter i det humane genom. Deres præcise rolle i forbindelse med genekspression kendes endnu ikke; men man ved, at de deltager i styringen af genregulering på transskriptorisk, post-transskriptorisk og epigenetisk niveau (45).

Pulpaforskning

Der er fundet flere forskellige ncRNA, som på forskellig vis regulerer heling og regeneration af pulpavæv. Ved undersøgelse af odontogent differentierende pulpaceller har man påvist 12 opregulerede og 10 nedregulerede miRNA (46). Ved nærmere analyse fandt man, at de gener, der blev regulerede, især kodede for differentiering af mesenkymalceller, regulering af osteoblasters differentiering og regulering af aktiviteten af mitogen-aktiveret proteinkinase. Et af de miRNA, der blev nedreguleret, var miR-135b, som er involveret i osteogenese (47-50). Da der er mange lighedspunkter mellem osteogenese og odontogenese, er det rimeligt at forestille sig, at disse miRNA kan spille en rolle i differentieringen af pulpacellepopulationer.

Potentiale

På grund af ikke-kodende RNA's rolle i genreguleringen er de attraktive for lægemiddelindustrien. I 2018 blev et siRNA-baseret lægemiddel, Patisiran, som det første af slagsen godkendt af FDA til behandling af polyneuropati hos patienter med hereditær transthyretin-medieret amyloidose (51,52). Der er for tiden flere miRNA-baserede lægemidler, der afprøves i kliniske fase I- og fase II-studier med henblik på anvendelse i behandling af fx hepatitis C (53) og T-cellelymfomer (54). Hanna et al. har for nylig publiceret en grundig oversigt om potentialet for miRNA-baserede lægemidler (55). Inden for odontologien er der mange miRNA'er, som er involveret i regulering af pulpacellers differentiering og eventuelt kan finde anvendelse som dentalmaterialer, fx miR135b og miR-20b (47-50). I andre undersøgelser har man påvist, at nedregulering af miR-143-5p

fremmer differentiering af pulpaceller til odontoblast-lignende celler ved at stimulere ekspression af RUNX2 (56), mens miR-675 faciliterer odontogen differentiering af pulpaceller ved at hæmme DNMT3B-medieret metylering af distal-less 3 (DLX3) (57). Andre ikke-kodende RNA'er, som har vist potentiale som lægemidler, er lncRNA DANCR, som undertrykker pulpacellers differentiering til odontoblast-lignende celler ved at hæmme wnt/ β -catenin pathway (58).

Den kraftigt forøgede indsigt, vi på det seneste har opnået om ncRNA's rolle i differentiering af pulpaceller, åbner nye muligheder for udvikling af terapeutiske stoffer inden for området regenerativ endodonti. Fx vil klinikere meget præcist kunne bestemme graden af pulpitis og ligefrem dæmpe inflammationen og fremme mineraliseringsprocessen (Fig. 2). Hvis fremtidig forskning fokuserer på at overvinde de udfordringer, der er ved ncRNA-baserede lægemidler, fx bivirkninger, formulering og klinisk godkendelse, er der gode chancer for, at ncRNA-baserede produkter kan finde vej til klinikken.

KONKLUSIONER

Dagens konservative strategier til behandling af beskadiget pulpavæv er grove og uspecifikke. Der er udtalt behov for at udvikle smartere løsninger og forøge vores viden om mekanismerne bag pulpasygdomme. Vores voksende forståelse af epigenetiske modifikationers rolle i reguleringen af pulpacellers differentiering har givet os epigenetiske nøgler til udvikling af nye biomaterialer og diagnostiske hjælpemidler. Den seneste forskning har været centreret omkring DNMTi og HDACis, som er i stand til at stimulere helingsprocesser og fremme mineralisering i forbindelse med tanddannelse og heling og giver mulighed for fremstilling af epigenetiske hæmmere, som kan appliceres lokalt i forbindelse med vital pulpabehandling. Der er endvidere betydeligt potentiale for klinisk relevant udforskning af andre epigenetiske modulatorer som fx ncRNAs som enten diagnostiske markører for pulpitis eller terapeutiske nøglemolekyler. ♦

ABSTRACT (ENGLISH)

REGENERATIVE ENDODONTICS. EPIGENETIC MODULATION OF DENTAL PULP CELLS

Preserving healthy pulp tissue and preventing apical periodontitis are at the core of Endodontology. Although, the dental pulp is able to recover from damage and severe irritation, traditionally treatment of exposed pulp has been unpredictable. Recent advances in pulp capping biomaterials, and improved understanding of pulp biology and regenerative processes have led to renewed enthusiasm for treating the exposed pulp; however, our understanding of the cellular regulators of pulpal inflammation/repair remains incomplete. Epigenetic modification of DNA-associated pack-

ing molecules and the influence of non-coding RNA have been shown to be central to several key processes in vital pulp treatment (VPT), including the self-renewal of stem cell populations and regulating mineralised tissue development and repair. Therapeutically, the use of pharmacological inhibitors targeted at epigenetic processes, such as DNA methyltransferases and histone deacetylases, have promoted repair processes in dental pulp cell (DPC) populations. This manuscript focuses on an analysis of the importance of epigenetic modifications on controlling DPC phenotype as well as the potential to target epigenetic modifications as part of a therapeutic strategy.

LITTERATUR

- Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res* 2002;36:223-32.
- Reeves R, Stanley HR. The relationship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966;22:59-65.
- Mjör IA, Tronstad L. The healing of experimentally induced pulpitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974;38:115-21.
- Lesot H, Smith AJ, Tziafas D et al. Biologically active molecules and dental tissue repair: A comparative view of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation in vitro. *Cell Mater* 1994;4:199-218.
- EUROPEAN SOCIETY OF ENDODONTOLOGY developed by; Duncan HF, Galler KM et al. European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J* 2019;52:923-34.
- Randow K, Glantz PO. On cantilever loading of vital and non-vital teeth. An experimental clinical study. *Acta Odontol Scand* 1986;44:271-7.
- Taha NA, Khazali MA. Partial pulpotomy in mature permanent teeth with clinical signs indicative of irreversible pulpitis: A randomized clinical trial. *J Endod* 2017;43:1417-21.
- Kearney M, Cooper PR, Smith AJ et al. Epigenetic approaches to the treatment of dental pulp inflammation and repair: Opportunities and obstacles. *Front Genet* 2018;9:311.
- Galler KM. Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. *Int Endod J* 2016;49:926-36.
- Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW et al. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent* 2010;38:687-97.
- Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A et al. Exploiting the bioactive properties of the dentin-pulp complex in regenerative endodontics. *J Endod* 2016;42:47-56.
- Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ et al. HDACi: cellular effects, opportunities for restorative dentistry. *J Dent Res* 2011;90:1377-88.
- Barros SP, Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res* 2009;88:400-8.
- Schroeder TM, Westendorf JJ. Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation. *J Bone Miner Res* 2005;20:2254-63.
- Shuttleworth SJ, Bailey SG, Townsend PA. Histone Deacetylase inhibitors: new promise in the treatment of immune and inflammatory diseases. *Curr Drug Targets* 2010;11:1430-8.
- Gordon JAR, Stein JL, Westendorf JJ et al. Chromatin modifiers and histone modifications in bone formation, regeneration, and therapeutic intervention for bone-related disease. *Bone* 2015;81:739-45.
- Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ et al. Histone deacetylase inhibitors epigenetically promote reparative events in primary dental pulp cells. *Exp Cell Res* 2013;319:1534-43.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
- Bird AP, Wolffe AP. Methylation-Induced Repression – belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999;99:451-4.
- Kim M, Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Exp Mol Med* 2017;49:e322.
- Hemberger M, Dean W, Reik W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:526-37.
- Cardoso FP, Viana MB, Sobrinho AP et al. Methylation pattern of the IFN-gamma gene in human dental pulp. *J Endod* 2010;36:642-6.
- Wang X, Feng Z, Li Q et al. DNA methylcytosine dioxygenase ten-eleven translocation 2 enhances lipopolysaccharide-induced cytokine expression in human dental pulp cells by regulating MyD88 hydroxymethylation. *Cell Tissue Res* 2018;373:477-85.
- Cao Y, Yang H, Jin L et al. Genome-wide DNA methylation analysis during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int* 2018;2018:8238496.
- Shen WC, Lai YC, Li LH et al. Methylation and PTEN activation in dental pulp mesenchymal stem cells promotes osteogenesis and reduces oncogenesis. *Nat Commun* 2019;10:2226.
- Ai T, Zhang J, Wang X et al. DNA methylation profile is associated with the osteogenic potential of three distinct human odontogenic stem cells. *Signal Transduct Target Ther* 2018;3:1.
- Zhang D, Li Q, Rao L et al. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod* 2015;41:640-5.
- Zhang T, Wu J, Ungvijanpunya N et al. Smad6 methylation represses NFκB activation and periodontal inflammation. *J Dent Res* 2018;97:810-9.
- Westendorf JJ, Zaidi SK, Cascino JE et al. Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Mol Cell Biol* 2002;22:7982-92.
- Vega RB, Matsuda K, Oh J et al. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 2004;119:555-66.
- Karaöz E, Demircan PC, Saglam O et al. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol* 2011;136:455-73.
- Opsahl Vital S, Gaucher C, Bardet C et al. Tooth dentin defects reflect genetic disorders affecting bone mineralization. *Bone* 2012;50:989-97.
- Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ et al. Epigenetic modulation of dental pulp stem cells: implications for regenerative endodontics. *Int Endod J* 2016;49:431-46.
- Luo Z, Wang Z, He X et al. Effects of histone deacetylase inhibitors on regenerative cell responses in human dental pulp cells. *Int Endod J* 2018;51:767-78.
- Klinz FJ, Korkmaz Y, Bloch W et al. Histone deacetylases 2 and 9 are coexpressed and nuclear localized in human molar odontoblasts in vivo. *Histochem Cell Biol* 2012;137:697-702.
- Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ et al. Histone deacetylase inhibitors induced differentiation and accelerated mineralization of pulp-derived cells. *J Endod* 2012;38:339-45.
- Jin H, Park JY, Choi H et al. HDAC inhibitor trichostatin A promotes proliferation and odontoblast differentiation of human dental pulp stem cells. *Tissue Eng Part A* 2013;19:613-24.
- Paino F, La Noce M, Tirino V et al. Histone deacetylase inhibition with valproic acid downregulates osteocalcin gene expression in human dental pulp stem cells and osteoblasts: evidence for HDAC2 involvement. *Stem Cells* 2014;32:279-89.
- Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ et al. The histone-deacetylase-inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid promotes dental pulp repair mechanisms through modulation of matrix metalloproteinase-13 activity. *J Cell Physiol* 2016;231:798-816.
- Richon VM, Webb Y, Merger R et al. Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5705-8.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:769-84.
- Karantzali E, Schulz H, Hummel O et al. Histone deacetylase inhibition accelerates the early events of stem cell differentiation: transcriptomic and epigenetic analysis. *Genome Biol* 2008;9:R65.
- Huangfu D, Maehr R, Guo W et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 2008;26:795-7.
- Palazzo AF, Lee ES. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front Genet* 2015;6:2.
- Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* 2013;193:651-69.
- Gong Q, Wang R, Jiang H et al. Alteration of microRNA expression of human dental pulp cells during odontogenic differentiation. *J Endod* 2012;38:1348-54.
- Yang C, Liu X, Zhao K et al. miRNA-21 promotes osteogenesis via the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1α pathway and enhances bone regeneration in critical size defects. *Stem Cell Res Ther* 2019;10:65.
- Kuang W, Zheng L, Xu X et al. Dysregulation of the miR-146a-Smad4 axis impairs osteogenesis of bone mesenchymal stem cells under inflammation. *Bone Res* 2017;5:17037. ▶

- 49.** Fan J, An X, Yang Y et al. MiR-1292 targets FZD4 to regulate senescence and osteogenic differentiation of stem cells in TE/SJ/mesenchymal tissue system via the Wnt/ β -catenin pathway. *Aging Dis* 2018;9:1103-21.
- 50.** Schaap-Oziemlak AM, Raymakers RA, Bergevoet SM et al. MicroRNA hsa-miR-135b Regulates mineralization in osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells. *Stem Cells Dev* 2010;19:877-85.
- 51.** Yang J. Patisiran for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2019;12:95-9.
- 52.** Kristen AV, Ajroud-Driss S, Conceição I et al. Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Neurodegener Dis Manag* 2019;9:5-23.
- 53.** Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 2013;368:1685-94.
- 54.** Seto AG, Beatty X, Lynch JM et al. Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2018;183:428-44.
- 55.** Hanna J, Hossain GS, Kocerha J. The Potential for microRNA therapeutics and clinical research. *Front Genet* 2019;10:478.
- 56.** Zhan FL, Liu XY, Wang XB. The Role of MicroRNA-143-5p in the Differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts by targeting runx2 via the OPG/RANKL signaling pathway. *J Cell Biochem* 2018;119:536-46.
- 57.** Zeng L, Zhao N, Li F et al. miR-675 promotes odontogenic differentiation of human dental pulp cells by epigenetic regulation of DLX3. *Exp Cell Res* 2018;367:104-11.
- 58.** Chen L, Song Z, Huang S et al. lncRNA DANCR suppresses odontoblast-like differentiation of human dental pulp cells by inhibiting wnt/ β -catenin pathway. *Cell Tissue Res* 2016;364:309-18.