

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg / Saar  
Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

# **Qualitative Untersuchung der initialen Proteinadsorption auf verschiedenen Materialien in der Mundhöhle**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2017**

vorgelegt von: Silke Maginot

geb. am: 08. November 1972 in Neunkirchen

**Tag der Promotion:**

**Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig**

**2. Berichterstatter:**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
1.1	Summary	8
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
2.1	Zusammensetzung der Pellikel	10
2.2	Die Entstehung der Pellikel	11
2.3	Funktionen der Pellikel	13
2.3.1	Bakterielle Adhärenz	13
2.3.2	Lubrikant	13
2.3.3	De- und Remineralisation	14
2.3.4	Antibakterielle Bestandteile und immunologische Reaktionen	16
2.4	Proteine in der Pellikel	17
2.5	Peptide in der Pellikel	22
2.6	Von der Pellikel zur Plaque	22
2.7	Zielsetzung	25
<b>3.</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>26</b>
3.1	Schema des prinzipiellen Versuchsablaufes (Elektrophorese)	26
3.2	Schema des prinzipiellen Versuchsablaufes (Western- Blot)	27
3.3	Versuchsvorbereitung	28
3.3.1	Herstellung der Prüfkörpertrageschienen	29
3.3.2	Befestigung der Prüfkörper	30
3.4	Ermittlung der effizientesten Methode zur Proteinsolubilisierung von der Prüfkörperoberfläche	30
3.5	Gewinnung der Pellikelproteine	31
3.6	Herstellung der 15%igen High- Tris- Gele	32
3.6.1	Das Bodengel	33
3.6.2	Das Trenngel	33
3.6.3	Das Sammelgel	34
3.7	Elektrophorese	35
3.8	Färbung der Gele	36
3.9	Silberfärbung	36
3.10	Einscannen der Gele	37
3.11	Auswertung der Gele	37
3.12	Aufbewahrung der Gele	37
3.13	Western Blot	37

3.13.1	Nachweis von spezifischen Pellikelproteinen	37
3.13.2	Herstellung der Biorad- Gele	38
3.13.2.1	Das Trenngel	38
3.13.2.2	Das Sammelgel	39
3.13.3	Molekulargewichts- Standards	39
3.13.4	Vorbereitung des Western- Blot	40
3.13.4.1	Transferpuffer	40
3.13.4.2	Blockierungslösung	40
3.13.4.3	Vorbereitung der PVDF- Membran	40
3.13.4.4	Die Blot- Kassette	40
3.13.4.5	Western- Blotting	42
3.13.5	Nachweis der spezifischen Proteine	43
3.13.5.1	Behandlung mit dem primären Antikörper	43
3.13.5.2	Behandlung mit dem sekundären Antikörper	43
3.13.5.3	Primäre und sekundäre Antikörper zum Nachweis spezifischer Pellikelproteine	44
3.13.5.4	Bepackung	49
3.13.5.5	Entwicklung	49
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
4.1	Bandenverteilung auf den verschiedenen Werkstoffen	50
4.1.1	Durchschnittliche bukkale Bandenzahl nach 1-, 3- und 30 Minuten	50
4.1.2	Durchschnittliche linguale Bandenzahl nach 1-, 3- und 30 Minuten	50
4.1.3	Durchschnittliche Bandenzahl nach 1 Minute bukkal/lingual	51
4.1.4	Durchschnittliche Bandenzahl nach 3 Minute bukkal/lingual	51
4.1.5	Durchschnittliche Bandenzahl nach 30 Minuten bukkal/lingual	51
4.2	Molekulargewichtsbereich der untersuchten Gele	55
4.3	Proteindetektion mittels Westernblotting	64
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
5.1	Diskussion der verwendeten Materialien und Methoden	65
5.1.1	Art der Prüfkörper und Durchführung der Trageversuche	65
5.1.2	Die Miniplastschiene als Prüfkörpertragehilfe	66
5.1.3	Versuchsbedingungen während der Trageversuche	66
5.1.4	Lokalisationsabhängige Unterschiede bei der Pellikelformation	67
5.1.5	Pellikelgewinnung und- verarbeitung	68
5.1.6	<i>In- vitro</i> Proteinadsorption auf verschiedenen Oberflächen	69
5.1.7	Materialspezifische Faktoren der Proteinadsorption und freie	70

	Oberflächenenergie <i>in- vitro</i>	
5.1.8	Physikalische Oberflächencharakteristika	71
5.1.9	High- Tris- Gel, Methodik der Gelfärbung, Auswertung mittels Image Master™ 1D	72
5.1.10	Auswertung der High- Tris- Gele	74
5.1.11	Anzahl und Verteilung der Banden	75
5.1.12	Western- Blot	75
5.2	Diskussion der Ergebnisse	76
5.2.1	Proteinbandenmuster auf verschiedenen Werkstoffen	77
5.2.1.1	Metallische Werkstoffe	77
5.2.1.2	Glasionomorzement	77
5.2.1.3	Kunststoff und Komposit	78
5.2.1.4	Teflon	78
5.2.2	Molekulargewichte	78
5.2.3	Nachweis der spezifischen Proteine	79
5.2.4	Schlussfolgerungen	79
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>7.</b>	<b>Materialliste</b>	<b>105</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>111</b>
<b>9.</b>	<b>Dank</b>	<b>126</b>

# 1. Zusammenfassung

Innerhalb von Sekunden bildet sich auf jeder dem Mundmilieu ausgesetzten Oberfläche eine Schicht aus Proteinen, Glykoproteinen, Kohlenhydraten und Lipiden, die sogenannte Pellikel. Sie ist der Mediator für Grenzflächeninteraktionen in der Mundhöhle. Die Pellikel zeigt ein ambivalentes Verhalten, indem sie sowohl protektive Eigenschaften besitzt, als auch Proteine, die als Rezeptoren die bakterielle Adhärenz und die Ausbildung eines strukturierten dreidimensionalen bakteriellen Biofilms begünstigen. Der Pellikel wird durch ihre Schlüsselrolle als Mediator zwischen Zahn und Mundmilieu eine besondere physiologische und pathophysiologische Bedeutung bei der Entstehung von Karies, Erosionen und Parodontopathien zugeschrieben.

Die Pellikel gilt als möglicher Ansatzpunkt in der Bekämpfung von Karies, Erosionen und Parodontopathien. Die Erforschung der Bildung, Ultrastruktur, Zusammensetzung und Funktion der Pellikel stellen die Grundlage verschiedenster neuer präventiver Therapieansätze dar.

Das Ziel dieser klinisch- experimentellen *in- situ*- Studie war es, das elektrophoretische Bandenmuster der in der Mundhöhle auf 10 verschiedenen Werkstoffen zu 3 unterschiedlichen Zeiten und an 2 unterschiedlichen Expositionsorten gebildeten Pellikel zu analysieren und den Nachweis von spezifischen Pellikelproteinen zu erbringen.

Über einen Zeitraum von 1, 3 und 30 Minuten trugen 6 gesunde Probanden partielle Miniplastschienen im Unterkiefer. Auf den Miniplastschienen wurden zur Zungenseite (lingual) und zur Wangenseite (bukkal) jeweils 4 Prüfkörper des gleichen Werkstoffes montiert. 10 verschiedene Werkstoffe (Rinderschmelz, Goldlegierung, Keramik, Prothesenkunststoff, Teflon, Komposit, Glasionomermzement, Amalgam, Glas und Titan) wurden untersucht. Die Prüfkörper wurden poliert, gereinigt und desinfiziert. Nach der jeweiligen intraoralen Expositionszeit wurden die Miniplastschienen mit destilliertem Wasser abgespült und die Prüfkörper von der Schiene entfernt. Zur Pellikelgewinnung wurden die Prüfkörper mit SDS getränkten Schwämmchen abgewischt. Die Schwämmchen wurden mit Lämmli- Puffer versetzt, die Proteinlösung abzentrifugiert und denaturiert. Die Proteine wurden entsprechend ihrem Molekulargewicht im Polyacrylamid- Gel elektrophoretisch aufgetrennt, gefärbt und mit einer speziellen Software ausgewertet.

In den nach verschiedenen Zeiten und Lokalisationen gepoolten Pellikelproben wurde nach spezifischen Pellikelproteinen (alpha- Amylase, Lysozym, Laktoferrin, Carboanhydrase I, Carboanhydrase II, Muzin I, sIgA, Glykosyltransferase B, Glykosyltransferase C,

Glykosyltransferase D, prolinreiche Proteine) mittels Western- Blotting gesucht. Dazu wurden die im Polyacrylamid- Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen („geblottet“) und immunochemisch das jeweilige Zielprotein nachgewiesen.

Die Proteinadsorption im Mundmilieu zeigte unabhängig vom Substrat, der Lokalisation, der Expositionszeit oder den Probanden eine hohe Uniformität.

Bis zu 41 Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 2,9 kDa und 348,5 kDa konnten in der Pellikel auf den 10 untersuchten Werkstoffen gefunden werden. Die Mittelwerte der Molekulargewichte der Pellikelproteine auf allen Werkstoffen, an beiden Lokalisationen, bei allen Probanden und zu allen drei Zeiten der intraoralen Exposition zeigten ein sehr homogenes Verteilungsmuster.

Bereits nach 1 Minute Bildungszeit wies die Pellikel ein ähnliches Proteinprofil wie nach 3- und 30 Minuten Bildungszeit auf, so dass die Pellikelbildung als ein schneller Prozess einzustufen ist.

Der qualitative Nachweis der spezifischen Pellikelproteine alpha- Amylase, Lysozym, Laktoferrin, Carboanhydrase I, Carboanhydrase II, slgA, Glykosyltransferase B, Glykosyltransferase C, Glykosyltransferase D und der prolinreiche Proteine konnte in der initialen *in-situ*- Pellikel mittels Western- Blot erbracht werden.

Die Pellikelbildung ist weitgehend unabhängig von der Substratoberfläche. Alle dem Mundmilieu und somit dem Speichel ausgesetzten Werkstoffe besitzen die Fähigkeit zur Ausbildung einer Pellikel.

In Folgeuntersuchungen könnten nano- massenspektrometrische Analyseverfahren genutzt werden, um das Pellikelproteom auf verschiedenen Substraten im Detail aufzuklären.

## 1.1 Summary

On all solid surfaces exposed to the oral environment a layer composed of proteins, glycoproteins, carbohydrates and lipids, termed pellicle, is formed within seconds. The pellicle is characterized by ambivalent properties, since it provides protective properties as well as specific proteins that function as receptor molecules for the bacterial adherence and, thus, facilitate formation of a three- dimensionally structured bacterial biofilm. The pellicle acts as physiological mediator between tooth surface and oral environment and has been ascribed a key role in the development of caries, erosion and periodontitis.

Modification of the pellicle layer has been supposed as a novel strategy to control and combat caries, erosion or periodontitis. In- detail investigation of the pellicle`s formation, ultrastructure, composition and function, therefore, is essential for the development of new approaches in preventive dentistry.

This *in- situ* study was conducted in order i) to analyse the electrophoretic protein profile of pellicles which were formed in the oral cavity on a variety of materials, at different sites and over differing periods of time and ii) to demonstrate the presence of specific pellicle proteins in the pellicle layer.

Six healthy volunteers wore partial Miniplast splints in the lower jaw for 1, 3 and 30 minutes, respectively. On top of the splints, 8 test specimens of identical materials were mounted (4 lingual and 4 buccal). Ten different materials were examined: bovine enamel, gold alloy, ceramic, prosthetic acrylic resin, Teflon, dental composite, glass ionomer cement, amalgam, glass and titanium. The test specimens were polished, cleaned and disinfected. After the respective exposure time, the Miniplast splints were rinsed with distilled water and the test specimens were removed from the splints. For pellicle removal, the test specimens were wiped with SDS- soaked sponges. Then, the sponges were exposed in Lämmli buffer and the protein solution was centrifuged and denaturated. The proteins were electrophoretically separated, stained and analysed with a special Software.

In addition, pooled pellicle samples were examined for detection of the the following pellicle proteins via Western blotting: alpha-amylase, lysozyme, lactoferrin, carbonic anhydrase I, carbonic anhydrase II, mucin I, slgA, glycosyltransferase B, glycosyltransferase C, glycosyltransferase D, proline- rich proteins.

Results:

The protein adsorption in the oral environment was neither affected by the solid substrate material, nor by the sites and times of intraoral exposure, or subject. Up to 41 bands between 2,9 kDa and 348,5 kDa were found in the electrophoretical profile of the protein solution from the pellicles of the 10 examined materials. The mean molecular weight of the pellicle proteins

was very similar among materials, oral sites, exposure times and subjects.

After being exposed to the oral environment for 1 minute, the pellicle's protein profile was already very similar to those which were detected after 3 and 30 minutes of the intraoral exposure. This indicates that the pellicle formation occurs very rapidly. The qualitative proof for the specific pellicle proteins alpha-amylase, lysozyme, lactoferrin, carbonic anhydrase I, carbonic anhydrase II, sIgA, glycosyltransferase B, glycosyltransferase C, glycosyltransferase D, and proline- rich proteins was revealed by Western blotting.

The results of this study indicate that the formation of pellicles is not distinctly affected by the material surface. Pellicles will develop on all materials which are exposed to the oral environment. Future studies might use nano mass spectrometric analysis methods in order to clarify in more detail the pellicle's proteome on different substrates.

## 2. Einleitung

Karies und Parodontitis zählen zu den häufigsten Erkrankungen in der Zahnmedizin. Beide Erkrankungen werden durch die Bildung eines bakteriellen Biofilms verursacht (Lenander-Lumikari und Loimaranta 2000; Listgarten und Loomer 2003; Marsh 2006; Moore und Moore 1994; van der Velden et al. 2006). Das Verständnis der Entstehung und Veränderung des oralen Biofilms ist von entscheidender Bedeutung, um Ansätze in der Bekämpfung dieser Krankheiten zu finden. Eine Biofilmbildung existiert nicht nur im Mundmilieu, sondern auf verschiedenen Oberflächen im feuchten Milieu durch Adsorption von organischen Materialien und Mikroorganismen (Costerton et al. 1995; Gaudie 2006; Hannig M und Joiner 2006; Marsh und Bradshaw 1995; Marsh und Martin 1999; Marsh 2006; Szymańska 2005).

So tritt das Phänomen der Bioadhäsion mit anschließender Biofilmbildung auch in Wasserrohrleitungen, an Schiffsrümpfen, an Implantaten, in Schläuchen oder an vielen anderen Oberflächen in Kontakt mit dem biologischen Milieu auf (Costerton et al. 2005; Donlan und Costerton 2002; Martin und Dailey 2001; Szymańska 2007; Walker et al. 2000).

Unterschiedliche wissenschaftliche Ansätze zur Biofilmmodifikation werden momentan untersucht. Bei einer *in-vitro*-Untersuchung wurden werkstoffabhängig spezifische Zusammensetzungen des adsorbierten Proteinfilms auf dentalen Werkstoffen festgestellt, die sich von der Zusammensetzung des Schmelzpellikels eindeutig unterscheiden (Svendsen und Lindh 2009). Diesem Aspekt der materialabhängigen Pellikelbildung auf verschiedenen Werkstoffen soll in der vorliegenden Studie mit *in-situ*-Experimenten vertiefend nachgegangen werden.

### 2.1 Zusammensetzung der Pellikel

An der Phasengrenze zwischen Zahnschmelz und Mundhöhle führt die Adsorption von Proteinen und auch anderen Makromolekülen aus dem Speichel zur Ausbildung einer Biopolymerschicht an der Zahnoberfläche (Norde 1984), die als Pellikel bezeichnet wird. Die Pellikel ist definiert als eine bakterienfreie Schicht an der Zahnoberfläche bestehend aus adsorbierten Proteinen, Glykoproteinen, Kohlenhydraten und Lipiden aus der umgebenden Mundhöhlenflüssigkeit (Dawes et al. 1963) und weist nicht die gleiche Zusammensetzung wie der Speichel auf (Carlén et al. 1998; Hannig M und Joiner 2006; Hay 1973; Lendemann et al. 2000; Sønju und Rølla 1973; Yao et al. 2003). Da spezifische chemische Reaktionen und Konformationsänderungen der Proteine zur Adsorption von Biopolymeren an einer intraoral exponierten Festkörperoberfläche beitragen können, besitzen nicht nur Zahnhartsubstanzen, sondern auch restaurative Werkstoffe trotz differierender chemischer

und physikalischer Oberflächeneigenschaften die Fähigkeit zur Pellikelbildung beim Kontakt mit dem Speichel (Glantz et al. 1996; Hannig M 1997). Die Pellikel wirkt als Lubrikant, als Ionendepot für die Remineralisation und als Erosionsschutz auf den Zähnen (Aguirre et al. 1987; Hannig M und Balz 2001; Hannig M 2002; Hannig M und Joiner 2006; Zahradnik et al. 1976; Zahradnik 1979). Hauptbestandteile der Pellikel sind Speichelproteine wie Histatin, Prolin-reiche Proteine, Statherin, Cystatin, Amylase und Lysozym, Glykoproteine wie Mucin MG1 und MG2, sowie Plasmaproteine, die über das Sulkusfluid die Mundhöhle erreichen (Carlén et al. 1998, 2003; Kraus et al. 1973; Li et al. 2004b; Mayhall und Butler 1976; Ørstavik und Kraus 1973, 1974; Rüdiger et al. 2002; Sønju et al. 1974). Nachweisbare Plasmaproteine in der Pellikel sind Fibronectin, Albumin, Fibrinogen oder IgG (Carlén et al. 1998, 2003, Li et al. 2004b, Ørstavik und Kraus 1974, Rüdiger et al. 2002). Weiterhin konnten Komponenten der spezifischen und unspezifischen Abwehr in der Pellikel detektiert werden (Al-Hashimi und Levine 1989; Carlén et al. 1998; Hannig C et al. 2005b; Kraus et al. 1973; Li et al. 2003, 2004b; Ørstavik und Kraus 1973, 1974; Rüdiger et al. 2002; Yao et al. 2001). Der häufigste Vertreter der spezifischen Abwehr ist das sekretorische IgA (Aguirre et al. 1987; Carlén et al. 1998; Hajishengallis et al. 1992; Rølla et al. 1983). Es kann Bakterien agglutinieren und deren Adhärenz an den oralen Oberflächen inhibieren (Hannig M und Joiner 2006; Marsh und Martin 1999; Rüdiger et al. 2002). Ein Faktor der unspezifischen Abwehr ist das stark eisenbindende Laktoferrin. Durch dieses Protein wird das Wachstum der unter eisenlimitierten Bedingungen wachsenden pathogenen Mikroorganismen behindert (Hannig M. und Joiner 2006, Marsh und Martin 1999). Darüber hinaus wirkt (eisenfreies) Laktoferrin bakterizid (Li et al. 2004b; Marsh und Martin 1999). Eine weitere wichtige Komponente der unspezifischen Abwehr ist das Lysozym- Protease- System (Hannig C et al. 2005b; Marsh und Martin 1999; Vacca- Smith und Bowen 2000). Lipide machen mit 22- 23% der Trockenmasse einen hohen Bestandteil der Pellikel aus (Slomiany et al. 1986; Slomiany et al. 1990).

## **2.2 Die Entstehung der Pellikel**

Die *in-situ*- Pellikelbildung im Mund läuft in verschiedenen Phasen ab. Der erste Schritt erfolgt innerhalb weniger Sekunden durch spontane Adsorption von Speichelproteinen (de Jong et al. 1984; Hannig M und Joiner 2006; Hannig M 1999a; Hay 1967, 1973; Skjørland et al. 1995).

Auf die initiale Adsorption von Speichelkomponenten und Ausbildung der Pellikelbasisschicht folgen innerhalb von 30-60 min eine schnelle Zunahme der Pellikeldicke unter Bildung einer

locker formierten, globulär oder granulär strukturierten Schicht und anschließend über Stunden ein langsames, kontinuierliches Pellikelwachstum unter zunehmender Verdichtung der Pellikelstruktur (Hannig M 1999; Hannig M und Balz 1999; Nyvad und Fejerskov 1987; Skjörland et al. 1995; Sørnju Clasen et al. 1997). Ein wenige Nanometer dicker Film aus sogenannten Pellikel-Präkursoren entsteht durch die Interaktion der Schmelzoberfläche mit den Speichelproteinen (Hannig M und Joiner 2006). Diese negativ geladenen Vorläuferproteine, Phosphoproteine wie Statherin, Histatin und sogenannte „prolinreiche“ Proteine, binden an Kalziumionen der Zahnhartsubstanz an (Yao et al. 1999).

Innerhalb von drei Minuten werden in der Pellikel auch Muzin, MG1 und MG2, Amylase, Cystatin, Lysozym, Carboanhydrase, Laktoferrin und bakterielle Glycosyltransferasen gefunden, und man geht davon aus, dass neben rein elektrostatischen auch hydrophobe Wechselwirkungen und von der Waals Kräfte mitwirken (Al-Hashimi und Levine 1989; Hannig C et al. 2004, 2005a; Hannig M und Joiner 2006; Stigler et al. 2003; Vacca-Smith und Bowen 2000; Vassilakos et al. 1992a,b,c, 1993; Yao et al. 2001).

Der schnelle Anstieg der Pellikeldicke lässt sich nicht durch die Adsorption einzelner Proteinmoleküle aus dem Speichel, wohl aber durch die Adhäsion von Proteinkomplexen (Hannig M 1999; Iontcheva et al. 1997; Rykke et al. 1995; Rykke et al. 1997; Skjörland et al. 1995) erklären. Parotisproteine kommen im Speichel als so genannte supramolekulare Pellikel-Präkursoren vor. Sie sind als globuläre, mizellenartige Strukturen mit einem Durchmesser von 100 bis 200 nm organisiert und haben eine negativ geladene Außenhülle und einen hydrophoben Kern (Rølla und Rykke 1994; Rykke et al. 1995). Durch die spezifische Adsorption dieser globulären, mizellenartigen Proteinagglomerate wird die zweite Phase der Pellikelbildung gekennzeichnet (Hannig M und Joiner 2006; Rølla und Rykke 1994, Rykke et al. 1995). Die mizellenartigen Proteinagglomerate oder heterotypen Komplexe bestehen aus Muzin und nicht kovalent gebundenen Proteinen wie Amylase, Lysozym, prolinreichen Proteinen, Cystatin und Statherin (Iontcheva et al. 1997; Vitkov et al. 2004; Young et al. 1999; Hannig M und Joiner 2006). Diese Pellikelpräkursoren sind ein Reservoir für die Pellikelproteine und schützen diese vor proteolytischer Umsetzung durch Speichelproteasen. Die Adsorption von heterotypen Komplexen führt zur Ausbildung einer biologisch aktiven Initialpellikel (Hannig M und Joiner 2006; Soares et al. 2004). Durch die physiologische Anflutung der Pellikel-Präkursoren wird eine schnelle Pellikelbildung erst möglich (Hannig M et al. 2001; Deimling D et al. 2004).

Aufgrund dieser Adsorptionsprozesse kommt es zu einem Gewinn an Entropie durch die Substitution von Wassermolekülen an der Schmelzoberfläche. Dies führt zur Reduktion der freien Oberflächenenergie (Vassilakos et al. 1992a, Vassilakos et al. 1992b, Vassilakos et al. 1993). Es kommt zur kontinuierlichen Adsorption von Biomolekülen, die nach 30 bis 90

Minuten ein Plateau erreicht (Hannig M und Joiner 2006; Kuboki et al. 1987; Skjorland et al. 1995; Sønju und Rølla 1973).

Bei der Vernetzung der einzelnen Komponenten der Pellikel spielen möglicherweise epitheliale Transaminierungsreaktionen eine Rolle (Bradway et al 1989, 1992; Hannig C et al. 2008a). Neben der Vernetzung können aber auch Proteolyse, Adsorption und Desorption das Erscheinungsbild der Pellikel *in-vivo* beeinflussen (Hajishengallis et al. 1992; Hannig C et al. 2005a,b; 2008a,b; Hannig M und Joiner 2006). Die Pellikel in der Mundhöhle scheint einem Turnover und einer Reifung im Sinne einer Remodellation zu unterliegen (Hannig C et al. 2005a; Hannig M und Joiner 2006; Iontcheva et al. 1997; Vacca-Smith und Bowen 2000; Yao et al. 2000; Yao et al. 2003).

## 2.3 Funktionen der Pellikel

### 2.3.1 Bakterielle Adhärenz

Die adsorbierte Pellikelschicht begünstigt die Adhärenz von initial besiedelnden Mikroorganismen, wie *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* und *Actinomyces viscosus* (Kishimoto et al. 1989; Gibbons 1989; Liljemark et al. 1986; Wolinsky et al. 1985; Liljemark und Schauer 1975, 1977; Ørstavik et al. 1974). Die Adhärenz des stark kariogenen Bakteriums *Streptococcus mutans* wird durch die Anwesenheit von prolinreichen Proteinen und hochmolekularen Speichelmuzinen in der Pellikel begünstigt (Schilling und Bowen 1992; Gibbons und Hay 1989; Gibbons et al. 1986).

### 2.3.2 Lubrikant

Die Pellikel ist beteiligt an der Befeuchtung der Zahnoberflächen, welche umgekehrt die Effizienz des Sprechens und Kauens verbessern (Tabak et al. 1982). Die Pellikel wirkt als Lubrikant, indem sie die Friktion sowohl zwischen antagonistischen Zähnen als auch zwischen den Zähnen und der oralen Mukosa herabsetzt. Abrasion und Attrition der Zähne werden während der Mastikation oder auch bei Parafunktionen verringert (Lendenmann et al. 2000; Nikiforuk 1985; Mayhall 1980). Mit *in-vitro*- Experimenten konnte aufgezeigt werden, dass der Reibungskoeffizient (Friktionskoeffizient) zwischen kontaktierenden Zahnhartsubstanzoberflächen bei Anwesenheit einer adsorbierten Schicht aus Speichelproteinen um den Faktor 20 reduziert ist (Berg et al. 2003). Eine Abrasion von Schmelz und Dentin durch die Zahnbürste kann durch die Pellikel reduziert werden (Joiner et

al. 2008).

### 2.3.3 De- und Remineralisation

Der Pellikel werden antierosive Funktionen zugeschrieben, die man auf die Proteinschutzschicht zurückführt (Hannig M und Balz 2001; Hannig M 2002; Hannig M et al. 2003; Nekrashevych und Stösser 2003; Zahradnik et al. 1976; Zahradnik 1979). Verschiedene *in-vitro* und *in-situ*- Studien untermauern die schützende Rolle der Pellikel gegen Säure induzierte Demineralisation, verursacht entweder durch chemische oder bakterielle Ursachen (Hannig M und Balz 2001; Hara et al. 2006; Siqueira et al. 2010; Cheaib und Lussi 2011). Ursprünglich ging man davon aus, die Reifung der Pellikel sei notwendig für ihre schützenden Eigenschaften gegen die Demineralisation. Verschiedene Studien untersuchten Pellikelbildungszeiten von 3 Minuten bis zu 7 Tagen. Diese gesammelten Erkenntnisse lassen vermuten, dass das Alter der Pellikel eine untergeordnete Rolle spielt (Hannig M und Balz 2001; Hannig M et al. 2003; Hannig M et al. 2004). Außerdem variieren die schützenden Eigenschaften der 1- h Pellikel in verschiedenen Regionen der Mundhöhle (Amaechi et al. 1999), aber die lokalisationsabhängigen Unterschiede erscheinen weniger wichtig in der 24 alten Stunden Pellikel (Hannig M und Balz 2001). Betrachtet man die Ultrastruktur der Pellikel, die Säure ausgesetzt ist, dann wird die äußere globuläre Schicht entfernt, aber die basale Schicht bleibt intakt (Hannig und Joiner 2006). Interessanterweise haben Histatine gezeigt, dass sie einen Schutz gegen die Demineralisation *in-vitro* liefern (Siquira et al. 2010). Dabei bieten alle Histatine einen gewissen Schutzlevel gegen Säureangriffe, phosphorylierte Histatine bieten einen größeren Schutzlevel als unphosphorylierte. Es wird ebenso vermutet, dass phosphorylierte Reste von Phosphorproteinen, wie Histatin 1 die starke Anhaftung zum Schmelz vermitteln. Statherin, ein anderes Phosphorprotein kommt in beiden Formen, intakt und fragmentiert, in der Pellikel vor (Li et al. 2004a); es scheint ebenso einen Beitrag zu der säureschützenden Natur der Pellikel zu leisten. *In-vivo* Fragmente von Statherin bieten Schutz gegen die Demineralisation *in-vitro*, wie auch Histatin; Teile, die phosphorylierte Reste enthalten, sind effektiver beim Erhalt des Mineralgleichgewichts (Richardson et al. 1993). Außerdem leisten andere Pellikelproteine, wie Mucin, ebenfalls einen Beitrag zur Säureabwehr (Cheaib und Lussi 2011). Der Kontakt mit Zitronensäure über einen Zeitraum von 20 Sekunden reduziert die Anzahl der identifizierten Pellikelproteine dramatisch. Säureresistente Proteine, wie Mucin, wurden nach dem Kontakt mit Zitronen- oder Milchsäure weiterhin gefunden (Delecrode et al. 2015a). Andere Proteine vermehrten sich nach dem Säurekontakt, darunter Cystatin B, welches um das 20 fache nach 10 Sekunden Kontakt mit Zitronensäure zunahm

und um das 13 fache nach 10 Sekunden Kontakt mit Milchsäure zunahm (Delecrode et al. 2015b). Viele Komponenten in der Pellikel sind am Schutz gegen die Schmelzdemineralisation beteiligt. Betrachtet man den Remineralisationsprozess, so zeigt die Pellikel eine "permselektive" Natur (Hannig M und Joiner 2006) in einer porösen, maschenartigen Struktur, die die Diffusion von Calcium, Phosphat und Fluoridionen erlauben könnte. Außerdem zeigen Vertiefungen auf der Schmelzoberfläche nach der Säuredemineralisation Pellikel- artige Proteine, darunter die Basalschicht der Pellikel (Hannig C et al. 2009), welche die Grundlage der Remineralisation liefern könnten (Kirkham et al. 2007). Von den 130 verschiedenen Proteinen, die *in- vivo* in der Pellikel identifiziert worden sind spielen 15% eine Rolle im Remineralisationsprozess (Siqueira et al. 2007).

Die Pellikel hat semipermeable Eigenschaften und reguliert De- und Remineralisationsprozesse über die Diffusion von Calcium und Phosphat (Zahradnik et al. 1976, 1978; Zahradnik 1979; Hannig M und Hannig C 2014). Die aus dem Speichel adsorbierten Proteine reduzieren die Löslichkeit der Schmelzoberfläche, indem sie als semipermeable Membran nicht nur den Ionenfluss von Calcium und Phosphat, sondern auch der sauren Noxe selbst verringern (Schüle 1961, 1962, 1963; Zahradnik et al. 1976). Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind Calcium und Phosphat bindende Peptide und Proteine, die sich in die Basispellikelschicht anlagern, von Bedeutung für die erosionsreduzierenden Effekte der Pellikel (Hannig M und Hannig C 2014). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der Mineralverlust und die Oberflächenalterationen unter dem Einfluss von Säuren bei pellikelbedeckten Schmelzproben weniger deutlich ausgeprägt sind als bei pellikelfreien Proben (Nekrashevych und Stösser 2003; Nekrashevych et al. 2004). Etliche *in- vivo*- Pellikelbestandteile, einschließlich der sauren PRPs und Statherin, können die kristalline Ausfällung auf Schmelzoberflächen verhindern (Hay und Moreno 1979). Statherin erscheint in physiologischer Konzentration der stärkste und einzig effektive Inhibitor der Kalziumausfällung zu sein (Tamaki et al. 2002). *In- vitro*- Studien erforschten 5 normalerweise in der *in- vivo*- Pellikel vorkommende funktionelle Breiche von Statherin, die zeigen, dass der N-terminale Bereich an der Hemmung des Hydroxylapatitkristallwachstums beteiligt ist und dass Phosphatgruppen signifikant zum hemmenden Effekt beitragen (Siqueira et al. 2012). Neben den Proteinen sind auch Lipide in der Schutzschicht wirksam (Slomiany et al. 1986; Slomiany et al. 1990). Unterschiede in der Lipidzusammensetzung und vor allem in der Lipidmenge der Pellikel bei verschiedenen Individuen scheinen mit der Kariesaktivität zu korrelieren. Die hydrophoben Lipidkomponenten optimieren vermutlich die Schutzeigenschaften der Pellikel gegen saure Noxen (Slomiany et al. 1986; Slomiany et al. 1990). Phospholipide steigern durch Interaktionen mit Muzinen dabei die Festigkeit der Pellikel (Slomiany et al. 1986; Slomiany et al. 1990).

Auch Carboanhydrasen (I, II, VI) wurden in der Pellikel nachgewiesen (Leinonen et al. 1999; Li et al. 2004b; Vaca-Smith und Bowen 2000). Zur Stabilisierung des pH-Wertes an der Zahnoberfläche können die Carboanhydrasen beitragen, da sie die Dissoziationsreaktionen der Kohlensäure katalysieren (Kadoya et al. 1987; Leinonen et al. 1999; Pakkila et al. 1990).

#### **2.3.4 Antibakterielle Bestandteile und immunologische Reaktionen**

Von den mehr als 100 Proteinen, die in der *in-vivo*-Pellikel identifiziert worden sind, werden 8% mit antimikrobiellen Funktionen in Zusammenhang gebracht, einschließlich Cystatin, Lysozym, Myeloperoxidase und Histatin (Siqueira et al. 2007). Von manchen dieser Proteine weiß man, dass ihre biologische Aktivität im adsorbierten Zustand aufrecht erhalten wird (Hannig C et al. 2005).

Die Enzyme Lysozym und Peroxidase sind protektive enzymatische Bestandteile der Pellikel (Hannig C et al. 2005a,b, 2008b; Mansson- Rahemtulla et al. 1988; Pruitt et al. 1969). Lysozym wird als der wichtigste antibakterielle Faktor angesehen. In der Pellikel liegt bereits nach einer Minute Bildungszeit eine hohe Lysozymaktivität an der Oberfläche vor (Hannig C et al. 2005b; Pruitt et al. 1969). Lysozym wirkt auf Bakterien lytisch und damit bakterizid, indem es die Peptidoglykanhülle der Zellwand hydrolysiert (Wang und Germaine 1993; Hannig M und Hannig C 2007a). In der Peptidoglykanschicht werden dabei die  $\beta$ -1,4 glykosidisch verknüpften Aminozucker, N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) gespalten (Hannig C et al. 2005a,b; Mayer 2005; Jaeger et al. 2005). Dadurch wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht, was osmotische Veränderungen verursacht (Wang und Germaine 1993). Durch Lysozym wird auch die bakterielle Autolyse der Mikroorganismen aktiviert (Hannig C et al. 2005b; Laible und Germaine 1985). Peroxidasen entgiften vor allem Radikale durch Hydrolyse und reduzieren so den oxidativen Stress in der Mundhöhle (Hannig C et al. 2008b; Lumikari et al. 1991). Außerdem katalysieren sie die Umsetzung von Peroxid und Thiocyanat zu Hypothiocyanat, was antibakteriell wirksam ist (Björk et al. 1975; Lenander- Lumikari et al. 1993; Steele und Morrison 1969). Histatine beeinflussen die Candidaspezies in ihrer Funktion, während die Cystatine auch antiviral wirksam sind (Al-Hashimi und Levine 1989; Li et al. 2003; Li et al. 2004b; Vacca- Smith und Bowen 2000; Yao et al. 2003). Das Protein Laktoferrin entzieht den Mikroorganismen das für ihren Organismus essentiell wichtige Eisen (Al-Hashimi und Levine 1989; Kraus et al. 1973; Rüdiger et al. 2002; Vacca- Smith und Bowen 2000).

11% bzw. 12% der entdeckten Proteine werden mit der Immunabwehr und Entzündungsreaktionen in Zusammenhang gebracht. Man unterstellt, dass die *in-vivo*-Pellikel eine aktive Rolle bei der Aufrechterhaltung der Mundgesundheit spielt (Siqueira et al.

2007). Als Vertreter der spezifischen Immunabwehr wurden drei Immunglobuline (IgG, IgM, IgA) in der Pellikel gefunden. Hauptsächlich von Bedeutung ist das Immunglobulin IgA, da die anderen Immunglobuline nur in Spuren detektiert werden konnten und vor allem bei entzündungsbedingt erhöhter Sulkusfluidflußrate an die Zahnoberflächen gelangen (Al-Hashimi und Levine 1989; Carlén et al. 1998; Kraus et al. 1973; Li et al. 2004b; Ørstavik und Kraus 1973; Rüdiger et al. 2002). Die Immunglobuline IgA, IgG und IgM besitzen unterschiedliche Funktionen, wobei die größte Bedeutung dem IgA in Speichel und Pellikel zukommt. Es neutralisiert das antigene Material. IgM neutralisiert und agglutiniert das Fremdmaterial und IgG opsoniert dieses für die Phagozytose (Al-Hashimi und Levine 1989; Carlén et al. 1998; Kraus et al. 1973; Li et al. 2003; Li et al. 2004b; Ørstavik und Kraus 1973; Ørstavik und Kraus 1974; Rüdiger et al. 2002; Vacca-Smith und Bowen 2000; Yao et al. 2001). Die mikrobielle Kolonisierung auf Zahnoberflächen ist begrenzt durch die mikrobielle Erkennung spezifischer Rezeptoren in der Pellikel, abhängig von der Oberflächenrauigkeit und der freien Oberflächenenergie (Wittaker et al. 1996). Die Erkennung ist in vielen Fällen so spezifisch, dass Bakterien an gebundene Proteine binden, aber nicht an das gleiche Protein, das sich in Lösung befindet (Gibbons et al. 1990). Die Pellikel / Bakterienwechselbeziehung erfolgt durch spezifische und unspezifische Mechanismen (Bowden und Hamilton 1998). Die Entwicklung und Virulenz des oralen Biofilms kann durch Nicht-Rezeptor-Proteine reguliert werden, die mit dem AEP Proteom verbunden sind. Das bakterielle Enzym Glykosyltransferase (Gtfs) wurde als Bestandteil der Pellikel identifiziert (Hannig C et al. 2008c) und kann den Zusammenhalt zwischen *S. mutans* Zellen und *C. albicans* Zellen verbessern (Gregoire et al. 2011).

## 2.4 Proteine in der Pellikel

130 Proteine wurden nach ihrer Herkunft, ihrer vermeintlichen biologischen Funktion und ihrer möglichen Rolle in der Pellikel-Struktur identifiziert (Siqueira et al. 2007). Nur 14% der identifizierten Proteine stammen aus exokrinen Speicheldrüsensekreten. Die meisten identifizierten Pellikelproteine stammen von nicht-exokrinen Anteilen des Gesamtspeichels, davon 68% aus Epithelzellen und 18% aus Serum. 3 Gruppen von Proteinen werden in der Pellikel unterschieden. Die erste Gruppe besteht aus Proteinen, die die Fähigkeit besitzen Calciumionen zu binden; dies macht 18% der identifizierten Pellikelproteine aus. Darunter befanden sich die sauren PRPs und Histatine. Beide stammen ursprünglich aus der exokrinen Speichelsekretion. Die zweite Gruppe (15%) bestand aus Proteinen, die eine hohe Tendenz zeigen, Phosphationen zu binden, wie Elongationsfaktor 2 und Myosin-9. Beide

Proteine werden aus Epithelzellen abgeleitet. Die dritte Gruppe (28%) besteht aus Proteinen, von denen beschrieben worden ist, dass sie Wechselwirkungen mit anderen Proteinen aufweisen (Lee et al. 2013). Ein Beispiel ist dafür ist MUC5B, von dem beschrieben worden ist, dass es Komplexe mit verschiedenen anderen Speichelproteinen bildet, einschließlich Speichel  $\alpha$ -Amylase, Histatin und Statherin (Iontcheva et al. 1997, 2000). Histatin 1 und Histatin 3 zeigen nach 60 und 120 Minuten eine drastische Mengenreduzierung in der Pellikel, im Vergleich zu den ersten 5 Minuten der Pellikelbildung (Lee et al. 2013). Trotz der hohen Affinität dieser Proteine zur Schmelzoberfläche sind Histatine sehr anfällig für proteolytischen Abbau (Helmerhorst et al. 2006). Auf der anderen Seite zeigte eine andere Studie, dass die Bindung von Histatin 1 an die Schmelzoberfläche das Protein weniger empfänglich für proteolytischen Abbau macht (McDonald et al. 2011). Auch Statherin, das ähnliche Eigenschaften wie Histatin hat, zeigt eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit und ist anfällig für proteolytischen Abbau im Speichel (Helmerhorst et al. 2010). Statherin kommt im Verlauf der 2 Stunden Pellikelbildung zu allen untersuchten Zeiten in ähnlicher Menge vor. Dies deutet darauf hin, dass Statherin nicht sehr anfällig für proteolytischen Abbau ist, wenn es an Schmelz gebunden ist, oder dieses Protein wird nicht durch andere Proteine oder Peptide, die in der Pellikel vorkommen, ersetzt. Um ein Profil des Proteinmusters während der ersten 2 Stunden *in-vivo*-Pellikelbildung zu erhalten, wurde von Lee YH et al. 2013 die nachfolgende Tabelle 1 erstellt. Die in der *in-vivo*-Pellikel identifizierten Proteine wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten untersucht. 89 verschiedene Proteine wurden nach 5 Minuten in der Pellikel identifiziert, 92 verschiedene Proteine wurden nach 10 minütiger Pellikelbildung identifiziert, 107 verschiedene Proteine wurden nach 60 minütiger Pellikelbildung identifiziert und 101 verschiedene Proteine wurden nach 120 minütiger Pellikelbildung identifiziert. Insgesamt 50 Proteine kamen zu allen vier Zeitpunkten vor. Sechs Proteine wurden ausschließlich nur in der 5 Minuten Pellikel identifiziert, vier Proteine wurden ausschließlich nur in der 10 Minuten Pellikel identifiziert, zwei Proteine wurden ausschließlich nur in der 60 Minuten Pellikel identifiziert und andere drei Proteine wurden ausschließlich nur in der 120 Minuten alten Pellikel identifiziert.

**Tab. 1: Nach 5, 10, 60 und 120 minütiger Pellikelbildung identifizierte Proteine der *in-vivo* Pellikel (Lee et al. 2013)**

	Protein Name	Chemical properties
Proteinnachweis zu allen 4 Zeitpunkten der Pellikelbildung	Carbonic anhydrase 6	Ca2+ and PO4 binding
	Protein S100-A14	Ca2+ binding
	Keratin type I cytoskeletal 9	protein- protein interaction
	cDNA FLJ54379 highly similar to Keratin type II cytoskeletal 6E	protein- protein interaction
	cDNA FLJ78504 highly similar to Homo sapiens keratin 6A (KRT6A) mRNA	
	Keratin type I cytoskeletal 10	protein- protein interaction, Ca2+ and PO4 binding
	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor	protein- protein interaction
	cDNA FLJ58539 highly similar to Keratin type II cytoskeletal 4	protein- protein interaction
	Alpha- Enolase	Ca2+ and PO4 binding
	HEAT repeat containing protein 3	protein- protein interaction, Ca2+ and PO4 binding
	Mucin 5A	protein- protein interaction
	Keratin, type I cytoskeletal 13	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Lysozyme C	
	cDNA FLJ56791 highly similar to Keratin type I cytoskeletal 16	protein- protein interaction
	Basic salivary proline rich protein 2	protein- protein interaction
	Cystatin C	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Peptidyl prolyl cis trans Isomerase B	protein- protein interaction
	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	
	PRB3 protein	protein- protein interaction
	IGL protein	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Calmodulin - like protein 3	Ca2+ binding
	Serotransferin	Ca2+ and PO4 binding
	cDNA FLJ60419 highly similar to R3H domain containing protein 2	
	Cystatin D	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Histatin 3	Ca2+ binding
	Calgranulin B	Ca2+ binding
	Statherin	Ca2+ binding
	Kallikrein 13 splice variant 7	
	Deleted in malignant tumors 1 protein(glycoprotein 340)	protein- protein interaction
	cDNA FLJ50396 highly similar to Zinc finger and BTB domain containing protein 17	
	Alpha- amylase 1	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Apolipoprotein A I	Ca2+ binding
	PCSK2 protein	
	Glutamate receptor interacting protein 2	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Teneurin 3	
	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Transcobalamin 1	
	Protein CBFA2T2	
	Histatin 1	Ca2+ binding

	FRAS1 related extracellular matrix protein 3	
	Keratin type II cytoskeletal 74	
	Cystatin SA	Ca2+ binding
	cDNA FLJ59187 highly similar to Multiple coagulation factor deficiency protein 2 homolog	
	Serum albumin	protein- protein interaction
	Prolactin inducible protein	protein- protein interaction
	Cystatin S	Ca2+ binding
	Lactoperoxidase	protein- protein interaction
	SNC73 protein	
	Polymeric immunoglobulin receptor	protein- protein interaction
	Salivary acidic proline rich phosphoprotein 1/2	Ca2+ binding
Proteinnachweis in der 5-min, 10- min und 60- min Pellikel	Glypican- 5	
	Nuclear receptor corepressor 1	
	Sialoashesin	protein- protein interaction
	TANK- binding kinase 1- binding protein 1	protein- protein interaction
	Protein dopey- 2	
	ADP- ribosylation factor- like protein 6- interacting protein 4	
	Transcobalamin- 1	
	cDNA FLJ61250, highly similar to Homo sapiens GTPase activating Rap/Ran GAP domain- like 3	
	Death- inducer obliterator 1	
	Tubulin polyglutamylase TLL4	
	Serine/threonine- protein kinase	Ca2+ binding
Proteinnachweis in der 5- min, 10- min und 120- min Pellikel	CAP- Gly domain- containing linker protein 1	
	Putative uncharacterized protein	
Proteinnachweis ausschließlich in der 5- min Pellikel	Cystatin- SN	Ca2+ binding
	Annexin (Fragment)	Ca2+ and PO4 binding
	Cathepsin D	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Small proline- rich protein 3	Ca2+ binding
	Cystatin- B	Ca2+ binding
	calgizzarin (s-100 calcium binding protein a11)	Ca2+ binding
Proteinnachweis in der 5- min und 10- min Pellikel	Calcium- binding protein 1	Ca2+ binding
	Fibrinogen gamma chain	protein- protein interaction
Proteinnachweis in der 5- min und 60- min Pellikel	Calmodulin	Ca2+ binding
	Peroxiredoxin- 1	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	carbonyl reductase	
Proteinnachweis in der 5- min und 120- min Pellikel	Mucin- 7	protein- protein interaction
	Transthyretin	
	Ig kappa hain V- III region HAH	protein- protein interaction
	IgGFc- binding protein	protein- protein interaction
	Myeloperoxidase	Ca2+ and PO4 binding
	Heat shock 70 kDa protein 1L	
Proteinnachweis in der 5- min, 60- min und 120- min Pellikel	proline- rich protein 25	Ca2+ binding
	Protein S100-A8	Ca2+ binding
	Putative uncharacterized protein	

	Putative uncharacterized protein	
	Alpha- 2- HS- glycoprotein	protein- protein interaction
	bacterial permeability- increasing protein	protein- protein interaction
	endoplasmic reticulum luminal Ca binding protein	Ca2+ binding
	Alpha- 2- macroglobulin	protein- protein interaction
	Cathepsin G	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Cysteine- rich secretory protein 3	
	Fatty acid- binding protein	protein- protein interaction
Proteinnachweis ausschließlich in der 10- min Pellikel	IgGfc- binding protein	protein- protein interaction
	Filaggrin	Ca2+ binding
	parotid secretory protein	Ca2+ binding
	Kallikrein- 10	Ca2+ binding
Proteinnachweis in der 10- min und 60- min Pellikel	Thioredoxin	
	Glutathione S- transferase P	
	calgranulin C	Ca2+ binding
	S100 calcium- binding protein A6	Ca2+ binding
Proteinnachweis in der 10- min und 120- min Pellikel	Mucin- 16	protein- protein interaction
	Alpha- 1-antitrypsin	
	Alpha- enolase	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Haptoglobin	
Proteinnachweis in der 10- min, 60- min und 120- min Pellikel	Albumin (Fragment)	protein- protein interaction
	Protein kinase C- binding protein 1 (Fragment)	Ca2+ binding
	Basic salivary proline- rich protein 4 allele M (Fragment)	protein- protein interaction
	Glyceraldehyde- 3- phosphate dehydrogenase	protein- protein interaction
	Immunglobulin heavy variable 4-31	protein- protein interaction
	Hemoglobin subunit beta	protein- protein interaction
	Basic salivary proline- rich protein 3	protein- protein interaction
	zinc- alpha- 2- glycoprotein precursor	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Basic salivary proline- rich protein 1	protein- protein interaction
	Basic salivary proline- rich protein 2 (Fragment)	protein- protein interaction
	Cathelicidin antimicrobial peptide	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Grancalcin	Ca2+ binding
	endoplasmic reticulum luminal Ca binding protein	Ca2+ binding
	protein kinase C inhibitor protein 1	Ca2+ binding
	Fibrinogen beta chain precursor	protein- protein interaction
Ig alpha- 1 chain c region	protein- protein interaction	
Proteinnachweis ausschließlich in der 60- min Pellikel	Fibrinogen gamma chain, isoform CRA_a	
	Squamous cell carcinoma antigen- 1 isoform SCCA- PD	
Proteinnachweis in der 60- min und 120- min Pellikel	Immunoglobulin superfamily member - 10	protein- protein interaction
	Annexin A1	protein- protein interaction
	Acitin, aortic smooth muscle	
	Complement C3	protein- protein interaction
	PRB1 protein	protein- protein interaction
	Short palate, lung and nasal epithelium carcinoma- associated protein 2	protein- protein interaction, Ca2+ binding
	Putative heat shock protein HSP 90- alpha A2	PO4 binding

	Glyceraldehyde- 3- phosphate dehydrogenase	protein- protein interaction
	L- lactate dehydrogenase	
	Ig kappa chain c	protein- protein interaction
Proteinnachweis ausschließlich in der 120- min Pellikel	Lactotransferrin	protein- protein interaction, Ca <sup>2+</sup> and PO <sub>4</sub> binding
	Desmoglein- 3	Ca <sup>2+</sup> and PO <sub>4</sub> binding
	Keratin, type II cytoskeletal 3	protein- protein interaction

## 2.5 Peptide in der Pellikel

Die Anzahl der Peptide, die in der Pellikel vorkommen, scheint groß zu sein und erhöht wahrscheinlich das funktionale Spektrum dieses Proteinfilms (Vitorino et al. 2007, 2008; Lee et al. 2013; Siqueira et al. 2012). Das Vorkommen von kleinen Peptiden in der Pellikel kann funktionsbezogen wichtig sein, da die Struktur-/ Funktionsstudien vieler Speichelproteine gezeigt haben, dass spezielle Bereiche innerhalb dieser natürlichen Proteine eine erweiterte biologische Aktivität aufweisen. Diese Daten stellen die Grundlage zur weiteren Erforschung der genauen Funktion dieser Pellikelpeptide dar und geben Einsicht in die Rolle, die die Pellikel in der Mundhöhle spielt (Siqueira und Oppenheim 2009).

## 2.6 Von der Pellikel zur Plaque

Die Pellikel bildet die Schnittstelle zwischen dem Schmelz und dem bakteriellen oralen Biofilm und moduliert die Anhaftung von Bakterien (Siqueira et al. 2012). Plaque entsteht erst sekundär auf der Basis der Pellikel und ist ein von Bakterien gebildeter, dreidimensionaler Biofilm (Hannig M und Joiner 2006; Lendenmann et al. 2000). Biofilme formen sich nicht nur auf dem Zahnhart- und- weichgewebe, wo sie die Hauptursache von Karies und parodontalen Erkrankungen darstellen (Sbordone und Bortolaia 2003), sondern auch auf der Vielzahl von Biomaterialoberflächen, die zur Wiederherstellung der Funktion in der Mundhöhle verwendet werden. Zahlreiche unterschiedliche Materialien, wie Schmelz, Dentin, Füllungsmaterialien oder Zahnimplantate, mit unterschiedlichen physikalisch- chemischen Eigenschaften mit möglichen Auswirkungen auf die erworbene Pellikel sind in der Mundhöhle vorhanden (Hannig C und Hannig M 2009). Abwehrmechanismen der Pellikel behindern die Adhärenz der Mikroorganismen. Diese verfügen jedoch über spezifische rezeptorvermittelte Anheftungsmechanismen an die Pellikel (Douglas 1994; Hannig M und Hannig C 2007a,b; Scannapieco 1994). Zu den Pionierkeimen zählen *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*,

*Actinomyces* (*A. neaslundii*, *A. odontolyticus*), *Haemophilus* spp., *Eikenella corrodens*, *Veillonella*, *Campylobacter* und *Prevotella melaninogenica* (Diaz et al. 2006; Douglas 1983, 1994; Hannig M und Hannig C 2007b; Hannig M und Joiner 2006; Marsh und Martin 1999). Andere Autoren gehen davon aus, dass es sich bei den ersten Bakterien, die adhären, auch um tote Mikroorganismen handeln könnte, die ein Gerüst für die folgenden Bakterien bilden (Netuschil et al. 1998). In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass die Vitalität initial mit 18 % sehr niedrig war und später auf 62% anstieg (Weiger et al. 1995). Über physiko-chemische Kräfte mit großer Reichweite lagern sich die Mikroorganismen noch reversibel an die Zahnoberfläche an (Cassels et al. 1995; Christersson 1991; Glantz et al. 1996; Lie und Gusberti 1978; Lie 1979; Pratt-Trepstra et al. 1989). An der Pellikeloberfläche können sich dann spezifische, irreversible Bindungen zur Pellikel ausbilden, die auf stereochemische Wechselwirkungen zurückgeführt werden (Marsh und Bradshaw 1995; Marsh und Martin 1999). Sogenannte Adhäsine sind Strukturen an der Bakterienoberfläche, die für eine rezeptorvermittelte Anbindung verantwortlich sind (Marsh und Bradshaw 1995; Marsh und Martin 1999). Hierbei handelt es sich um Lipoteichonsäure, Lectine, kohlenhydratbindende Proteine oder Polysaccharidschichten an der Bakterienoberfläche (Liljemark und Bloomquist 1996; Marsh und Bradshaw 1995; Marsh und Martin 1999). Viele Pellikelbestandteile fungieren als spezifische Rezeptoren zur Adhärenz bestimmter Mikroorganismen (Bennick et al. 1983; Douglas 1990, 1994; Kousvelari et al. 1980; Rogers et al. 2001; Scannapieco et al. 1995). Eine exponierte Stellung nimmt die Amylase ein, da diese die spezifische, rezeptorvermittelte Adhärenz von *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. parasanguis*, *S. christa* und *S. salivarius* ermöglicht (Douglas 1990; Douglas 1994; Gong et al. 2000; Gwynn und Douglas 1994; Kilian und Nyvad 1990; Rogers et al. 2001; Scannapieco et al. 1989; Scannapieco et al. 1990; Scannapieco et al. 1993; Scannapieco 1994; Scannapieco et al. 1995). Außerdem ist die Amylase ein Stärke hydrolysierendes und somit Oligo- bzw. Disaccharid freisetzendes Enzym (Hannig C et al. 2004; Morishita et al. 2000; Sreebny 1982). Glykosidische Bakterien nutzen die Oligosaccharide als Substrat (Aguirre et al. 1987; Douglas 1994; Hannig C et al. 2005a). Die Amylase und Glykosyltransferasen sind bereits in der initialen Pellikel enzymatisch aktiv und nehmen somit für die bakteriellen Mikroorganismen unter den relevanten Pellikelkomponenten eine besondere Stellung ein (Hannig C et al. 2004, 2008c; Vacca-Smith et al. 1996a,b). Glykosyltransferasen sind eine Familie extrazellulärer Enzyme aus Streptokokken, welche die  $\alpha$ -glykosidische Bindung von Saccharose nutzen, um aus den Glykosylresten extrazelluläre Polysaccharide zu synthetisieren, die sog. Glukane (Rølla et al. 1983; Scheie und Rølla 1986; Scheie et al. 1987). Glukane kommen bereits in der Pellikel vor und sind als bakterielle Rezeptoren wirksam (Hiroi et al. 1992). Bei der Biofilmbildung nimmt die

extrazelluläre Matrix durch die von Glykosyltransferasen synthetisierten wasserlöslichen und wasserunlöslichen Glukane zu (Costerton 1995; Costerton et al. 1995, Kuramitsu 1974a, b; Scheie 1994). Unlösliche extrazelluläre Polysaccharide stabilisieren den Biofilm und unterstützen die Adhäsion weiterer Mikroorganismen (Flemming und Wingender 2001a,b; Kuramitsu 1974a,b; Sutherland 2001). Lösliche extrazelluläre Polysaccharide können im Biofilm verstoffwechselt werden (Flemming und Wingender 2001a). Durch Immobilisation von Proteinen in der Pellicel verändern diese ihre Konformation, so dass Rezeptoren für bestimmte Bakterienspezies exponiert werden (Gibbons und Etherden 1983; Gibbons und Hay 1988; Jenkinson und Lamont 1997). Diese "versteckten" Rezeptoren nennt man Kryptitope (Gibbons et al. 1990; Marsh und Martin 1999; Schade 2005). Durch Koaggregation mit weiteren Bakterien wird die initiale bakterielle Adhärenz fortgeführt (Marsh 2004, 2005, 2006). Außerdem kommt es zu Interaktionen mit Glykolipiden, Fibrinogen und Kollagen (Cassels et al. 1995; Scannapieco 1994). Wird die Entwicklung der Plaque nicht durch äußere Einflüsse gestört, sorgt die extrazelluläre Matrix für so große Stabilität des Biofilms, dass natürliche Reinigungsmechanismen unwirksam sind. Die Mikroorganismen beginnen untereinander Signale auszutauschen (Kohlenbrander 2000; Bowden und Hamilton 1998). Diese Kommunikation wird „Quorum sensing“ genannt (De Kievit und Iglewski 2000; Kohlenbrander 2000). Die Dichte der Biomasse steigt in Richtung der Zahnoberfläche an, was eine Erklärung für die schlechte Penetration der Plaque mit Desinfizienzien oder Färbemitteln sein könnte (Robinson et al. 2006). Auf der Oberfläche von Biofilmen werden Stoffe freigesetzt, welche bakterizide Substanzen, Antibiotika, Detergentien und Angriffe der Immunabwehr neutralisieren (Marquis 1995; Robinson et al. 2006).

## 2.7 Zielsetzung

Viele Studien befassten sich mit der Pellikelbildung auf Schmelz. Hierzu sind in der Literatur zahlreiche Daten veröffentlicht. Nur wenige Studien haben die *in-situ* / *in-vivo*-Pellikelbildung auf Dentalmaterialien untersucht (Hannig M 1998; Hannig M 2004; Hannig C und Hannig M 2009; Weyland 2010). Deshalb existieren nur wenige Daten zur Bildung und Zusammensetzung der Pellikel auf den verschiedenen Materialien (Hannig M 1998; Hannig M 2004; Hannig C und Hannig M 2009; Weyland 2010). Dies wirft die Frage auf, ob werkstoffspezifische Eigenschaften die initiale Pellikelbildung beeinflussen können. Speziell die initialen Proteinadhaesionsprozesse auf den verschiedenen Werkstoffen sollen in dieser Studie untersucht werden.

Das Ziel dieser klinisch- experimentellen *in-situ*- Studie war es, das elektrophoretische Bandenmuster der unter Mundhöhlenbedingungen auf 10 verschiedenen Werkstoffen zu 3 unterschiedlichen Zeiten und an 2 unterschiedlichen Expositionsorten gebildeten Pellikel zu analysieren und den Nachweis von spezifischen Pellikelproteinen zu erbringen. Dabei sollten folgende Fragen geklärt werden:

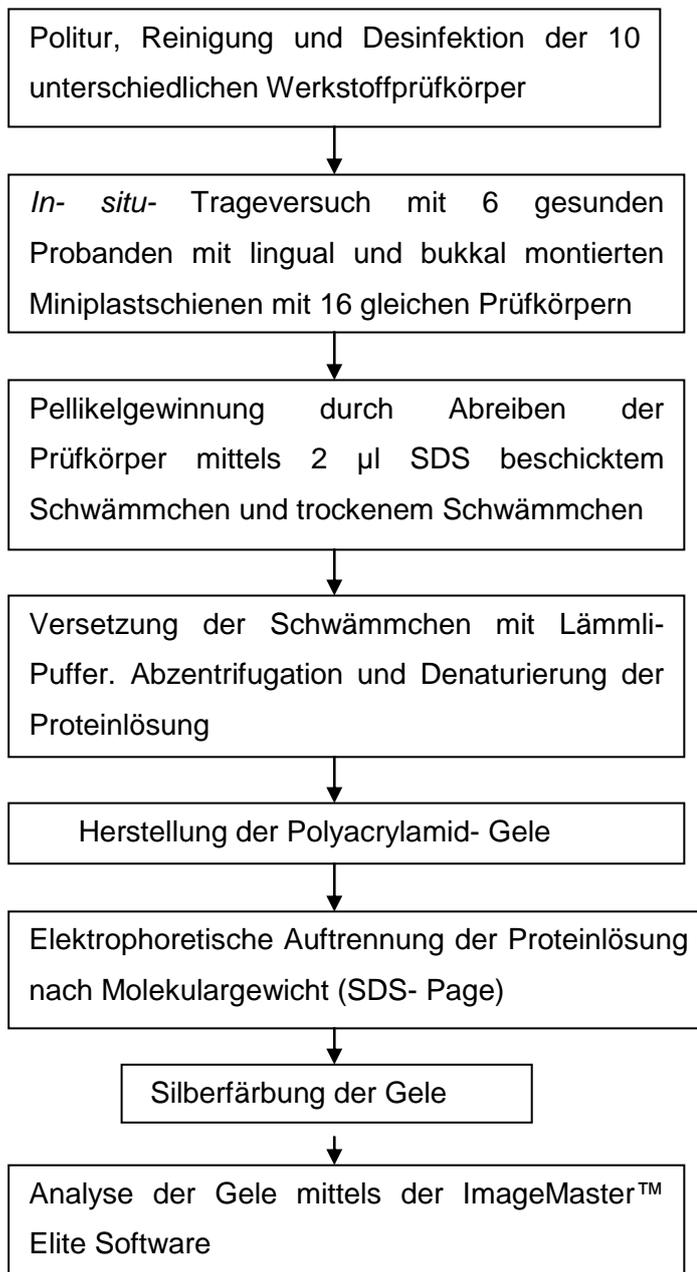
1. Gibt es substratabhängige, lokalisationsabhängige und bildungszeitabhängige Unterschiede im elektrophoretisch detektierbaren Proteinprofil (Bandenmuster, Molekulargewichte) der *in-situ* gebildeten Pellikel?
2. Sind die Proteine alpha- Amylase, Lysozym, Laktoferrin, Carboanhydrase I, Carboanhydrase II, Muzin I, sIgA, Glykosyltransferase B, Glykosyltransferase C, Glykosyltransferase D und die prolinreichen Proteine in den Pellikelproben nachweisbar?

### 3. Material und Methode

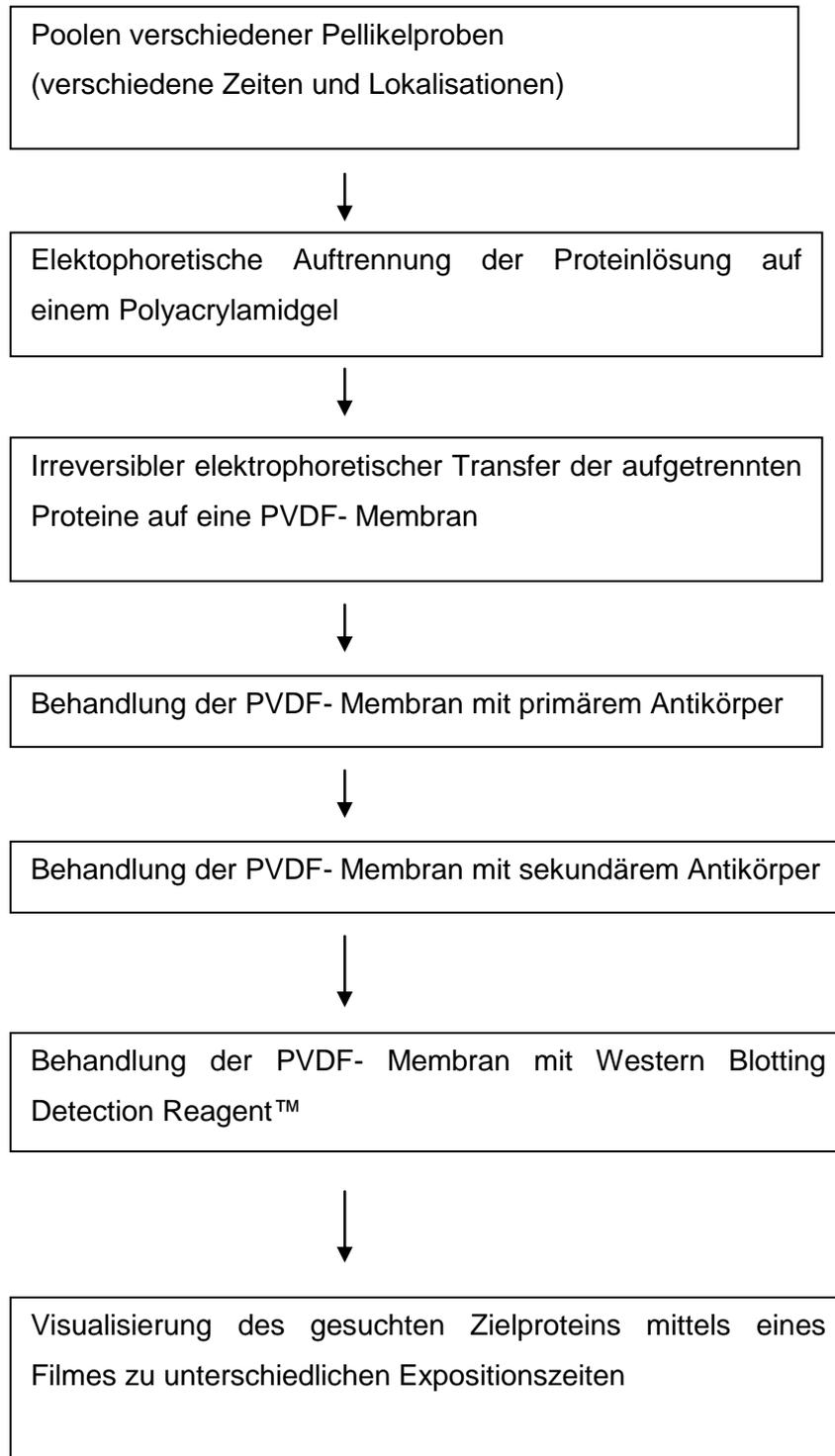
Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene, auf Minioplastschienen montierte Prüfkörper über unterschiedliche Zeitspannen dem Mundmilieu ausgesetzt und anschließend die anhaftenden Proteine mittels Elektrophorese untersucht. Das positive Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes zur Durchführung der Studie lag vor (AZ: 238/03).

In weiteren Versuchen wurde mittels Western-Blot in den gepoolten Proben der Probanden nach 11 spezifischen Pellikelproteinen gesucht.

#### 3.1 Schema des prinzipiellen Versuchsablaufes (Elektrophorese)



### 3.2 Schema des prinzipiellen Versuchsablaufes (Western- Blot)



### 3.3 Versuchsvorbereitung

Zunächst wurden die Kiefer der 6 Probanden mit blend-a-print Elastic-Alginat (Mat. 1) abgeformt und die Abformungen 10 Minuten im Tauchbad desinfiziert (Mat. 2). Die Abformungen wurden mit dem Superhartgips GC Fujirock® (Mat. 3) ausgegossen und mit Hartgips Moldano® blau stone Typ S (Mat. 4) gesockelt. Nach Aushärtung und Ausarbeitung der Modelle wurden Prüfkörpertrageschienen (Mat. 5, 6) auf den Modellen hergestellt.

Prüfkörper aus folgenden zehn verschiedenen Materialien wurden in die Versuchsreihen einbezogen:

1. Titanprüfkörper Ø10 mm, Frios® 10-5010 (Friadent, Mannheim) (Mat. 9)
2. Amalgamprüfkörper 7×7mm, ORALLOY MAGICAPS (coltène® AG, Altstätten, Schweiz) (Mat. 10)
3. Keramikprüfkörper 7×7 mm, CEREC® VITABLOCKS® Mark II (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen) (Mat. 11)
4. Glasprüfkörper 7×7 mm, aus Objektträger 76×26 mm herausgeschnitten (Menzel Gläser, Braunschweig) (Mat. 12)
5. Kunststoffprüfkörper 7×7 mm, Palapress® (Heraeus- Kulzer, Hanau) (Mat. 13)
6. Glasionomerzementprüfkörper 7×7 mm, 3M ESPE Ketac™ Fil Plus Aplicap™ (3M ESPE, Seefeld) (Mat. 14)
7. Teflonprüfkörper 7×7 mm aus einer 6×10×2 mm Teflonform (Mat. 15)
8. Schmelzprüfkörper 7×7 mm aus frisch extrahierten Rinderschneidezähnen (Mat. 16)
9. Goldprüfkörper 8×8 mm, Bio Herador® N (Heraeus-Kulzer, Hanau) (Mat. 17)
10. Kompositprüfkörper 7×7 mm, XRV™ Herculite® (Kerr, Scafati, Italien) (Mat. 18)

Alle Prüfkörper wurden mit Nassschleifpapier MICRO CUT®, Ø 250 mm (Mat. 22) aufsteigend bis zur Körnung 4000 poliert (Mat. 21, 22). Der Prüfkörper Glas (Mat. 12) wurde nur mit der 4000er Körnung poliert, da seine Oberfläche schon sehr eben war. Mit einem Auflichtmikroskop (Mat. 23) wurden die Oberflächen der 10 verschiedenen Werkstoffe kontrolliert und bei Bedarf nachpoliert.

Weitere Details zur Herstellung der Prüfkörper sind in der Dissertationsschrift von Mario Weyland zu entnehmen (Weyland 2010).

### 3.3.1 Herstellung der Prüfkörpertrageschienen

Nachfolgend wurden für jeden der 6 Probanden 10 Unterkieferminioplastschienen im Vakuumtiefziehverfahren (Mat. 8) hergestellt. Verwandt wurden hartelastische transparente Duran®- Folien 1,0 x125 mm (Scheu- Dental, Iserlohn) (Mat. 5). Die Ausdehnung der Prüfkörpertrageschiene im Frontzahnbereich endete in einem Millimeter Abstand zum Gingivalrandsaum. Im Seitenzahnbereich, etwa ab dem Eckzahn, wurde die Schiene vertikal bis zur mukogingivalen Grenze ausgedehnt, um die Prüfkörper bukkal und lingual befestigen zu können. Zur besseren Retention des Befestigungssilikons (Mat. 29) wurden die Schienen lingual und bukkal mit einem Rosenbohrer (Mat. 7) perforiert. Die Schienen und Prüfkörper wurden jeweils vor jedem Trageversuch und nach dessen Auswertung im Ultraschallbad (Mat. 26) für 30 Minuten mit 70% igem Alkohol (Mat. 24) desinfiziert. Um ein Anlösen der Oberfläche zu vermeiden, wurden die Prüfkörper aus Kunststoff (Mat. 13) und Komposit (Mat. 18) nur 5 Minuten im Ultraschallbad mit 70%igem Alkohol (Mat. 24) desinfiziert. Anschließend wurden die Prüfkörper mit Aqua dest. (Mat. 25) abgespült und für 5 Minuten im Ultraschallbad (Mat. 26) in Aqua dest. (Mat. 25) gereinigt. Nach der chemischen Reinigung wurden die Prüfkörper nach jedem Trageversuch mit 4000er Nassschleifpapier (Mat. 21, 22) erneut aufpoliert, um so auch mechanisch die angelagerten Proteine zu entfernen. Abschließend wurden die Prüfkörper im Ultraschallbad (Mat. 26) für 5 Minuten mit Aqua dest. (Mat. 25) gereinigt. Die Entfernung des Biofilms auf den Schmelzprüfkörpern erfolgte mit 1%igem Natriumhypochlorit (Mat. 27) für 5 Minuten im Ultraschallbad (Mat. 26). Anschließend wurden diese mit Aqua dest. (Mat. 25) abgespült. Gelagert wurden alle Prüfkörper im Kühlschrank (Mat. 20) in Aqua dest. (Mat. 25).

Die Probanden wurden angewiesen 30 Minuten vor den Trageversuchen eine gründliche mechanische Reinigung der Zähne durchzuführen. Erlaubt waren Zahnbürste, Zahnseide und Interdentalbürste. Nicht erlaubt waren Zahnpasten und Mundspüllösungen. Auch am Vortag sollte keine Mundspüllösung verwandt werden, um jegliches Verfälschen des Versuches zu vermeiden. Nach der Reinigung sollte der Mund dreimal mit Wasser ausgespült werden. Während des Versuches war jegliche Nahrungsaufnahme untersagt. Die am Vortag gereinigten Prüfkörper wurden am Versuchstag aus dem Kühlschrank (Mat. 20) genommen. Als Unterlage wurden saubere Einmalhandtücher benutzt. Weiterhin war eine zuvor mit 70%igem Alkohol (Mat. 24) gereinigte Teflonpinzette (Mat. 34) zum Greifen der Prüfkörper notwendig. Es wurde mit Einmalhandschuhen (Mat. 28) gearbeitet um eine Kontamination der Schienen (Mat. 5) oder der Prüfkörper auszuschließen.

### 3.3.2 Befestigung der Prüfkörper

Die sauberen und trockenen Schienen wurden auf das passende Modell gesetzt. Mit einem niedrigviskösen Abformsilikon (President Plus light body Abformmasse, coltène® AG, Altstätten, Schweiz) (Mat. 29) wurden die Prüfkörper an den Schienen (Mat. 5) befestigt. Das Abformsilikon (Mat. 29) wurde auf die Schiene mittels einer Mischpistole (Mat. 30, 31) aufgetragen und der jeweilige Prüfkörper vorsichtig mit der Teflonpinzette (Mat. 34) in das noch plastische Silikon (Mat. 29) gedrückt. Jeweils von der regio 34 bis 37 und 44 bis 47 wurden bukkal und lingual 4 Prüfkörper des gleichen Materials befestigt, also insgesamt 16 Prüfkörper pro Trageversuch. Eine Kontamination der Prüfkörper musste unbedingt vermieden werden. Nach dem Abbinden des Silikons wurde die Schiene dem Probanden für die jeweilige Expositionszeit eingesetzt. Zu untersuchende Expositionszeiten waren 1 Minute, 3 Minuten und 30 Minuten. Kontrolliert wurde die Zeit mittels einer Stoppuhr.

### 3.4 Ermittlung der effizientesten Methode zur Proteinsolubilisierung von der Prüfkörperoberfläche

In einem Vorversuch wurde ermittelt, welche Methode die besten Ergebnisse bei der Proteinsolubilisierung im Rahmen der Abgewinnung der *in-situ* gebildeten Pellikel von der Prüfkörperoberfläche ergab. Als Prüfkörper diente Rinderschmelz bei einer Tragezeit von 3 Minuten im Mundmilieu. Die auf der Prüfkörpertrageschiene später bukkal gelegenen Prüfkörper und die lingual befestigten Prüfkörper wurden getrennt untersucht.

Folgende Methoden wurden in einem 15% High- Tris- Gel mit späterer AgNO<sub>3</sub>- Färbung gegenübergestellt:

1. Proteinlösung mittels Aqua dest. im Ultraschallbad  
    Probenauftrag von 26 µl mit der Mikropipette  
    Probenauftrag von 20 µl mit der Mikropipette
2. Proteinlösung mittels SDS (Natriumlaurylsulfat) (Mat. 39) im Ultraschallbad (Mat. 26).
3. Proteinlösung mittels SDS (Natriumlaurylsulfat) (Mat. 39) im Ultraschallbad (Mat. 26) und späterer Proteindenaturierung für 1,5 Minuten bei 95° C im Wasserkocher.
4. Proteinlösung mittels 2 µl SDS (Natriumlaurylsulfat) (Mat. 39) und Abrieb mittels Schwämmchen, dannach erfolgte eine Proteindenaturierung für 1,5 Minuten bei 95°C im Wasserkocher (Mat. 45).

**Tab. 2: Anzahl der elektrophoretisch separierbaren / detektierbaren Proteinbanden in Abhängigkeit von der Abgewinnungsmethode der 3- min Pellikel von bukkal bzw. lingual intraoral exponierten Schmelzprüfkörpern.**

		bukkal getragene Proben				
	Bench Marker™	Aqua dest. 26 µl	Aqua dest. 20 µl	SDS US 26 µl	SDS US/gek. 26 µl	Schwämmchen 26 µl
Anzahl der Banden	17	23	21	13	10	27
		lingual getragene Proben				
	Bench Marker™	Aqua dest. 26 µl	Aqua dest. 20 µl	SDS US 26 µl	SDS US/gek. 26 µl	Schwämmchen 26 µl
Anzahl der Banden	17	17	17	10	9	25

Als effizienteste Methode erwies sich die Proteinsolubilisierung der Pellikel mittels Schwämmchen. Die höchste Anzahl der Banden und die beste Färbung der Banden erfolgte eindeutig mit der Proteinlösung mit SDS und Abrieb mittels Schwämmchen und späterer Silberfärbung. Somit wurde diese Methode in allen weiteren Versuchen zur Proteinsolubilisierung der Pellikelschichten verwandt.

### 3.5 Gewinnung der Pellikelproteine

Nach Ablauf der jeweiligen Expositionszeit in der Mundhöhle wurde die Schienen (Mat. 5) vorsichtig aus dem Mund des Probanden entnommen. Eine Berührung der Prüfkörper wurde vermieden. Danach wurden die Prüfkörper mit Aqua dest. (Mat. 25) abgespült und mit Druckluft aus der Dose (Mat. 37) getrocknet. Überflüssiger Speichel wurde so entfernt. Die Prüfkörper wurden nun von der Miniplastschiene (Mat. 5) vorsichtig mit einem Heidemannspatel (Mat. 36) abgehoben und auf Einmaltücher gelegt. Man benötigte eine Pinzette (Mat. 35) zum Festhalten der Prüfkörper sowie eine Teflonpinzette (Mat. 34) und zwei Schwämmchen (Pele Tim No. 0) (Mat. 33) zum Abreiben der Prüfkörper. Die Prüfkörper wurden unter festem Anpressdruck abgewischt. Zuerst trocken, dann wurde mittels einer Mikropipette (Mat. 40, 41) 2 µl 2%ige Natriumlaurylsulfatlösung (SDS) (Mat. 39) auf das erste Schwämmchen (Mat. 33) gegeben und damit der Prüfkörper kräftig abgewischt. Anschließend wurde mittels des zweiten trockenen Schwämmchens (Mat. 33) erneut über den ersten Prüfkörper gewischt, um verbliebene Restfeuchtigkeit aufzunehmen. So wurde

mit jedem Prüfkörper verfahren. Die Schwämmchen eines jeden Probanden wurden in zuvor beschrifteten Eppendorfcups (Mat. 42, 43) nach Expositionszeit, Material und Lokalisation getrennt gesammelt. Pro Versuch wurde 32 Schwämmchen mit Protein gesammelt, 16 bukkal und 16 lingual. Zur Aufbewahrung wurden die verschlossenen und beschrifteten Eppendorfcups (Mat. 42) bei  $-81^{\circ}\text{C}$  in der Gefriertruhe (Mat. 44) gelagert.

Um eine größere Proteinmenge zu erhalten, wurden jeweils Pools zusammengefasst. Es wurden jeweils 16 Schwämmchen zusammengefasst, die von einem Werkstoff, einer Lokalisation (bukkal bzw. lingual), einem Probanden und einer Expositionszeit stammten. Somit ergaben sich aus 2880 Einzelproben ( $10 \times 6 \times 3 \times 16$ ) 360 Poolgruppen ( $2880:8=360$ ).

Vor der Weiterverarbeitung wurden die tiefgefrorenen Proben langsam aufgetaut und auf dem Rüttler (Vortex) (Mat. 47) durchmischt.  $40\ \mu\text{l}$  des 2-fach Lämmli- Puffers (Mat. 46, Anhang Tab. 1) wurden mit der Mikropipette (Mat. 40, 41) entnommen und auf die im Eppendorfcup (Mat. 42) befindlichen 16 Schwämmchen (Mat. 33) verteilt. Mit der auf der Mikropipette (Mat. 40) aufgesetzten Einmalpipettenspitze (Mat. 41) wurde die Lösung mit den Schwämmchen (Mat. 33) gut durchmischt. Anschließend wurde der Inhalt des Eppendorfcup (Mat. 42) auf dem Rüttler (Vortex) (Mat. 47) noch einmal vermengt und 5 Minuten zur Minderung der Schaumbildung stehen gelassen. Das gefüllte Eppendorfcup wurde auf der Unterseite mit 70%igem Alkohol (Mat. 24) desinfiziert und mit einer sterilen Sonde (Mat. 48) wurde ein Loch in den Eppendorfcupboden gestochen. Dieses Eppendorfcup (Mat. 42) wurde in ein zweites vorher beschriftetes Eppendorfcup (Mat. 42) gestellt. So wurde mit allen Proben verfahren.

Alle zuvor so bearbeiteten Eppendorfcups (Mat. 42) wurden in der Zentrifuge (Mat. 49) mit einer Drehzahl von  $14000\ \text{U/min}$  8 min zentrifugiert. Das gewonnene Zentrifugat, welches sich im unteren Eppendorfcup (Mat. 42) befand, wurde mit einem Eppendorfcupständer für  $1\ \frac{1}{2}$  Minuten zur Denaturierung der Proteine in einen zuvor auf  $95^{\circ}\text{C}$  geheizten Wasserkocher (Mat. 45) gestellt. Es wurde gerade soviel Wasser eingefüllt, dass das gewonnenen Zentrifugat im kochenden Wasser stand. Nach langsamer Abkühlung wurden alle Eppendorfcups (Mat. 42) wieder eingefroren.

### **3.6 Herstellung der 15% igen High- Tris- Gele**

Zur Herstellung einer Form zum Gießen der Gele wurden ein Sockel mit Hohlfräsung (Mat. 55) und zwei Glasplatten (Mat. 56) verwandt. An einem Ende einer Glasplatte befand sich

eine rechteckige Aussparung. Die Glasplatten waren in passender Größe zur Innenaussparung der Sockelform geschnitten. Zwischen beide Glasplatten wurden rechts und links an den Glasrand zwei Abstandshalter (Spacer) (Mat. 57) gelegt, die auch die spätere Dicke des Gels bestimmten. Weiterhin waren 4 Klammern notwendig, die vorgenannte zwei Glasplatten mit innenliegenden Spacern zusammenhielten. In das noch nicht abgebundene Gel wurde zum Abschluss in die rechteckige Aussparung ein 21zähliger Teflonkamm (Mat. 58) eingebracht. Nach Entfernen des Kamms hatte man 21 Geltaschen zum Einbringen der Proben. Alle Materialien wurden sorgfältig vor dem Aufbau mit Ethanol (Mat. 24) gereinigt. Auf der Glasplatte mit Aussparung wurde mit einem wasserfesten feinen Stift eine Markierung in doppelter Kammhöhe angebracht. Außerdem wurde die Glasplatte mit Name, Datum und Gelart beschriftet. Das spätere Gel setzt sich aus drei Komponenten zusammen. Dem Bodengel, dem Trenngel und dem Sammelgel.

### **3.6.1 Das Bodengel**

Das Bodengel bestand aus einer 2%igen Agarlösung (Mat. 59), welche in einer dunklen Glasflasche aufbewahrt wurde. Im Mikrowellenherd (Mat. 60) wurde die Glasflasche mit zuvor abgenommenem Deckel 2-3 Minuten erhitzt. Die heiße Flasche wurde mittels Handschuh aus dem Mikrowellenherd entnommen und 10 ml der nun flüssigen 2%igen Agarlösung wurden in einen Messbecher abgefüllt. Diese Menge wurde in den Sockel (Mat. 55) gefüllt. Die mit Spacern auf Abstand gehaltenen, zusammengeklammerten Glasplatten wurden in die Innenaussparung des Sockels und somit in die 2%ige Agarlösung (Mat. 59) gestellt. Durch die Agarlösung wurde der untere Anteil der Glasplatten abgedichtet.

### **3.6.2 Das Trenngel (Anhang, Tab. 2)**

Das Trenngel (Anhang, Tab. 2) bestand aus verschiedenen Substanzen, welche in ein Becherglas (Mat. 61) pipettiert und mittels eines Magnetrührers (Mat. 62, 63) vermischt wurden.

- Acrylamid 4 × 40% (Mat. 64)
- Bisacrylamid 2%, sterifiltrierte (N,N'-Methylen-bisacrylamid 2 × 2%) (Mat. 66)
- 1,875 Tris pH 8,8 mit HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) (Mat. 67)
- Millipore H<sub>2</sub>O (Mat. 68)
- 10% SDS (Mat. 39)

Die Abbindereaktion des Gels begann mit Pipettierung folgender Lösungen, die im Kühlschrank aufbewahrt wurden:

- TEMED (N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin) (Mat. 69)
- 20% AMPS (Amoniumpersulfat) (Mat. 70)

Nach deren Zugabe war eine zügige Verarbeitung erforderlich. Das zusammengerührte Trenngel (Anhang, Tab. 2) wurde in den Hohlraum zwischen beide Glasplatten mit 1-2 mm Überschuss über der zuvor angezeichneten Markierung gegossen. Dies diente zum Ausgleich der Polymerisationsschrumpfung. Um eine glatte Trennlinie zwischen Trenngel (Anhang, Tab. 2) und Sammelgel (Anhang, Tab. 3) zu erhalten wurde das Trenngel (Anhang, Tab. 2) mit 500 µl Butanol (Mat. 71) überschichtet. Nach Aushärtung des Trenngeles (Anhang, Tab. 2) wurde das Butanol vorsichtig abgegossen und der Rest des Butanols mit vorher zurechtgeschnittenen Filterpapierstreifen (Mat. 72) abgesaugt. Das Trenngel (Anhang, Tab. 2) durfte dabei nicht berührt werden.

### **3.6.3 Das Sammelgel (Anhang, Tab. 3)**

Die verschiedenen Substanzen zur Herstellung der Sammelgele (Anhang, Tab. 3) wurden während der 15-minütigen Abbindereaktion der Trenngele in ein Becherglas (Mat. 61) pipettiert und mittels eines Magnetrührers (Mat. 62, 63) vermischt.

Je nach Anzahl der zu herstellenden Gele wurden die in den Tabellen (siehe Anhang, Tab. 2, 3) angegebenen Mengen verwendet.

- Acrylamid 4x40% (Mat. 64)
- Bisacrylamid 2% (Mat. 66)
- Millipore H<sub>2</sub>O (Mat. 68)
- 1M Tris pH 6,8 (Mat. 75)
- 10% SDS (Mat. 39)
- TEMED (Mat. 69)
- 20% AMPS (Mat. 70)

Nach Zugabe von TEMED (Mat. 69) und AMPS (Mat. 70) war eine zügige Verarbeitung erforderlich. Es kam zu einer noch schnelleren Abbindereaktion als bei den Trenngelen (Anhang, Tab. 2). Nachdem die Sammelgele (Anhang, Tab. 3) in die Formen gegossen

worden waren, wurde ein 21zähliger Kamm (Mat. 58) eingesetzt.

Nun wurden die gegossenen Gele mit Parafilm (Mat. 76), einer dehnbaren, weißlich durchscheinenden Verschlussfolie, sorgfältig abgedeckt und mindestens eine Woche lang zur abschließenden Polymerisation im Kühlschrank gelagert.

### 3.7 Elektrophorese

Die tiefgefrorenen Proben wurden aufgetaut, 20 s bei 14.000 U/min zentrifugiert (Mat. 77) und danach 5 min im Eppendorf-Thermostat (Mat. 78) bei 95 °C gekocht. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und das Zentrifugat gleichmäßig vermischt.

Nun wurde die eigentliche Elektrophorese vorbereitet. Die Gele wurden aus dem Kühlschrank genommen. Parafilm, der 21zählige Kamm und die Klammern wurden vorsichtig entfernt. Die Laufpufferkammer bestand aus einer unteren Kammer mit erhöhter Rückwand, an welche das Gel mit 4 Klammern befestigt wurde und einer oberen Kammer. Die Aussparung wurde in Richtung der oberen Kammer ausgerichtet.

Ein Liter 1fach konzentrierter Laufpuffer (Mat. 81) wurde durch Verdünnen von 5fach konzentriertem Laufpuffer (200 ml 5fach Laufpuffer + 800 ml Millipore H<sub>2</sub>O) hergestellt und in die obere und untere Kammer der Apparatur gefüllt. Der Laufpuffer sollte das Sammelgel (Anhang, Tab. 3) etwa einen halben Zentimeter bedecken und ebenso das Bodengel. Beide Kammern standen somit in Kontakt über das eingespannte Gel.

5fach Laufpuffer (Mat. 81):

Tris 50 mM	302,9 g
Glycin 384 mM	1441,4 g
SDS 0,1%	50,0 g
ad 10 Liter H <sub>2</sub> O bidestillata	

Mit einer Spritze (Hamilton Microliter®) (Mat. 82) wurden jeweils 26 µl der jeweiligen Probe in die zweite bis einundzwanzigste Tasche appliziert. Die Spritzenspitze wurde langsam auf den Boden der Tasche vorgeschoben und die Probe langsam eingebracht. Ein Überschwappen der jeweiligen Probenflüssigkeit musste vermieden werden. Nach jeder Probenapplikation wurde die Spritze im Laufpufferbecken gespült und auf Filterpapier (Mat. 72) getrocknet. In die erste Tasche wurde 1 µl Bench- Marker™ (Mat. 83), ein Marker eingebracht.

Nach fertiger Probenapplikation wurde der Deckel aufgesetzt und mit einer schweren Glasflasche beschwert. Die Elektrophorese (Mat. 79, 80) wurde über Nacht bei niedriger Stromstärke (5 mA) ausgeführt und morgens für 1 Stunde auf 44 mA erhöht. Nachdem die Lauffront das Bodengel erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Das festgeklammerte Gel wurde aus der Laufpufferkammer entnommen. Beide Glasplatten wurden vorsichtig mit einem Spatel auseinandergehoben, die Spacer (Mat. 57) entfernt und das Bodengel mittels einer der beiden Glasplatten abgetrennt. Abschließend wurde eine untere Ecke des Gels als Orientierung entfernt. Es wurde immer die Ecke auf der Seite des Bench Markers™ (Mat. 83) entfernt.

### **3.8 Färbung der Gele**

Um die Ergebnisse auswerten zu können, mussten die Gele eingefärbt werden. Das Gel wurde in ein Kunststoffbehältnis gegeben und mit Coomassiefärbelösung (Anhang, Tab. 4; Mat. 84) übergossen. Nach einer halben Stunde Einwirkzeit auf dem Schüttelapparat (Mat. 85) wurde die Coomassielösung (Anhang, Tab. 4; Mat. 84) abgegossen und Entfärber I (Anhang, Tab. 5; Mat. 86) in das Gefäß gegeben. Nach einer weiteren halben Stunde auf dem Schüttelapparat wurde Entfärber I (Anhang, Tab. 5; Mat. 86) abgegossen und zweimal mit Millipore H<sub>2</sub>O dest. (Mat. 68) gespült. Abschließend wurde Entfärber II (Anhang, Tab. 6; Mat. 87) auf das Gel gegeben und ungefähr 2 Tage auf dem Schüttelapparat (Mat. 85) entfärbt. Es wurde so lange entfärbt, bis nur noch eine schwache Färbung übrig blieb.

### **3.9 Silberfärbung**

Nachdem die Gele entfärbt waren, wurde auf einer kleinen Wippe eine Silberfärbung durchgeführt. Dazu benötigte man 7 verschiedene Lösungen (Anhang, Tab. 7). Die vorhandenen Flaschen, in denen die verschiedenen Rezepturen zur Silberfärbung angesetzt wurden waren mit den Zahlen 2, 4 bis 9 gekennzeichnet. Alle Flascheninhalte wurden auf das Ansetzungsdatum und auf ausreichenden Inhalt kontrolliert und gegebenenfalls erneuert. Die optimalen Einwirkzeiten (Anhang, Tab. 8) in den Lösungen 2- 9 wurden mittels einer Stoppuhr kontrolliert. Es konnten 2 Gele gleichzeitig auf der Wippe (Mat. 95) gefärbt werden. Benötigte Materialien waren 2 Kunststoffbehältnisse (für jedes Gel eines) und eine Stoppuhr. In Lösung 7 war nicht die Zeit entscheidend, sondern die optische Kontrolle. Es wurde die beste Kontrastbildung abgewartet.

### **3.10 Einscannen der Gele**

Die Gele wurden mit einem Durchlichtscanner (Mat. 98) mit der LabScan- Software® 3.01 (Mat. 99) eingelesen. Die Auflösung betrug 300 dpi, eingestellt waren 16 bit Standard Graustufen und „Colour optimised for: Blue source“. Gespeichert wurde die Gele als nicht komprimierte Tif-Datei.

### **3.11 Auswertung der Gele**

Die Auswertung der Gele erfolgte mittels der ImageMaster™ 1D Elite Software (Mat. 100).

### **3.12 Aufbewahrung der Gele**

Zur Aufbewahrung wurden die Gele ca. 30 Minuten in einem Wasser- Glycerin- Gemisch (Mat. 68, 94) inkubiert, zwischen in derselben Lösung angefeuchtete Cellophanfolie (Mat. 96) gelegt und in einen Trockenrahmen (Mat. 97) eingespannt. Die Gele waren nach ca. 12 Stunden getrocknet und konnten aus dem Trockenrahmen (Mat. 97) entnommen werden.

### **3.13 Western- Blot**

#### **3.13.1 Nachweis von spezifischen Pellikelproteinen**

Gepoolt wurden dazu 3 palatinale und 3 bukkale Proben eines männlichen Probanden mit einer Expositionszeit von 3 Minuten im Mundmilieu, 3 palatinale und 3 bukkale Proben eines anderen männlichen Probanden mit einer Expositionszeit von 30 Minuten im Mundmilieu und 3 palatinale und 3 bukkale Proben eines weiblichen Probanden mit einer Expositionszeit von 2 Stunden im Mundmilieu. Nach folgenden Proteine wurde mittels Western- Blot in diesem Proteingemisch gesucht:

1. alpha- Amylase (Mat.115)
2. Lysozym (Mat. 116)
3. Laktoferrin (Mat. 114)
4. Carboanhydrase I (Mat. 112)
5. Carboanhydrase II (Mat. 113)

6. Muzin 1 (Mat. 111)
7. s IgA (Mat. 110)
8. Glykosyltransferase B (Mat. 117)
9. Glykosyltransferase C (Mat. 118)
10. Glykosyltransferase D (Mat. 119)
11. PRP (Mat. 120)

### **3.13.2 Herstellung der Biorad- Gele**

#### **3.13.2.1 Das Trenngel (Anhang, Tab. 9)**

Folgende Substanzen wurden in ein Becherglas (Mat. 61) pipettiert und mittels eines Magnetrührers vermischt:

- Millipore H<sub>2</sub>O (Mat. 68)
- 30% Acrylamid (Mat. 65)
- 1,5 M Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) (Mat. 134)
- 10% SDS (Mat. 39)
- TEMED (Mat. 69)
- AMPS (Mat. 70)

Mit Zugabe der Substanzen TEMED und AMPS begann die Abbindereaktion und es musste zügig gearbeitet werden. Auch hier gab es zwei unterschiedliche Glasplatten, eine kürzere und eine mit aufgesetzten Abstandshaltern. Alles wurde sorgfältig mit Ethanol (Mat. 24) gereinigt. Die beiden Glasplatten wurden in einen grünen Gelrahmen eingesetzt. Die kurze Platte zeigte nach vorne. Die beiden Hebel des Gelrahmens wurden nach außen gedrückt und die Glasplatten so zueinander auf Abstand (0,75 mm) gehalten. Der Gelrahmen wurde anschließend in einen Gießstand eingesetzt, durch die Klammer am oberen Rand der Apparatur mit Druck gegen die untere graue Gummileiste gedrückt und damit abgedichtet. Mit einem wasserfesten Stift wurde die spätere Trenngelhöhe auf der Glasplatte markiert. Die Trenngellösung wurde bis zur Markierung in den Hohlraum zwischen beide Glasplatten gegossen. Anschließend wurde das Trenngel, um eine glatte Oberfläche zu erhalten, mit Isopropanol überschichtet. Das Isopropanol wurde weggegossen und das noch verbliebene Isopropanol vorsichtig mit Filterpapierstreifen (Mat. 72) getrocknet.

### 3.13.2.2 Das Sammelgel (Anhang, Tab. 9)

Zur Herstellung der Sammelgele wurden folgende Substanzen in ein Becherglas (Mat. 61) pipettiert und mittels eines Magnetrührers (Mat. 62, 63) vermischt.

- Millipore H<sub>2</sub>O (Mat. 68)
- Acrylamid 30% (Mat. 65)
- 0,5 M Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) (Mat. 135)
- 10% SDS (Mat. 39)
- TEMED (Mat. 69)
- AMPS (Mat. 70)

Nach der Zugabe von TEMED und AMPS musste das Sammelgel zügig in den Hohlraum zwischen beide Glasplatten gegossen werden. Anschließend wurde im noch nicht polymerisierten Zustand ein 10- zähniger Kamm eingesetzt. Nach circa 10- 15 Minuten war das Sammelgel polymerisiert.

### 3.13.3 Molekulargewichts- Standards

Um den in der Literatur bekannten kDa - Bereich des jeweiligen Proteins zur Identifizierung zu nutzen, wurden verschiedene Molekulargewichts-Standards für SDS- Page verwandt:

BenchMark™ Protein Ladder (Mat. 83): 15 rekombinante Proteine im Molekulargewichtsbereich von 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 und 220 kDa. Zusätzlich intensivere 20 und 50 kDa Bandendarstellung.

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Mat. 108): Bandendarstellung im Bereich 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130 und 170 kDa. Orangene- Referenz- Bande bei 70 kDa.

Kaleidoscope™ Prestained Standard (Mat. 109): 7 verschieden gefärbte Proteine (Aprotinin, Lysozyme, Soybean trypsin inhibitor, Carbonic anhydrase, BSA, beta- Galactosidase, Myosin). Violett bei 44 kDa.

### **3.13.4 Vorbereitung des Western –Blot**

#### **3.13.4.1 Transferpuffer**

3 Liter werden für 1 Gel gebraucht: 21,6 g Glycin (Mat. 102)  
4,5 g Tris (Mat. 75)  
in 3000 ml Aqua dest. (Mat. 68)

Glycin und Tris wurden mithilfe einer Waage (Mat. 101) genau dosiert und dann in 3000 ml Aqua dest. gegeben. Mittels eines Magnetrührers (Mat. 62, 63) wurde die Lösung gut durchmischt.

#### **3.13.4.2 Blockierungslösung**

Ein 50 ml Falconröhrchen (Mat. 104) mit Schraubkappe wurde zum Ansetzen der Blockierungslösung benutzt. Diese bestand aus 2,5 g handelsüblichem Milchpulver (Mat. 103) und 50 ml 1×TBS (Mat. 105). Beide Substanzen wurden auf einem Rollenmischer (Mat. 107) homogen vermischt.

#### **3.13.4.3 Vorbereitung der PVDF- Membran**

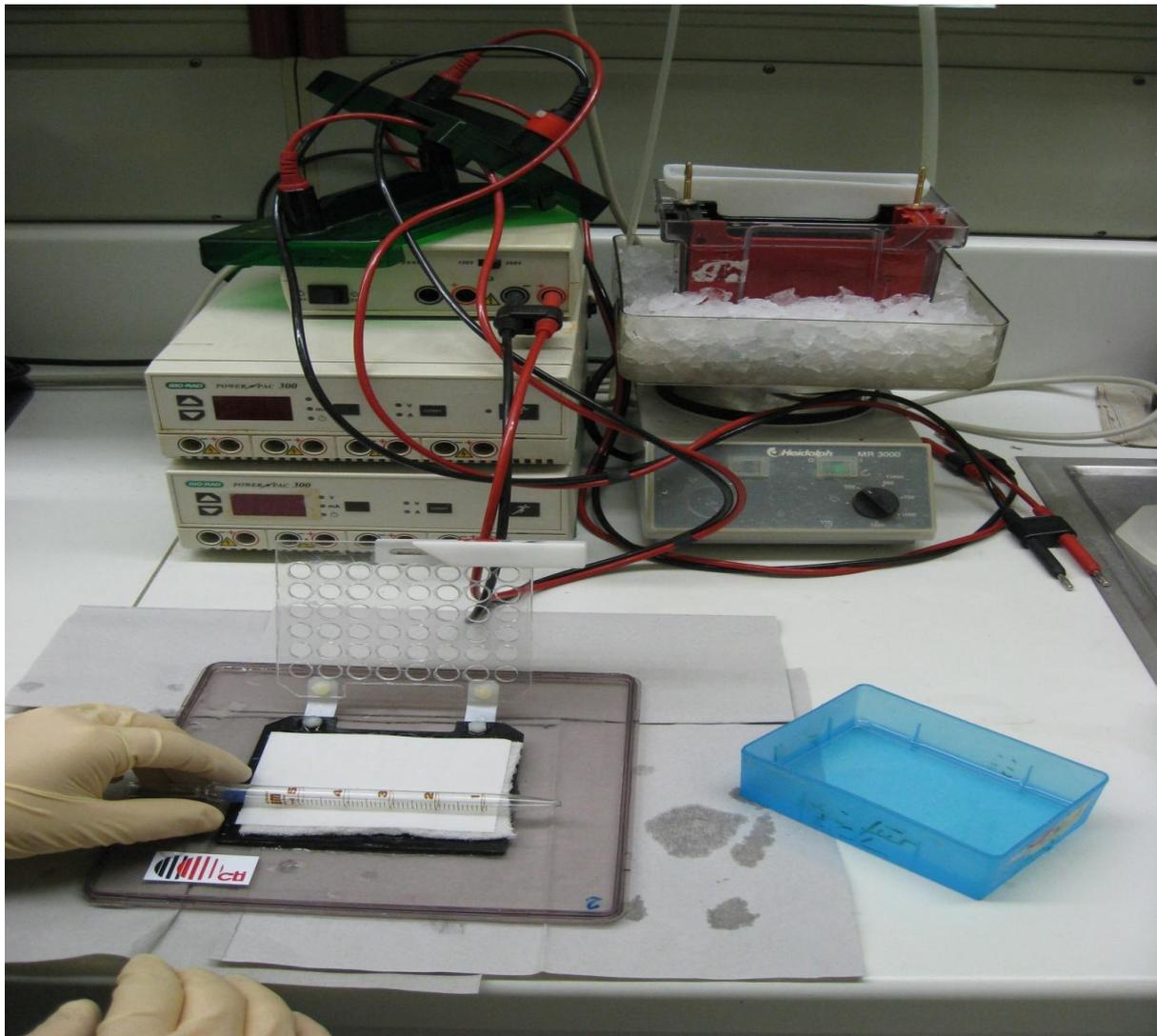
Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden Lineal und Bleistift sorgfältig mit Ethanol (Mat. 88) gereinigt. Die PVDF- Membran (Mat. 123) wurde auf eine Größe von 10×15 cm zugeschnitten. Dies war das Medium, auf das die Proteine transferiert wurden. In gleicher Größe (10×15 cm) wurde Filterpapier (2× 3MM Whatman- Papier) geschnitten. Zur Aktivierung wurde die PVDF -Membran mit 100% igem Methanol (Mat. 121) benetzt und kurz mit Wasser (Aqua dest.) abgespült. Danach wurde die Membran 10 Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Das Filterpapier (Mat. 72) wurde hinzugelegt.

#### **3.13.4.4 Die Blot- Kasette**

In das schwarze, untere Teilstück der Blot- Kasette (Mat. 122) wurden nacheinander ein zuvor in Transferpuffer getränkter Schwamm, getränktes Filterpapier (3 MM Whatmann- Papier) (Mat. 72), das Gel mit links abgetrennter Ecke mit derselben nach rechts, die PVDF-

Membran (Mat. 123) mit rechts ausgeschnittener Ecke und ein zweites getränktes Filterpapier (3 MM Whatmann- Papier) geschichtet.

Die das Blotting verfälschenden Lufteinschlüsse wurden durch mehrfaches Überrollen mit einer Glaspipette (Mat. 73) entfernt. Ein zweiter zuvor in Transferpuffer getränkter Schwamm bildete die letzte Schicht in der Blot- Kassette, bevor jene durch das obere weiße Teilstück verschlossen wurde.



**Abb. 1** Elektrophoreseapparatur (links hinten) mit Blotkammer der Firma Bio-Rad™ auf einem Magnetrührer (rechts hinten). Im Vordergrund die Vorbereitung der Blot- Kassette.

### 3.13.4.5 Western- Blotting

Die in den SDS- Gelen aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf die unmittelbar in der Blotkassette (Mat. 122) darunterliegende PVDF- Membran in einer Blotkammer (Mat. 128) übertragen. Als Übertragungsmedium diente der vorher hergestellte Transferpuffer, mit welchem die Blotkammer befüllt wurde. Bei 400 mA (konstant) sowie 24 V und bei 15° C Temperatur (Mat. 129) unter Rühren, mittels Magnetrührer, wurde 16.27 Stunden über Nacht geblottet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde geprüft, ob die aufgetrennten Proteine des SDS- Gels effektiv auf die PVDF- Membran übertragen wurden.

Dazu wurde die PVDF- Membran auf der Wippe in einem Plastikgefäß 3 Minuten mit Ponceau S (Mat. 124) gefärbt. Anschließend die Membran mit Aqua dest. gewaschen bis die Banden sichtbar waren. Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, der genutzt wird, um Proteine reversibel anzufärben, indem er reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet. Eine Ponceau- S- Färbung ist sehr leicht mit Wasser auszuwaschen, um die Membran für die Immundetektion mit Antikörpern weiterzuverwenden. Das Restgel wurde einer Coomassiefärbung auf der großen Wippe unterzogen. Durch Vergleich der Proteinmuster vor und nach dem Blotten kann auf die Effizienz des Proteintransfers geschlossen werden. Die PVDF- Membran wurde nun in Aqua dest. geschwenkt und mit einem schwarzen Kugelschreiber beschriftet. Jeweils hinter dem aufgebrachten Marker wurde die PVDF-Membran, mit Ethanol gereinigtem Skalpell und Lineal, in Streifen geschnitten. Auf einem PVDF- Streifen befanden sich immer das zu identifizierende Protein und der Marker. Die PVDF- Streifen wurden in Methanol (Mat. 121) wieder aktiviert und anschließend in Aqua dest. gespült. Eine Minute wurden nun die Streifen in 1×TBS (Mat. 105) geschwenkt. Bei Raumtemperatur wurden die PVDF- Streifen in einem Glasgefäß 1 Stunde auf einem sogenannten Roller mit der zuvor vorbereiteten 5%igen Blockierungslösung (50ml) benetzt. Proteinfreie Zonen der PVDF-Membran (Mat. 123) wurden so mit Milchproteinen abgesättigt und verhindert, dass keine Antikörper unspezifisch an die Membranoberfläche binden. Die überschüssige Blockierungslösung wurde nun abgeschüttet und die PVDF- Streifen (Mat. 123) wurden in 1×TBS (Mat. 105) und anschließend in H<sub>2</sub>O (Mat. 68) geschwenkt.

### **3.13.5 Nachweis der spezifischen Proteine**

#### **3.13.5.1 Behandlung mit dem primären Antikörper**

In ein 15 ml Falconröhrchen der Firma Sarstedt (Mat. 125) wurden in 8 ml Blockierungslösung 16 µl des ersten Antikörpers pipettiert und auf dem Roller (Mat. 107) vermischt. Die Verdünnung betrug 1:500. Die PVDF- Streifen (Mat. 123) wurden 1 ½ Stunden auf der Wippe (Mat. 95) mit dem ersten Antikörper benetzt.

Die vorbereitete Antikörperlösung wurde im Eisbad (Mat. 52) während der Versuche kühl aufbewahrt, bevor sie wieder bei -81° C in der Gefriertruhe (Mat. 44) gelagert wurde.

Das Gefäß mit den PVDF- Streifen wurde von der Wippe (Mat. 95) genommen und der erste Antikörper abpipettiert. Die Streifen wurden nun 2x5 Minuten mit 1xTBST (Mat. 106) gewaschen. Das 1xTBST wurde abgegossen. Danach wurde 2x5 Minuten mit 1xTBS (Mat. 105) gewaschen. Dies wurde auch abgegossen. Nicht gebundene Antikörper wurden mit diesen Waschschrinen entfernt.

#### **3.13.5.2 Behandlung mit dem sekundären Antikörper**

In ein 15 ml Sarstedt- Gefäß (Mat. 125) wurden in 8 ml der 5%igen Blockierungslösung 8 µl des sekundären Antikörpers (1:1000) pipettiert und auf dem Roller (Mat. 107) vermischt. Der sekundäre Antikörper ist gegen den primären Antikörper gerichtet und mit dem Enzym Meerrettich- Peroxidase kovalent gekoppelt. Die PVDF- Membran (Mat. 123) wurde 1 ½ Stunden mit dem sekundären Antikörper auf der Wippe (Mat. 95) benetzt. Nach dieser Zeit wurde der zweite Antikörper abpipettiert und 2x5 Minuten mit 1xTBST (Mat. 106) gewaschen. Das TBST wurde jeweils abgegossen. Danach wurde 2x5 Minuten mit TBS (Mat. 105) gewaschen und dieses wieder entfernt.

### 3.13.5.3 Primäre und sekundäre Antikörper zum Nachweis spezifischer Pellikelproteine

**Tab. 3: Nachweisprotokoll für das Protein  $\alpha$ -Amylase**

$\alpha$ - Amylase					
	12,5 ng $\alpha$ - Amylase	25 ng $\alpha$ - Amylase	50 ng $\alpha$ - Amylase	26 $\mu$ l Probe	2 $\mu$ l Bench Marker™
Erster Antikörper	Verdünnung anti- Amylase (1/500)				
Zweiter Antikörper	Verdünnung anti- sheep (1/1000)				

2  $\mu$ l Bench Marker™ (Mat. 83) wurde als Referenz in der letzten Spur eingebracht. In den ersten 3 Spuren wurde das Protein  $\alpha$ - Amylase in gestaffelter Menge eingebracht (12,5 ng, 25 ng, 50 ng). In die nachfolgende Spur wurden 26  $\mu$ l der Probe pipettiert. Als erster Antikörper wurde anti- Amylase in der Verdünnung von 1/500 verwandt, danach der zweite Antikörper anti- sheep in der Verdünnung 1/1000.

**Tab. 4: Nachweisprotokoll für das Protein Lysozym**

Lysozym					
	12,5ng Lysozym	25ng Lysozym	50ng Lysozym	26 $\mu$ l Probe	2 $\mu$ l Bench Marker™
Erster Antikörper	anti- Lysozyme Verdünnung (1/500)				
Zweiter Antikörper	anti- sheep Verdünnung (1/1000)				

2  $\mu$ l Bench Marker™ (Mat. 83) wurde als Referenz in die letzte Spur gegeben. In den ersten 3 Spuren wurde das Protein Lysozym (Tab. 4) in gestaffelter Menge eingebracht (12,5 ng, 25 ng, 50 ng). An vierter Stelle wurden 26  $\mu$ l der Probe pipettiert. Als erster Antikörper wurde anti- Lysozyme in der Verdünnung 1/500 verwandt. Danach der zweite Antikörper anti- sheep in der Verdünnung 1/1000.

**Tab. 5: Nachweisprotokoll für das Protein Laktoferrin**

Laktoferrin					
	12,5ng Laktoferrin	25ng Laktoferrin	50ng Laktoferrin	26µl Probe	2µl Bench Marker™
Erster Antikörper	anti- Laktoferrin (1/500)				
Zweiter Antikörper	anti- sheep (1/1000)				

2 µl Bench Marker™ (Mat. 83) wurde als Referenz in die letzte Spur gegeben. In den ersten 3 Spuren wurde das Protein Laktoferrin (Tab. 5) in gestaffelter Menge eingebracht (12,5 ng, 25 ng, 50 ng). An vierter Stelle wurden 26 µl der Probe pipettiert. Als erster Antikörper wurde Laktoferrin in der Verdünnung 1/500 verwandt, danach der zweite Antikörper anti- sheep in der Verdünnung 1/1000.

**Tab. 6: Nachweisprotokoll für das Protein Laktoferrin**

Laktoferrin			
	25 ng Laktoferrin	52 µl Probe	4 µl Page Ruler™
Erster Antikörper	anti- Laktoferrin (1/500)		
Zweiter Antikörper	anti- sheep (1/1000)		

Als Referenz wurde der Molekulargewichtsstandard Page Ruler™ (4 µl) (Mat. 108) benutzt. 25 ng des Proteins Laktoferrin (Tab. 6) in der ersten Spur aufgetragen und 52 µl der Probe in der zweiten Spur. Als erster Antikörper wurde anti- Laktoferrin in der Verdünnung 1/500 verwandt, danach der zweite Antikörper anti- sheep in der Verdünnung 1/1000.

**Tab. 7: Nachweisprotokoll für das Protein Carboanhydrase I**

Carboanhydrase I		
	26 µl Probe	4 µl Kaleidoscop-Marker™
Erster Antikörper	anti- Carboanhydrase I (1/500)	
Zweiter Antikörper	anti- sheep (1/1000)	

Als Referenz wurde der Molekulargewichtsstandard Kaleidoscop- Marker™ (4 µl) (Mat. 109) benutzt. Carboanhydrase I (Tab. 7) lag nicht als Protein vor, ist aber ein Protein des Molekulargewichtsstandard Kaleidoscop- Marker™. 26 µl der Probe wurden in der ersten Spur aufgetragen. Als erster Antikörper wurde anti- Carboanhydrase I in der Verdünnung 1/500 verwandt, danach der zweite Antikörper anti- sheep in der Verdünnung 1/1000.

**Tab. 8: Nachweisprotokoll für das Protein Carboanhydrase II**

Carboanhydrase II			
	50 ng Carboanhydrase II	26 µl Probe	4 µl Page- Ruler™
Erster Antikörper	anti- Carboanhydrase II (1/500)		
Zweiter Antikörper	anti- sheep (1/1000)		

Als Referenz wurde der Molekulargewichtsstandard Page- Ruler™ (4 µl) (Mat. 108) benutzt. 50 ng des Protein Carboanhydrase II (Tab. 8) wurden in der ersten Spur aufgetragen und 26 µl der Probe in der zweiten Spur. Als erster Antikörper wurde anti- Carboanhydrase II in der Verdünnung 1/500 verwandt, danach als zweiter Antikörper anti- sheep in der Verdünnung 1/1000.

**Tab. 9: Nachweisprotokoll für das Protein IgA**

IgA		
	26 µl Probe	3 µl Page- Ruler™
Erster Antikörper	anti- IgA (1/500)	

Als Referenz wurde der Molekulargewichtsstandard Page- Ruler™ (3 µl) (Mat. 108) benutzt. 26 µl der Probe wurden in der ersten Spur aufgetragen. Als erster Antikörper wurde anti- IgA in der Verdünnung 1/500 verwandt.

**Tab. 10: Nachweisprotokoll für das Protein Glykosyltransferase B**

Glykosyltransferase B			
	3 µl Page Ruler™	26 µl Probe	3 µl Page Ruler™
Erster Antikörper	anti- GTFB (1/500)		
Zweiter Antikörper	anti- rabbit (1/1000)		

Als Referenz wurde in der ersten und dritten Spur der Molekulargewichtsstandard Page- Ruler™ (3 µl) (Mat. 108) benutzt. 26 µl der Probe wurden in der zweiten Spur aufgetragen. Als erster Antikörper wurde anti- GTFB in der Verdünnung 1/500 verwandt, danach als zweiter Antikörper anti- rabbit in der Verdünnung 1/1000.

**Tab. 11: Nachweisprotokoll für das Protein Glykosyltransferase C**

Glykosyltransferase C			
	3 µl Page Ruler™	26 µl Probe	3 µl Page Ruler™
Erster Antikörper	anti- GTFC (1/500)		
Zweiter Antikörper	anti- rabbit (1/1000)		

Als Referenz wurde in der ersten und dritten Spur der Molekulargewichtsstandard Page- Ruler™ (3 µl) (Mat. 108) benutzt. 26 µl der Probe wurden in der zweiten Spur aufgetragen. Als erster Antikörper wurde anti- GTFC in der Verdünnung 1/500 verwandt, danach als zweiter Antikörper anti- rabbit in der Verdünnung 1/1000.

**Tab. 12: Nachweisprotokoll für das Protein Glykosyltransferase D**

Glykosyltransferase D			
	3 µl Page Ruler™	26 µl Probe	3 µl Page Ruler™
Erster Antikörper	anti- GTFD (1/500)		
Zweiter Antikörper	anti- rabbit (1/1000)		

Als Referenz wurde in der ersten und dritten Spur der Molekulargewichtsstandard Page-Ruler™ (3 µl) (Mat. 108) benutzt. 26 µl der Probe wurden in der zweiten Spur aufgetragen. Als erster Antikörper wurde anti- GTFD in der Verdünnung 1/500 verwandt, danach als zweiter Antikörper anti- rabbit in der Verdünnung 1/1000.

**Tab. 13: Nachweisprotokoll der Prolinreichen Proteine**

Prolinreiche Proteine		
	26 µl Probe	4 µl Page -Ruler™
Erster Antikörper	anti- PRP (1/500)	
Zweiter Antikörper	anti- goat (1/1000)	

Als Referenz wurde der Molekulargewichtsstandard Page- Ruler™ (4 µl) (Mat. 108) benutzt. 26 µl der Probe wurde in der ersten Spur aufgetragen. Als erster Antikörper wurde anti- PRP in der Verdünnung 1/500 verwandt, danach der zweite Antikörper anti- goat in der Verdünnung 1/1000.

**Tab. 14: Nachweisprotokoll für das Protein Mucin I**

Mucin I			
	500 ng Muzin I	26 µl Probe	4 µl Page- Ruler™
Erster Antikörper	anti- Mucin I (1/500)		
Zweiter Antikörper	anti-mouse (1/1000)		

Als Referenz wurde der Molekulargewichtsstandard Page- Ruler™ (4 µl) (Mat. 108) benutzt. 500 ng des Protein Muzin I (Tab. 14) wurden in der ersten Spur aufgetragen und 26 µl der Probe in der zweiten Spur. Als erster Antikörper wurde anti- Mucin I in der Verdünnung 1/500 verwandt, danach der zweite Antikörper anti- mouse in der Verdünnung 1/1000.

Der Western- Blot wurde anfänglich mit 15%igen High-Tris Gelen durchgeführt. Aus Gründen der Zeitersparnis, der besseren Handhabung und der Tatsache, dass Mucin I über 220 kDa liegt und dadurch nicht mehr in das 15%ige High-Tris Gel einläuft, wurde mit 10%igen Biorad-Gelen weitergearbeitet.

#### **3.13.5.4 Bepackung**

Vorher geschnittenes Filterpapier (Mat. 72) wurde auf der untenliegenden Innenseite der Hyperkassette™ Amersham Biosciences (Mat. 131) mit Klebestreifen beidseitig fixiert. Eine doppelt gelegte Folie wurde auf das Filterpapier gelegt und linksseitig mit Klebestreifen fixiert.

#### **3.13.5.5 Entwicklung**

Um visuelle Ergebnisse zu erzielen, wurden 2x2,56 ml Amersham™ ECL™ (Mat. 132) im Verhältnis 1:1 gemischt. Die PVDF- Membran (Mat. 123) wurde darin 1 Minute geschwenkt, zwischen die doppelte Folie in die Hyperkassette™ (Mat. 131) gelegt und verschlossen. Mit Hyperfilm™ ECL (Mat. 130), der Hyperkassette™ mit innenliegender PVDF- Membran, einer Stoppuhr und einer Schere vorbereitet wurde in einer Dunkelkammer weitergearbeitet. Die Hälfte des Hyperfilm™ genügte um die PVDF- Membran komplett zu erfassen. Dieser wurde auf die PVDF- Membran gelegt, die Hyperkassette™ zügig verschlossen, nach gewünschter Expositionszeit der Film aus der Hyperkassette™ entnommen und in der Tischentwicklungsmaschine (Mat. 133) entwickelt. Um gute Ergebnisse zu erzielen, wurden verschiedene Belichtungszeiten ausgetestet. Angefangen von 15 Sekunden bis mehrere Minuten.

## 4. Ergebnisse

In dieser Studie wurde die Proteinadsorption auf 10 unterschiedlichen Werkstoffen untersucht. Die Proben wurden von 6 Probanden über Zeiträume von 1-, 3- und 30 Minuten intraoral an zwei Lokalisationen (bukkal / lingual) getragen. Nach Abgewinnung der Pellikelproteine wurden diese gepoolt, aufbereitet und elektrophoretisch aufgetrennt.

### 4.1 Bandenverteilung auf den verschiedenen Werkstoffen

Auf den 18 hergestellten High- Tris Gelen konnten nach erfolgter Silberfärbung bis zu 41 Banden festgestellt werden. In dem Bereich unter 15 kDa zeigten sich dicke, stark gefärbte Banden. Über 80- 220 kDa zeigten sich dünne, schwach gefärbte Banden. Zwischen 50- 80 kDa zeigten sich viele eng zusammenliegenden Banden, die meist intensiv gefärbt waren. Häufig fiel bei den Gelen eine stärkere Färbung der Laufspur der Werkstoffe Kunststoff, Titan, Amalgam, Komposit und Keramik auf. Die Werkstoffe Schmelz, Glas, Gold und Teflon zeigten meist schwächer gefärbte Laufspuren. Betrachtet man das einzelne Gel, so finden sich kleine Unterschiede in der Bandenverteilung auf den einzelnen Werkstoffen. Insgesamt betrachtet zeigt sich jedoch eine sehr hohe Uniformität der Proteinadsorption auf allen untersuchten Werkstoffen (Diag.1-6; Abb. 2-4).

#### 4.1.1 Durchschnittliche bukkale Bandenzahl nach 1-, 3- und 30 Minuten

Die durchschnittliche bukkale Bandenzahl nach 1-, 3- und 30 Minuten auf allen untersuchten Werkstoffen stellte sich recht homogen dar. Kunststoff hatte nach 30 Minuten mit durchschnittlichen 31,67 Banden die größte Bandenmenge. Bei den Werkstoffen Gold-, Keramik-, Teflon-, Kunststoff-, Schmelz- und Titan wurden nach 1 Minute durchschnittlich 1- 3 Banden mehr gefunden als nach 3 Minuten. Mit Ausnahme des Werkstoffes Gold fanden sich durchschnittlich nach 30 Minuten immer die meisten Banden (Diag. 1).

#### 4.1.2 Durchschnittliche linguale Bandenzahl nach 1-, 3- und 30 Minuten

Die durchschnittliche linguale Bandenzahl zeigt mit Ausnahme von GIZ und Amalgam nach 30 Minuten die meisten Banden. Auch hier sind bei den Werkstoffen Keramik-, Teflon-,

Schmelz-, Titan-, Glas-, Komposit-, GIZ- und Amalgam nach 3 Minuten durchschnittlich 1-3 Banden weniger als nach einer Minute zu verzeichnen. Kunststoff hat mit 31,17 durchschnittlichen Banden die meisten Banden nach 30 Minuten. Mit durchschnittlich 30,17 Banden bei Teflon und 30 Banden bei Titan wurden bei Kunststoff-, Teflon-, und Titan lingual nach 30 Minuten durchschnittlich bis zu 6 Banden mehr als bei den restlichen Werkstoffen festgestellt. Amalgam wies mit durchschnittlich 24,33 Banden die geringste Bandenanzahl lingual nach 30 Minuten auf (Diag. 2).

#### **4.1.3 Durchschnittliche Bandenzahl nach 1 Minute bukkal/lingual**

Kunststoff hatte mit durchschnittlich 28,50 Banden bukkal und 28,67 Banden lingual die größte Bandenanzahl. Gold mit durchschnittlich 24,83 Banden bukkal und 24,67 Banden lingual die geringste Bandenanzahl. Schmelz zeigte mit 24,83 ebenso weniger bukkale Banden wie Gold. Es zeigten sich keine auffälligen Unterschiede in der Bandenverteilung zwischen den Werkstoffen, lediglich feine Tendenzen (Diag. 7).

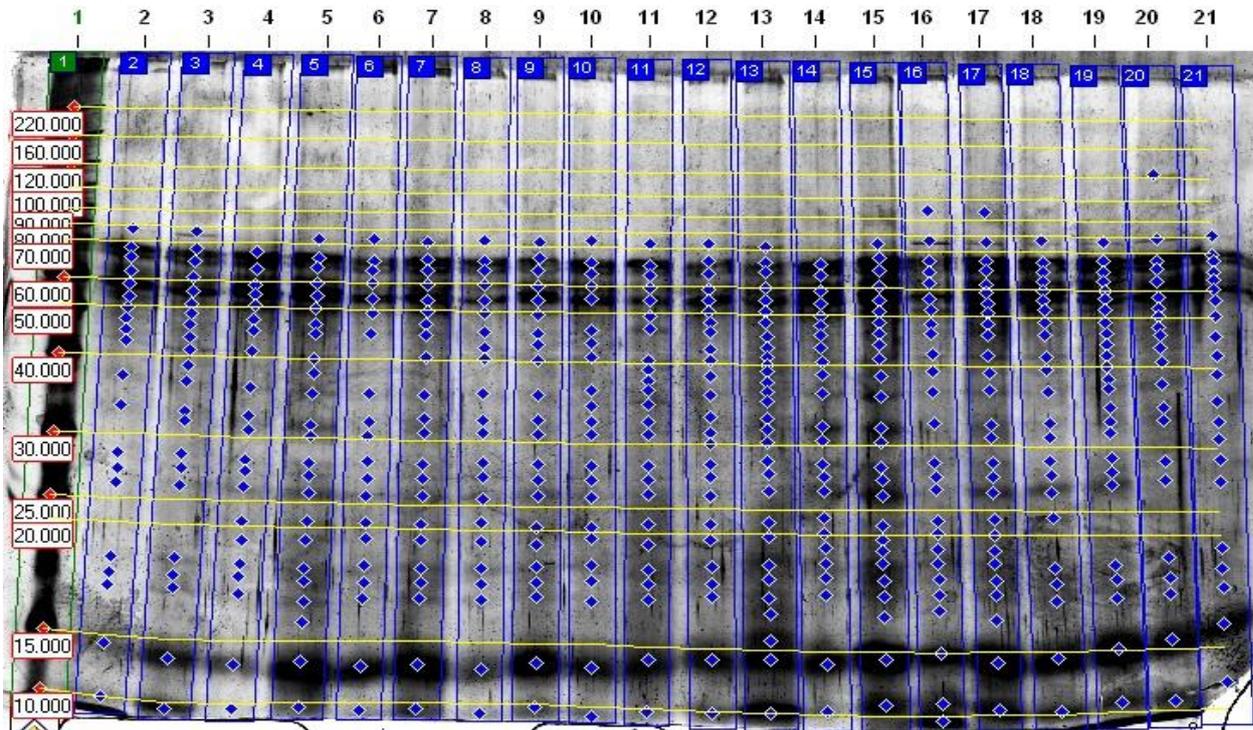
#### **4.1.4 Durchschnittliche Bandenzahl nach 3 Minuten bukkal/lingual**

Die größte Menge an Banden wies nach durchschnittlich 3 Minuten lingual Kunststoff mit 29,83 Banden auf. Schmelz hatte mit 22,67 Banden bukkal und 23 Banden lingual eine sehr geringe durchschnittliche Bandenanzahl. Mit 22,50 durchschnittlichen Banden zeigte Amalgam lingual die geringste Bandenanzahl. Ansonsten zeigte sich ein homogenes Bild in der Bandenverteilung. 7,33 durchschnittliche Banden betrug der Unterschied von der geringsten Anzahl an Banden bis zur größten Anzahl an Banden (Diag. 8).

#### **4.1.5 Durchschnittliche Bandenzahl nach 30 Minuten bukkal/lingual**

Insgesamt mehr Banden konnten nach durchschnittlich 30 Minuten bukkal und lingual festgestellt werden. Aber auch hier konnten bei dem Werkstoff Kunststoff die meisten Banden gefunden werden. Dies waren bukkal 31,67 Banden und lingual 31,17 Banden. Mit durchschnittlich 24,17 Banden hatte Gold gefolgt von Amalgam mit 24,33 Banden die geringste Bandenanzahl (Diag. 9).

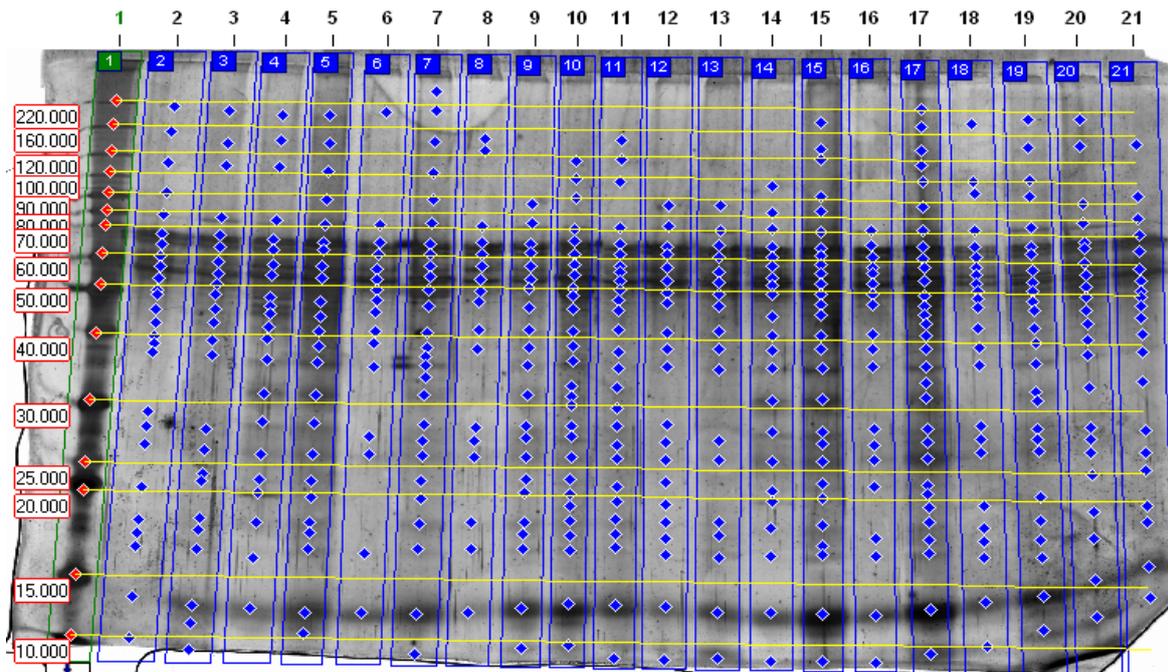
Die Abbildungen 2, 3 und 4 zeigen exemplarisch typische Gele zu den verschiedenen Expositionszeiten von 1-, 3- und 30 Minuten.



**Abb. 2: Elektrophoretische Auftrennung von 1min- Pellikelproben**

**Legende (Laufspuren 1 bis 21):**

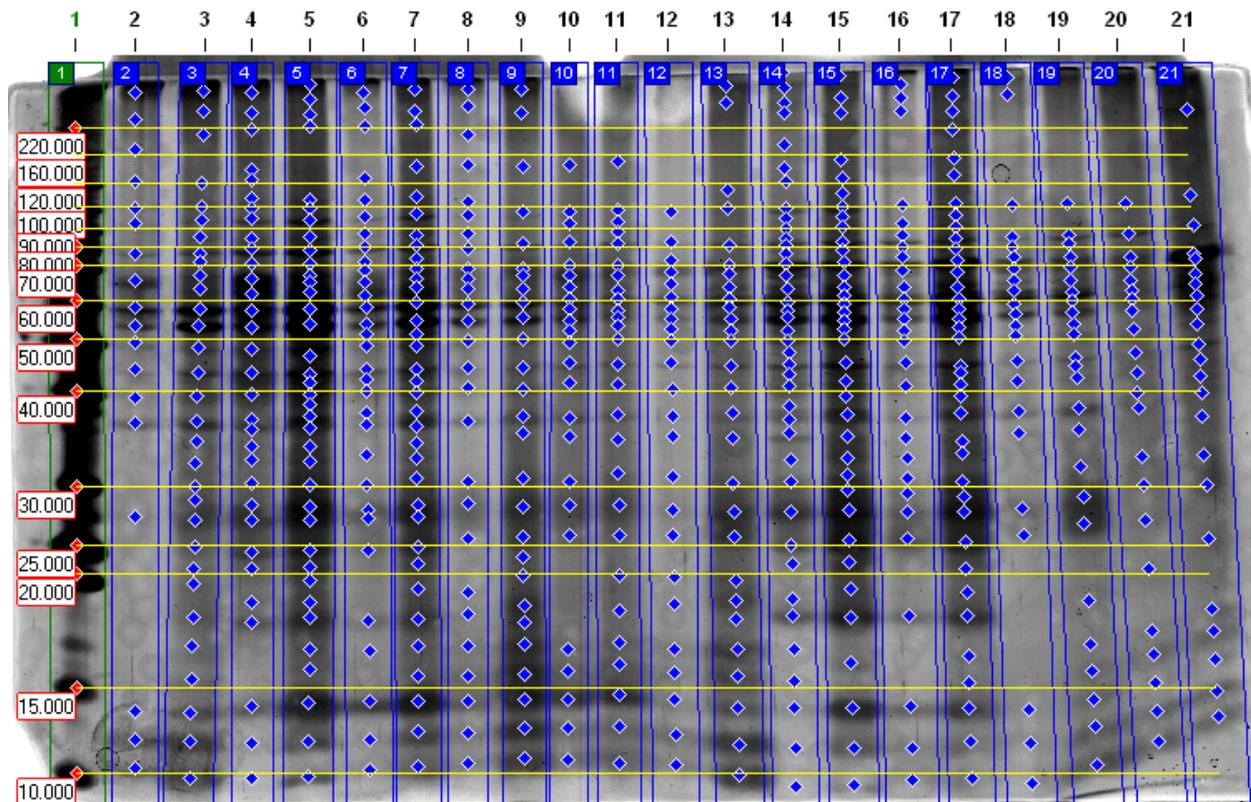
- 1: Bench-Marker™ 10 bis 220 kDa
- 2: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Gold**prüfkörpern
- 3: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 4: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 5: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 6: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 7: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Titan**prüfkörpern
- 8: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Glas**prüfkörpern
- 9: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 10: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Glasionomerzement**prüfkörper
- 11: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Amalgam**prüfkörpern
- 12: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Gold**prüfkörpern
- 13: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 14: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 15: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 16: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 17: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Titan**prüfkörpern
- 18: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Glas**prüfkörpern
- 19: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 20: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Glasionomerzement**prüfkörpern
- 21: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Amalgam**prüfkörpern



**Abb. 3: Elektrophoretische Auftrennung von 3 min- Pellikelproben**

**Legende (Laufspuren 1 bis 21):**

- 1: Bench-Marker™ 10 bis 220 kDa
- 2: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Gold**prüfkörpern
- 3: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 4: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 5: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 6: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 7: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Titan**prüfkörpern
- 8: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Glas**prüfkörpern
- 9: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 10: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Glasionomerzement**prüfkörper
- 11: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Amalgam**prüfkörpern
- 12: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Gold**prüfkörpern
- 13: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 14: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 15: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 16: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 17: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Titan**prüfkörpern
- 18: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Glas**prüfkörpern
- 19: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 20: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Glasionomerzement**prüfkörpern
- 21: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Amalgam**prüfkörpern



**Abb. 4: Elektrophoretische Auftrennung von 30 min- Pellikelproben**

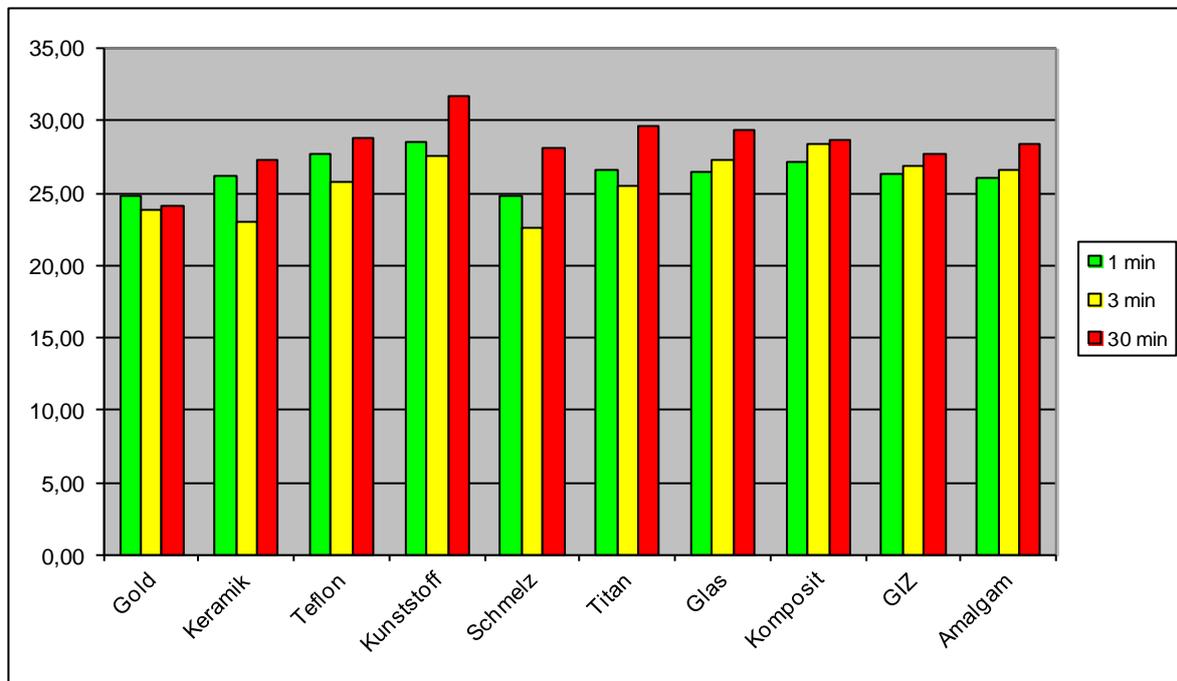
**Legende (Laufspuren 1 bis 21):**

- 1: Bench-Marker™ 10 bis 220 kDa
- 2: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Gold**prüfkörpern
- 3: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 4: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 5: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 6: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 7: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Titan**prüfkörpern
- 8: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Glas**prüfkörpern
- 9: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 10: Bandenmuster der Pellikelproben von **bukkal** getragenen **Glasionomerzement**prüfkörper
- 11: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Amalgam**prüfkörpern
- 12: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Gold**prüfkörpern
- 13: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 14: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 15: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 16: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 17: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Titan**prüfkörpern
- 18: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Glas**prüfkörpern
- 19: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 20: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Glasionomerzement**prüfkörpern
- 21: Bandenmuster der Pellikelproben von **lingual** getragenen **Amalgam**prüfkörpern

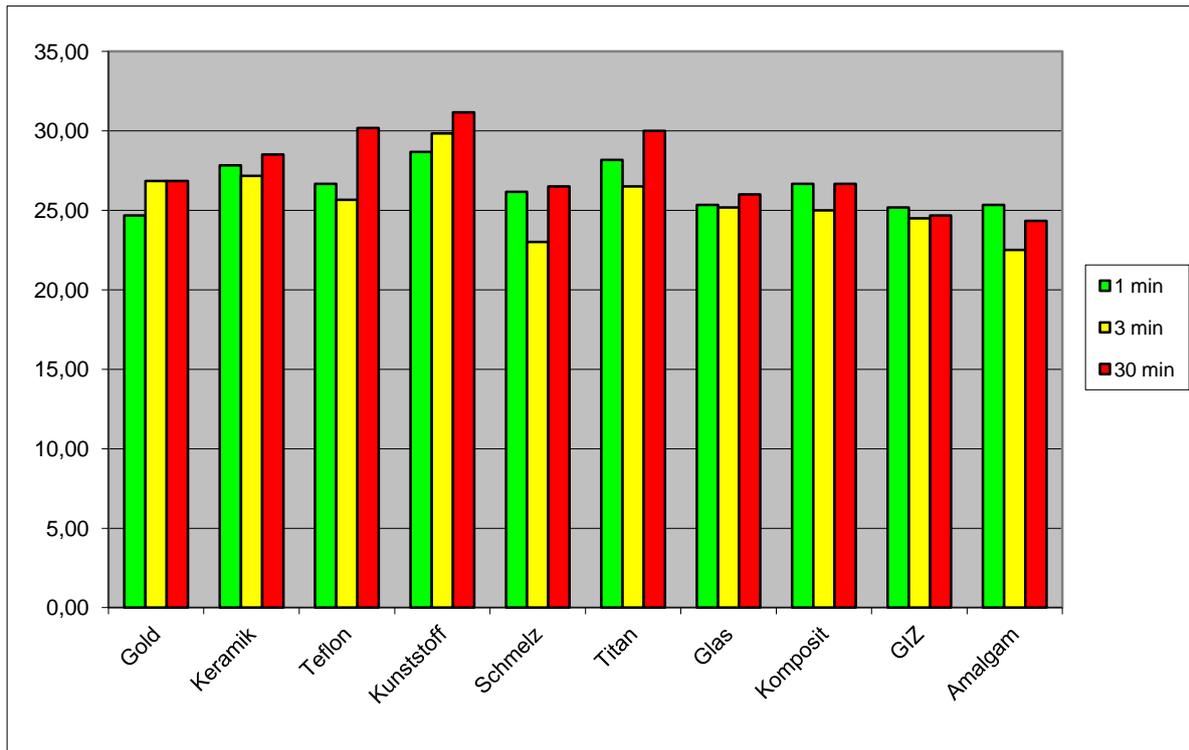
## 4.2 Molekulargewichtsbereich der untersuchten Gele

Der Molekulargewichtsbereich der Proteinbanden in allen untersuchten Gele erstreckte sich von 2,9 kDa bis 348,5 kDa. Die zugeordneten Bandenwerte unter 10 kDa und über 220 kDa, also Werte außerhalb des aufgetragenen Markers, sind aufgrund der exponentiellen Stauchung nur als Annäherungswerte zu betrachten.

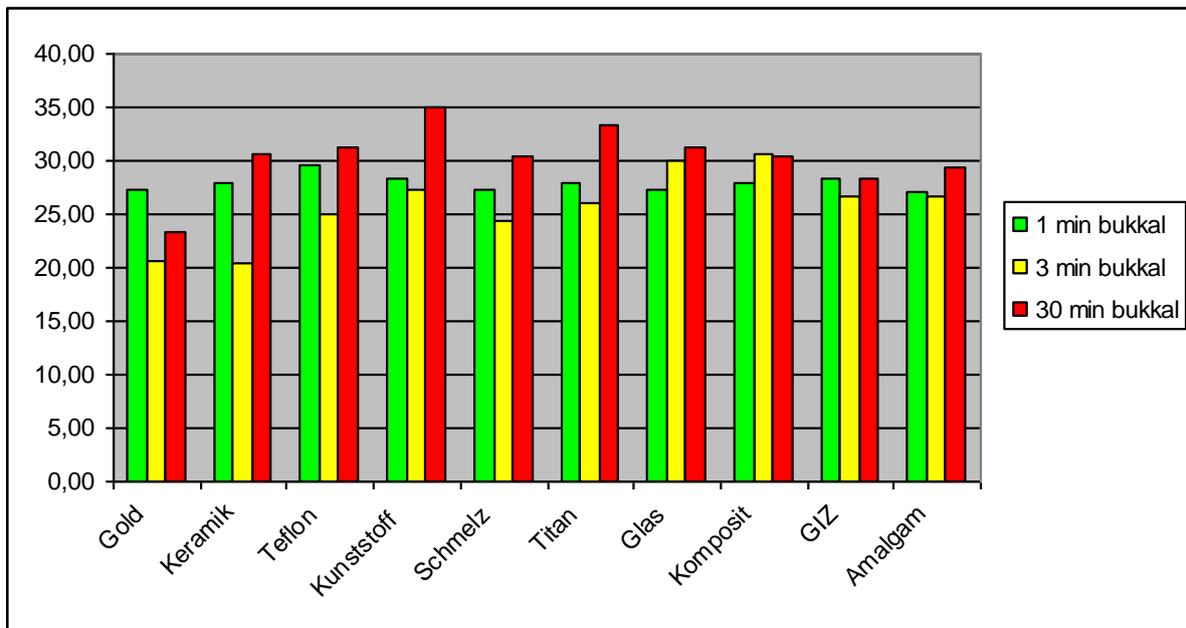
Insgesamt zeigte sich ein sehr homogenes Bild hinsichtlich der Molekulargewichte in Abhängigkeit von den untersuchten Faktoren Zeit, Werkstoff, Lokalisation und Proband (Abb. 2-4; Diag. 10-13).



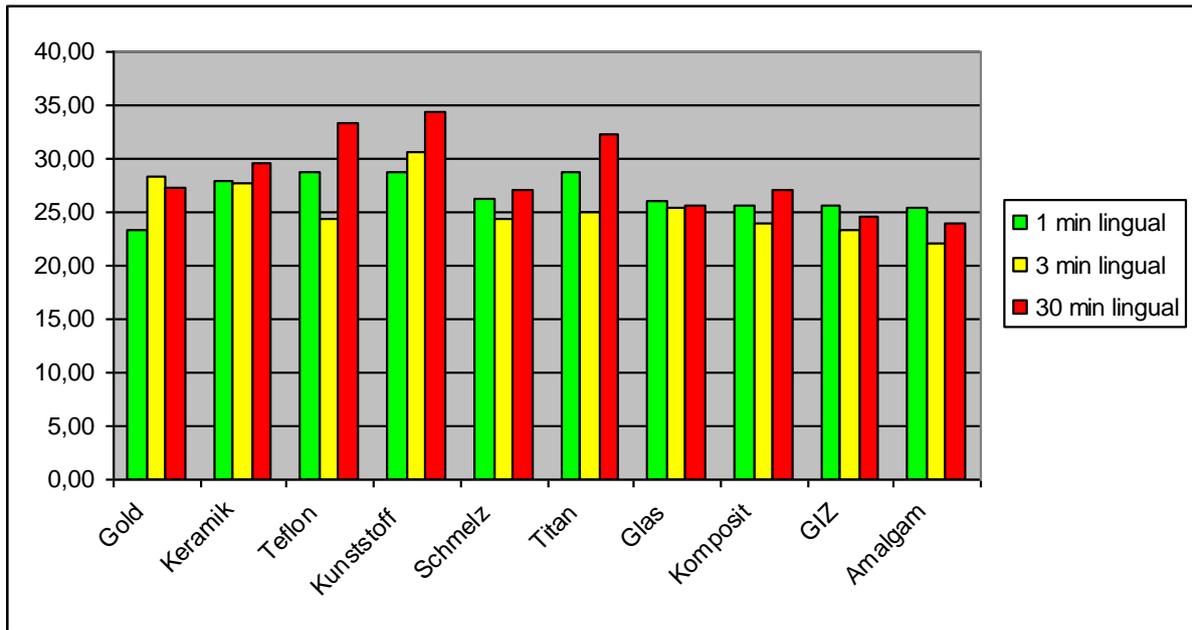
Diag. 1: Durchschnittliche Bandenzahlen in den bukkalen Pellikelproben



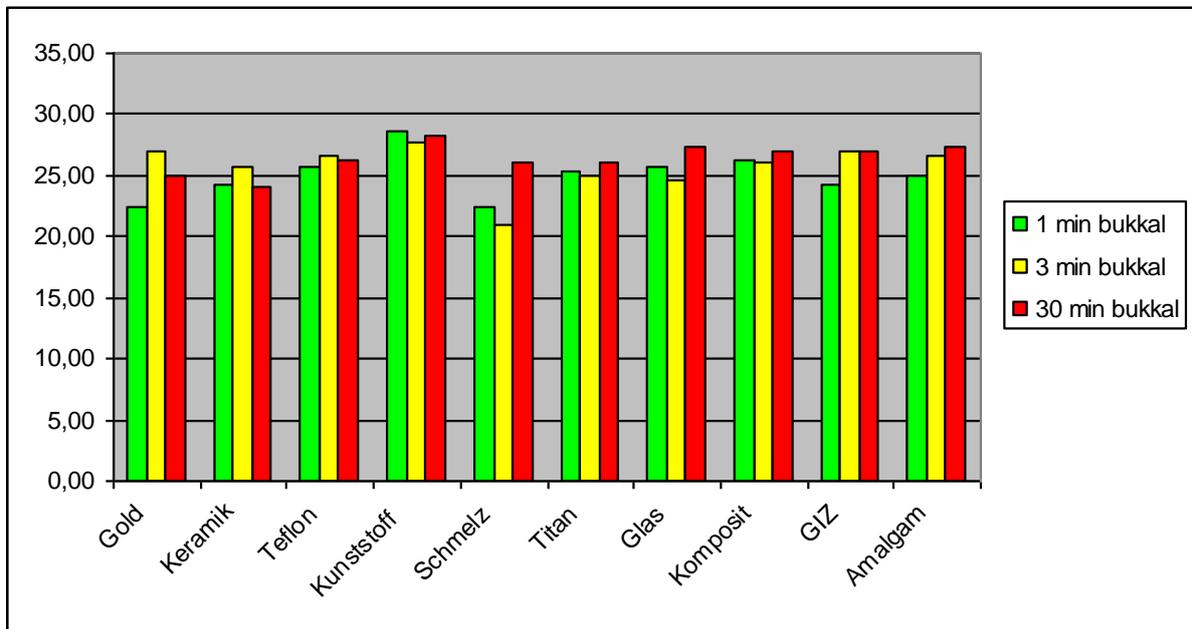
**Diag. 2: Durchschnittliche Bandenzahlen in den lingualen Pellikelproben**



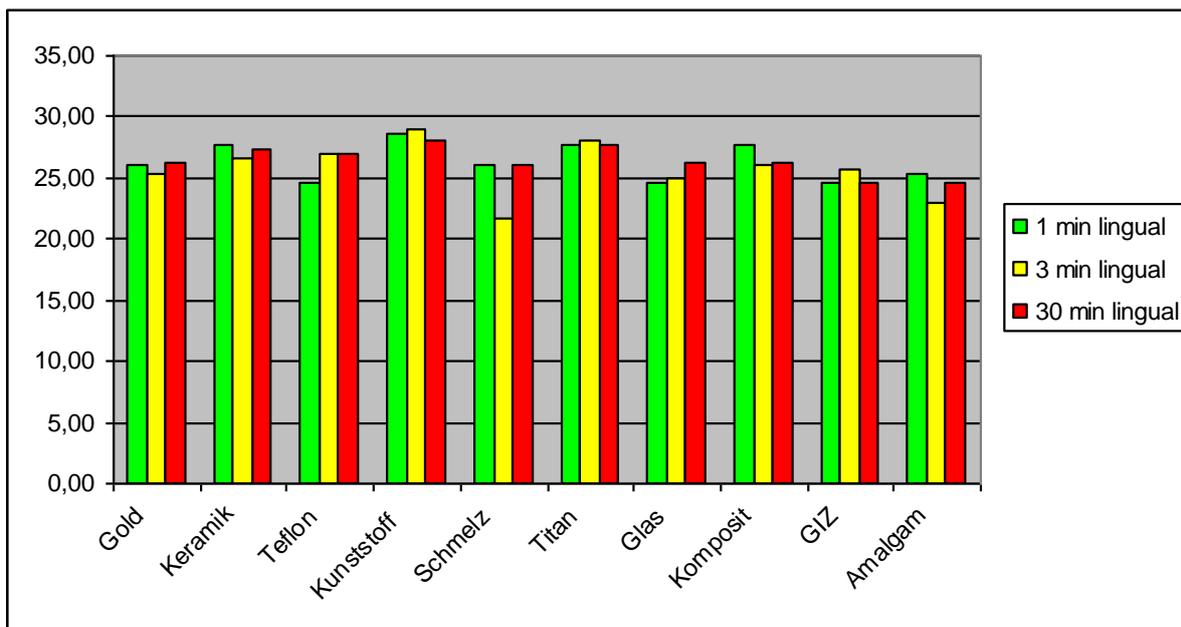
**Diag. 3: Durchschnittliche Bandenzahlen in den bukkalen Pellikelproben der weiblichen Probanden**



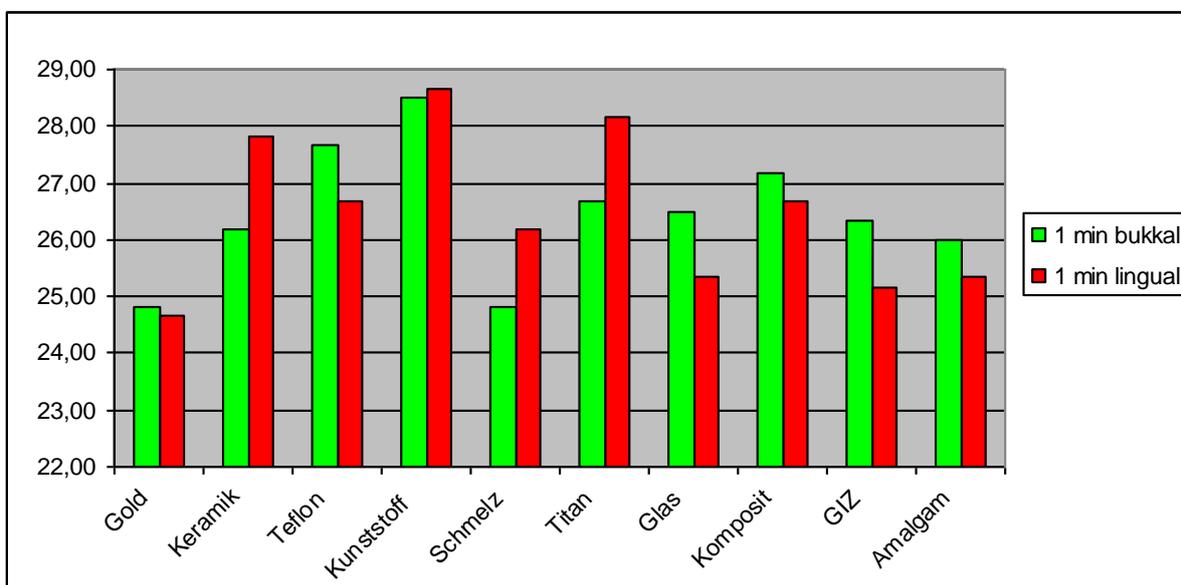
**Diag. 4: Durchschnittliche Bandenzahlen in den lingualen Pellikelproben der weiblichen Probanden**



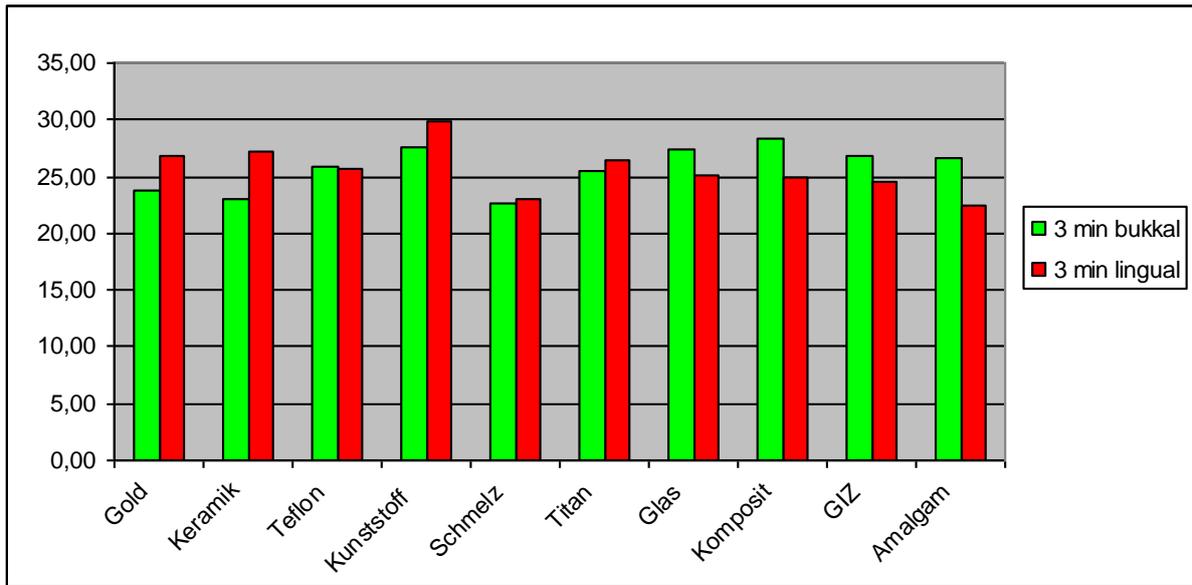
**Diag. 5: Durchschnittliche Bandenzahlen in den bukkalen Pellikelproben der männlichen Probanden**



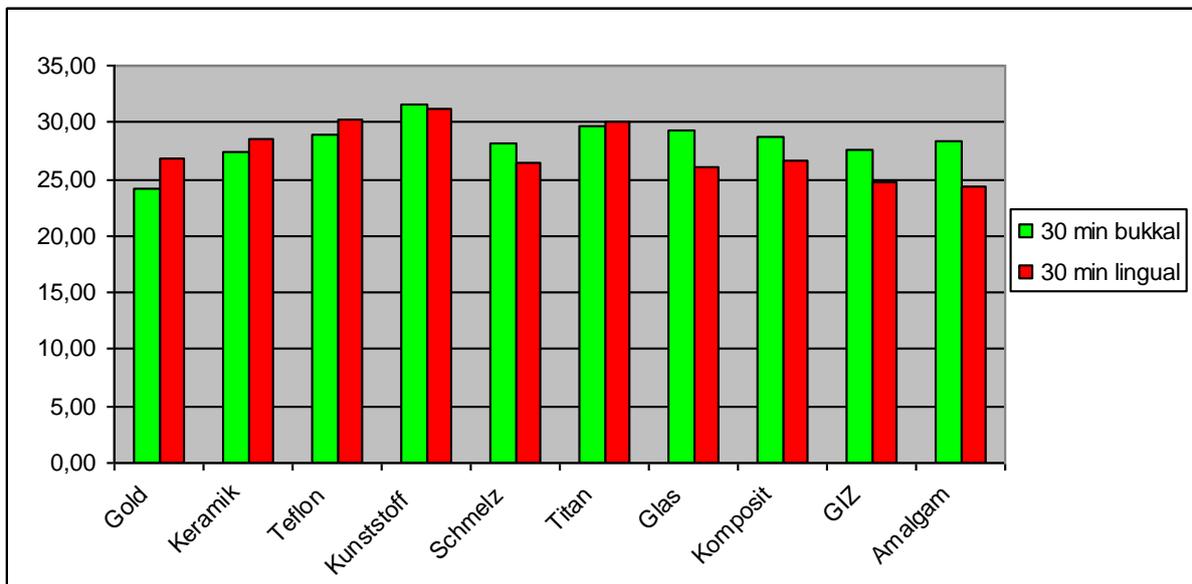
**Diag. 6: Durchschnittliche Bandenzahl in den lingualen Pellikelproben der männlichen Probanden**



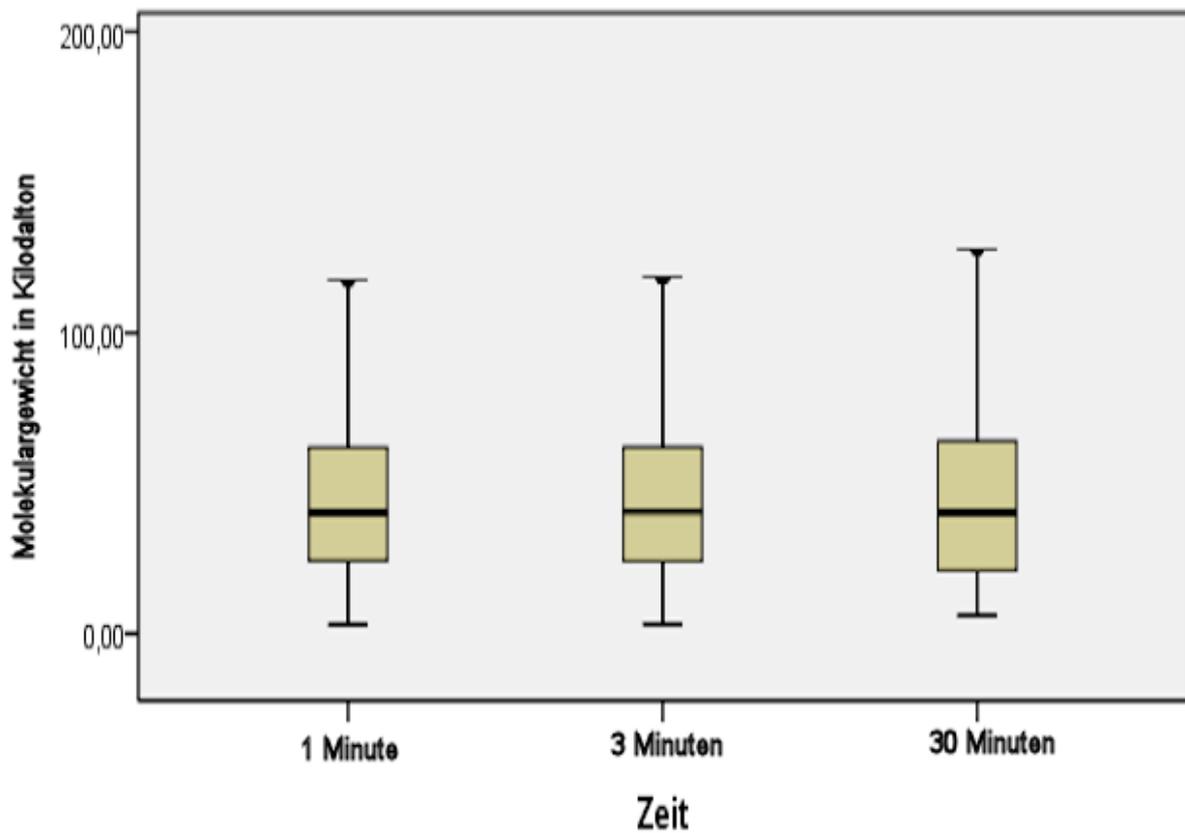
**Diag. 7: Durchschnittliche Bandenzahl nach 1- minütiger Pellikelbildungszeit für die lingualen und bukkalen Pellikelproben aller 6 Probanden auf den verschiedenen Materialien.**



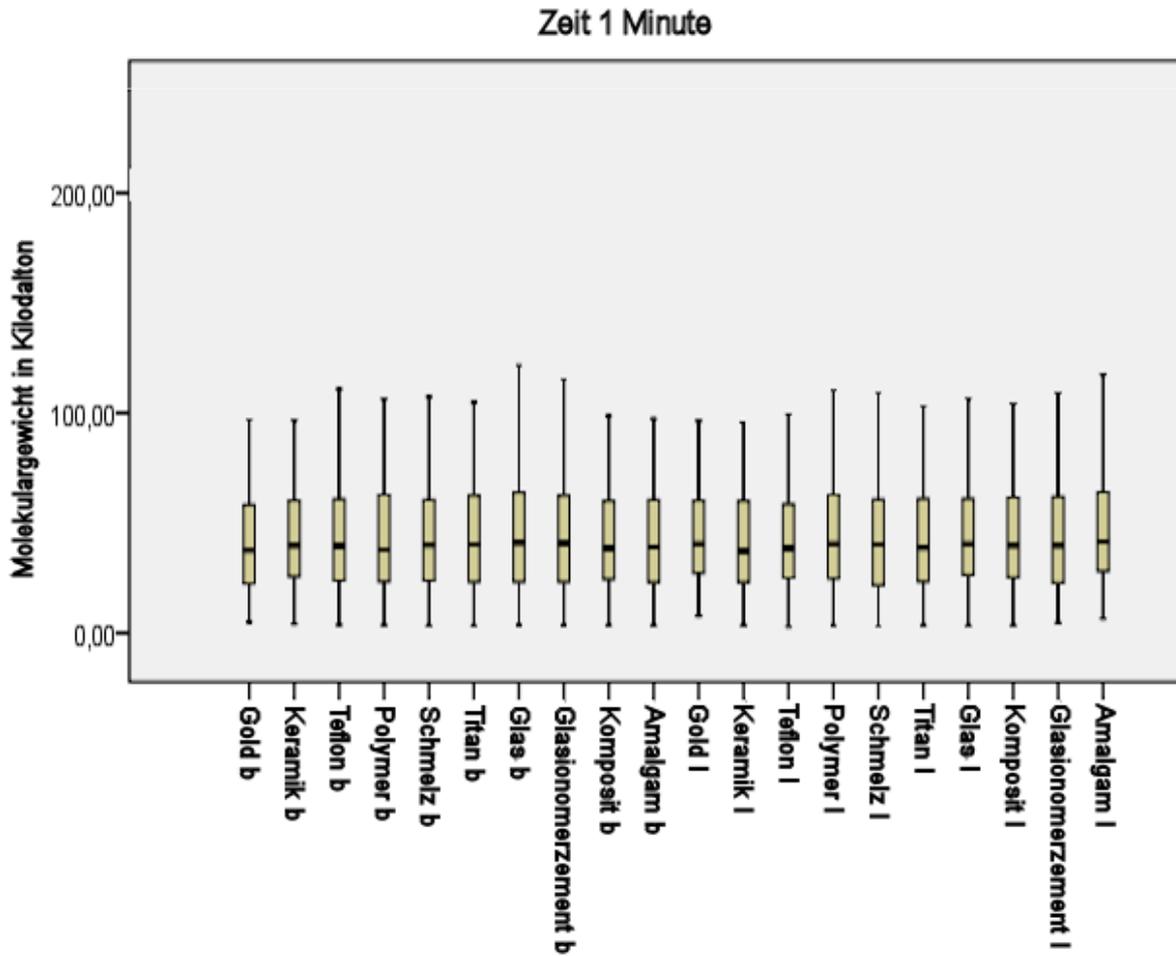
**Diag. 8: Durchschnittliche Bandenzahl nach 3- minütiger Pellicelbildungszeit für die lingualen und bukkalen Pellicelproben aller 6 Probanden auf den verschiedenen Materialien.**



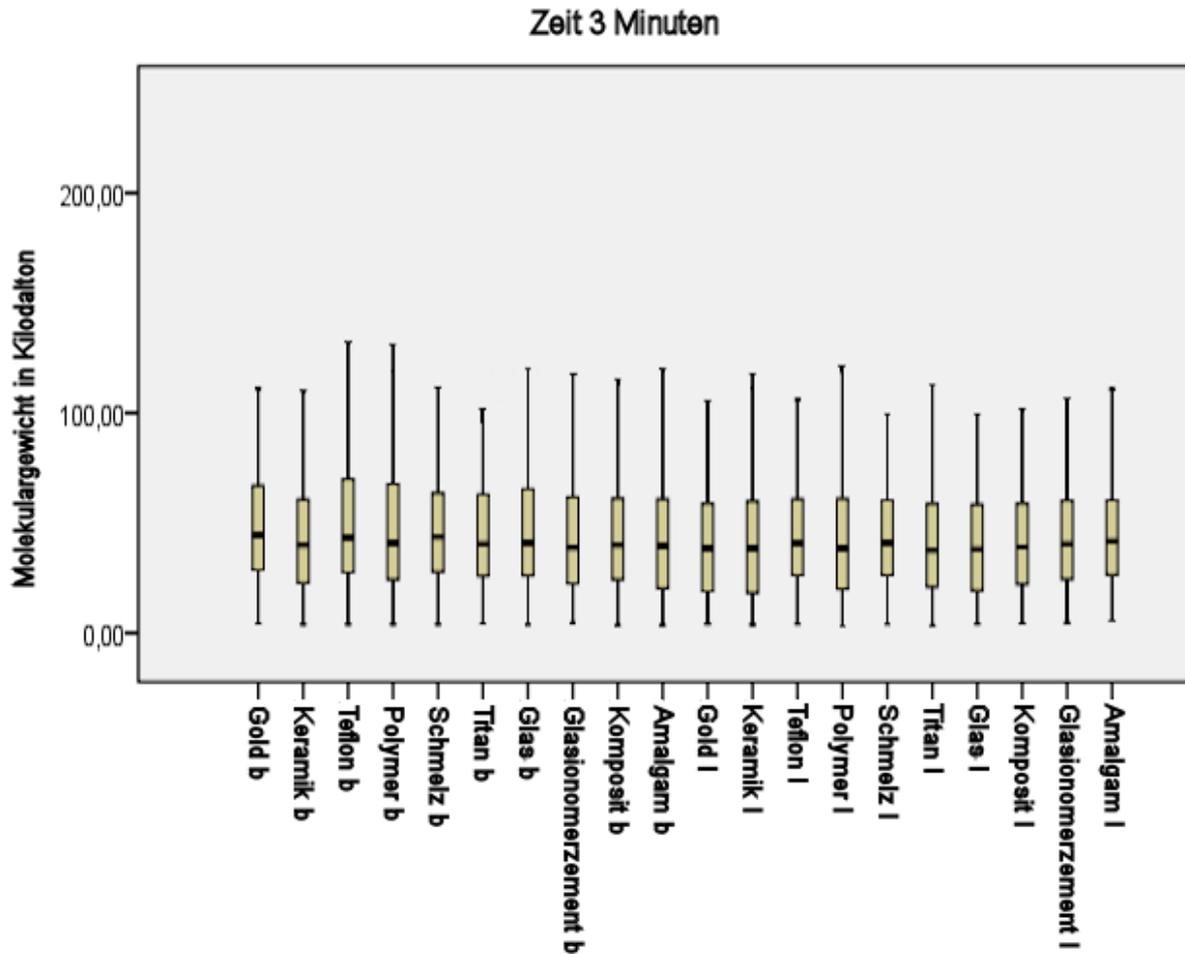
**Diag. 9: Durchschnittliche Bandenzahlen nach 30- minütiger Pellicelbildungszeit für die lingualen und bukkalen Pellicelproben aller 6 Probanden auf den verschiedenen Materialien.**



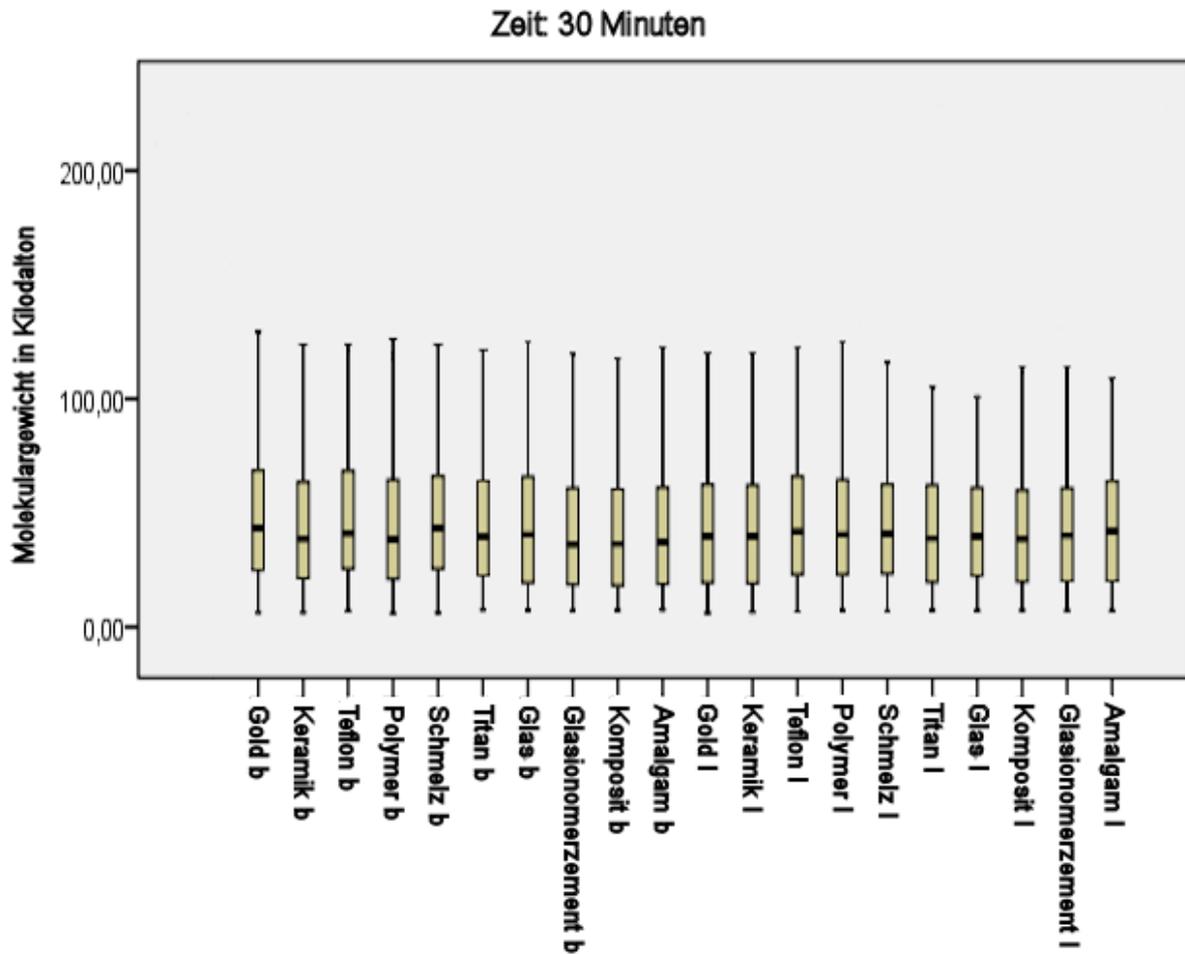
**Diag. 10: Molekulargewichte der Pellikelproteine - Zusammenfassende Darstellung der Molekulargewichtsbereiche für die Pellikelproben auf allen Werkstoffen und an beiden Lokalisationen mittels Box- Plot- Whisker Diagramm in Abhängigkeit von der intraoralen Expositionszeit (1 Minute, 3 Minuten und 30 Minuten).-**



Diag. 11: Molekulargewichte der Pellicelproteine auf den verschiedenen Werkstoffen nach 1-minütiger intraoraler Exposition. Auf der X- Achse sind die 10 untersuchten Werkstoffe mit ihrer jeweiligen Lokalisation (lingual/bukkal) dargestellt. Die Box- Plot- Whisker- Diagramme stellen in ihrer Ausdehnung den Molekulargewichtsbereich der Pellicelproben in Abhängigkeit vom jeweiligen Werkstoff dar. Der untersuchte Pellicelbildungszeitraum betrug 1 Minute.



Diag. 12: Molekulargewichte der Pellicelproteine auf den verschiedenen Werkstoffen nach 3-minütiger intraoraler Exposition. Auf der X- Achse sind die 10 untersuchten Werkstoffe mit ihrer jeweiligen Lokalisation (lingual/bukkal) dargestellt. Die Box- Plot- Whisker- Diagramme stellen in ihrer Ausdehnung den Molekulargewichtsbereich der Pellicelproben in Abhängigkeit vom jeweiligen Werkstoff dar. Der untersuchte Pellicelbildungszeitraum betrug 3 Minuten.



Diag. 13: Molekulargewichte der Pellicelproteine auf den verschiedenen Werkstoffen nach 30-minütiger intraoraler Exposition. Auf der X- Achse sind die 10 untersuchten Werkstoffe mit ihrer jeweiligen Lokalisation (lingual/bukkal) dargestellt. Die Box- Plot- Whisker- Diagramme stellen in ihrer Ausdehnung den Molekulargewichtsbereich der Pellicelproben in Abhängigkeit vom jeweiligen Werkstoff dar. Der untersuchte Pellicelbildungszeitraum betrug 30 Minuten.

### 4.3 Proteindetektion mittels Westernblotting

Etwa 25 ng Lysozym, mehr als 50 ng  $\alpha$ - Amylase und weniger als 12,5 ng Laktoferrin konnten in 26  $\mu$ l der Probe gefunden werden. Carboanhydrase II ist in 26  $\mu$ l Pellikelprobenauftrag deutlich darstellbar. Durch die Verwendung der doppelten Menge an Probe (52  $\mu$ l) konnte Laktoferrin eindeutig nachgewiesen werden. Carboanhydrase I konnte durch den Molekulargewichtsstandard Kaleidoskop- Marker in der Probe identifiziert werden. Hier diente der Kaleidoskop- Marker als Molekulargewichtsstandard und Referenz, da die Carboanhydrase I ein Bestandteil des Markers ist. IgA konnte in 26  $\mu$ l Pellikelprobenauftrag eindeutig nachgewiesen werden. Die prolinreichen Proteine konnten ebenfalls in 26  $\mu$ l Pellikelprobenauftrag gefunden werden. Nach mehrmaligem Waschen mit TBST und TBS und einer Belichtung von 6 Minuten konnten die Glykosyltransferase B als schwache Bande im Bereich von 68 kDa, die Glykosyltransferase C als schwache Bande im Bereich von 57 kDa und die Glykosyltransferase D als Bande im Bereich von 60 kDa nachgewiesen werden. Der Antikörper s IgA konnte auch als spezifisches Protein im Proteingemisch nachgewiesen werden. Mucin I ist in der Literatur im hochmolekularen Bereich von Levine et al. (1987) und Tabak (1995) mit einem Molekulargewicht > 1000 kDa isoliert und charakterisiert worden. Somit ist Mucin I nicht ins 15% ige High- Tris- Gel eingelaufen, und es war keine Bande darstellbar. Durch eine Änderung der Konzentration und Umstellung auf ein 10% iges Biorad- Gel konnte nicht eindeutig eine Bande dargestellt werden. Die qualitative Analyse der spezifischen Proteine zeigt mit Ausnahme von Mucin I in allen Pellikelproben positive Antikörperreaktionen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion der verwendeten Materialien und Methoden

#### 5.1.1 Art der Prüfkörper und Durchführung der Trageversuche

Die vorliegende Studie untersucht das initiale Adsorptionsverhalten von Proteinen auf 10 verschiedenen Werkstoffoberflächen in der Mundhöhle. Ein repräsentativer Querschnitt von Dentalmaterialien wurde im Vergleich zu Referenzmaterialien untersucht. Verwandt wurden eine Goldlegierung, Keramik, Prothesenkunststoff, Titan, Komposit, Amalgam, Glasionomierzement, Glas, Teflon und Rinderschmelz. Rinderschmelz wurde als Schmelzanalogen verwendet. Die Prüfkörper stammten aus extrahierten Frontzähnen frisch geschlachteter Rinder. Esser et al. (1998) stellten in ihrer Studie fest, dass Rinderschmelz zu Humanschmelz hinsichtlich seiner chemischen Zusammensetzung, seiner Wärmekapazität und Dichte sehr gut vergleichbar ist. Phosphat-, Kalzium- und Magnesiumgehalt sind bei bovinem und humanem Schmelz fast identisch und der chemische Aufbau ist annähernd gleich (Davidson et al. 1973). Bislang konnte kein ultrastruktureller Unterschied zwischen Human- und Rinderschmelz hinsichtlich der Biopolymeradsorption festgestellt werden (Hannig M 1998). Amalgame, Komposite, Kunststoffe sowie Glas- Polyalkenoat- Zemente besitzen, unmittelbar nach dem Anmischen und Erhärten, antibakterielle Eigenschaften. Diese antibakterielle Wirkung geht jedoch mit zunehmendem Alter der Proben verloren und ist bereits nach wenigen Tagen nicht mehr nachweisbar (Nunez et al. 1976; Meryon und Johnson 1989). Um diesen kurzfristigen und somit klinisch irrelevanten Aspekt nicht in die Untersuchung mit einfließen zu lassen, wurden die Prüfkörper erst nach einer frühestens 7 tägigen extraoralen Lagerung benutzt. Die Lagerung von Glasionomierzement erfolgte zudem bei 100%iger Luftfeuchtigkeit. Die Studie von Carlen et al. (2001) und eine neuere Studie von Müller et al. (2006) belegen, dass sich mehr Proteine an rauen Oberflächen anlagern. Durch eine standardisierte Politur mit einem Nassschleifpapier der Körnung "4000" wurde eine vergleichbare Oberfläche auf allen 10 Materialien geschaffen. Titan erwies sich jedoch als schlecht polierbar und war nicht als hochglänzend zu bezeichnen. Eine mechanische Reinigung der Materialoberflächen mit einer erneuten Nasspolitur und eine anschließende Ultraschallreinigung erfolgte vor jedem Trageversuch. Oberflächenkontaminationen wurden somit gründlich entfernt und führte in weiteren Trageversuchen zu keiner Verfälschung der Ergebnisse. Die Positionierung der Prüfkörper erfolgte reproduzierbar immer in der gleichen Region der Mundhöhle, da die Rate der Biofilmbildung in unterschiedlichen Regionen der Mundhöhle erheblich differiert (Quirynen und Van Steenberghe 1989; Quirynen et al. 1991).

Die stärkste Pellikelbildung wird an oberen Molaren und Prämolaren sowie an unteren Frontzähnen gefunden (Hannig M 1998).

### **5.1.2 Die Miniplastschiene als Prüfkörpertragehilfe**

Miniplastschienen als Träger der Prüfkörper wurden bereits von Tinanoff et al. (1976a,b,c) und Adams et al. (1979) beschrieben. Sie sind nicht invasiv, kostengünstig und wiederverwendbar. Durch die Verwendung von Abformsilikon zur Befestigung der Prüfkörper wurde eine ausreichend starke Befestigung und eine leichte Entfernbarkeit der Prüfkörper erreicht, ohne dass eine Materialreaktion, wie sie von der initialen Speichellöslichkeit von Befestigungszementen bekannt ist (Arends et al. 1995), in Kauf nehmen zu müssen. Auf Zahnschmelzproben, die an einer inkorporierten Trägerschiene montiert waren, entwickelte sich nach Mac Pherson et al. (1991) ein vergleichbares Plaqueökosystem wie auf natürlichem Zahnschmelz. Vor jedem Trageversuch wurde die bestückten Schienen für 24 Stunden in destilliertem Wasser kühl gelagert, was z. B. die antibakteriellen Eigenschaften von Kunststoffen deutlich reduziert (Ørstavik und Hensten- Pettersen 1978). Die Schienen bedeckten das marginale Parodont lediglich im Seitenzahnbereich. Dort wurden die Schienen zur besseren Befestigung der Prüfkörper bis zur mukogingivalen Grenze ausgedehnt. Mit dieser Einschränkung konnte die Sulkusflüssigkeit und deren Inhalt unbeeinträchtigt am Bioadhäsionsprozess teilhaben.

### **5.1.3 Versuchsbedingungen während der Trageversuche**

Um möglichst vergleichbare Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden modulierende äußere Einflüsse während der Trageversuche weitestgehend eliminiert. Nach Nyad und Fejerskov (1984) führen adsorbierbare Bestandteile aus der Nahrung zur Veränderung der Pellikelmorphologie. Auch jüngere Untersuchungen belegen einen Einfluss der Nahrung und ihrer Bestandteile auf die Pellikelzusammensetzung (Rykke und Sønju 1991; Schüpbach et al. 1996). Um diese Veränderungen auszuschließen, wurde die Aufnahme von Nahrung oder Flüssigkeiten durch die Probanden während der Trageversuche unterlassen.

Anamnestisch wurden Alkohol-, Nikotin- und Medikamenteneinnahme, spezielle Ernährungsgewohnheiten und Erkrankungen ausgeschlossen. Insbesondere Karies, Parodontitiden und Mundschleimhauterkrankungen konnten bei einer oralen Befundung der Probanden nicht festgestellt werden. Die mechanische Reinigung der Zähne 30 Minuten vor Versuchsbeginn erfolgte ohne die Verwendung von Zahnpasten und Mundspüllösungen, um

den Einfluss der darin enthaltenen Substanzen auszuschließen. Verwandt wurden Zahnbürste, Zahnseide und Wasser. Abschließend wurde die Mundhöhle dreimal gründlich mit Wasser ausgespült.

#### **5.1.4 Lokalisationsabhängige Unterschiede bei der Pellikelformation**

Neuere elektronenmikroskopische und CLSM (konfokale Laser-Raster-Mikroskopie)- Studien konzentrieren sich auf die lokalisationsabhängigen Unterschiede der Morphogenese der *in-vivo*- Pellikel (Hannig M 1999; Amaechi et al. 1999). Amaechi et al. analysierten (1999) mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) die Stärke der Pellikelschicht, die sich *in-situ* innerhalb von einer Stunde auf Zahnschmelzproben an 8 verschiedenen intraoralen Lokalisationen bildet. Nach der *in-situ*- Pellikelbildung wurden die Schmelzplättchen mit einem kombinierten Antihuman Immunglobulin GAM behandelt, welches zur besseren mikroskopischen Visualisierung der Pellikel mit Fluoreszinoisothiocyanat konjugiert wurde. Die CLSM Ergebnisse zeigten, dass die Pellikeldicke je nach Lokalisation deutlich variierte. Die durchschnittliche Dicke reichte von 0,3 µm an den Palatinalflächen der oberen Schneidezähne bis zu 1,06 µm an den Lingualflächen der unteren Molaren. Die dickste Pellikel wurde an den unteren hinteren lingualen Oberflächen gebildet. Diese Flächen sind permanent dem Submandibular- und SublingualdrüsenSpeichel ausgesetzt. Dementsprechend wurde die dünnste Pellikel an den Palatinalflächen der oberen Schneidezähne gebildet. Diese Flächen werden weniger mit Speichel benetzt als die vestibulären, und sind der Abrasion durch die keratinisierten Anteile der Zunge ausgesetzt (Amaechi et al. 1999). Diese Resultate sind ein Hinweis für die lokalisationsabhängig unterschiedliche Morphogenese der *in-vivo* gebildeten Pellikel. Es wird angenommen, dass lokalwirksame Faktoren in der Mundhöhle wie z.B. Scherkräfte und die unterschiedliche Verfügbarkeit von Speichelbiopolymeren den Prozess der Pellikelbildung beeinflussen (Hannig M 1999; Amaechi et al. 1999; Hannig M 1997; Carlén et al. 1998). Die Bestückung der Minioplastschienen erfolgte mit 16 Prüfkörpern des gleichen Werkstoffes. Jeweils 4 Prüfkörper lingual und 4 Prüfkörper bukkal wurden in der regio 34- 37 und 44- 47 an der Minioplastschiene befestigt. Somit waren die lokalwirksamen Faktoren während der Expositionsversuche mit den 10 unterschiedlichen Materialien annähernd gleich. Auch Materialreaktionen unter den 10 verschiedenen Werkstoffen, wie es bei einer rotierenden Bestückung der Schienen hätte vorkommen können, konnten durch die gleichartige Beladung der Minioplastschienen ausgeschlossen werden.

### 5.1.5 Pellikelgewinnung und- verarbeitung

In Vorversuchen wurden verschiedene Methoden der Proteingewinnung gegenübergestellt: die Lösung der Proteine mittels Aqua dest. (20 µl, 26 µl) im Ultraschallbad, mittels Natriumlaurylsulfat 26 µl im Ultraschallbad, mittels Natriumlaurylsulfat 26 µl im Ultraschallbad und späterer Proteindenaturierung für 1,5 Minuten bei 95°C im Wasserkocher und die Proteingewinnung mit 2 µl 2% Natriumlaurylsulfat und Abreiben mittels Schwämmchen. Als effizienteste Methode erwies sich die Proteinsolubilisierung mittels Schwämmchen. Diese schon von Carlén et al. (1998) für die Pellikelabgewinnung vom Zahnschmelz beschriebene chemo- mechanische Methode kam somit hier auf den 10 verschiedenen Werkstoffen zum Einsatz. Nach der jeweiligen intraoralen Expositionszeit wurden die Prüfkörper mit destilliertem Wasser von Speichel befreit und vorsichtig mit Luft getrocknet. Danach erfolgte der feste Abrieb mittels zweier Schwämmchen. Das erste Schwämmchen wurde mit 2 µl 2%igem SDS beschickt und unter festem Anpressdruck wurden die Prüfkörperoberflächen abgewischt. Das gleiche Procedere erfolgte mit einem trockenem Schwämmchen. Aufgrund der Tatsache, dass mit festem Anpressdruck die jeweilige Materialoberfläche abgewischt und durch ein zweites trockenem Schwämmchen die Restfeuchtigkeit mit weiteren Proteinen aufgenommen wurde konnten mehr Banden als in vorhergehenden Versuchen in den High-Tris- Gelen dargestellt werden. Eine Weiterverarbeitung erfolgte durch Poolen der von einem Werkstoff gewonnenen Schwämmchen. Durch Zugabe von 2 fach- Lämmli- Puffer und darauffolgender Zentrifugation konnten die darin enthaltenen Proteine gelöst werden. Zur Proteindenaturierung wurde die Lösung für 1,5 Minuten bei 95° gekocht. Um eine Zerstörung der Proteine zu vermeiden wurde eine längere Erhitzungsphase vermieden. Visuell zeigten sich in den abzentrifugierten Schwämmchen, kleine vom Lämmli-Puffer blau gefärbte Gebiete, die sich auch nach nochmaliger Benetzung und längerer Zentrifugation nicht herauslösen ließen. Carlén et al. (1998) und Weyland (2010) stellten bei der erneuten Behandlung der Schwämmchen einen Verbleib von Protein in den Schwämmchen fest. In diesen Zweit zentrifugaten zeigte sich ein im Vergleich zu den zuerst gewonnen Proben ähnliches, aber schwächer ausgeprägtes elektrophoretisches Bandenmuster.

Embery et al. (1986) entwickelten ebenfalls eine Methode zur schrittweisen Entfernung der Pellikel, hierbei wurde die Schmelzoberfläche zuerst mit 2 M CaCl- Lösung behandelt und anschließend mit Küretten. In der Fraktion der zuerst desorbierten Pellikelschicht konnten vor allem hochmolekulare Moleküle nachgewiesen werden, wohingegen in der danach mit Küretten entfernten Schicht vor allem niedermolekulare Moleküle zu finden waren.

Die *in- vivo* gebildete Pellikel besteht aus einer äußeren, locker formierten globulären Schicht und einer dicht strukturierten Basisschicht. Hannig M et al. (2005) entwickelten ein Verfahren

zur selektiven Rückgewinnung dieser Schichten von der Schmelzoberfläche. Die Pellikelgewinnung auf *in-vivo*- Schmelzproben erfolgte mittels mechanischer (Schaben mit Scaler, Küretten oder einer Rasierklinge oder Reiben mit einem Schwamm) oder chemischer Methoden (Phosphat- Puffer, NaCl, NaOCl, CaCl<sub>2</sub>, NaSCN, Harnstoff, Tetrahydrofuran, Guanin, SDS, HCL, oder EDTA mit oder ohne zusätzliche Ultraschallbehandlung). Anschließend wurden die Schmelzproben durch transmissionselektronenmikroskopische Analysen auf Pellikelrückstände untersucht. Die meisten chemischen Behandlungen konnten die globuläre Schicht nicht vollständig entfernen. Die vollständige Entfernung der globulären Schicht ohne Unterbrechung der basalen Schicht wurde durch Reiben mit Schwämmchen oder durch CaCl<sub>2</sub> in Kombination mit Ultraschall erreicht. Die Entfernung der basalen Schicht wurde nach der Behandlung mit HCl, EDTA oder NaOCl in Kombination mit Ultraschall beobachtet. Durch die schrittweise Entfernung der Pellikel mittels SDS und EDTA konnte die gesamte Proteinschicht gewonnen werden (Hannig M et al. 2005). In der vorliegenden Studie, bei der nur die alleinige SDS-Schwämmchen-Methode verwandt wurde, wurden keine Versuche bezüglich verbliebener Pellikelrückstände auf den verwandten Prüfkörpern durchgeführt. Es zeigte sich, obwohl in Versuchen gezeigt werden konnte, dass durch die Desorption mittels SDS und Schwämmchen nicht die gesamte Pellikel gewonnen werden konnte, in den verwendeten 15% High-Tris-Gelen mit anschließender Silberfärbung ein breit gefächertes Proteinspektrum von 2,9 kDa bis 348,5 kDa. Svendsen et al. (2008) konnten durch Abreiben der Schmelzoberfläche mittels eines mit 0,5% SDS (Natriumdodecylsulfat) getränkten Schaumstoffpellets alle anhaftenden Proteine zur weiteren Untersuchung extrahieren.

Hannig M (1998a) konnte in seinen elektronenoptischen Studien zeigen, dass eine bakterielle Besiedlung der Pellikel überwiegend erst nach 2 Stunden intraoralen Exposition erfolgte. Nur vereinzelte Kokken adhärirten vor dieser Zeit. SDS löst neben den gewollten Proteinen der Pellikel auch Membranen von Mikroorganismen und Epithelzellen. So könnten weitere Proteine in der extrahierten Lösung enthalten sein. Da diese Versuchsreihe nur intraorale Expositionszeiten von 1, 3 und 30 Minuten untersucht, ist aufgrund der geringen Anzahl von Kokken, die in diesem Zeitraum adhaerieren, nicht mit größeren Verfälschungen der Ergebnisse zu rechnen.

#### **5.1.6 *In-vitro* Proteinadsorption auf verschiedenen Oberflächen**

Die primäre Proteinanhaftung wird eher durch physikalisch-chemische Interaktionen als durch spezifische Bindungen determiniert (Glantz 1977; Vassilakos et al. 1992c). Die meisten *in-vitro*- Studien weisen auf die bedeutenden Auswirkungen der unterschiedlichen

physikalischen Oberflächeneigenschaften auf die Proteinadsorption hin (Arvidsson et al. 2004, Christersson und Dunford 1991, Lee SJ et al. 2001, Lindh et al. 1999, Lindh et al. 2002, Vassilakos et al. 1992a). Dabei ist es beachtenswert, dass Proteinschichten auf mit Wasser gespülten Proben dicker sind als auf ungespülten Proben (Glantz 1977). Das zeigt, dass die Flüssigkeitsschicht erhebliche Auswirkung auf die Proteinanlagerung hat. Proteine haben unterschiedliche Affinitäten zu unterschiedlichen Substraten. Mehr Proteine adsorbieren an rauen Oberflächen (Carlén et al. 2001; Müller et al. 2006). Des Weiteren ist sowohl die Proteinadsorption als auch die Bakterienanhaftung hauptsächlich durch die Oberflächenrauheit bestimmt, mehr als durch andere materialspezifische physikochemische Oberflächencharakteristika (Quiryne und Bollen 1995, Siegrist et al. 1991).

Der möglichen Einflussgröße der Rauigkeit wurde durch eine sorgfältige, gleichartige Politur vor Versuchsbeginn Rechnung getragen. Die Oberflächen wurden durch ein Auflichtmikroskop kontrolliert und lokale Irregularitäten bei Bedarf nachpoliert. Eine Änderung der freien Oberflächenenergie bei Erhöhung der Oberflächenrauigkeit ist über veränderte Werte bei Bestimmung des Kontaktwinkels erfassbar: Ist er kleiner als  $60^\circ$ , sinkt er durch das Erhöhen der Rauigkeit, ist er größer als  $86^\circ$  steigt er. Bei Kontaktwinkeln zwischen  $60^\circ$  und  $86^\circ$  hat die Erhöhung der Rauigkeit keinen Einfluss auf den Kontaktwinkel bzw. die freie Oberflächenenergie (Busscher HJ et al. 1984b). Diese Zusammenhänge wurden insbesondere für Polymere nachgewiesen. Eine Bestimmung des Kontaktwinkels erfolgte bei dieser Untersuchung nicht.

### **5.1.7 Materialspezifische Faktoren der Proteinadsorption und freie Oberflächenenergie**

#### ***In- vitro***

Die Menge der unter *in- vitro*- Bedingungen adsorbierten Proteine korreliert mit der Oberflächenenergie der Substrate (Arvidsson et al. 2004). Die Oberflächenenergie der Substrate beeinflusst die Geschwindigkeit der Pellikelbildung (Hannig M et al. 2004). In einer anderen Studie waren die angelagerten Proteinschichten auf Mittel- Energie- Oberflächen höher als auf Niedrig- Energie- Oberflächen (Christersson und Dunford 1991). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Veränderung von Oberflächen wie bei Silikonscheiben durch die Beschichtung mit Polyglykol oder Fluorkohlenwasserstoffresten die Proteinanlagerung reduziert werden konnte (Müller et al. 2006). Etliche Studien untersuchten die Proteinanlagerung auf hydrophilen und hydrophoben Oberflächen. Größere Mengen von Speichelproteinen adsorbieren an hydrophoben Oberflächen im Vergleich zu hydrophilen Proben (Lindh et al. 1999; Lindh 2002; Lindh et al. 2002; Vassilakos et al. 1992a,c; Vassilakos et al. 1993). Hydrophobe Wechselbeziehungen scheinen eine wichtige

Rolle als treibende Kraft in der Pellikelbildung zu spielen (Lindh et al. 1999; Lindh 2002; Lindh et al. 2002; Vassilakos et al. 1992a,c; Vassilakos et al. 1993). Hydrophile Oberflächen interagieren bevorzugt mit polaren Gruppen der anhaftenden Substrate, während von der Adsorption auf hydrophoben Oberflächen angenommen wird, dass sie durch Kohlenwasserstoffreste organischer Moleküle vermittelt wird (Vassilakos et al. 1992c). An hydrophoben Oberflächen adsorbieren größere Mengen von hydrophoben Speichelfractionen als an hydrophilen Materialien. Auf hydrophilen Oberflächen adsorbiert die größte Menge von hochmolekularen Fraktionen (Vassilakos et al. 1992c). Es kann gefolgert werden, dass das substratabhängige Adsorptionsverhalten der Speichelproteine eine breite Variation zwischen den verschiedenen Fraktionen zeigen könnte (Lindh 2002; Vassilakos et al. 1992c). Daher wurde in die vorliegende *in-situ*- Studie eine breite Palette von Dental- und Referenzmaterialien als Substrat für die Pellikelbildung einbezogen.

#### **5.1.8 Physikalische Oberflächencharakteristika**

Innerhalb von 5 Minuten wird die freie Oberflächenenergie von humanem Schmelz von 84 auf 110 mJ / cm<sup>2</sup> durch die *in-vivo*- Pellikelbildung erhöht (de Jong et al. 1984). Nach 5 Minuten bleibt die freie Oberflächenenergie von Pellikel überzogenen Substraten für wenigstens 2 Stunden konstant (de Jong et al. 1984). Nach 30- minütiger Exposition, in einer *in-situ*- Studie mit Beagle- Hunden, konvergierte die freie Oberflächenenergie unterschiedlicher Materialien, die ursprünglich von 22 bis 134 mJ / m<sup>2</sup> reichte, zu Werten zwischen 60 und 100 mJ / m<sup>2</sup> (Van Dijk et al. 1987). Es kann gefolgert werden, dass nur die initiale Phase der Proteinanlagerung während der Pellikelbildung durch die freie Oberflächenenergie beeinflusst ist (Van Dijk et al. 1987, Van Dijk et al. 1988). Trotzdem die anhaftenden Eigenschaften der Unterlage könnten weiterhin durch bestimmte Materialien beeinflusst werden vor allem unter Berücksichtigung der Biofilmbildung. Die *in-situ*-Pellikelbildung auf künstlichen Oberflächen mit unterschiedlichen freien Energien wiesen eine gewisse qualitative Selektivität auf (Baier und Glantz 1978), aber die *in-situ* Exposition mit der Mundflüssigkeit kompensierte für die verschiedenen Oberflächen die freien Energien der Festkörper und reduzierte die Benetzungswinkel entsprechend (Busscher et al. 1984a; Lockowandt et al. 1991; Morge et al. 1989). Die Koordination der Atome und Ionen an der Oberfläche metallischer oder keramischer Werkstoffe unterscheidet sich von der im Inneren dieser Werkstoffe. Im Inneren des Metall- bzw. Kristallgitters sind die Valenzen durch die Bindungen mit Nachbaratomen abgesättigt, an der Oberfläche stehen dagegen freie Valenzen zur Verfügung, die wiederum starke Anziehungskräfte auf die Adsorption von Makromolekülen ausüben (Baier et al. 1984, Engel 1986, Kasemo und Lausmaa 1986,

Gristina et al. 1988). Saubere Metalloberflächen weisen eine hohe Oberflächenenergie auf und besitzen eine hohe Reaktivität im Grenzflächenbereich, was die Adsorption von Biopolymeren begünstigt (Engel 1986). Im Gegensatz zu den Oxidschichten auf Gold und Amalgam besitzen die entstehenden Titanoxide einen amphoteren Charakter (Boehm 1974), die eine Kationen- und Anionenaustauschreaktion ermöglichen. Dadurch können an Titanoberflächen Biopolymere sowohl über kovalente, als auch über ionische und Wasserstoffbrückenbindungen adsorbieren (Kasemo und Lausmaa 1986). Dabei erhöht die Pellikel drastisch die Benetzbarkeit einer großen Anzahl von Materialien und maskiert den Effekt der ursprünglichen Oberflächenaktivität unter Erzeugung eines homogenisierenden Effektes (Jendresen und Glantz 1981, Lockowandt et al. 1991, Morge et al. 1989, Van Dijk et al. 1988). Die vorliegende *in-situ*- Studie untersucht speziell die initiale Phase der Pellikeladsorption bei 1-, 3- und 30- minütiger Exposition der 10 verschiedenen Substrate in der Mundhöhle. Auffällig war nur die erhöhte Proteinadsorption an Kunststoff, die sich durch die hohen Bindungskapazitäten für Speichelproteine aufgrund nicht gebundener Oberflächenvalenzen erklären könnte. Die freie Oberflächenenergie könnte einen Einfluss auf die Proteinadsorption in der initialen Phase der Pellikelbildung haben. Ansonsten zeigt sich eine hohe Uniformität der Proteinanlagerung auf allen Substraten in der initialen Phase. Die Pellikelbildung ist weitgehend unabhängig von der Substratoberfläche.

#### **5.1.9 High-Tris- Gel, Methodik der Gelfärbung, Auswertung mittels ImageMaster™ 1D**

Früher kamen chromatografische Methoden (Armstrong 1967; Mayhall 1977; Oste et al. 1981; Al-Hashimi und Levine 1989; Rykke et al. 1990; Rykke und Sønju 1991, Sønju Clasen et al. 1997; Yao et al. 1999) zur Untersuchung der Pellikel zum Einsatz, wobei nur eine eingeschränkte Analyse der Proteine möglich war. Die Gelelektrophorese stellte sich als ein besseres und vielfältigeres Instrument zur Untersuchung der Proteine in der Pellikel dar.

Deshalb wurde sie in mannigfachen Untersuchungen benutzt (Ruan et al. 1986; Al-Hashimi und Levine 1989; Jensen et al. 1992; Iontcheva et al. 1997; Carlén et al. 1998; Lee et al. 2001; Yao et al. 2001; Yao et al. 2003). Das PhastSystem™ der Firma Amersham Biosciences, eine vollautomatische Elektrophoreseapparatur mit integrierter Färbereinheit, brachte in zahlreichen Vorversuchen von Weyland (2010) keine verwertbaren Ergebnisse. Auch Stigler et al. (2003) konnten nur bis zu 11 Proteine identifizieren.

In dieser Versuchsreihe wurden selbst hergestellte 15%ige High- Tris- Gele, die mit einer Silberfärbung behandelt wurden, eingesetzt. Es konnten bis zu 41 Proteinbanden auf einer Lauffront festgestellt werden. Das 15% ige High- Tris- Gel trennt Proteine im Bereich von 10 kDa bis 220 kDa auf. Als Referenz wurde der Molekulargewichtsstandard BenchMark™

Protein Ladder von Invitrogen verwandt. Banden mit stärkerer Intensität zeigt er im Bereich von 20 kDa und 50 kDa, weitere Banden bei 10, 15, 25, 30, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 und 220 kDa.

Bei der Probenbeladung der Geltaschen mit der Mikroliter- Spritze wurde immer die Tasche vom Boden aus vorsichtig und mit wenig Druck gefüllt. Visuell erfolgte die Kontrolle über den Verbleib der blauen Probenflüssigkeit in der jeweiligen Geltasche. Ein Kontaminieren der Nachbartaschen wäre schon durch geringe Mengen Probenflüssigkeit möglich und würde zu einem verfälschten Ergebnis führen. Zur Vermeidung einer Kontamination der Nachbartaschen sollten Abstände zwischen den einzelnen Proben eingehalten werden. So könnte nur jede zweite Geltasche mit Probenflüssigkeit beladen werden, oder für jede Probe ein eigenes Gel benutzt werden. Hier lag eine mögliche Fehlerquelle, da geringste Mengen an Probenflüssigkeit nach Applikation und Entfernung der Mikroliter- Spritze aus der Geltasche die anderen Proben, trotz größter Sorgfalt, kontaminieren konnten. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele zuerst einer Coomassiefärbung unterzogen. Diese Methode ist nicht so sensitiv wie die Silberfärbung. Die Nachweisgrenze liegt bei ungefähr 0,5 µg Protein pro Bande im Gel. Eine erste Kontrolle der Proteinbeladung war aber somit relativ einfach möglich. Außerdem ist mit dieser Färbung die Quantifizierung der Proteine im Gel möglich. Dies war nicht Bestandteil dieser Versuche, könnte aber interessante Aspekte in weiteren Versuchen liefern. Nach der Behandlung mit Entfärber I und Entfärber II wurden die Gele durch 7 verschiedene Färbelösungen der Silberfärbung unterzogen. Im Vergleich zur Coomassiefärbung zeichnet sich die Silberfärbung durch eine hohe Sensivität aus, deren Nachweisgrenze im Bereich von 0,1 ng bis 1 ng pro Bande liegt. Somit konnten bis zu 41 Proteinbanden pro Lauffront festgestellt werden. Die Intensität der Bandenfärbung hängt von der Primärstruktur des Proteins ab. Feinere Banden und eine höhere Anzahl von Banden konnten mit der Silberfärbung dargestellt werden. Verschiedene Faktoren hatten Einfluss auf die Qualität der Silberfärbung, zum einen die Sauberkeit der Gefäße, in denen die Entwicklung stattfand, zum anderen die Reinheit und das Alter der verwendeten Reagentien. Vom Alter und der Menge des Formaldehyds im Reagenz (Paraformaldehyd bildet sich bei länger angesetzten Lösungen am Boden der Flasche) war die Bandendarstellung im Gel entscheidend abhängig. Deshalb wurden die Lösungen frühzeitig erneuert, um gute Ergebnisse zu erhalten. Beim Entwicklungsschritt mit Formaldehyd werden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert. Das Silber färbt die Proteine im Gel schwarz. Diese Entwicklung führte zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen und musste visuell kontrolliert beendet werden. Wartete man zu kurz, waren nicht alle Banden darzustellen. Vor allem Proteinbanden im Bereich von 90 kDa bis 220 kDa waren dann nicht sichtbar. Wurde zu lange gewartet, färbte sich der Hintergrund immer dunkler und der Kontrast im Gel ging

verloren, und es war schwer auswertbar.

#### **5.1.10 Auswertung der High-Tris- Gele**

Eine Vielzahl von Problemen ergab sich bei dieser umfangreichen Studie zur Proteinadsorption auf den 10 verschiedenen Werkstoffen und der späteren Suche mittels Western- Blot nach spezifischen Proteinen im Verlaufe der Versuche und Auswertungen. Die Auswertung der Gele mit dem ImageMaster™1D war mit einigen Problemen verbunden. Die automatische Bandendetektion des Programmes erkannte nicht selektiv die Proteinbanden des Geles. Es wurden Bereiche auch außerhalb der aufgetrennten Pellicelproteinbanden der verschiedenen Werkstoffe durch die Software detektiert, in denen es zur einer horizontalen Diffusion innerhalb des Geles kam. Verunreinigungen wurden durch das Auswertungsprogramm ebenso erkannt. In Bereichen, in denen visuell keine Banden zu erkennen waren, markierte die Analysesoftware ImageMaster™ trotzdem feine Linien als Proteinbanden, die wo möglich durch horizontale Diffusion oder durch Verunreinigungen während der Silberfärbung entstanden waren. Verringerte man die Detektionssensivität, erkannte das Analyseprogramm visuell eindeutig erkennbare Proteinbanden nicht. Es wurde mit hoher Detektionssensivität weitergearbeitet, und manuell wurden alle Banden, die nicht eindeutig als Proteinbande zu deuten waren, gelöscht. Durch fehlerhafte Interpretation könnte es zum Informationsverlust einzelner Proteinbanden gekommen sein. Außerdem lagen im Bereich von ungefähr 50 kDa bis 80 kDa die Proteinbanden sehr nah beieinander und konnten nicht klar voneinander abgegrenzt werden. Ein Informationsverlust durch Bandenüberlappung war hier nicht auszuschließen. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass fehlerhaft markierte Banden mitgewertet wurden oder Proteinbanden nicht entdeckt wurden. Wünschenswert wäre eine verbesserte Analysesoftware, die selektiv nur Proteinbanden markiert. Aufgrund des sogenannten "Smiling-Effektes"- (dieser Effekt entsteht, weil die Proteinproben in den äußeren Gelspuren langsamer wandern als Proben in der Mitte des Geles) konnten die aufgetrennten Proteine in den verschiedenen Spuren nicht miteinander verglichen werden. Das Auswertungsprogramm wies eindeutig gleichen Proteinbanden in unterschiedlichen Spuren verschiedene kDa- Werte zu. Eine Molekulargewichtsbestimmung war trotz verschiedener Programmeinstellungen im Analyseprogramm nicht möglich. Zur Auswertung kamen nur die absoluten Proteinbandenzahlen der einzelnen Spuren, Lokalisationen (bukkal/lingual) und Expositionszeiten von 1-, 3- und 30 Minuten. Die geschlechtsbezogene Auswertung war aufgrund der geringen Probandenzahl (3 weibliche und 3 männliche Probanden) nicht aussagekräftig. Im niedermolekularen Bereich von 0 bis 15 kDa zeigten sich generell bei

allen Gelen dicke und stark gefärbte Banden, im hochmolekularen Bereich von 90 bis 348,5 kDa dagegen feine und eher schwach gefärbte Banden.

#### **5.1.11 Anzahl und Verteilung der Banden**

Die Auswertung der 18 High-Tris- Gele zeigte in diesen Versuchen bis zu 41 Banden je Laufspur. Der Molekulargewichtsbereich der Banden erstreckte sich von 2,9 kDa bis 348,5 kDa. Diese absoluten Zahlen sind durch einen Vergleich mit der Markerspür errechnet worden und somit wegen des "Smiling- Effektes" nur eingeschränkt aussagekräftig. Der horizontale Vergleich der Banden untereinander war durch die falsche kDa- Zuweisung eindeutig gleicher Banden in unterschiedlichen Spuren nicht möglich. Dies hätte einen Vergleich der unterschiedlichen Materialien, Lokalisationen und Expositionszeiten sehr vereinfacht. Eine weitere Verfälschung dieser absoluten Zahlen entsteht durch die exponentielle Stauchung bei Werten oberhalb von 220 kDa und Werten unterhalb von 10 kDa. Leider ist auch die Bandenanzahl nur eingeschränkt aussagekräftig. Informationsverluste könnten durch Bandenüberlappung und durch unterschiedliche Entwicklungsergebnisse bei der Silberfärbung und somit Nichtdarstellung von Banden im Gel entstanden sein. "Pseudobanden" durch falsche Analyse der Detektionssoftware und durch horizontale Diffusion entstandene Banden könnten die Ergebnisse ebenso verfälscht haben.

#### **5.1.12 Western- Blot**

Western- Blot stellt ein Nachweisverfahren von Proteinen in einem Proteingemisch dar. Dafür werden die zuvor in einer Gel- Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine feste Trägermatrix übertragen. Als feste Trägermatrix kam eine PVDF- Membran zum Einsatz. Dieser Prozess wird Blotting genannt. In den Versuchen wurden markierte „sekundäre“ Antikörper verwendet. Die sekundären Antikörper binden spezifisch an den artspezifischen konstanten Teil des primären Antikörpers. Die durch die konjugierte Peroxidase bewirkte Nachweisreaktion kann dort stattfinden, wo der Primärantikörper und somit das Zielprotein auf der Membran befindlich ist. Diesen Vorgang nennt man Chemolumineszenzreaktion. Eine genaue Zuweisung des spezifischen Protein zu der korrespondierenden Bande bzw. Doppelbande im Polyamidgel würde weitere Erkenntnisse liefern. Eine Proteinbande im Gel ist nicht automatisch auch ein Protein. Als Beispiel wäre hier die  $\alpha$ - Amylase mit ihrer typischen Doppelbande zu nennen. Abbauprodukte, horizontale Diffusion und Verunreinigungen könnten mittels Erfahrungswerten aus dem Gel eliminiert werden. Nicht für

alle spezifischen Proteine lag das gesuchte Proteine als Referenz vor, sondern nur für die spezifischen Proteine  $\alpha$ - Amylase, Laktoferrin, Lysozym und Carboanhydrase II. Bei diesen spezifischen Proteinen wäre auch eine Quantifizierung möglich. Carboanhydrase I als Bestandteil des Molekulargewichtsstandard konnte durch diese Referenz eindeutig nachgewiesen werden. Die spezifischen Proteine Glykosyltransferase B, C und D konnten in dem in der Literatur nachgewiesenen Molekulargewichtsbereich nachgewiesen werden. Ebenso die spezifischen Proteine IgA und PRP. Durch Austestung mußte der ideale Belichtungszeitraum, bei dem sich die gesuchte Bande zeigte, festgestellt werden. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass zur Auswertung Erfahrungswerte erforderlich sind, die sich erst aus einer großen Zahl von Versuchen ergeben. Einige spezifische Proteine, die in geringer Menge vorlagen, konnten erst durch vorangegangene Waschschrte sichtbar gemacht werden.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

Insgesamt zeigte sich bei allen 10 Werkstoffen, beiden Lokalisationen und den drei intraoralen Expositionszeiten ein einheitliches Bandenmuster der Pellikelproteine. Lediglich einzelne Tendenzen fielen auf. Pellikelproben auf Kunststoff hatten zu allen Expositionszeiten die meisten Banden, mit der Ausnahme der lingualen Lokalisation bei 3 Minuten Expositionszeit.

Im Gegensatz zu früheren Studien (Stigler et al. 2003; Hannig M et al. 2002, 2005; Carlén et al. 1998), die zeigten, dass mittels der SDS- Schwämmchen- Methode allein die Proteine der Pellikelbasisschicht nur sehr spärlich bis gar nicht zu desorbieren wären, was sich im geringen Vorkommen der niedermolekularen Proteine niederschlagen würde, konnten in dieser Studie mit der SDS- Methode eindeutig niedermolekulare Banden dargestellt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Studie von Weyland (2010). Stigler et al. (2003) konnte die Proteine mit den Molekulargewichten von 73 kDa bis 190 kDa fast ausschließlich mit der EDTA- Methode nachweisen. In diesem Molekulargewichtsbereich fanden sich in dieser Studie viele feine Banden. Dies deckt sich mit Ergebnissen der Studie von Weyland (2010), der ebenfalls mit der SDS- Methode in diesem Bereich viele Banden fand. In dieser Studie wurden bis zu 41 Banden auf den untersuchten Werkstoffen festgestellt, Weyland (2010) fand in seiner Studie bis zu 65 Banden. Es wurde in beiden Studien eine hohe Zahl an Banden mit der SDS- Schwämmchen- Methode auf allen Werkstoffen gefunden. Mit Hilfe

der Massenspektrometrie konnten Lee et al. (2013) in ihrer Studie 130 AEP- Proteine nach Herkunft, vermeintlicher biologischer Funktion und möglicher Bedeutung in der Pellikel identifizieren und charakterisieren. Zusätzlich zeigte die Studie von Lee et al. (2013), dass Speichelproteine mit einer Affinität zu Calcium und Phosphat zahlreicher in den frühen Stadien der Pellikelbildung vorkommen, während Proteine mit Protein- Protein- Wechselwirkungen signifikanter in späteren Phasen der Pellikelbildung zu finden sind.

Nur wenige Studien untersuchten bisher die *in- situ* / *in- vivo*- Pellikelbildung auf Dentalmaterialien. Überwiegend gibt es Daten zur *in- vitro*- Pellikelbildung in diesem Bereich. Die initial adsorbierte Proteinschicht ist der Mediator für Grenzflächeninteraktionen in der Mundhöhle und trotz dieser wichtigen Schlüsselposition ist die Kurzzeitpellikel nur wenig untersucht. Diese *in- situ*- Studie untersucht erstmalig die 1-min Pellikel auf den verschiedenen Materialien. Die größten Abweichungen der Bandenzahlen unter den verschiedenen Werkstoffen zeigten die Mittelwerte für die Proben aller 6 Probanden beider Lokalisationen zu der 1- minütigen Expositionszeit. Insgesamt betrachtet ist dennoch eine hohe Uniformität der Proteinadsorption auf den 10 Werkstoffen, beiden Lokalisationen, zu den drei Expositionszeiten und allen 6 Probanden zu beobachten.

## **5.2.1 Proteinbandenmuster auf verschiedenen Werkstoffen**

### **5.2.1.1 Metallische Werkstoffe**

In dieser Studie zeigte sich ein gleichförmiges Verteilungsmuster der verschiedenen Proteine auf allen untersuchten Werkstoffen. Lediglich im einminütigen durchschnittlichen Untersuchungsergebnis differierten Gold und Amalgam mit weniger Proteinanlagerung. Titan jedoch zeigte hier keinerlei Abweichungen nach oben oder unten.

### **5.2.1.2 Glasionomerzement**

Dem in der Literatur untersuchten Maximum der Fluoridfreisetzung in den ersten 24 Stunden und der rapiden Senkung der Freisetzungsmenge auf ein gleichbleibendes Niveau ab etwa dem 8. Tag (El Mallakh und Sarkar 1990; Creanor et al. 1994) wurde durch Lagerung der Prüfkörper über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 100% Luftfeuchtigkeit Rechnung getragen. In den Expositionsversuchen über einen Zeitraum von 1 Minute bei Glasionomerzement zeigten sich lingual weniger Banden als bukkal.

### **5.2.1.3 Kunststoff und Komposit**

Hannig, M. (1998) stellte in seinen elektronenoptischen Studien eine hohe Uniformität des Proteinadsorptionsverhaltens auf allen untersuchten Werkstoffen u. a. Kunststoff und Komposit fest. Unter *in-vitro*- Bedingungen, haben Proteine meistens eine höhere Affinität zu Polymermaterialien, welche üblicherweise einen hydrophoben Charakter haben (Steinberg und Eyal 2002). Polymere Werkstoffe besitzen aufgrund ihrer nicht gebundenen Oberflächenvalenzen hohe Bindungskapazitäten für Speichelproteine. Durch die Lichtpolymerisation werden nur ca. 55 bis 70% der Monomere zahnärztlicher Komposite in Polymere überführt. Sowohl bei der 1- minütigen, als auch bei der 3- und 30- minütigen Exposition konnten in den aktuellen Versuchen auf Kunststoffprüfkörpern mehr Banden dargestellt werden als auf allen anderen untersuchten Materialien.

### **5.2.1.4 Teflon**

In transmissionselektronenoptischen Untersuchungen wurde durch Hannig M (1998a) weder ein Unterschied in der Pellikelbildung noch in der bakteriellen Adhärenz auf Teflon im Vergleich zu anderen Materialien gefunden. Auch in den jetzigen Untersuchungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Proteinadsorption auf allen untersuchten Materialien einschließlich Teflon.

### **5.2.2 Molekulargewichte**

Die Mittelwerte der Molekulargewichte der Pellikelproteine auf allen Werkstoffen, in beiden Lokalisationen, bei allen Probanden und zu allen drei Zeiten der intraoralen Exposition zeigen ein sehr homogenes Verteilungsmuster. Der Molekulargewichtsbereich der Banden erstreckte sich von 2,9 kDa bis 348,5 kDa.

Eine regelmäßige Bandenverteilung bei allen elektrophoretischen Analysen zeigte sich in dem Molekulargewichtsbereich von 25 kDa bis 80 kDa. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Untersuchung von Weyland (2010). Schon Eggen und Rølla (1982, 1983) fanden heraus, dass der Hauptanteil der Pellikeproteine Molekulargewichte unter 67 kDa aufweist.

### 5.2.3 Nachweis der spezifischen Proteine

Verschiedenste Methoden zum Nachweis von spezifischen Proteinen in der Pellikel wurden durchgeführt (Hannig M et al. 2004; Vacca- Smith and Bowen 2000) und verfeinerten sich über die Jahre. Mit den heutigen Methoden der Massenspektrometrie konnten 130 verschiedene Proteine in der Pellikel identifiziert werden (Lee et al. 2013). In der vorliegenden Studie wurde der qualitative Nachweis der spezifischen Proteine alpha-Amylase, Lysozym, Laktoferrin, Carboanhydrase I, Carboanhydrase II, slgA, Glykosyltransferase B, Glykosyltransferase C, Glykosyltransferase D und der prolinreichen Proteine mittels Western- Blot erbracht. Diese Ergebnisse dieser mit Western- Blot in der initialen Pellikel identifizierten Proteine decken sich mit den in der Literatur beschriebenen Pellikelproteinen. Lediglich der Nachweis von Mucin I mittels Westernblotting gelang nicht.

### 5.2.4 Schlussfolgerungen

Die Pellikelbildung ist im Hinblick auf die Proteinzusammensetzung weitgehend unabhängig von der Substratoberfläche: Alle dem Mundmilieu und somit dem Speichel ausgesetzten Werkstoffe besitzen die Fähigkeit zur Ausbildung einer Pellikel.

Bereits nach 1 Minute zeigt die Pellikel ein ähnliches Proteinprofil wie nach 3- und 30 Minuten, was den Rückschluß zu läßt, dass es sich bei der Pellikelbildung um ein sehr schnelles Geschehen handelt.

Bis zu 41 Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 2,9 kDa und 348,5 kDa konnten auf den 10 untersuchten Werkstoffen gefunden werden.

Der qualitative Nachweis der spezifischen Pellikelproteine alpha- Amylase, Lysozym, Laktoferrin, Carboanhydrase I, Carboanhydrase II, slgA, Glykosyltransferase B, Glykosyltransferase C, Glykosyltransferase D und der prolinreiche Proteine konnte in der initialen *in-situ*- Pellikel mittels Western- Blot erbracht werden.

In Folgeuntersuchungen könnten nano- massenspektrometrische Analyseverfahren genutzt werden, um das Pellikelproteom auf verschiedenen Substraten im Detail aufzuklären.

## 6. Literaturverzeichnis

### A

Adams D, Stipho HDK, Murphy WM: Variations in the initial formation of pellicle and plaque on enamel in vivo. *J Dent* 7, 169- 173 (1979)

Aguirre A, Levine MJ, Cohen RE, Tabak LA: Immunochemical quantitation of alpha-amylase and secretory IgA in parotid saliva from people of various ages. *Arch Oral Biol* 32, 297-301 (1987)

Al-Hashimi I, Levine MJ: Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 34, 289-295 (1989)

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A: Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res* 78, 1821-1828 (1999)

Arends J, Dijkman GEHM, Dijkman AG: Review of fluoride release and secondary caries reduction by fluoridating composites. *Adv Dent Res* 9, 367-376 (1995)

Armstrong WG: The composition of organic films formed on human teeth. *Caries Res* 1, 89-103 (1967)

Arvidsson A, Lofgren CD, Christersson CE, Glantz PO, Wennerberg A: Characterisation of structures in salivary secretion film formation. An experimental study with atomic force microscopy. *Biofouling* 20, 181-188 (2004)

### B

Baier RE, Meyer AE, Natiella JR, Natiella RR, Carter JM: Surface properties determine bioadhesive outcomes: Methods and results. *J Biomed Mater Res* 18, 337-335 (1984)

Baier RE, Glantz PO: Characterization of oral in vivo films formed on different types of solid surfaces. *Acta Odontol Scand* 36, 289-301 (1978)

Bennick A, Chau G, Goodlin R, Abrams S, Tustian D, Madapallimattam G: The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle *in vivo* and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Arch Oral Biol* 28, 19-27 (1983)

Berg IC, Rutland MW, Arnebrant T: Lubricating properties of the initial salivary pellicle--an AFM study. *Biofouling* 19, 365-369 (2003)

Boehm HP: Funktionelle Gruppen an Festkörperoberflächen. *Chem Ing Techn* 46, 716-719 (1974)

Bjørck L, Rosen C, Marshall V, Reiter B: Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other gram-negative bacteria. *Appl Microbiol* 30, 199-204 (1975)

Bowden GH, Hamilton IR: Survival of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 9, 54-85 (1998)

Bradway SD, Bergey EJ, Jones PC, Levine MJ: Oral mucosal pellicle. Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. *Biochem J* 261, 887-896 (1989)

Bradway SD, Bergey EJ, Scannapieco FA, Ramasubbu N, Zawacki S, Levine MJ: Formation of salivary-mucosal pellicle: the role of transglutaminase. *Biochem J* 284, 557-564 (1992)

Busscher HJ, de Jong HP, van Pelt AW, Arends J: The surface free energy of human dental enamel. *Biomater Med Devices Artif Organs* 12, 37-49 (1984)

Busscher HJ, Van Pelt AWJ, De Boer P, De Jong HP, Arends J: The effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. *Colloids and Surfaces* 9, 319-331 (1984)

## **C**

Carlén A, Börjesson AC, Nikdel K, Olsson J : Composition of pellicles formed *in vivo* on tooth surfaces in different parts of the dentition, and *in vitro* on hydroxyapatite. *Caries Res* 32, 447-455 (1998)

Carlén A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J: Surface characteristics and *in vitro* biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials* 22, 481-487 (2001)

Carlén A, Rüdiger SG, Loggner I, Olsson J: Bacteria-binding plasma proteins in pellicles formed on hydroxyapatite *in vitro* and on teeth *in vivo*. *Oral Microbiol Immunol* 18, 203-207 (2003)

Cassels FJ, Hughes CV, Nauss JL: Adhesin receptors of human oral bacteria and modeling of putative adhesin-binding domains. *J Ind Microbiol* 15, 176-185 (1995)

Cheaib Z, Lussi A: Impact of aquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. *Caries Res* 45, 107-112 (2011)

Christersson CE: On salivary film formation and bacterial retention to solids. A methodological and experimental *in vitro* study. *Swed Dent J* 77 (Suppl), 1-82 (1991)

Christersson CE, Dunford RG: Salivary film formation on defined solid surfaces in the absence and presence of microorganisms. *Biofouling* 3, 237-250 (1991)

Costerton JW: Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15, 137-140 (1995)

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM: Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711-745 (1995)

Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR: Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs* 28, 1062-1068 (2005)

Creanor SL, Carruthers LMC, Saunders WP, Strang R, Foye RH: Fluoride uptake and release characteristics of glass ionomer cements. *Caries Res* 28, 322-328 (1994)

D

Dawes C, Jenkins GN, Tonge CH: The nomenclature of integuments of the enamel surface of teeth. *Br Dent J* 115, 65-68 (1963)

Davidson CL, Boom G, Arends J: Calcium distribution in human and bovine surface enamel. *Caries Res* 7, 349-359 (1973)

Deimling D, Breschi L, Hoth- Hannig W, Ruggeri A, Hannig C, Nekrashevych Y, Prati C, Hannig M: Electron microscopic detection of salivary alpha- amylase in the pellicle formed in situ. *Eur J Oral Sci* 112, 503-509 (2004)

De Jong HP, de Boer P, Busscher HJ, van Pelt AW, Arends J: Surface free energy changes of human enamel during pellicle formation. An *in vivo* study. *Caries Res* 18, 408-415 (1984)

De Kievit TR, Iglewski BH: Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68, 4839-4849 (2000)

Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Leite AL, Xiao Y, Rios D, Magalhães AC, Buzalaf MAR: Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle. *J Dent* 43, 583- 588 (2015a)

Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Moffa EB, Mussi MCM, Xiao Y, Buzalaf MAR: Identification of acid- resistant proteins in acquired enamel pellicle. *J Dent* 43, 1470-1475 (2015b)

Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer Jr RJ, Kolenbrander PE: Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 72, 2837-2848 (2006)

Donlan RM, Costerton JW: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167-193 (2002)

Douglas CW: The binding of human salivary alpha-amylase by oral strains of streptococcal bacteria. *Arch Oral Biol* 28, 567-573 (1983)

Douglas CW: Characterization of the alpha-amylase receptor of *Streptococcus gordonii* NCTC 7868. *J Dent Res* 69, 1746-1752 (1990)

Douglas CW: Bacterial- protein interactions in the oral cavity. *Adv Dent Res* 8, 254-262 (1994)

## E

Eggen KH, Rølla G: Gel filtration, ion exchange chromatography and chemical analysis of macromolecules present in acquired enamel pellicle (2-hour-pellicle). *Scand J Dent Res* 90, 182-188 (1982)

Eggen KH, Rølla G: Further studies on the composition of the acquired enamel pellicle. *Scand J Dent Res* 91, 439-446 (1983)

EI Mallakh BF, Sarkar NK: Fluoride release from glass-ionomer cements in de-ionized water and artificial saliva. *Dent Mater* 6, 118-122 (1990)

Embery G, Heaney TG, Stanbury JB: Studies on the organic polyanionic constituents of human acquired dental pellicle. *Arch Oral Biol* 31, 623-625 (1986)

Engel T: Low-energy atom scattering from surfaces. *Science* 56, 491-495 (1986)

Esser M, Tinschert J, Marx R: Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Dtsch Zahnärztl Z* 53, 713-717 (1998)

## F

Flemming HC, Wingender J: Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol* 43, 1-8 (2001a)

Flemming HC, Wingender J: Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part II: Technical aspects. *Water Sci Technol* 43, 9-16 (2001b)

## G

Gaudie WM: Contamination of dental unit waterlines: a re-evaluation. *J N Z Soc Periodontol* (89), 12-16 (2006)

Gibbons RJ, Etherden I: Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infect Immun* 41, 1190-1196 (1983)

Gibbons RJ, Cohen L, Hay DI: Strains of streptococcus mutans and streptococcus sobrinus attach to different pellicle receptors. Infect Immun 52, 555-561 (1986)

Gibbons RJ, Hay DI: Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of Actinomyces viscosus LY7 to apatitic surfaces. Infect Immun 56, 439-445 (1988)

Gibbons RJ: Bacterial adhesion to oral tissue: A model for infection diseases. J Dent Res 68, 750-760 (1989)

Gibbons RJ, Hay DI: Adsorbed salivary acidic praline-rich proteins contribute to the adhesion of streptococcus mutans JBP to apatitic surfaces. J Dent Res 68, 1303-1307 (1989)

Gibbons RJ, Hay DI, Childs WC, Davis G: Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. Arch Oral Biol 35, 107-114 (1990)

Glantz PO: Adhesion to teeth. Int Dent J 27,324-332 (1977)

Glantz PO, Baier RE, Christersson CE: Biochemical and physiological considerations for modeling biofilms in the oral cavity: a review. Dent Mater 12, 208-214 (1996)

Gong K, Mailloux L, Herzberg MC: Salivary film expresses a complex, macromolecular binding site for Streptococcus sanguis. J Biol Chem 275, 8970-8974 (2000)

Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI et al.: Role of glucosyltransferase B in interactions of Candida albicans with Streptococcus mutans and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surface. Appl Environ Microbiol 77, 6357-6367 (2011)

Gristina AG, Naylor P, Myrvik Q. Infektions from biomaterials and implants: a race for the surface. Med Prog Technol 14, 205-224 (1988)

Gristina AG, Naylor P, Myrvik Q: The race for the surface: microbes, tissue cells and biomaterials. In: Switalski L, Höök M, Beachy E Molekular mechanisms of microbial adhesion. 1. Aufl., Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg 177-211 (1988)

Gwynn JP, Douglas CW: Comparison of amylasebinding proteins in oral streptococci. FEMS Microbiol Lett 124, 373-379 (1994)

H

Hajishengallis G, Nikolova E, Russell MW: Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A (S-IgA) antibodies to cell surface protein antigen I/II: reversal by IgA1 protease cleavage. Infect Immun 60, 5057-5064 (1992)

Hannig C, Attin T, Hannig M, Henze E, Brinkmann K, Zech R: Immobilisation and activity of human alpha-amylase in the acquired enamel pellicle. Arch Oral Biol 49, 469-475 (2004)

Hannig C, Hannig M, Attin T: Enzymes in the acquired enamel pellicle. Eur J Oral Sci 113, 2-13 (2005a)

Hannig C, Hoch J, Becker K, Hannig M, Attin T: Lysozyme activity in the initially formed *in situ* pellicle. Arch Oral Biol 50, 821-828 (2005b)

Hannig C, Spitzmüller B, Miller M, Hellwig E, Hannig M: Intrinsic enzymatic crosslinking and maturation of the *in situ* pellicle. Arch Oral Biol 53, 416-422 (2008a)

Hannig C, Spitzmüller B, Knausenberger S, Hoth-Hannig W, Hellwig E, Hannig M: Detection and activity of peroxidase in the *in situ* formed enamel pellicle. Arch Oral Biol 53, 849-858 (2008b)

Hannig C, Ruggeri A, Al-Khayer B, Schmitz P, Spitzmüller B, Deimling D, Huber K, Hoth-Hannig W, Bowen WH, Hannig M: Electron microscopic detection and activity of Glucosyltransferase B, C, and D in the *in situ* formed pellicle. Arch Oral Biol 53, 1003-1010 (2008c)

Hannig C, Hannig M: The oral cavity- a key system to understand substratum- dependent bioadhesion on solid surfaces in man. Clin Oral Invest 13, 123-139 (2009)

Hannig C, Spitzmüller B, Hannig M: Transaminases in the acquired pellicle. Arch Oral Biol 54, 445-448 (2009)

Hannig M: Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci* 105, 422-433 (1997)

Hannig M: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der initialen Bioadhäsionsprozesse an Festkörperoberflächen in der Mundhöhle. 1. Aufl. Berlin: Quintess Verlags- GmbH, (1998)

Hannig M: Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Invest* 3, 88-95 (1999a)

Hannig M: Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur J Oral Sci* 107, 55-64 (1999b)

Hannig M, Balz M: Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 33, 372-379 (1999)

Hannig M, Balz M: Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res* 35, 142-148 (2001)

Hannig M, Herzog S, Willigeroth S, Zimehl R: Atomic force microscopic investigation of salivary pellicle formed on enamel and glass in vivo. *Colloid Polymer Sci* 279, 479-483 (2001)

Hannig M: The protective nature of the salivary pellicle. *Int Dent J* 52, 417-423 (2002)

Hannig M, Khanafer A, Hoth-Hannig W, Acil Y: A method for stepwise removal and analysis of the in vivo-formed salivary pellicle layer. *J Dent Res* 81, 287 (2002)

Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M: Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization- an in situ pilot study. *Clin Oral Invest* 7, 158-161 (2003)

Hannig M, Döbert A, Stigler R, Müller U, Prokhorova SA: Initial Salivary Pellicle Formation on Solid Substrates Studied by AFM. *J. Nanosci Nanotech* 4, 1-7 (2004)

Hannig M, Joiner A: The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 19, 29-64 (2006)

Hannig M, Khanafer AK, Hoth-Hannig W, Al-Marrawi F, Ail Y: Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle. Clin Oral Investig 9, 30-37 (2005)

Hannig M, Hannig C: Does a biofilm free of bacteria, exist in situ? Parodontologie & Implantologie Orale 26, 187-200 (2007a)

Hannig M, Hannig C: Der initiale orale Biofilm- pathogen oder protektiv? Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde 29, 73-82 (2007b)

Hannig M, Hannig C: The pellicle and erosion. Monogr Oral Sci 25, 206-14 (2014)

Hara AT, Ando M, Gonzalez- Cabezas C, Cury JA, Serra MC; Zero DT: Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. J Dent Res 85, 612-616 (2006)

Hay DI: The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. Arch Oral Biol 12, 937-946 (1967)

Hay DI: The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. Arch Oral Biol 18, 1517-1529 (1973)

Hay DI, Moreno EC: Differential adsorption and chemical affinities of proteins for apatitic surfaces. J Dent Res 58 (Spec Iss B), 930-942 (1979)

Helmerhorst EJ, Alagl AS, Siqueira WL, Oppenheim FG: Oral fluid proteolytic effects on histadin 5 structure and function. Arch Oral Biol 51, 1061- 1070 (2006)

Helmerhorst EJ, Traboulsi G, Salih E, Oppenheim FG: Mass spectrometric identification of key proteolytic cleavage sites in statherin affecting mineral homeostasis and bacterial binding domains. J Proteome Res 9, 5413- 5421 (2010)

Hiroi T, Fukushima K, Kantake I, Namiki Y, Ikeda T: De novo glucan synthesis by mutants streptococcal glucosyltransferases present in pellicle promotes firm binding of Streptococcus gordonii to tooth surfaces. FEMS Microbiol Lett 75, 193-198 (1992)

## I

Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF: Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. *J Dent Res* 76, 734-743 (1997)

Iontcheva I, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF: Molecular mapping of statherin- and histatin- binding domains in human salivary mucin MG1 (MUC5B) by the yeast two- hybrid system. *J Dent Res* 79, 732- 739 (2000)

## J

Jaeger T, Arsic M, Mayer C: Scission of the lactyl ether bond of N-acetylmuramic acid by *Escherichia coli* "etherase". *J Biol Chem* 280, 30100- 30106 (2005)

Jendresen MD, Glantz PO: Clinical adhesiveness of selected dental materials. An in-vivo study. *Acta Odontol Scand* 39, 39-45 (1981)

Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG: Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: A comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J Dent Res* 71, 1569-1576 (1992)

Jenkinson HF, Lamont RJ: Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 8, 175-200 (1997)

Joiner A, Schwarz A, Philpotts CJ, Cox TF, Huber K, Hannig M: The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine. *J Dent* 36, 360-368 (2008)

## K

Kadoya Y, Kuwahara H, Shimazaki M, Ogawa Y, Yagi T: Isolation of a novel carbonic anhydrase from human saliva and immunohistochemical demonstration of its related isoenzymes in salivary gland. *Osaka City Med J* 33, 99-109 (1987)

Kasemo B, Lausmaa J: Surface science aspects on inorganic biomaterials. *CRC Crit Rev Biocompat* 2, 335-380 (1986)

Kilian M, Nyvad B: Ability to bind salivary alphaamylase discriminates certain viridans group streptococcal species. *J Clin Microbiol* 28, 2576-2577 (1990)

Kirkham J, Firth A, Vernals D, Boden N, Robinson C, Shore RC et al.: Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *J Dent Res* 86, 426-430 (2007)

Kishimoto E, Hay DI, Gibbons RJ: A human salivary protein which promotes adhesion of *Streptococcus mutans* serotype c strains to hydroxyapatite. *Infect Immun* 5, 3702-3707 (1989)

Kolenbrander PE: Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 54, 413-437 (2000)

Kousvelari EE, Baratz RS, Burke B, Oppenheim FG: Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle, and glandular tissue specimens. *J Dent Res* 59, 1430-1438 (1980)

Kraus FW, Ørstavik D, Hurst DC, Cook CH: The acquired pellicle: variability and subject-dependence of specific proteins. *J Oral Pathol* 2, 165-173 (1973)

Kuboki Y, Teraoka K, Okada S: X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel. *J Dent Res* 66, 1016-1019 (1987)

Kuramitsu HK: Adherence of *Streptococcus mutans* to dextran synthesized in the presence of extracellular dextransucrase. *Infect Immuno*. 9, 764-765 (1974a)

Kuramitsu HK: Characterization of cell-associated dextransucrase from glucose-grown cells of *Streptococcus mutans*. *Infect Immuno* 10, 227-235 (1974b)

L

Laible NJ, Germaine GR: Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect Immun* 48, 270-278 (1985)

Lee SJ, Kho HS, Lee SW, Yang WS: Experimental salivary pellicles on the surface of orthodontic materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1, 59-66 (2001)

Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, Siqueira WL: Proteomic Evaluation of Acquired Enamel Pellicle during In Vivo Formation. *Plos One* 8 (2013)

Leinonen J, Kivela J, Parkkila S, Pakkila Ak, Rajaniemi H: Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle. *Caries Res* 33, 185-190 (1999)

Lenander-Lumikari M, Tenovuo J, Mikola H: Effects of a lactoperoxidase system-containing toothpaste on levels of hypothiocyanite and bacteria in saliva. *Caries Res* 27, 285-291 (1993)

Lenander-Lumikari M, Loimaranta V: Saliva and Dental Caries. *Adv Dent Res* 14, 40-47 (2000)

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG: Saliva and dental pellicle-a review. *Adv Dent Res* 14, 22-28 (2000)

Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA, Loomis RE, Bergey EJ, Jones PC, Cohen RE, Stinson MW, Al-Hashimi I: Structural aspects of salivary glycoproteins. *J Dent Res* 66, 436- 441 (1987)

Li J, Helmerhorst EJ, Corley RB, Luus LE, Troxler RF, Oppenheim FG: Characterization of the immunologic responses to human in vivo acquired enamel pellicle as a novel means to investigate its composition. *Oral Microbiol Immunol* 18, 183-191 (2003)

Li J, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG: Identification of *in vivo* pellicle constituents by analysis of serum immune responses. *J Dent Res* 83, 60-64 (2004b)

Li J, Helmerhorst EJ, Yao Y, Nunn ME, Troxler RF, Oppenheim FG: Statherin is an in vivo pellicle constituent: identification and immunoquantification. *Ach Oral Biol* 49, 379- 385 (2004a)

Lie T, Gusberti F: Dental plaque morphology as revealed by direct observation and by replicating techniques. *Acta Odontol Scand* 36, 279-288 (1978)

Lie T: Morphologic studies on dental plaque formation. *Acta Odontol Scand* 37, 73-85 (1979)

Liljemark WF, Schauer SV: Studies on the bacterial components which bind streptococcus sanguis and streptococcus mutans to hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 20, 609-615 (1975)

Liljemark WF, Schauer SV: Competitive binding among oral streptococci to hydroxyapatite. *J Dent Res* 56: 157-165 (1977)

Liljemark WF, Fenner LJ, Bloomquist CG: In vivo colonization of salivary pellicle by haemophilus, actinomyces and strepto-coccus species. *Caries Res* 20, 481-497 (1986)

Liljemark WF, Bloomquist CG: Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 7, 180-198 (1996)

Lindh L, Arnebrandt T, Isberg PE, Glantz PO: Concentration dependence of adsorption from human whole resting saliva at Solid/liquid interfaces: an ellipsometric study. *Biofouling* 14, 189-196 (1999)

Lindh L: On the adsorption behaviour of saliva and purified salivary proteins at solid/liquid interfaces. *Swed Dent J* 152 (Suppl),1-57 (2002)

Lindh L, Glantz PO, Stromberg N, Arnebrandt T: On the adsorption of human acidic Proline-rich proteins (PRP-1 and PRP-3) and statherin at solid/liquid interface. *Biofouling* 18, 87-94 (2002)

Listgarten MA, Loomer PM: Microbial identification in the management of periodontal diseases. A systematic review. *Ann Periodontol* 8, 182-192 (2003)

Lockowandt P, Loges H, Wagner IV: Restorative materials and initial pellicle formation. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 79, 147-151 (1991)

Lumikari M, Soukka T, Nurmio S, Tenovuo J: Inhibition of the growth of Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus and Lactobacillus casei by oral peroxidase systems in human saliva. *Arch Oral Biol* 36, 155-160 (1991)

## M

Mac Pherson LMD, Mac Farlane TW, Weetman, Stephen KW: Comparison of the plaque microflora from natural and appliance- borne enamel surface. *Caries Res* 25, 58-64 (1991)

Mansson-Rahemtulla B, Rahemtulla F, Baldone DC, Pruitt KM, Hjerpe A: Purification and characterization of human salivary peroxidase. *Biochemistry* 27, 233-239 (1988)

Marquis RE: Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. *J Ind Microbiol* 15, 198-207 (1995)

Marsh PD, Bradshaw DJ: Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 15, 169-175 (1995)

Marsh PD, Martin MV: *Oral Microbiology*, 4th ed. Butterworth-Heinemann. Wright, Oxford (1999)

Marsh PD: Dental plaque as a microbiol biofilm. *Caries Res* 38, 204-211 (2004)

Marsh P: Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 32 (Suppl 6), 7-15 (2005)

Marsh PD: Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health* 6, 14 (2006)

Martin MV, Dailey Y: A preliminary investigation of the microbiology and endotoxin content in the water reservoirs of benchtop non-vacuum autoclaves. *Br Dent J* 191, 622-624 (2001)

Mayer C: Wie Bakterien ihre Verpackung wiederverwerten: Mureinabbau und Recycling. *Biospektr* 5, 616-619 (2005)

Mayhall CW, Butler WT: The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. *J Oral Pathol* 5, 358-370 (1976)

Mayhall CW: Amino acid composition of experimental salivary pellicles. *J Periodontol* 2, 78-91 (1977)

Mayhall CW: Nonmineralized coverings of the enamel surface. Menaker L (ed): The biologic basis of dental caries. 1. Aufl.,(Harper and Row, Publishers Inc., Hagerstown): 148-166 (1980)

McDonald EE, Goldberg HA, Tabbara N, Mendes FM, Siqueira WL: Histadin 1 resists proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. J Dent Res 90, 268- 272 (2011)

Meryon SD, Johnson SG: The modified model cavity method for assessing antibacterial properties of dental restorative materials. J Dent Res 68, 835-839 (1989)

Moore WE, Moore LV: The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 5, 66-77 (1994)

Morge S, Adamczak E, Linden LA: Variation in human salivary pellicle formation on biomaterials during the day. Arch Oral Biol 34, 669-674 (1989)

Morishita Y, Iinuma Y, Nakashima N, Majima K, Mizuguchi K, Kawamura Y: Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O-beta-D-galactopyranosylmaltoside. Clin Chem 46, 928-933 (2000)

Müller R, Hiller KA, Schmalz G, Ruhl S: Chemiluminescence- based detection and comparison of protein amounts adsorbed on differently modified silica surfaces. Anal Biochem 359, 194-202 (2006)

N

Nekrashevych Y, Stösser L: Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. Caries Res 37, 225-231 (2003)

Nekrashevych Y, Hannig M, Stösser L: Assessment of enamel erosion and protective effect of salivary pellicle by surface roughness analysis and scanning electron microscopy. Oral Health Prev Dent 2, 5-11 (2004)

Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M: A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. Arch Oral Biol 43, 277-285 (1998)

Nikiforuk G: Understanding dental caries. Vol. 1. Etiology and mechanisms. Basic and clinical aspects. 1. Aufl., Karger, Basel. 253-256 (1985)

Norde W: Adsorption of biopolymers and its relevance for particle adhesion: a physico-chemical approach. In: Ten Cate JM, Leach SA, Arends J bacterial adhesion and preventive dentistry. 1. Aufl., IRL Press Ltd., Oxford 1-17 (1984)

Nunez LF, Schmalz G , Hembree JH: Influence of amalgam, alloy and Hg on the in vitro growth of streptococcus mutans: III. Effect of specimen age and composition. J Dent Res 55, 1001- 1003 (1976)

Nyvad B, Fejerskov O: Experimentally induced changes in ultrastructure of pellicle and microbial colonization on enamel in vivo. In: Ten Cate JM, Leach SA, Arends J: bacterial adhesion and preventive dentistry. 1. Aufl., IRL Press, Oxford, S. 143-151 (1984)

Nyvad B, Fejerskov O: Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. Scand J Dent Res 95, 287-296 (1987)

Nyvad B, Fejerskov O: Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. Scand J Dent Res 95, 297-307 (1987)

O

Ørstavik D, Kraus FW: The acquired pellicle: immunofluorescent demonstration of specific proteins. J Oral Pathol 2, 68-76 (1973)

Ørstavik D, Kraus FW: The acquired pellicle: enzyme and antibody activities. Scand J Dent Res 82, 202-205 (1974)

Ørstavik D, Kraus FW, Henshaw LC: In vitro attachment of streptococci to the tooth surface. Infect Immun 9, 794-800 (1974)

Ørstavik D, Hensten-Pettersen A: Antibacterial activity of tooth-colored dental restorative materials. J Dent Res 57, 171-175 (1978)

Oste R, Ronstrom A, Birkhed D, Edwardsson S, Stenberg G: Gas-liquid chromatographic analysis of amino acids in pellicle formed on tooth surface and plastic films in vivo. *Arch Oral Biol* 26, 635-641 (1981)

## P

Pakkila S, Kaunisto K, Rajaniemi H: Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. *J Histochem Cytochem* 38, 941-947 (1990)

Pratt-Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ: The effects of pellicle formation on streptococcal adhesion to human enamel and artificial substrata with various surface free-energies. *J Dent Res* 68, 463-467 (1989)

Pruitt KM, Caldwell RC, Jamieson AD, Taylor RE: The interaction of salivary proteins with tooth surface. *J Dent Res* 48, 818-823 (1969)

## Q

Quirynen M, Van Steenberghe D: Is early plaque growth rate constant with time? *J Clin Periodontol* 16, 278-283 (1989)

Quirynen M, Dekeyser C, Van Steenberghe D: The influence of gingival inflammation tooth type and timing on the rate of plaque formation. *J Periodontol* 62, 219-222 (1991)

Quirynen M, Bollen CM: The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodont* 22, 1-14 (1995)

## R

Richardson CF, Johnsson M, Raj PA, Levine MJ, Nancollas GH: The influence of histatin-5 fragments on the mineralization of hydroxyapatite. *Ach Oral Biol* 38, 997-1002 (1993)

Robinson C, Strafford S, Rees G, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Watson PS, Wood S: Plaque biofilms: the effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture. *Arch Oral Biol* 51, 1006-1014 (2006)

Rogers JD, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE, Scannapieco FA: Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect Immun* 69, 7046-7056 (2001)

Rølla G, Ciardi JE, Bowen WH: Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin, alpha-amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva. *Scand J Dent Res* 91, 186-190 (1983)

Rølla G, Rykke M: Evidence for presence of micelle-like protein globules in human saliva. *Coll Surf B Bioint* 3, 177-182 (1994)

Ruan MS, Di Paola C, Mandel ID: Quantitative immunochemistry of salivary proteins adsorbed in vitro to enamel and cementum from caries-resistant and caries-susceptible human adults. *Arch Oral Biol* 31, 597-601 (1986)

Rüdiger SG, Carlén A, Meurman JH, Kari K, Olsson J: Dental biofilms at healthy and inflamed gingival margins. *J Clin Periodontol* 29, 524-530 (2002)

Rykke M, Sønju T, Rølla G: Interindividual and longitudinal studies of amino acid composition of pellicle collected in vivo. *Scand J Dent Res* 98, 129-134 (1990)

Rykke M, Sønju T: Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected in vivo after 2 hours and after 24 hours. *Scand J Dent Res* 99, 463-469 (1991)

Rykke M, Smistadt G, Rølla G, Karlsen J: Micellelike structures in human saliva. *Coll Surf B Bioint* 4, 33-40 (1995)

Rykke M, Young A, Rølla G, Devold T, Smistad G: Transmission electron microscopy of human saliva. *Coll Surf B Bioint* 9, 257-267 (1997)

## S

Sbordone L, Bortolaia C: Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig* 7, 181-188 (2003)

Scannapieco FA, Bergey EJ, Reddy MS, Levine MJ: Characterization of salivary alpha-amylase binding to *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun* 57, 2853-2863 (1989)

Scannapieco FA, Bhandary K, Ramasubbu N, Levine MJ: Structural relationship between the enzymatic and streptococcal binding sites of human salivary alpha-amylase. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 1109-1115 (1990)

Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ: Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 4, 301-307 (1993)

Scannapieco FA: Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* 5, 203-248 (1994)

Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ: Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J Dent Res* 74, 1360-1366 (1995)

Schade R: Entwicklung eines *in vitro*- Systems zur Prüfung der initialen Plaqueadhärenz an dentalen Biomaterialien. Naturw Diss, Universität Jena (2005)

Scheie AA, Rølla G: Cell-free glucosyltransferase in saliva. *Caries Res* 20, 344-348 (1986)

Scheie AA, Eggen KH, Rølla G: Glucosyltransferase activity in human *in vivo* formed enamel pellicle and in whole saliva. *Scand J Dent Res* 95, 212-215 (1987)

Scheie AA: Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 8, 246-253 (1994)

Schilling KM, Bowen WH: Glucans synthesized *in situ* in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for streptococcus mutans. *Infect Immun* 60, 284-295 (1992)

Schüle H: Chemische Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften des Schmelzoberhäutchens. Arch Oral Biol 4, 40-49 (1961)

Schüle H: Das Schmelzoberhäutchen. Untersuchungen über die morphologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften. Thieme, Stuttgart - New York (1962)

Schüle H: The enamel cuticle in incipient caries, morphological and biochemical investigations. Int Dent J 13, 465-470 (1963)

Schüpbach P, Neeser JR, Golliard M, Rouvet M, Guggenheim B: Incorporation of caseinoglycomacropeptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutans streptococci. J Dent Res 75, 1779-1788 (1996)

Siegrist BE, Brex MC, Gusberti FA, Joss A, Lang NP: In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study. Clin Oral Implants Res 2, 38-46 (1991)

Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE: New insights into the composition and functions of acquired enamel pellicle. J Dent Res 91, 1110-1118 (2012)

Siqueira WL, Oppenheim FG: Small molecular weight proteins/peptides present in the vivo formed human acquired enamel pellicle. Arch Oral Biol. 54, 437-444 (2009)

Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM, Oppenheim FG: Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle. J Dent Res 89, 626-630 (2010)

Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG: Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. J Proteome Res 6, 2152-2160 (2007)

Skjörland KK, Rykke M, Sønju T: Rate of pellicle formation in vivo. Acta Odontol Scand 53, 358-362 (1995)

Slomiany BL, Murty VL, Zdebska E, Slomiany A, Gwozdziński K, Mandel ID: Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. Arch Oral Biol 31, 187-191 (1986)

Slomiany BL, Murty VL, Mandel ID, Sengupta S, Slomiany A: Effect of lipids on the lactic acid retardation capacity of tooth enamel and cementum pellicles formed in vitro from saliva of caries-resistant and caries-susceptible human adults. Arch Oral Biol 35, 175-180 (1990)

Soares RV, Lin T, Siqueira CC, Bruno LS, Li X, Oppenheim FG, Offner G, Troxler RF: Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated prolinerich protein and lysozyme. Arch Oral Biol 49, 337-343 (2004)

Sønju Clasen AB, Hannig M, Skjørland K, Sønju T: Analytical and ultrastructural studies of pellicle on primary teeth. Acta Odontol Scand 55, 339-343 (1997)

Sønju T, Christensen TB, Kornstad L, Rølla G: Electron microscopy, carbohydrate analyses and biological activities of the proteins adsorbed in two hours to tooth surfaces *in vivo*. Caries Res 8, 113-122 (1974)

Sønju T, Rølla G: Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. Caries Res 7, 30-38 (1973)

Sreebny LM: Sugar and human dental caries. World Rev Nutr Diet 40, 19-65 (1982)

Steele WF, Morrison M: Antistreptococcal activity of lactoperoxidase. J Bacteriol 97, 635-639 (1969)

Steinberg D, Eyal S: Early formation of Streptococcus sobrinus biofilm on various dental restorative materials. J Dent 30, 47-51 (2002)

Sutherland I: Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 147, 3-9 (2001)

Stigler R, Carlén A, Nagursky H, Hannig M: Composition of the salivary pellicle formed in eight different locations of the dentition. J Dent Res, B-217 (2003)

Svendsen IE, Arnebrant T, Lindh L: Validation of mechanically- assisted sodium dodecylsulphate elution as a technique to remove pellicle protein components from human enamel. Biofouling 24, 227-33 (2008)

Svendsen IE, Lindh L: The composition of enamel salivary films is different from the ones formed on dental materials. *Biofouling* 25 (3), 255-61 (2009)

Szymańska J: Electron microscopic examination of dental unit waterlines biofilm. *Ann Agric Environ Med* 12, 295-298 (2005)

Szymańska J: Bacterial contamination of water in dental unit reservoirs. *Ann Agric Environ Med* 14, 137-140 (2007)

## T

Tabak LA: In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol* 57, 547- 564 (1995)

Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA: Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol* 11, 1-17 (1982)

Tamaki N, Tada T, Morita M, Watanabe T: Comparison of inhibitory activity on calcium phosphate precipitation by acidic proline-rich proteins, statherin, and histatin-1. *Calcif Tissue Int* 71, 59-62 (2002)

Tinanoff N, Brady JM, Gross A: The effect of NaF and SnF<sub>2</sub> mouthrinses on bacterial colonization of tooth enamel. TEM and SEM studies. *Caries Res* 10, 415- 426 (1976a)

Tinanoff N, Glick PL, Weber DF: Ultrastructure of organic films on the enamel surface. *Caries Res* 10, 19-32 (1976b)

Tinanoff N, Gross A, Brady JM: Development of plaque on enamel. Parallel investigations. *J Periodontol Res* 11, 197-209 (1976c)

## V

Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Quivey RG, Bowen WH: Interactions of streptococcal glucosyltransferases with alpha-amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 41, 291-298 (1996a)

Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Schilling KM, Bowen WH: Characterization of glycosyltransferase of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surfaces. *Caries Res* 30, 354-360 (1996b)

Vacca-Smith AM, Bowen WH: *In situ* studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 45, 277-291 (2000)

Van der Velden U, Abbas F, Armand S, Loos BG, Timmerman MF, Van der Weijden GA, Van Winkelhoff AJ, Winkel EG: Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. *J Clin Periodontol* 33, 540-548 (2006)

Van Dijk L, Herkströter F, Busscher h, weerkamp AH, Jansen HWB, Arends J: Surface free energy and bacterial adhesion- an in vivo study with beagle dogs. *J Clin Periodontol* 14, 300-304 (1987)

Van Dijk L, Golsweer R, Busscher HJ: Interfacial free energy as a driving force for pellicle formation in the oral cavity: an in vivo study in beagle dogs: *Biofouling* 1, 19-25 (1988)

Vassilakos N, Arnebrant T, Glantz PO: Adsorption of whole saliva onto hydrophilic and hydrophobic solid surfaces: influence of concentration, ionic strength and pH. *Scand J Dent Res* 100, 346-353 (1992)

Vassilakos N, Arnebrant T, Rundegren J, Glantz PO: *In vitro* interactions of anionic and cationic surfactants with salivary fractions on well-defined solid surfaces. *Acta Odontol Scand* 50, 179-188 (1992)

Vassilakos N, Rundegren J, Arnebrant T, Glantz PO: Adsorption from salivary fractions at solid/liquid and air/liquid interfaces. *Arch Oral Biol* 37, 549-557 (1992)

Vassilakos N, Arnebrandt T, Glantz PO: An in vitro study of salivary film formation at solid/liquid interfaces. *Scand J Dent Res* 101, 133-137 (1993)

Vitkov L, Hannig M, Nekrashevych Y, Krautgartner WD: Supramolecular pellicle precursors. *Eur J Oral Sci* 112, 320-325 (2004)

Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Williams J, Ferrer-Correia AJ, Tomer KB, Duarte JA, Domingues PM, Amado FML: Peptidomic analysis of human acquired enamel pellicle. *Biomed Chromatogr* 21, 1107-1117 (2007)

Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Duarte JA, Domingues PM, Amado FML: Peptide profile of human acquired enamel pellicle using MALDI tandem MS. *J Sep Sci* 31, 523-537 (2008)

W

Walker JT, Bradshaw DJ, Bennett AM, Fulford MR, Martin MV, Marsh PD: Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Appl Environ Microbiol* 66, 3363-3367 (2000)

Wang YB, Germaine GR: Effects of pH, potassium, magnesium, and bacterial growth phase on lysozyme inhibition of glucose fermentation by *Streptococcus mutans* 10449. *J Dent Res* 72, 907-911 (1993)

Weiger R, Netuschil L, von Ohle C, Schlagenhaut U, Brex M: Microbial generation time during the early phases of supragingival dental plaque formation. *Oral Microbiol Immunol* 10, 93-97 (1995)

Weyland M: Elektrophoretische Untersuchungen der Speichelproteinadsorption (und initialen Biofilmbildung) auf Festkörperoberflächen in der Mundhöhle. *Med Diss, Homburg* (2010)

Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE: Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50: 513-552 (1996)

Wolinsky LE, Seto B, Cerveny R: Effect of saliva substitutes upon binding of selected oral bacteria to hydroxyapatite. *Caries Res* 19, 507-511 (1985)

Y

Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG: Pellicle precursor proteins: acidic proline-rich proteins, statherin, and histatins, and their crosslinking reaction by oral transglutaminase. *J Dent Res* 78, 1696-1703 (1999)

Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG: Pellicle precursor protein crosslinking characterization of an adduct between acidic proline-rich protein (PRP-1) and statherin generated by transglutaminase. *J Dent Res* 79, 930-938 (2000)

Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, Costello CE, Oppenheim FG: Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol* 46, 293-303 (2001)

Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG: Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem* 278, 5300-5308 (2003)

Young A, Rykke M, Rølla G: Quantitative and qualitative analyses of human salivary micelle-like globules. *Acta Odontol Scand* 57, 105-110 (1999)

Z

Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ: Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization *in vitro*. *J Dent Res* 55, 664-670 (1976)

Zahradnik RT, Propas D, Moreno EC: Effect of salivary pellicle formation time on *in vitro* attachment and demineralization by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 57, 1036-1042 (1978)

Zahradnik RT: Modification by salivary pellicles of *in vitro* enamel remineralization. *J Dent Res* 58, 2066-2073 (1979)

## 7. Materialliste

- Mat. 1** blend-a-print Elastic-Alginat, blend-a-med Forschung Procter & Gamble GmbH, Schwalbach, Deutschland
- Mat. 2** ESPE Impresept®, Espe Dental- Medizin GmbH & Co. KG, Seefeld, Deutschland
- Mat. 3** Superhartgips, GC Fujirock®, G-C Dental Ind. Corp., Tokyo, Japan
- Mat. 4** Hartgips Moldano® blau stone Typ S, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland
- Mat. 5** Tiefziehplatten Scheu Duran® 1,0 × 125mm, Scheu- Dental GmbH, Hanau, Deutschland
- Mat. 6** Diamantierte Trennscheibe Horico H 350220, Horico, Berlin, Deutschland
- Mat. 7** Rosenbohrer H1SE, Brasseler GmbH & Co. KG, Lemgo, Deutschland
- Mat. 8** Erkodent erkopress® ES 2004, Erkodent Erich Kopp GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland
- Mat. 9** Titanprüfkörper Frios® 10-5010, FRIADENT GmbH, Mannheim, Deutschland
- Mat. 10** Amalgamprüfkörper ORALLOY MAGICAP S, coltène® AG, Altstätten, Schweiz
- Mat. 11** Keramikprüfkörper CEREC® VITABLOCKS® Mark II, Vita Zahnfabrik Rauter GmbH & Co. KG, Bad Säckingen, Deutschland
- Mat. 12** Glasprüfkörper Objektträger 76 × 26mm, Menzel Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
- Mat. 13** Kunststoffprüfkörper Palapress®, Heraeus- kulzer GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland
- Mat. 14** Glasionomermertmentprüfkörper 3M ESPE Ketac™ Fil Plus Aplicap™, 3M ESPE AG, Seefeld, Deutschland
- Mat. 15** Teflonprüfkörper aus Teflonschablone, unbekannter Hersteller
- Mat. 16** Schmelzprüfkörper, frisch extrahierten Rinderschneidezähne
- Mat. 17** Goldprüfkörper Bio Herador® N, Heraeus- Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland
- Mat. 18** Kompositprüfkörper XRV™ Herculite®, Kerr Italia S. p. A. Scafati, Italien
- Mat. 19** UV- Lampe Astralis 5, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein
- Mat. 20** Liebherr premium, Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
- Mat. 21** Gripo Schleif- und Poliermaschine, Metkon® Gripo 2V, Bursa, Türkei
- Mat. 22** Schleifpapier MICRO CUT®, Buehler®, Düsseldorf, Deutschland
- Mat. 23** Auflicht Stereo Zoom Mikroskop Motic® Deutschland GmbH, Wetzlar,

- Deutschland
- Mat. 24** Alkohol Ethanol 70%, Apotheke in den Univ. Kliniken des Saarlandes, Deutschland
- Mat. 25** Aqua Spüllösung, Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland -Roth Rotilabo® Spritzflasche, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Mat. 26** Bandelin Sonorex Super, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
- Mat. 27** Natriumhypochlorit 1% + 3%, A. Hedinger GmbH, Stuttgart, Deutschland
- Mat. 28** Peha- Soft®, Einmal- Untersuchungshandschuhe, puderfrei, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
- Mat. 29** PRESIDENT PLUS light body Abformmasse, coltène® AG, Altstätten, Schweiz
- Mat. 30** Kettenbach Applifix 2, Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg, Deutschland
- Mat. 31** Mixing Tips, coltène® AG, Altstätten, Schweiz
- Mat. 32** KaVo ESTTETICA Sensus 1066 T, KaVo Dental GmbH, Biberach, Deutschland
- Mat. 33** Schaumstoffpellete Pele Tim No. 0, VOCO GmbH, Cuxhaven, Deutschland
- Mat. 34** Teflonpinzette T519, Plano, Wetzlar, Deutschland
- Mat. 35** Anatomische Pinzette, gerade, Standard 14,5 cm, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
- Mat. 36** Heidemannspatel DE420R, 2,0 mm, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
- Mat. 37** Druckluftspray 67 Super, 200ml, CRC- Kontaktchemie
- Mat. 38** Natriumlaurylsulfat Lösung 2%, Apotheke d. Unikliniken d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- Mat. 39** SDS, Dodecylsulfate Na-salt, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Mat. 40** Eppendorf Reference 1-10µl, 10-100µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Mat. 41** ratiolab® Pipettenspitzen, Müller, Dreieich, Deutschland
- Mat. 42** Reagiergefäße Mikrotubes 1,5ml, 39 x 10mm, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
- Mat. 43** Herma Haftetiketten 12 x 18mm, Herma GmbH, Stuttgart, Deutschland
- Mat. 44** Hereaus Herafreeze HFC 286 Basic, Kendro, Hanau, Deutschland
- Mat. 45** Julabo MWB, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
- Mat. 46** Lämmli-Puffer, Eigenherstellung Med. Biochemie, Universität d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- Mat. 47** Vortex Genie 2, Scientific Industries INC., Bohemia, N.Y., 11716, USA

- Mat. 48** Zahnsonde Nr. 9, gerade, Omnident® Dentalhandelsgesellschaft GmbH, Rodgau, Deutschland
- Mat. 49** Biofuge Primo, Heraeus, Kendro Laboratory products GmbH, Hanau, Deutschland
- Mat. 50** Beckmann Mikrofuge® Tubes 1,5ml, Beckmann instruments, Inc. Palo Alto, USA
- Mat. 51** Trichloressigsäure p. A., MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 52** neolab® Eisbad 1-6031, Laborspezialprodukte, neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Mat. 53** Eppendorf Centrifuge 5402, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Mat. 54** Aceton p. A., MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 55** Sockel mit Hohlfräsung für Elektrophoresegele, Eigenbau Med. Biochemie, Univ. d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- Mat. 56** Glasplatten für Elektrophoresegele, Glaserei Peter Wenzel, München, Deutschland
- Mat. 57** Teflonspacer für Elektrophoresegele, Mauly® Foldback- Klemmer 51, Jakob Maul GmbH, Kirchen, Deutschland
- Mat. 58** 21er Teflonkamm für Elektrophoresegele, Eigenbau Med. Biochemie, Univ. d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- Mat. 59** Bacto- Agar, DIFCO Laboratories, Detroit, USA
- Mat. 60** Mikrowelle Intellowave LG MS-197H, LG Electronics Deutschland GmbH, Willich, Deutschland
- Mat. 61** Becherglas, Schott Duran, Schott AG, Mainz, Deutschland
- Mat. 62** VWR™ Magnetrührstäbchen, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 63** Magnetrührer IKA Combimag RCT, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen Breisgau, Deutschland
- Mat. 64** Acrylamid 4 x 40%, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Mat. 65** Acrylamid 30%, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Mat. 66** Bisacrylamid 2%, sterilfiltriert, N' N-Methylene-bisacrylamide 2x2%, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Mat. 67** 1,875 M Tris pH 8,8 mit HCL, Tris(hydroxymethyl)aminomethan, MERCK KG aA, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 68** Millipore-H2O, Milli Q® Water purification system, Millipore Corporation, Bedford Massachusetts, USA
- Mat. 69** TEMED , N, N, N', N'- Tetramethyldiamin, SERVA Electrophoresis GmbH,

- Heidelberg, Deutschland
- Mat. 70** 20% AMPS, Amoniumpersulfat, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Mat. 71** 1-Butanol, MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 72** Filterpapier, Whatman®, Schleicher & Schuell®, Dassel, Deutschland
- Mat. 73** Glaspipetten 5 + 10 ml, Hirschmann® EM Techcolor, Hirschmann® Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
- Mat. 74** Pipettierhilfe, Automatic Sarpette® DESAGA, Sarstedt Gruppe Drummond scientific Co. Broomall, PA., USA
- Mat. 75** 1M Tris pH 6,8, aus Tris(hydroxymethyl)aminomethan, MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 76** Parafilm "M"® Laboratory Film, American CAN COMPANY, Greenwich, Großbritannien
- Mat. 77** Eppendorf Centrifuge 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Mat. 78** Eppendorf Thermostat 5320, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Mat. 79** Elektrophoreseapparatur, Eigenbau Med. Biochemie, Univ. d. Saarlandes, Homburg
- Mat. 80** Stromgeber, Pharmacia Biotech Electrophoresis Power Supply EPS 3500, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
- Mat. 81** Laufpuffer, Eigenherstellung Med. Biochemie, Universität d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- Mat. 82** Hamilton Microliter® Syringe, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
- Mat. 83** BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Mat. 84** Coomassiefärbelösung, Eigenherstellung Med. Biochemie, Universität d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- Brilliant Blue G, SIGMA- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- SERVA Blue R, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Mat. 85** Kreis-Schüttler, GFL 3019, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwendel, Deutschland
- Mat. 86** Entfärber I, Eigenherstellung Med. Biochemie, Universität d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- Mat. 87** Entfärber II, Eigenherstellung Med. Biochemie, Universität d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- Mat. 88** Ethanol 99%, Zentrales Chemikalienlager Universität d. Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
- Mat. 89** Essigsäure 99%, Zentrales Chemikalienlager Universität d. Saarlandes,

- Saarbrücken, Deutschland
- Mat. 90** Glutardialdehyd 25%, MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
- Mat. 91** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 12,5%, Natriumcarbonat, MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 92** Silbernitrat p.A., MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 93** Formaldehyd 37%, MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 94** Glycerin 87%, MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 95** Rocky® Wippe, Typ RT-1S, Fröbel Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
- Mat. 96** Cellophanfolie 0,023 mm, Pütz Folien, Taunusstein Wehen, Deutschland
- Mat. 97** Trockenrahmen, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
- Mat. 98** Durchlichtscanner Epson Expression 1680 Pro, Seiko Epson® Corp., Japan
- Mat. 99** ImageMaster™ LabScan Version 3.01  
Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden
- Mat. 100** ImageMaster™ 1D Elite Version 4.10c  
Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden
- Mat. 101** Sartorius BP 4100 Laborwaage, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- Mat. 102** Glycin krist. H<sub>2</sub>N CH<sub>2</sub> COOH, MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 103** frema Reform Instant- Magermilchpulver, Reformhaus
- Mat. 104** Falcon- Röhrchen 50ml, 115x28mm, steril, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
- Mat. 105** 1xTBS, Eigenherstellung Med. Biochemie, Universität d. Saarlandes,  
Homburg, Deutschland
- Mat. 106** 1xTBST, Eigenherstellung Med. Biochemie, Universität d. Saarlandes,  
Homburg, Deutschland
- Mat. 107** Greiner, Taumel- Rollenmischer, LABCON GmbH, Heppenheim, Deutschland
- Mat. 108** PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon- Rot,  
Deutschland
- Mat. 109** Kaleidoscope™ Prestained Standard, Bio-Rad München, Deutschland
- Mat. 110** Immunglobulin A (IgA) (sheep), BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln,  
Deutschland
- Mat. 111** Mucin 1 (MUC-1) (mouse), BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln,  
Deutschland
- Mat. 112** Carbonic Anhydrase 1 (CA1) (sheep), BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln,  
Deutschland
- Mat. 113** Carbonic Anhydrase 2 (CA2) (sheep), BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln,  
Deutschland
- Mat. 114** Lactoferrin (sheep), BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
- Mat. 115** Amylase (sheep), BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland

- Mat. 116** Lysozyme (muramidase) (sheep), BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
- Mat. 117** Glykosyltransferase B (rabbit), BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
- Mat. 118** Glykosyltransferase C (rabbit), BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
- Mat. 119** Glykosyltransferase D (rabbit), BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
- Mat. 120** PRP (goat)
- Mat. 121** Methanol 100%, Zentrales Chemikalienlager Universität d. Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
- Mat. 122** Blot- Kassette, Mini Trans- Blot™, BioRad München, Deutschland
- Mat. 123** PVDF- Membran, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Mat. 124** Ponceau S, Sigma- Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Mat. 125** Röhre 15ml, 120x17 mm, steril, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
- Mat. 126** Variomag Electronicrührer MULTIPOINT HP, H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Germany
- Mat. 127** Kühlung Pharmacia LKB, Multi Temp II, Amersham Pharmacia Biotech, Upsala Schweden
- Mat. 128** Blotkammer Trans- Blot® Cell, BioRad, München, Deutschland
- Mat. 129** Electrophoresis Power Supply- EPS 600, Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden
- Mat. 130** Amersham Hyperfilm™ ECL (High performance chemiluminescence film), Amersham Biosciences, GE Healthcare, Japan
- Mat. 131** Hyperkassette™, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
- Mat. 132** Amersham™ ECL™ (Western Blotting Detection Reagent), Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
- Mat. 133** Tischentwicklungsmaschine, Curix 60, AGFA, Siemens Healthcare, Deutschland
- Mat. 134** 1,5M Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 135** 0,5M Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland

## 8. Anhang

**Tab. 1: Rezept zur Herstellung des Lämmli- Puffers**

Stammlösung	1fach	2fach	5fach
2M Tris pH 6,8	3,0 ml	6,0 ml	15,0 ml
10% SDS	20,0 ml	40,0 ml	100 ml
87% Glycerin	11,5 ml	23,0 ml	57,7 ml
ad H <sub>2</sub> O	95,0 ml	90,0 ml	75,0 ml
	davon	davon	davon
Gebrauchslösung	9,5 ml	9,0 ml	7,5 ml
β- Mercaptoethanol	500 µl	1,0 ml	2,5 ml
Bromphenolblau	nach Bedarf	nach Bedarf	nach Bedarf
	~2 Kristalle	~2 Kristalle	~2 Kristalle

(Mat. 46)

**Tab. 2: Rezept zur Herstellung der Trenngele**

Trenngel	Stock	1 Gel	2 Gele	3 Gele	4 Gele	5 Gele	6 Gele
10%	40% Acrylamid (ml)	3,75	7,5	11,25	15	18,75	22,5
12,50%		4,69	9,38	14,07	18,76	23,45	28,14
15%		5,63	11,26	16,89	22,52	28,15	33,78
17,50%		6,56	13,12	19,68	26,24	32,8	39,36
10%	2% Bisacrylamid (ml)	1	2	3	4	5	6
12,50%		1,25	2,5	3,75	5	6,25	7,5
15%		1,5	3	4,5	6	7,5	9
17,50%		1,76	3,52	5,28	7,04	8,8	10,56
10,00%	Wasser (ml)	4,05	8,1	12,15	16,2	20,25	24,3
12,50%		2,86	5,72	8,58	11,44	14,3	17,16
15%		1,67	3,34	5,01	6,68	8,35	10,02
17,50%		1,39	2,78	4,17	5,56	6,95	8,34
	1,875M Tris pH 8,8 (ml)	6	12	18	24	30	36
	10% SDS (µl)	150	300	450	600	750	900
	20% AMPS (µl)	45	90	135	180	225	270
	TEMED (µl)	5	10	15	20	25	30
Endvolumen ( ml )		15	30	45	60	75	90

**Tab. 3: Rezept zur Herstellung der Sammelgele**

Sammelgel	Bestandteile	1	2	3	4	5	6
5%	40% Acrylamid (ml)	0,9	1,8	2,7	3,6	4,5	5,4
	2% Bisacrylamid (ml)	0,24	0,48	0,72	0,96	1,2	1,44
	Wasser (ml)	5,01	10,02	15,03	20,04	25,05	30,06
	1M Tris pH 6,8 (ml)	0,9	1,8	2,7	3,6	4,5	5,4
	10% SDS (µl)	72	144	216	288	360	432
	20% AMPS (µl)	67,5	135	202,5	207	337,5	405
	TEMED (µl)	10,5	21	31,5	42	52,5	63
	Gesamtvolumen	7,2	14,4	21,6	28,8	36	43,2

**Tab. 4: Rezept zur Herstellung von Coomassielösung**

Coomassiefärbung	
0,2% Coomassie R250	1,000 g
0,005% Coomassie G250	0,025 g
40% Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O dest.	120 ml
10% Essigsäure	50 ml
ad 500 ml H <sub>2</sub> O bid.	

**Tab. 5: Rezept zur Herstellung von Entfärber I**

Entfärber I	für 8l
10% Eisessig technisch	800 ml
40% Methanol	3200 ml
H <sub>2</sub> O dest.	3840 ml
87% Glycerin 2%	180 ml

**Tab. 6: Rezept zur Herstellung von Entfärber II**

Entfärber II	für 8 l
5% Eisessig technisch	400 ml
10% Methanol	800 ml
H <sub>2</sub> O dest.	6620 ml
87% Glycerin 2%	180 ml

**Tab. 7: Rezepte zur Herstellung der Färbelösungen**

2	Ethanol 99% (Mat. 88)	250 ml
	Essigsäure 99% (Mat. 89)	50 ml
	Millipore H <sub>2</sub> O	200 ml
4	Glutardialdehyd (Mat. 90)	150 ml
	Millipore H <sub>2</sub> O	300 ml
5	Millipore H <sub>2</sub> O	600 ml
6	Silbernitrat (Mat. 92)	2,5 g
	Millipore H <sub>2</sub> O	1000 ml
7	Natriumcarbonat 12,5% (Mat. 91)	100 ml
	Millipore H <sub>2</sub> O	400 ml
	Formaldehyd 37% (Mat. 93)	200 µl
8	Essigsäure 99%	25 ml
	Millipore H <sub>2</sub> O	475 ml
9	Essigsäure 99%	50 ml
	Glycerin 87% (Mat. 94)	28,7 ml
	Millipore H <sub>2</sub> O	421,3 ml

**Tab. 8: Einwirkzeiten der Färbelösungen**

Lösung	Einwirkzeit
2	5 min
4	6 min
5	2x2 min
6	30 min
5	2x2 min
7	ca. 15 min optische Kontrolle
8	2 min
9	ca. 10 min
Millipore H <sub>2</sub> O mit Glycerin	

**Tab. 9: Rezept zur Herstellung der Biorad- Gele**

10% Gele (2x) Biorad	
Trenngel	Sammelgel (5%)
4,00 ml H <sub>2</sub> O	2,693 ml H <sub>2</sub> O
3,30 ml 30% Acrylamid	1,007 ml 30% Acrylamid
2,50 ml 1,5M Tris	1,250 ml 0,5 M Tris
100 µl 10% SDS	50 µl 10% SDS
5 µl TEMED	10 µl TEMED
50 µl AMPS	25 µl AMPS

**Tab. 10: Bandenzahl der Pellikelproben von Proband 1 in Abhängigkeit von Werkstoff, Expositionszeit und Lokalisation.**

Bandenzahl Proband 1 (männl.)							
Zeit		1 min		3 min		30 min	
Lokalisation		bukkal	lingual	bukkal	lingual	bukkal	lingual
Werkstoff	Gold	20	25	26	21	25	24
	Keramik	22	29	24	18	24	26
	Teflon	21	24	22	22	23	25
	Kunststoff	24	26	24	28	28	25
	Schmelz	20	26	16	19	24	25
	Titan	22	27	27	31	25	29
	Glas	22	23	17	24	29	23
	Komposit	22	25	22	26	26	23
	GIZ	22	22	28	23	28	22
	Amalgam	24	21	27	21	26	22

**Tab. 11: Bandenzahl der Pellikelproben von Proband 2 in Abhängigkeit von Werkstoff, Expositionszeit und Lokalisation.**

Bandenzahl Proband 2 (weibl.)							
Zeit		1 min		3 min		30 min	
Lokalisation		bukkal	lingual	bukkal	lingual	bukkal	lingual
Werkstoff	Gold	24	16	18	29	18	24
	Keramik	27	27	20	25	31	28
	Teflon	30	25	27	25	32	40
	Kunststoff	30	29	30	33	37	37
	Schmelz	26	25	23	22	31	28
	Titan	27	30	26	23	35	38
	Glas	27	22	33	27	27	22
	Komposit	25	20	34	24	27	25
	GIZ	25	23	23	23	24	22
	Amalgam	23	22	24	23	27	23

**Tab. 12: Bandenzahl der Pellikelproben von Proband 3 in Abhängigkeit von Werkstoff, Expositionszeit und Lokalisation.**

Bandenzahl Proband 3 (männl.)							
Zeit		1 min		3 min		30 min	
Lokalisation		bukkal	lingual	bukkal	lingual	bukkal	lingual
Werkstoff	Gold	20	29	27	27	26	26
	Keramik	26	29	23	31	26	30
	Teflon	25	28	26	28	30	29
	Kunststoff	32	32	25	28	28	33
	Schmelz	23	29	21	27	27	28
	Titan	27	28	23	28	26	29
	Glas	29	28	25	25	27	29
	Komposit	29	32	26	27	28	30
	GIZ	24	30	27	26	26	28
	Amalgam	26	28	25	28	28	28

**Tab. 13: Bandenzahl der Pellikelproben von Proband 4 in Abhängigkeit von Werkstoff, Expositionszeit und Lokalisation.**

Bandenzahl Proband 4 (weibl.)							
Zeit		1 min		3 min		30 min	
Lokalisation		bukkal	lingual	bukkal	lingual	bukkal	lingual
Werkstoff	Gold	29	24	21	20	24	27
	Keramik	27	25	19	25	28	28
	Teflon	28	29	21	20	27	25
	Kunststoff	26	26	22	25	27	28
	Schmelz	27	27	25	22	26	22
	Titan	25	26	24	22	28	29
	Glas	24	28	25	21	29	27
	Komposit	28	25	23	21	30	27
	GIZ	26	25	25	21	30	26
	Amalgam	28	25	25	19	26	25

**Tab. 14: Bandenzahl der Pellikelproben von Proband 5 in Abhängigkeit von Werkstoff, Expositionszeit und Lokalisation.**

Bandenzahl Proband 5 (männl.)							
Zeit		1 min		3 min		30 min	
Lokalisation		bukkal	lingual	bukkal	lingual	bukkal	lingual
Werkstoff	Gold	27	24	28	28	24	29
	Keramik	25	25	30	31	22	26
	Teflon	31	22	32	31	26	27
	Kunststoff	30	28	34	31	29	26
	Schmelz	24	23	26	19	27	25
	Titan	27	28	25	25	27	25
	Glas	26	23	32	26	26	27
	Komposit	28	26	30	25	27	26
	GIZ	27	22	26	28	27	24
	Amalgam	25	27	28	20	28	24

**Tab. 15: Bandenzahl der Pellikelproben von Proband 6 in Abhängigkeit von Werkstoff, Expositionszeit und Lokalisation.**

Bandenzahl Proband 6 (weibl.)							
Zeit		1 min		3 min		30 min	
Lokalisation		bukkal	lingual	bukkal	lingual	bukkal	lingual
Werkstoff	Gold	29	30	23	36	28	31
	Keramik	30	32	22	33	33	33
	Teflon	31	32	27	28	35	35
	Kunststoff	29	31	30	34	41	38
	Schmelz	29	27	25	29	34	31
	Titan	32	30	28	30	37	30
	Glas	31	28	32	28	38	28
	Komposit	31	32	35	27	34	29
	GIZ	34	29	32	26	31	26
	Amalgam	30	29	31	24	35	24

**Tab. 16: Durchschnittliche Bandenzahl der bukkalen  
Pellicelproben aller Probanden zu den 3 Expositionszeiten.**

Durchschnittliche Bandenzahl bukkal			
	1 min	3 min	30 min
Gold	24,83	23,83	24,17
Keramik	26,17	23,00	27,33
Teflon	27,67	25,83	28,83
Kunststoff	28,50	27,50	31,67
Schmelz	24,83	22,67	28,17
Titan	26,67	25,50	29,67
Glas	26,50	27,33	29,33
Komposit	27,17	28,33	28,67
GIZ	26,33	26,83	27,67
Amalgam	26,00	26,67	28,33

**Tab. 17: Durchschnittliche Bandenzahl der lingualen  
Pellicelproben aller Probanden zu den 3 Expositionszeiten.**

Durchschnittliche Bandenzahl lingual			
	1 min	3 min	30 min
Gold	24,67	26,83	26,83
Keramik	27,83	27,17	28,50
Teflon	26,67	25,67	30,17
Kunststoff	28,67	29,83	31,17
Schmelz	26,17	23,00	26,50
Titan	28,17	26,50	30,00
Glas	25,33	25,17	26,00
Komposit	26,67	25,00	26,67
GIZ	25,17	24,50	24,67
Amalgam	25,33	22,50	24,33

**Tab. 18: Durchschnittliche Bandenzahl der Pellikelproben weiblicher Probanden (bukkal) zu den 3 Expositionszeiten.**

Durchschnittliche Bandenzahl weiblicher Probanden				
Zeit		1 min	3 min	30 min
Lokalisation		bukkal	bukkal	bukkal
Werkstoff	Gold	27,33	20,67	23,33
	Keramik	28,00	20,33	30,67
	Teflon	29,67	25,00	31,33
	Kunststoff	28,33	27,33	35,00
	Schmelz	27,33	24,33	30,33
	Titan	28,00	26,00	33,33
	Glas	27,33	30,00	31,33
	Komposit	28,00	30,67	30,33
	GIZ	28,33	26,67	28,33
	Amalgam	27,00	26,67	29,33

**Tab. 19: Durchschnittliche Bandenzahl der Pellikelproben weiblicher Probanden (lingual) zu den 3 Expositionszeiten.**

Durchschnittliche Bandenzahl weiblicher Probanden				
Zeit		1 min	3 min	30 min
Lokalisation		lingual	lingual	lingual
Werkstoff	Gold	23,33	28,33	27,33
	Keramik	28,00	27,67	29,67
	Teflon	28,67	24,33	33,33
	Kunststoff	28,67	30,67	34,33
	Schmelz	26,33	24,33	27,00
	Titan	28,67	25,00	32,33
	Glas	26,00	25,33	25,67
	Komposit	25,67	24,00	27,00
	GIZ	25,67	23,33	24,67
	Amalgam	25,33	22,00	24,00

**Tab. 20: Durchschnittliche Bandenzahl der Pellikelproben männlicher Probanden (bukkal) zu den 3 Expositionszeiten.**

Durchschnittliche Bandenzahl männlicher Probanden				
Zeit		1 min	3 min	30 min
Lokalisation		bukkal	bukkal	bukkal
Werkstoff	Gold	22,33	27,00	25,00
	Keramik	24,33	25,67	24,00
	Teflon	25,67	26,67	26,33
	Kunststoff	28,67	27,67	28,33
	Schmelz	22,33	21,00	26,00
	Titan	25,33	25,00	26,00
	Glas	25,67	24,67	27,33
	Komposit	26,33	26,00	27,00
	GIZ	24,33	27,00	27,00
	Amalgam	25,00	26,67	27,33

**Tab. 21: Durchschnittliche Bandenzahl der Pellikelproben männlicher Probanden (lingual) zu den 3 Expositionszeiten.**

Durchschnittliche Bandenzahl männlicher Probanden				
Zeit		1 min	3 min	30 min
Lokalisation		lingual	lingual	lingual
Werkstoff	Gold	26,00	25,33	26,33
	Keramik	27,67	26,67	27,33
	Teflon	24,67	27,00	27,00
	Kunststoff	28,67	29,00	28,00
	Schmelz	26,00	21,67	26,00
	Titan	27,67	28,00	27,67
	Glas	24,67	25,00	26,33
	Komposit	27,67	26,00	26,33
	GIZ	24,67	25,67	24,67
	Amalgam	25,33	23,00	24,67

**Tab. 22: Durchschnittliche Bandenzahl der Pellikelproben (bukkal/lingual)**

aller Probanden zu der Expositionszeit von 1 Minute (Diag. 7).

Durchschnittliche Bandenzahl bukkal/lingual		
	1 min bukkal	1 min lingual
Gold	24,83	24,67
Keramik	26,17	27,83
Teflon	27,67	26,67
Kunststoff	28,50	28,67
Schmelz	24,83	26,17
Titan	26,67	28,17
Glas	26,50	25,33
Komposit	27,17	26,67
GIZ	26,33	25,17
Amalgam	26,00	25,33

**Tab. 23: Durchschnittliche Bandenzahl der Pellikelproben (bukkal/lingual)**

aller Probanden zu der Expositionszeit von 3 Minuten.

Durchschnittliche Bandenzahl bukkal/lingual		
	3 min bukkal	3 min lingual
Gold	23,83	26,83
Keramik	23,00	27,17
Teflon	25,83	25,67
Kunststoff	27,50	29,83
Schmelz	22,67	23,00
Titan	25,50	26,50
Glas	27,33	25,17
Komposit	28,33	25,00
GIZ	26,83	24,50
Amalgam	26,67	22,50

**Tab. 24: Durchschnittliche Bandenzahl der Pellikelproben (bukkal/lingual)**

aller Probanden zu der Expositionszeit von 30 Minuten.

Durchschnittliche Bandenzahl bukkal/lingual		
	30 min bukkal	30 min lingual
Gold	24,17	26,83
Keramik	27,33	28,50
Teflon	28,83	30,17
Kunststoff	31,67	31,17
Schmelz	28,17	26,50
Titan	29,67	30,00
Glas	29,33	26,00
Komposit	28,67	26,67
GIZ	27,67	24,67
Amalgam	28,33	24,33

**Tab. 25: Durchschnittliche Bandenzahl der Pellikel aller Probanden in Abhängigkeit von Werkstoff und Lokalisation nach 1 Minute, daneben jeweils die minimale und die maximale gefundene Bandenzahl.**

Durchschnittliche Bandenzahl Probanden 1 bis 6 sowie Maximum und Minimum							
Zeit		1 min					
Lokalisation		bukkal			lingual		
		Mittel	Min	Max	Mittel	Min	Max
Werkstoff	Gold	24,83	20	29	24,67	16	30
	Keramik	26,17	22	30	27,83	25	32
	Teflon	27,67	21	31	26,67	22	32
	Kunststoff	28,50	24	32	28,67	26	32
	Schmelz	24,83	20	29	26,17	23	29
	Titan	26,67	22	32	28,17	26	30
	Glas	26,50	22	31	25,33	22	28
	Komposit	27,17	22	31	26,67	20	32
	GIZ	26,33	22	34	25,17	22	30
	Amalgam	26,00	23	30	25,33	21	29

**Tab. 26: Durchschnittliche Bandenanzahl der Pellikel aller Probanden in Abhängigkeit von Werkstoff und Lokalisation nach 3 Minuten, daneben jeweils die minimale und die maximale gefundene Bandenanzahl.**

Zeit		3 min					
Lokalisation		bukkal			lingual		
		Mittel	Min	Max	Mittel	Min	Max
Werkstoff	Gold	23,83	18	28	26,83	20	36
	Keramik	23,00	19	30	27,17	18	33
	Teflon	25,83	21	32	25,67	20	31
	Kunststoff	27,50	22	34	29,83	25	34
	Schmelz	22,67	16	26	23,00	19	29
	Titan	25,50	23	28	26,50	22	31
	Glas	27,33	17	33	25,17	21	28
	Komposit	28,33	22	35	25,00	21	27
	GIZ	26,83	23	32	24,50	21	28
	Amalgam	26,67	24	31	22,50	19	28

**Tab. 27: Durchschnittliche Bandenanzahl der Pellikel aller Probanden in Abhängigkeit von Werkstoff und Lokalisation nach 30 Minuten, daneben jeweils die minimale und die maximale gefundene Bandenanzahl.**

Zeit		30 min					
Lokalisation		bukkal			lingual		
		Mittel	Min	Max	Mittel	Min	Max
Werkstoff	Gold	24,17	18	28	26,83	24	31
	Keramik	27,33	22	33	28,50	26	33
	Teflon	28,83	23	35	30,17	25	40
	Kunststoff	31,67	27	41	31,17	25	38
	Schmelz	28,17	24	34	26,50	22	31
	Titan	29,67	25	37	30,00	25	38
	Glas	29,33	26	38	26,00	22	29
	Komposit	28,67	26	34	26,67	23	30
	GIZ	27,67	24	31	24,67	22	28
	Amalgam	28,33	26	35	24,33	22	28

Exemplarisch ein typischer Western- Blot:

Abb. 1: Western- Blot zur Identifikation von Carboanhydrase II und Laktoferrin; Belichtung 15 Sekunden.

Streifen 2: 50ng Carboanhydrase II in der ersten Spur; 26µl der Probe in der zweiten Spur; Molekulargewichtsstandard Page Ruler (4µl) in der dritten Spur; erster Antikörper anti-Carboanhydrase II (1:500); zweiter Antikörper anti- sheep (1:1000); Nachweis von Carboanhydrase II in 26µl der Probe

Streifen 3: 25ng Laktoferrin in der ersten Spur; 52µl der Probe in der zweiten Spur; Molekulargewichtsstandard Page Ruler (4µl) in der dritten Spur, erster Antikörper anti-Laktoferrin (1:500); zweiter Antikörper anti- sheep (1:1000); Nachweis von Laktoferrin in 52µl der Probe



## 9. Dank

- Herrn Prof. Dr. M. Hannig                      Thema, Betreuung, Material, Bereitstellung Labor, Übersetzungshilfe, Literatur
- Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Zimmermann:
- Herrn Prof. Dr. R. Zimmermann              Biochemie, Bereitstellung Labor, Materialien
- Herrn PD Dr. M. Jung                              Biochemie, Technische Unterstützung, Durchführung, Materialien
- Frau S. Amann                                        Biochemie, Technische Unterstützung, Durchführung, Materialien
- Herrn Dr. F. Al Marrawi                            Statistische Analyse
- Herrn Dr. M. Weyland                              Unterstützung    Anwendung    Analysesoftware, Durchführung, Proband
- Herrn Dr. D. Dahm                                   Korrekturlesung
- Frau E. Stillemunke                                Zahntechnisches Labor
- Herrn Dr. T. Diegisser                              Übersetzungshilfe
- Den 6 Probanden                                      Mitwirkung