

1. Zusammenfassung

Alle in der Mundhöhle exponierten Zahnoberflächen werden von einer Schicht aus adsorbierten Speichelproteinen, der sogenannten Pellikel, bedeckt. In der Pellikel konnten verschiedene antimikrobiell wirksame und auch puffernde Komponenten nachgewiesen werden.

Die Zielsetzung der vorliegenden Studie bestand darin, die Enzyme Carboanhydrase I und II und Lysozym sowie die protektiven Proteine sekretorisches Immunglobulin A und Laktoferrin in der in situ gebildeten Pellikelschicht zu visualisieren. Das zeit- und lokalisationsabhängige Verteilungsmuster dieser antimikrobiellen und puffernden Speichelproteine innerhalb der Pellikel wurde mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie analysiert.

Zur In-situ Pellikelbildung wurden Rinderschmelzproben jeweils bukkal und palatinal im Bereich der ersten oberen Molaren an individuellen Prüfkörpertrageschienen befestigt. Die Trageschienen wurden von 6 Probanden über Zeiträume von 30 bzw. 120 Minuten intraoral getragen. Nach der Exposition in der Mundhöhle wurden die pellikelbedeckten Schmelzproben für die transmissionselektronenmikroskopische Analyse aufbereitet. Das Verteilungsmuster von sekretorischem IgA, von Carboanhydrase I und II, von Lysozym und von Lactoferrin in der Pellikel wurde mit dem Verfahren des Goldimmunolabelings visualisiert. Die Zahl der an der Pellikel gebundenen Goldpartikel wurden gezählt und statistisch ausgewertet.

Die transmissionselektronenmikroskopische Analyse ergab, dass die in der vorliegenden Studie untersuchten antimikrobiellen und puffernden Speichelproteine in der In-situ gebildeten Pellikel randomisiert verteilt waren. Signifikant mehr Gold-markierte Proteine waren nach 120 minütger Pellikelbildungszeit im Vergleich zur Pellikelbildung über eine Zeitspanne von nur 30 Minuten zu finden. Weiterhin wurden signifikant größere Zahlen Gold-gelabelter Lactoferrin- und Lysozymmoleküle in der Pellikel auf den bukkal montierten Schmelzproben im Vergleich zu den palatinal getragenen Schmelzproben detektiert. Im Gegensatz dazu hatte die intraorale Lokalisation der Schmelzproben keinen signifikanten

Einfluss auf die Zahl der mittels Goldimmunolabelling in der Pellikel detektierbaren Carboanhydrase I und II sowie sekretorische-IgA-Moleküle.

Die Ergebnisse der vorliegenden immuno-elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigen zum einen, dass die untersuchten protektiven Proteine aufgrund des randomisierten Verteilungsmusters innerhalb der Pellikel wichtige Strukturkomponenten der In-situ gebildeten Pellikelschicht darstellen. Zum anderen zeigen die Resultate der vorliegenden Studie auch, dass die Gesamtmenge der in der Pellikel immobilisierten protektiven Speichelproteine mit zunehmender Pellikelbildungszeit signifikant ansteigt. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass auch das protektive Potential der Pellikel mit steigender Pellikelbildungszeit zunimmt.

1.1 Summary

Immuno electronmicroscopical detection of protective proteins in the in situ formed pellicle.

All tooth surfaces exposed to the oral environment are covered by a layer of adsorbed proteins, termed pellicle. Several salivary anti-microbial and buffering components are part of the pellicle.

The purpose of the present study was to visualize the enzymes carbonic anhydrases I and II and lysozyme as well as the protective proteins secretory immunoglobulin A and lactoferrin within the in situ formed pellicle. The distribution of these anti-microbial and buffering proteins within the pellicle was investigated by transmission electron microscopy with respect to time and intraoral site of pellicle formation.

For in situ pellicle formation, bovine enamel specimens were positioned on the buccal and palatal sites of the upper first molar teeth using individual acrylic splints. These splints were carried intraorally by 6 subjects over periods of 30 and 120 min, respectively. After oral exposure, the enamel specimens were processed for transmission electron microscopy. Secretory immunoglobulin A, carbonic anhydrases I and II, lysozyme and lactoferrin were visualized in the in situ formed pellicle layer using the technique of gold immuno-labelling. The number of gold particles adhering to the pellicle layer was counted and analysed statistically. Transmission electron microscopic analysis revealed that all investigated anti-bacterial and buffering proteins were randomly distributed in the in situ formed pellicle layer. Significantly higher amounts of the proteins were detected after 120 min compared to 30 min of pellicle formation time. Furthermore, significantly more gold-labelled lactoferrin and lysozyme were found on buccal surfaces compared to the palatal sites. In contrast, for carbonic anhydrases I and II, and secretory immunoglobulin A no significant influence of the intraoral site on the number of counted gold particles was detected.

The present immuno electromicroscopical data indicate that the protective salivary proteins investigated in this study are randomly distributed in the in situ formed pellicle layer, and thus, are important structural components of the pellicle. The detectable amount of these anti-microbial and buffering proteins, immobilised in the in situ pellicle, increases significantly dependent on the formation time. Therefore, it may be concluded that the protective potential of the pellicle layer increases with increasing formation time.

2. Einleitung

2.1. Bildung, Funktion und Bedeutung der Pellikel

Die Pellikel stellt ein erworbenes Schmelzoberhäutchen dar, das durch selektive Adsorption, hauptsächlich von Speichelproteinen, im Mundhöhlenmilieu entsteht (ARMSTRONG 1967; LEACH 1967; MAYHALL 1970; SONJU und RÖLLA 1973; MAYHALL 1975; SÖNJU und GLANTZ 1975; KOUSVELARI et al. 1980; BENNICK et al. 1983; RYKKE et al. 1990). Die Neubildung einer Pellikel setzt auf einer von allen organischen Auflagerungen befreiten Schmelzoberfläche innerhalb von Sekunden ein und ist nach ca. 1-2 Stunden abgeschlossen. Daraus resultieren zum einen die dauernde Regeneration und zum anderen die ständige Anwesenheit der Pellikel auf dem Zahnschmelz. Die extrem hydrophile und hoch geladene Schmelzoberfläche führt zur sofortigen Adsorption spezifischer Proteine aus dem Speichel und deren fester Haftung am Zahnschmelz. Dabei sind Proteine und Glykoproteine in der Lage, über verschiedene chemische Bindungstypen an intraorale Festkörperoberflächen zu adsorbieren (HANNIG M. 1994). Dawes et al. gingen 1963 davon aus, daß die Pellikel embryologischen Ursprungs durch Kaufunktion schnell verloren geht und durch ein erworbenes Schmelzoberhäutchen ersetzt wird. Frank stellte bereits 1949 fest, daß die Pellikel auch auf abraderten und mit Amalgam gefüllten Zähnen nachzuweisen ist. Es handelt sich daher um eine erworbene, azelluläre und bakterienfreie Struktur (DAWES et al. 1963). In Abhängigkeit von der Lokalisation in der Mundhöhle und dem Pellikelalter treten deutlich Unterschiede in der Zusammensetzung und Ultrastruktur der Pellikel auf. Mit der Zeit, d.h. mit dem Alter der Pellikel, nimmt die Heterogenität ihrer Morphologie zu, auch die Pellikeldicke erweist sich als zeitabhängig (HANNIG M. 1999b). Ebenso ändert sich die biochemische Zusammensetzung mit zunehmendem Alter. Weiterhin modifizierend auf die Pellikelmorphologie und Funktion können sich die Speichelzusammensetzung sowie Sekretionsstörungen (Hyposialie, Xerostomie, z.B. nach Radiatio im Kiefer- und

Gesichtsbereich) auswirken (HANNIG 1994). Die Pellikel stellt einen dynamischen Biofilm dar, der regulierend und modulierend auf alle Interaktionen an der Grenzfläche zwischen Festkörper und Mundhöhle einwirkt. Die Hauptaufgabe der Pellikel besteht im Schutz vor säurebedingtem Mineralverlust (ZHRADNIK et al. 1976; ZHRADNIK et al. 1977; SLOMIANY et al. 1986; NIEUW AMEROGEN et al. 1987; SLOMIANY et al. 1990; MEURMAN und FRANK 1991; MOSS 1998; AMAECHI et al. 1999; HANNIG M. und BALZ 1999; HANNIG M. 2002; HANNIG M. et al. 2004). Hinsichtlich der Erosion von Zahnhartsubstanz handelt es sich dabei um einen lokalisationsabhängigen Vorgang (AMAECHI et al. 1999). Der Erosionsgrad ist umgekehrt proportional zur Pellikeldicke. Andererseits spielt die Pellikel eine Rolle in der Ätiologie von Karies und Parodontopathien. Die Adhärenz von oralen Bakterien an der pellikelbedeckten Zahnoberfläche und die anschließende Proliferation der Mikroorganismen führen zur Ausbildung des mikrobiellen Zahnbelags, der Plaque. Sowohl Karies als auch die häufigsten Parodontopathien lassen sich auf die Existenz von Plaque zurückführen. In Anbetracht der Tatsache, daß die Adhärenz von Bakterien an die pellikelbedeckte Zahnoberfläche der wohl entscheidende Faktor für die Pathogenität des dentalen Biofilms ist, gilt es, weitere Untersuchungen hinsichtlich der Struktur und Zusammensetzung der Pellikel durchzuführen. Wenn es gelänge, den adsorbierten Speichelproteinfilm in seiner Struktur und Zusammensetzung dauerhaft zu verändern, wäre eine Beeinflussung der bakteriellen Adhärenz denkbar.

2.2 Literaturübersicht

2.2.1. Die Pellikel - der initiale orale Biofilm

Auf einer von allen organischen Auflagerungen befreiten Schmelzoberfläche setzt innerhalb von Sekunden in Kontakt mit dem Mundhöhlenmilieu die Bildung eines erworbenen Schmelzoberhäutchens, der sogenannten Pellikel, ein (ERICSON et al. 1982; BUSSCHER et al. 1984; LENDENMANN et al. 2000; HANNIG und JONIER 2006). Nicht nur auf Zahnschmelz wurden diese pellikelartigen Strukturen nachgewiesen. Sie finden sich auf allen festen, dem Mundhöhlenmilieu ausgesetzten Oberflächen (HANNIG C. et al. 2005; HANNIG M. 1999; HANNIG und JONIER 2006; LENDENMANN et al. 2000), freiliegendem Dentin oder Wurzelzement sowie organischen und anorganischen Materialien. Anfängliche Untersuchungen beschrieben einen embryologischen Ursprung der Pellikel (NASMYTH 1839). Es handelt sich jedoch um eine erworbene, azelluläre und bakterienfreie Struktur (DAWES et al. 1963).

2.2.2 Entstehung und Aufbau der Pellikel

2.2.2.1 Speichel als Grundlage der Pellikelbildung

Die Bezeichnung „Speichel“ steht für das Gemisch der Sekrete der drei großen paarigen Speicheldrüsen, der kleineren Schleimhautdrüsen und der gingivalen Sulkusflüssigkeit, das die Zähne und die Mundschleimhaut kontinuierlich benetzt (WHELTON 1996). Die reinen Drüsensekrete nehmen in der Mundhöhle Bakterien, Epithelzellen der Schleimhäute sowie zelluläre und azelluläre Bestandteile der Sulkusflüssigkeit auf und bilden den sogenannten Mischspeichel (KÖNIG 1987). Die Ohrspeicheldrüse (Glandula parotidea), die

Unterkieferdrüse (Glandula submandibularis) und die Unterzungendrüse (Glandula sublingualis) sind die drei großen paarigen Speicheldrüsen, neben denen kleinere Drüsen in der Schleimhaut von Lippe, Wange, Gaumen und Zunge existieren.

Die Bildung des Speichels übernehmen die o.g. Speicheldrüsen, in deren Azinuszellen zunächst der „primäre Speichel“ gebildet wird, der ein Ultrafiltrat des Blutplasmas darstellt. Im weiteren Prozess erfolgt in den Streifenstücken der Ausführungsgänge die Rückresorption vor allem von Natrium und Chlorid. Die Speichelproteinsynthese und deren Glykosylierung findet vorwiegend in den Azinuszellen statt. Daneben werden einige Proteine in den Ausführungsgängen synthetisiert (SMITH 1996).

Im Allgemeinen besteht der Speichel bis zu 94% aus Wasser und zu 6% aus Trockensubstanz. Die Trockensubstanz besteht zu einem Drittel aus anorganischem und zu zwei Dritteln aus organischem Material (BUDDECKE 1981) (**Tab. 1**). Die Quelle des Wassers und der Ionen ist das Blutplasma. Nur das Bicarbonat wird in den Speicheldrüsen mit Hilfe der Carboanhydrase aus Kohlendioxid synthetisiert (SMITH 1996). Der Speichel ist eine hypotone Flüssigkeit mit anderen Elektrolytkonzentrationen als das Blutplasma (COLE und EASTOE 1998).

Die Zusammensetzung des in der jeweiligen Speicheldrüse sezernierten Speichels ist unterschiedlich. Der rein seröse Parotisspeichel besteht zu einem großen Anteil aus prolinreichen Proteinen (PRP) bzw. glykosylierten prolinreichen Proteinen. Die Glandula sublingualis ist hingegen für die Synthese der Muzine verantwortlich (BEELEY 1991). Das seromuköse Sekret der Glandula submandibularis ist vorwiegend serös. Im Mischspeichel sind aufgrund proteolytischer Prozesse eine Vielzahl von Proteinbruchstücken vorhanden.

Die Zusammensetzung des Speichels ist nicht nur von der Beteiligung der einzelnen Speicheldrüsen abhängig, sondern wird auch durch weitere individuelle Faktoren beeinflusst. Zu diesen Faktoren zählen neben der Plasmazusammensetzung, die Fließrate, die Art und Dauer der Stimulation, der biologische Rhythmus, Hormone, Schwangerschaft, zahlreiche

Medikamente mit salivationshemmenden Nebenwirkungen und unterschiedliche Krankheiten (DAWES 1996).

Tabelle 1. : Organische Inhaltsstoffe des menschlichen Speichels

| Organische Inhaltsstoffe | |
|---|---|
| Biologisch aktive Proteine und Aminoverbindungen | α -Amylase, Maltase, Hexokinase; Aldolase, Dehydrogenasen, Kallikrein, Carboanhydrase, Speichelperoxidase, Lipase, Glukosidasen, Proteasen, Peptidasen |
| Glykoproteine | Muzine, Parotisagglutinin, sIgA, Lactoferrin |
| Weitere Speichelproteine | PRP, Statherin, Cystatine, Histatine, Sialin, Histamin, Harnstoff |
| Fette | Lipide, Lipoide |
| Säuren | Laktat, Ziträt, Harnsäure |
| Hormone | Östrogene, Progesteron |
| Vitamine | C, B ₁ , B ₂ , B ₁₂ |
| Abwehrfaktoren | <i>unspezifisch</i> : Lysozym, Lactoferrin, Speichelperoxidase, neutrophile Granulozyten <i>spezifisch</i> : Immunglobuline: sIgA, IgG |

2.2.2.2 Pellikelbildung

Das als Pellikel bezeichnete exogene Zahnoberhäutchen entsteht durch eine selektive Adsorption von vorwiegend spezifischen Speichelglykoproteinen und anderen Makromolekülen aus dem Speichel an die Hydroxylapatit-Kristallite des Zahnschmelzes (ARMSTRONG 1967; LEACH et al. 1967; MAYHALL 1970; SÖNJU und RÖLLA 1973; SÖNJU und RÖLLA 1974; MAYHALL 1975; SÖNJU und GLANTZ 1975; MAYHALL 1977; KOUSVELARI et al. 1980; ÖSTE et al. 1981; RYKKE et al. 1990). Hinzu kommen in geringen Anteilen Plasmaproteine, Blutgruppenproteine, Enzyme und Nahrungsbestandteile, die im flüssigen Milieu der Mundhöhle am Aufbau der Pellikel beteiligt sind.

Eine dem Speichel ausgesetzte, von organischen Auflagerungen gesäuberte Schmelzoberfläche wird innerhalb von Sekunden mit Biopolymeren bedeckt (ERICSSON et al. 1982; BUSSCHER et al. 1984; HANNIG M. und JOINER A. 2006; HANNIG M. und

HANNIG C. 2007). Die Haftung der Proteine wird hierbei hauptsächlich über elektrostatische Bindungen an Kalzium und an Phosphatgruppen der Hydratationschicht erreicht (HAY 1973; JURIAANASE und BOOIJ 1979; BENNICK et al 1981).

Die Kalziumionen und Phosphatreste sind Bestandteile des Hydroxylapatits des Schmelzes, wobei Kalziumionen eine stärkere Neigung haben, in Kontakt mit dem Speichel in Lösung zu gehen. So entsteht eine negative Ladung an der Oberfläche des Schmelzes, die jedoch unter physiologischen Bedingungen von einer Schicht aus 90% Kalziumionen und 10% Phosphatresten umgeben und damit neutralisiert wird (SÖNJU et al. 1986). Die zuerst gebildete Pellikelschicht besteht vor allem aus Phosphoproteinen. Diese sind zu Austauschreaktionen mit den Phosphatanteilen des Schmelzes befähigt und besitzen dadurch eine große Affinität zu der Oberfläche des Zahnes. Neben den Ionenbindungen werden kovalente Bindungen, Ion-Dipol-Interaktionen, Dipol-Dipol-Interaktionen, Wasserstoffbrücken und hydrophile Wechselwirkungen als Bindungstypen benannt (HANNIG M. 1994; SCANNAPIECO 1995).

Bereits an der Oberfläche des Zahnes adsorbierte Glykoproteine steuern über Interaktionen mit freien Biopolymeren das weitere Pellikelwachstum (LAMKIN et al. 1996). Dabei spielen Pellikelvorläuferproteine, wie saure prolinreiche Proteine, Statherine und Histatine, eine übergeordnete Rolle. Sie sind in der Lage, Bindungen miteinander einzugehen und induzieren somit möglicherweise die Adsorption anderer Proteine an die Pellikel (YAO et al. 1999).

Bei der Bildung der Pellikel handelt es sich um einen selektiven Prozess, bei dem die Speichelproteine als Substrat zur Verfügung stehen (siehe **Tabelle 1**). Hierbei binden einige Speichelproteine schneller an der Hydroxylapatitoberfläche des Zahnes als andere (LAMKIN et al. 1996). Bislang wurden die an der Pellikelbildung beteiligten Proteine mittels biochemischer, histochemischer, immunologischer und elektrophoretischer Analysen nachgewiesen (ÖRSTAVIK und KRAUS 1973; KOUSVELARI et al. 1980; EGGEN und RÖLLA 1982; BENNIK et al. 1983; RUAN et al. 1986; FISCHER et al. 1987; CARLEN et al. 1998; SCHÜPBACH et al. 2001). Als wesentliche Komponente der Pellikel konnten AL-

HASHIMI und LEVINE (1989) die alpha-Amylase, Cystatin, MG-1, und sekretorisches Immunglobulin A nachweisen.

Auch Kohlenhydrate als Bestandteile der Pellikel sind in zahlreichen Studien quantifiziert und lokalisiert worden (HAY 1969; MAYHALL 1970; SÖNJU et al. 1974; MAYHALL und BUTLER 1976; MAYHALL 1977). Erstmals wurden diese 1964 in der Pellikel nachgewiesen (LÖE 1964). Die Analyse der In-vivo gebildeten Pellikel zeigte Glukose, Galaktose, Fruktose, Mannose, Glukosamin, Galaktosamin sowie auch N-Acetylneuraminsäure und andere Sialinsäuren als deren Bestandteile (HAY 1969; MAYHALL 1970; SÖNJU et al. 1974; MAYHALL und BUTLER 1976; MAYHALL 1977). SÖNJU und Mitarbeiter wiesen 1974 folgende Kohlenhydrat-Zusammensetzung der Pellikel nach: 65% Glukose, 19% Glukosamin, 9,5% Galaktose und Mannose mit einem Anteil von 6,5%. Der Ursprung des vergleichsweise hohen Glukoseanteil konnte nicht eruiert werden. Es werden die Speicheldrüsen diskutiert (MANDEL und THOMPSON et al. 1963), weiterhin extrazelluläre Polysaccharide, die von Bakterien als Stoffwechselfprodukte produziert werden. Da der Glukoseanteil im Speichel sehr gering ausfällt, ist der hohe Glukoseanteil in der Pellikel wohl eher auf einen extrazellulären bakteriellen Ursprung zurückzuführen (SÖNJU et al. 1986). SLOMNIANY et al. suchten 1986 nach weiteren Erklärungsmöglichkeiten für den hohen Glukosegehalt in der Pellikel und stießen dabei auf die Anwesenheit von Glykolipiden.

Die Pellikel weist einen Gesamtlipidgehalt von mehr als 20% des Trockengewichtes auf (SLOMNIANY et al. 1986; 1990). Bisher wurden in der natürlich entstandenen als auch in der experimentell gebildeten Pellikel neutrale Lipide, vor allem freie Fettsäuren, Triglyceride, Cholesterin und deren Ester sowie verschiedene Phospholipide und Glykolipide als Bestandteile der Pellikel angegeben (SLOMNIANY et al. 1986 und 1990). SLOMNIANY et al. 1986 konnten nachweisen, dass Probanden mit einer hohen Kariesaktivität eine signifikant andere Lipidzusammensetzung in der Pellikel aufweisen als Probanden mit einer geringen Kariesaktivität. SLOMNIANY et al. zeigten 1990, dass durch die Entfernung der Lipide aus

der Pellikel die Diffusionsrate von Milchsäure um 35-50% erhöht wurde. Lipide bewirken damit bei Säureeinwirkung einen kariesprotektiven Effekt für den Zahnschmelz.

Die Pellikel ist zu ca. 45% aus Aminosäuren aufgebaut (ARMSTRONG 1967). Die Aminosäurezusammensetzung in der natürlich geformten 2-Stunden-Pellikel besteht zum einen aus einem großen Anteil saurer Aminosäuren wie Glutaminsäure und Asparbinsäure und andererseits aus hohen Konzentrationen an Alanin, Gycin, Serin und Prolin (ARMSTRONG 1966; ARMSTRONG 1967; LEACH et al. 1967; ARMSTRONG und HAYWARD 1968; MAYHALL 1970; SÖNJU und RÖLLA 1973; MAYHALL 1975; EGGEN und RÖLLA 1982; EGGEN und RÖLLA 1983). In geringen Teilen kommen auch basische und schwefelhaltige Aminosäuren in der Pellikel vor (SÖNJU et al. 1986). Desweiteren konnte Muraminsäure, eine Aminosäure, die insbesondere in der Zellwand von Bakterien zu finden ist, in der Pellikel nachgewiesen werden (ARMSTRONG und HAYWARD 1968). Analysen von LENDEMANN et al. (2000) zeigten, dass zwischen der Zusammensetzung des sezernierten Speichels und der Aminosäurezusammensetzung in der Pellikel wesentliche Unterschiede bestehen. Die Pellikel enthält beispielsweise wesentlich mehr hydrophobe Aminosäuren als die Speichelsekrete. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich die Zusammensetzung der Pellikel von der des Speichels unterscheidet und die Pellikelbildung auf der selektiven Adsorption von Proteinen aus dem Speichel beruht.

2.2.3. Ultrastruktur der Pellikel

Mikromorphologisch betrachtet ist die Pellikel eine strukturlose, homogene, amorphe Membran (LEACH 1967; LENZ 1967; ARMSTRONG und HAYWARD 1968). Elektronenmikroskopisch erscheinen die Pellikelstrukturen feingranulär bis granulär mit unterschiedlicher Elektronendichte sowie auch globulär und homogen (LIE 1977; BERTHOLD 1979; NYVAD und FEJERSKOV 1987; HANNIG und BÖSSMANN 1989). Es handelt sich um eine erworbene, azelluläre und bakterienfreie Struktur (DAWES et al. 1963). Abhängig von der Untersuchungsmethodik, der Lokalisation und der Pellikelbildungszeit liegen unterschiedliche Daten zur Pellikeldicke in einem Bereich von wenigen Nanometern bis hin zu mehreren Mikrometern vor. In Zonen der Selbstreinigung wurden Pellikeldicken von 0,03–0,08 µm (LEACH und SAXTON 1966; LENZ 1967) und approximal bis zu 2,0 µm (FRANK und BRENDEL 1966) gemessen. Mit der Zeit, d.h. mit dem Alter der Pellikel, nimmt die Heterogenität ihrer Morphologie zu. Des Weiteren erweisen sich die Pellikeldicke, die Ultrastruktur sowie die biochemische Zusammensetzung als zeitabhängig (HANNIG M. 1997; CARLEN et al. 1998; HANNIG M. 1999b). Auf den Lingualflächen der Zähne bildet sich nach circa zwei Stunden eine 20-80 nm dicke, homogene und vorwiegend granulär strukturierte Pellikel aus, wohingegen die Dicke der bukkalen Pellikel 200-700 nm beträgt und diese eher globulär strukturiert ist (HANNIG M. 1999b). LIE (1979) zeigte, dass die initiale Pellikel dünn und inkomplett ist. Nach mehrtägiger Reifung erscheint die Pellikel kompakt und elektronendicht (LENZ 1967; LIE 1979). Dies lässt auf Veränderungen in der Proteinzusammensetzung und -konformation innerhalb der Pellikel schließen (MAYHALL 1970, 1975, 1977; HAY und MORENO 1979; BENNICK et al. 1983; EMBERY et al. 1986). Eine Untersuchung von HANNIG (1999b) zum zeitlichen Verlauf der Pellikelbildung zeigte, dass, eine elektronenmikroskopisch darstellbare Pellikelschicht eine Minute nach Exposition der Schmelzproben in der Mundhöhle vorliegt.

Nach SKÖRLAND et al. (1995) wird die initiale Pellikeldicke nach zwei bis drei Minuten erreicht. Auf diesem Niveau verharrt die Pellikel ca. 30 min, verdreifacht sich anschließend

ihre Dicke und bleibt für das untersuchte Zeitintervall von zehn Stunden konstant. Anhand der röntgenphotoelektronenspektroskopischen Studie von KUBOKI et al. (1987) konnte ein Anstieg der Pellikeldicke bis zur 30-ten Minute und ein Plateau der Adsorption nach 90 Minuten ermittelt werden. Bei Beobachtungen über 30, 60, 90 und 120 min wurde eine Stagnation der Menge an Aminosäuren nach 90 min beobachtet (SÖNJU und RÖLLA 1973). ÖSTE et al. (1981) schlossen auf eine endgültige Dicke der Pellikel nach ein bis zwei Stunden. Weitere Studien benennen für das Eintreten eines Gleichgewichtes zwischen Adsorption und Desorption eine Zeit von zwei Stunden. Der Nachweis von Bakterien auf in der Mundhöhle getragenen Schmelzsplinten gelang erst nach vier Stunden (LIE 1975).

2.2.4. Funktion der Pellikel

Die Pellikel stellt einen dynamischen Biofilm dar, der regulierend und modulierend auf alle Interaktionen an der Grenzfläche zwischen Festkörper und Mundhöhle einwirkt. Die Hauptaufgabe der Pellikel besteht im Schutz vor säurebedingtem Mineralverlust und in ihrer antibakteriellen Funktion (ZAHRADNIK et al. 1976; ZAHRADNIK et al. 1977; SLOMIANY et al. 1986; NIEUW AMEROGEN et al. 1987; SLOMIANY et al. 1990; MEURMAN und FRANK 1991; MOSS 1998; AMAECHI et al. 1999; HANNIG und BALZ 1999; LENDENMANN et al. 2000; HANNIG und JOINER 2006; HANNIG C. et al. 2005). Der Proteinfilm fungiert als Lubrikant und als antierosive Barriere (HANNIG und BALZ 1999/ 2001; HANNIG 2002). Nach Reifungs- und Komplettierungsvorgängen, die eine Dauer von mehreren Tagen in Anspruch nehmen, besitzt eine intakte Pellikel, kariesprotektive Eigenschaften und spielt weiterhin eine wichtige Rolle in der Retention sowie Anreicherung von Fluoriden an der Schmelzoberfläche (KAUTSKY und FEATHERSTONE 1993). Dieser Kariesschutz beruht auf der Beeinflussung von Ionenaustausch- und Diffusionsprozessen an der Grenzfläche zwischen Zahnschmelz und Mundhöhle. BÖSMANN und HOPPE (1974) zeigten einen verzögerten Eintritt der Karies beim Vorhandensein des Zahnoberhäutchens. Als semipermeable, dauerselektive Membran reduziert eine unversehrte Pellikel die Diffusionsrate

von Kalzium- und Phosphationen sowie z.B. auch von Milchsäure, sodass der Zahnschmelz vor Säureeinwirkung geschützt werden kann. Die Pellikelmaturation führt innerhalb einer Woche zur Reduktion von Diffusionsprozessen an der Schmelzoberfläche. Im Anschluss an die Pellikelbildung erfolgt in der Mundhöhle die Bildung der Plaque durch Adhärenz von Mikroorganismen an die pellikelbedeckende Zahnoberfläche (DOUGLAS 1996). Nach Adsorption bestimmter Speichelproteine, wie der sauren prolinreichen Proteine, der Histatine und der Amylase (SCANNAPIECO et al. 1995; BERGMANN und GÜLZOW 1995), können pathogene Streptokokken und Aktinomyzeten adhären. Das aminoterminal Ende der sauren PRPs bindet an Hydroxylapatit, während das Carboxylende als Rezeptor für die bakterielle Adhärenz fungiert. Erst nach der Adsorption werden die in Lösung maskierten Bindungsstellen der sauren PRP's durch Konformationsänderung frei (GIBBONS und HAY 1988a, 1988b).

Weiterhin stellt die Pellikel funktionell betrachtet ein Reservoir für kariesprotektive Ionen, z.B. Fluoridionen, dar. Nach Fluoridapplikation ist die Pellikel an der langanhaltenden Retention der CaF_2 -Deckschicht auf der Schmelzoberfläche komplex beteiligt. Die Aufnahme von Fluorid in die oberflächliche Schmelzschicht ist aufgrund der Semipermeabilität der Pellikel nicht beeinträchtigt (ARENDS et al. 1986).

Eine weitere Funktion ist die Herabsetzung der Attrition antagonistischer Zahngruppen. Vor allem die PRP und die Muzine tragen zum lubrikativen Effekt bei (HATTON et al. 1985). So bietet die Pellikel den Zähnen Schutz vor Abrasion und Attrition

Neben diesen positiven Eigenschaften hat die Pellikel jedoch den Nachteil, dass ihre Bildung eine Veränderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Schmelzoberfläche bewirkt, wodurch den Bakterien ein Anheften an die pellikelbedeckte Oberfläche ermöglicht wird (PRUITT et al. 1969). Sie ist damit Ausgangspunkt der bakteriellen Biofilmbildung.

2.2.5. Charakteristika protektiver Komponenten der Pellikel

2.2.5.1 Immunologische Komponenten (spezifische/ unspezifische Abwehr)

Die unspezifische Abwehr ist in der Lage, Fremdkörper und Krankheitserreger allgemeiner Art bereits beim ersten Kontakt unschädlich zu machen. Es wird deshalb von ihr auch als "angeborene Immunität" gesprochen. Zur unspezifischen Abwehr gehören humorale und zelluläre Mechanismen.

Die sogenannten humoralen, d.h. die in den Körperflüssigkeiten gelösten Faktoren des unspezifischen Abwehrsystems, sind bakterizid wirkende Substanzen. Dazu gehört das Enzym Lysozym, das in verschiedenen Körpersekreten wie Tränenflüssigkeit und Speichel enthalten ist und die Zellwand zahlreicher Bakterien angreift (BUDDECKE 1981). Daneben gibt es das sogenannte Komplementsystem. Hierbei handelt sich um ein von der Leber gebildetes Enzymsystem, das aus einer Gruppe von etwa 20 Bluteiweißkörpern besteht und die Auflösung körperfremder Zellen bewirkt. Darüber hinaus gehören auch die sogenannten Interferone, die eine vorwiegend antiviral gerichtete Wirkung haben, zur unspezifischen humoralen Abwehr.

Zu den Abwehrzellen des unspezifischen Systems, gehören Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen. Sie enthalten in ihrem inneren, mikroskopisch kleine Körnchen, die sogenannte Granula, die eine im Normalfall auf Heilung ausgerichtete entzündliche Reaktion auslösen bzw. verstärken können.

Neben den humoralen und zellulären Mechanismen unterstützen weitere Faktoren die unspezifische Immunabwehr. So bietet die gesunde Haut einen natürlichen Schutz gegen das Eindringen von Krankheitserregern. Magensaft vernichtet durch seinen hohen Säuregehalt Bakterien, die mit der Nahrung aufgenommen werden. Krankheitserreger, die durch die Atemluft in die Luftwege geraten, bleiben am von der Schleimhaut gebildeten

Schleim hängen und werden durch den Schlag der Flimmerhaare aus dem Körper geschleust.

Die spezifische Abwehr entwickelt sich im Gegensatz zur unspezifischen erst in der direkten Auseinandersetzung mit einem bestimmten Krankheitserreger. Sie wird daher auch als erworbene Immunität bezeichnet. Es kommt dabei zur Ausbildung besonderer Schutzmaßnahmen, die ganz gezielt gegen ein erneutes Eindringen des gleichen Krankheitserregers in den Körper gerichtet sind. Darüber hinaus hat das spezifische Immunsystem die Fähigkeit, krankhafte körpereigene Zellen wie Tumorzellen zu erkennen und anzugreifen. Die spezifische Immunabwehr wird durch Immunzellen vermittelt. Es handelt sich dabei um Lymphozyten. Allerdings befinden sich 98% der Lymphozyten nicht im Blut, sondern in den lymphatischen Organen (Lymphknoten, Lymphbahnen, Milz) und im Knochenmark. Von dort aus wird ständig ein kleiner Teil der Zellen ins Blut abgegeben. Die Lebensdauer der Lymphozyten beträgt zwischen zehn Tagen und mehreren Jahren. Sie entwickeln sich zunächst im Knochenmark und im Thymus, d.h. den primären Organen des Immunsystems, und besiedeln von dort aus die sekundären Immunorgane wie Lymphgewebe und Milz. Im Thymus werden sogenannte T-Lymphozyten gebildet und darauf geprägt, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Die T-Lymphozyten machen etwa 70-80% aller Lymphozyten im Blut aus. Sie gehören zur spezifischen zellulären Immunabwehr. Bei Kontakt mit einem Fremdkörper entwickeln sie sich zu sogenannten T-Effektorzellen, die verschiedene Immunreaktionen auslösen bzw. verstärken, oder zu längerlebigen T-Gedächtniszellen, die auch nach Jahren noch bei einem erneuten Eindringen des gleichen Fremdkörpers diesen erkennen und zu verstärkten Immunreaktionen führen.

2.2.5.1.1. Lysozym

Das **Lysozym** des Speichels ist ein säurehaltiges Protein. Es vermag bei längerer Einwirkung das Muringerüst der Bakterienzellwand zu spalten und kann damit die völlige Lyse des Bakteriums herbeiführen. Es ist demnach ein Bestandteil der bakteriellen Abwehr (BUDDECKE 1981). Trotzdem sind manche grampositive Bakterien, wie auch *S. mutans*, resistent gegen die Spaltung durch Lysozym (LAIBLE und GERMAINE 1985). Lysozym wurde sowohl in experimentellen Studien (VACCA SMITH und BOWEN 2000, RÖLLA 1983; PRUITT 1969) wie auch In-vitro nachgewiesen (LAIBLE 1985). Es zeigt bereits nach fünf Minuten in der In-situ geformten Pellikel eine konstante enzymatische Aktivität (VACCA SMITH und BOWEN 2000; HANNIG C. et al. 2005, 2009). Lysozym kann an bestimmte Bakterien binden, um zu einer Aggregation dieser zu führen (TELLEFSON und GERMAINE 1986) und andererseits eine Anlagerung von *Streptococcus-mutans* an das speichelüberzogene Hydroxylapatit zu inhibieren. Im Gegensatz zur alpha-Amylase, die hauptsächlich durch die Glandula parotidea sezerniert wird, wird das Lysozym von den sublingualen und submandibulären Speicheldrüsen sezerniert. Hierbei weist die Pellikel abhängig von der Lokalisation der Zähne unterschiedliche enzymatische Aktivität des Lysozymes auf. Als ein bedeutender Bestandteil der Pellikel aggregiert das Lysozym Bakterien und hemmt die Säureproduktion in der Plaque (TWETMAN et al. 1986).

2.2.5.1.2. Lactoferrin

Lactoferrin ist Bestandteil der Pellikel (KRAUS et al. 1973; RÜDIGER et al. 2002; VACCA SMITH und BOWEN 2000). Das im Speichel und in der Pellikel vorhandene eisenbindende Protein vermag mit Mikroorganismen erfolgreich um das Eisen (Fe^{3+}) zu konkurrieren, sodass das für das Bakterienwachstum essentielle Eisen nicht mehr zu Verfügung steht (VAN NIEUW AMERONGEN et al. 2004). So besitzt das Lactoferrin einen wachstumshemmenden, respektive bakteriostatischen Effekt auf Mikroorganismen wie z.B. *Candida albicans* (HELLWIG et al. 1999). Lactoferrin ist ein Beispiel für ein nicht-enzymatisches, antimikrobielles Protein. Außerdem konnte In-vitro eine entzündungshemmende Wirkung nachgewiesen werden. Durch die Möglichkeit der Bindung an Speichelagglutinin können diese beiden Proteine zusammen agieren (VAN DER KRAAN et al. 2004). Die größten Mengen werden von den kleinen Speicheldrüsen sezerniert. Insgesamt sind es im Speichel 20 mg/l.

2.2.5.1.3. Immunglobulin A (IgA)

Das sekretorische Immunglobulin A ist Bestandteil des spezifischen Immunsystems. Es inhibiert die bakterielle Adhärenz und deren Kolonisation (VAN NIEUW AMERONGEN et al. 2004). Verschiedene **Immunglobuline (Ig)** sind in der Pellikel und im Speichel nachweisbar (AL-HASHIMI und LEVINE 1989; CARLEN et al. 1998; KRAUS 1973; ORSTAVIK et al. 1973). Ihre Basisstruktur besteht aus zwei leichten und zwei schweren, symmetrisch aufgebauten und durch Disulfidbrücken miteinander verbundene Peptidketten.

Das **IgA** enthält hierbei eine sekretorische Komponente, durch die die Moleküle über einen Endozytoseablauf in die Azinuszellen der Speicheldrüsen gelangen (BUDDECKE 1981). Die Antikörper vom Typ A gehören zur Primärantwort des Organismus gegen infektiöse Partikel wie Bakterien oder Viren. Die Bekämpfung der Krankheitserreger erfolgt durch

Neutralisierung und Opsonierung (LÖFFLER 1997). Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass auch **IgG** und **IgM** in der Pellikel nachgewiesen wurden. Sie werden wahrscheinlich in den kleinen Speicheldrüsen (SMITH et al. 1991) gebildet oder gelangen durch das Sulkusfluid in die Mundhöhle (AALTONEN et al. 1985; TENOVUO et al. 1991).

2.2.5.2. Säurepuffernde Komponente - Carboanhydrase

Die pufferaktiven Enzyme Carboanhydrase I (VACCA SMITH und BOWEN 2000), Carboanhydrase II (LI et al. 2004, VACCA SMITH und BOWEN 2000) und Carboanhydrase VI (LEINONEN et al. 1999) sind Bestandteile der Pellikel.

Im Allgemeinen beteiligt sich die **Carboanhydrase (CA)** an der Aufrechterhaltung der pH-Homeostase in der Mundhöhle (AI-HASHIMI und LEVINE 1989). Die Pufferwirkung des im Speichel enthaltenen Hydrogencarbonates bzw. Carbonates begünstigt eine Neutralisierung der von den Plaquebakterien gebildeten organischen Säuren und schützt so die Zahnschmelze vor dessen Einflüssen (HANNIG C. et al. 2005; WOLINSKI 1994). Als ein Enzym mit der höchsten Turn-over-Rate steuert es die reversible Bildung von CO_2 und H_2O zu HCO_3^- und H^+ . Die Pufferwirkung basiert hierbei im Wesentlichen auf der Wirkung von Bicarbonationen (ERICSSON 1959). Die Bildung von Bicarbonationen wird durch die Carboanhydrase (Isoenzym II) eingeleitet.

Es werden weitere sieben Isoenzyme beschrieben (CA I-VIII). Hierbei ist hauptsächlich das Isoenzym VI in der Mundhöhle zu finden, aber auch Isoenzym I und II wurden im Speichel und den großen Speicheldrüsen nachgewiesen (PARKILLA et al. 1990; LENANDER-LUMIKARI 2000). Diskutiert wird eine mögliche Elimination der Säuren in der Pellikel und damit deren antikariogene Wirkung (LEINONEN et al. 1999). Es konnte eine besonders hohe Aktivität der Carboanhydrase im Speichel von Kindern mit kariesfreiem Gebiss ermittelt werden. Dieser Wert korreliert reziprok mit den DMFT (SZABO 1974). Mit Hilfe

histochemischer Analyseverfahren konnte gezeigt werden, dass an die Pellikel gebundene Carboanhydrase ihre enzymatische Aktivität nicht verliert.

2.2.6. Methoden zur Untersuchung der Pellikel

2.2.6.1. Gewinnung der Pellikel

Erste Versuche, die Pellikel zu gewinnen, erfolgten anhand von extrahierten Zähnen. Hierfür wurden die Zähne zuerst von der Plaque befreit und anschließend mit EDTA, Salzsäure und Natriumphosphat behandelt, um die Pellikel zu lösen. (HAY 1967; LEACH 1967; ARMSTRONG und HAYWARD 1968; MAYHALL 1970). Eine genaue Aussage bezüglich des Alters der gewonnenen Pellikel war nicht möglich. Aus diesem Grund wurde von SÖNJU und RÖLLA eine Methode entwickelt, die es ermöglichen sollte, eine Pellikel bekannten Alters zu gewinnen (SÖNJU und RÖLLA 1973). Hierfür wurden Zähne von Probanden, einer Zahnreinigung mit Bims-Pulver unterzogen, um die vorhandene Pellikel vollständig zu entfernen. Während der Pellikelbildungszeit von 120 min wurde auf eine Nahrungskarenz geachtet. Anschließend wurden die Zähne mit Kofferdam versehen, mit Wasser abgespült und getrocknet. Der Biofilm wurde dann mit Scalern entfernt und auf Glaswolle und PVDF-Membranen gesammelt (SÖNJU und RÖLLA 1973). Mit Hilfe dieser PVDF-Membran ist es jedoch nicht möglich, alle Proteine von der Zahnoberfläche zu gewinnen (YAO et al. 2001). Desweiteren zeigte die Untersuchung von YAO et al. (2001), dass es mit dieser Methode nicht zu einer vollständigen Entfernung der "alten" Pellikel kommt.

Eine andere Methode erlaubte eine schrittweise Entfernung der Pellikel (EMBERY et al. 1986). Hierbei wurde die auf der Zahnoberfläche exponierte Pellikel für fünf Minuten mit Natriumchlorid behandelt. Hochmolekulare, locker gebundene Proteine wurden auf diese Weise gewonnen. Die festere innere Schicht, die nach der Methode von SÖNJU (1973) bearbeitet wurde, bestand hauptsächlich aus niedermolekularen Proteinen (EMBERY et al.

1986). Bei neueren Verfahren werden die Proteine direkt mittels Schwämmchen und Membranen von der Zahnoberfläche gewonnen (CARLEN et al. 1998; YAO et al. 2001). Dabei erwies sich eine zweiprozentige SDS- (sodium dodecyl sulfate) Lösung als effektives Medium zur Gewinnung und Analyse der Pellikelproteine (CARLEN et al. 1998).

2.2.6.2. Methoden zur Analyse der Pellikel

Die geringen Mengen an Pellikel, die gewonnen werden können, limitierten die Untersuchungen der Pellikelproteine zunächst auf die Analyse der Aminosäuren. Solche Studien wurden zahlreich vorgenommen (ARMSTRONG 1966, 1967; LEACH 1967; LEACH et al. 1967; ARMSTRONG und HAYWARD 1968; MAYHALL 1970, 1975, 1977; SÖNJU und RÖLLA 1973; ÖSTE et al. 1981; EGGEN und RÖLLA 1982, 1983; AL-HASHIMI und LEVINE 1989; RYKKE et al. 1989). Die Pellikel wurde zunächst mittels Scaler oder Säure als Proteingemisch gewonnen (LEACH et al. 1967), danach hydrolysiert und anhand chromatographischer Methoden analysiert (ARMSTRONG 1967; MAYHALL 1970; ARMSTRONG 1971; MAYHALL 1975). Neben der Aminosäurenanalyse wendeten SKÖRLAND et al. (1995) die Auger-Elektronenspektroskopie an. Weitere Untersuchungen widmeten sich den strukturellen und morphologischen Aspekten der Pellikel unter Anwendung elektronenmikroskopischer (LEACH und SAXTON 1966; LENZ 1967) gekoppelt mit phasenkontrastmikroskopischen Verfahren (ARMSTRONG und HAYWARD 1968). Weiterhin erfolgten Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (HANNIG M. und BÖSSMANN 1989; HANNIG M. 1997) und Rasterelektronenmikroskopie (MEURMAN und FRANK 1991). Mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie untersuchten KUBOKI et al. (1987) am Schmelz adsorbierte Speichelbestandteile. LEACH und APPLETON (1981) nahmen Untersuchungen zur Ultrastruktur von Pellikel- und Plaquekomponenten mit Hilfe der energiedispersen Röntgenmikroanalyse vor. Chemische Analysen von Makromolekülen in der 2-Stunden-Pellikel wurden mittels Gel-Filtration und Ionenaustauschchromatographie von EGGEN und RÖLLA (1982) durchgeführt. Anhand radioaktiver Markierung untersuchten

FISHER et al. (1987) die Pellikelkomponenten. KOUSVELARI et al. (1980) gelang der immunochemische Nachweis der PRP im Speichel und in der Pellikel. Ebenfalls mit immunochemischen Methoden nahmen RUAN et al. (1986) quantitative Bestimmungen von In-vitro adsorbierten Speichelproteinen an Schmelz und Zement vor. Weitere analytische Bestimmungen erfolgten chromatographisch (BERNARDI et al. 1972), teilweise auch mit Hydroxylapatitsäulen (MORENO et al. 1984) und auch mittels Flüssigkeitsgaschromatographie (ÖSTE et al. 1981). JENSEN et al. (1992) analysierten die aus verschiedenen Speicheldrüsensekreten experimentell erzeugten Pellikelarten mittels Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie kombiniert mit Gelfiltration. LAMKIN et al. (1996) wendeten ebenfalls die Gelfiltration zur Pellikelanalyse an. Anhand SDS-Page und Immunblotting untersuchten CARLÉN et al. (1998) In-vivo und In-vitro gebildete Pellikel. Aktuellste Studien bedienen sich der Massenspektrometrie. Aktuelle Studien bedienen sich häufig der Massenspektrometrie, um die biochemische Zusammensetzung der Pellikel zu analysieren (SIQUEIRA und OPPENHEIM 2009, SIQUEIRA et al. 2007, VITORINO et al. 2007,2008). Die Bestimmung der Enzymaktivitäten in der Pellikel erfolgt photometrisch oder fluorimetrisch (HANNIG C. et al 2004; 2005; 2008). Zur detektion spezifischer Komponenten und ihres Verteilungsmusters in der Pellikel wurde in den letzten Jahren das Verfahren des Gold-immunolabeling mit anschließender elektronenmikroskopischer Analyse herangezogen (DEIMLING et al. 2004, SCHÜPBACH et al. 2001, HANNIG C. et al. 2007,2008).

Für die immuno-elektronenmikroskopische Detektierung von Pellikelkomponenten werde die Präparate mit primären spezifischen Antikörpern gegen die verschiedenen Enzyme inkubiert, gespült und diese durch Inkubation mit einem sekundären Antikörper (gebunden an 10 nm große kolloidale Goldpartikel) markiert (DEIMLING et al. 2004).

2.3 Fragestellung

Mit biochemischen Analysen konnte das prinzipielle Vorhandensein von Lactoferrin, Lysozym, sIgA, Carboanhydrase I und II als Komponenten in der Pellikel aufgezeigt werden. Bisher fehlen aber Informationen zur Visualisierung und zum Verteilungsmuster von antibakteriellen und puffernden Komponenten in der In-situ geformten Pellikel.

Die Zielsetzung der vorliegenden Studie bestand daher darin, die Enzyme Carboanhydrase I und II sowie Lysozym und die protektiven Proteine Immunglobulin A und Lactoferrin in der in situ gebildeten Pellikel mit Hilfe des Verfahrens des Gold-Immunolabelings elektronenmikroskopisch zu visualisieren und ihr Verteilungsmuster zu untersuchen. Dabei sollten folgende Hypothesen überprüft werden:

- a) Lysozym, Lactoferrin, IgA und Carboanhydrase sind gleichmäßig in der Pellikel verteilt.
- b) Bildungszeit und Lokalisation der Pellikel haben einen Einfluss auf die Menge der detektierbaren Komponenten Lysozym, Lactoferrin, IgA und Carboanhydrase.

3. Material und Methoden

3.1. Probanden

Für die klinisch experimentellen Untersuchungen wurden insgesamt sechs gesunde Probanden im Alter zwischen 28 und 36 ausgewählt (w=5; m=1) (**Tab. 2**). Die Erhebung der Anamnese ergab keine Anhaltspunkte für Alkoholkonsum, Nikotinabusus oder Medikamenteneinnahme. Alle sechs Probanden waren allgemeinmedizinisch gesund und es lagen keine Funktionsstörungen der Speicheldrüsen vor. Die Probanden verfügten über eine ausgezeichnete Mundhygiene. Es bestanden gesunde Mundschleimhautverhältnisse und keinerlei Kariesaktivität bzw. suffizient versorgte Gebisse (DEIMLING 2004; HANNIG C. 2004, 2005, 2006). Die In-situ-Pellikelbildung erfolgte nach der von Hannig (1997) beschriebenen Methode. Vor der Durchführung der Versuche wurde die Zustimmung der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes (52/05) eingeholt.

Tabelle 2. : Probanden der experimentiellen Untersuchung nach Geschlecht und Alter

| Proband | Alter | Geschlecht |
|---------|-------|------------|
| U.M. | 36 | Weiblich |
| D.D. | 28 | Weiblich |
| N.B. | 30 | Männlich |
| N.H. | 30 | Weiblich |
| K.H | 34 | Weiblich |
| A.D. | 28 | Weiblich |

3.2. Herstellung der Schmelzprobekörper

Für die Herstellung der Schmelzkörper wurden frisch extrahierte Rinderfrontzähne verwendet (HANNIG C. et al. 2004, 2005, 2006). Alle Rinder waren zuvor auf bovine spongiform encephalopathy (BSE) negativ getestet worden. Nach der Durchführung einer Reinigung und Entfernung von gelegentlich auftretendem koronalem Zement mittels Scaler und Handinstrumenten wurden aus der Labialfläche des Zahnes runde Schmelzkörper mit einem Durchmesser von jeweils 4 mm mit Hilfe eines Trepanbohrers ausgefräst. Zur besseren Orientierung wurde mittels eines Rosenbohrers die Dentinseite gekennzeichnet. Die Schmelzoberfläche der Probekörper wurde anschließend mit Nassschleifpapier abnehmender Korngröße plan getrimmt. Dabei wurde mit der Körnung 800 begonnen und, über die Körnung 1000 bis 1200 zur Politur vorbehandelt. Die abschließende Politur erfolgte mittels Körnung 2400 und 4000. Um etwaige Verfärbungen, Oberflächeninhomogenitäten, Opazitäten und/ oder Entmineralisierungen der Schmelzproben auszuschließen, wurde die Qualität der Prüfkörperoberfläche unter einem Stereoauflichtmikroskop geprüft. Fehlerhafte Proben wurden verworfen. Um den „smear layer“ zu entfernen, wurden vor der intraoralen Exposition die Oberflächen der Probekörper für zehn Minuten mit 1%-iger Natriumhypochloritlösung im Ultraschallbad gereinigt (DEIMLING et al. 2004; HANNIG M. et al. 2005; HANNIG C. et al. 2007). Anschließend erfolgte für 30 min eine Desinfektion mit 70%-igem Ethanol. Nach 24-stündiger Lagerung in destilliertem, pyrogenfreiem Wasser bei 4° C standen die Schmelzproben zur Verwendung bereit.

3.3. Intraorale Exposition der Schmelzprobekörper

In Anlehnung an die Publikationen von HANNIG (1997; 1999) wurden für jeden Probanden individuelle Tiefziehschienen hergestellt (HANNIG C.; 2004, 2005, 2006) Nach Alginatabformung des Oberkiefers wurden Modelle aus Superhartgips angefertigt. Mittels Tiefziehverfahren wurden die Schienen mit einer Kunststoffstärke von 0,3 mm hergestellt. Die Schmelzproben wurden auf den partiellen Minioplastschienen ("mini-splints") jeweils bukkal und palatinal im Bereich des ersten Molaren mit einem Vinylpolysiloxan-Abdruckmaterial (Dimension Garant L; 3M ESPE, Seefeld, Germany) befestigt. Zwölf Stunden vor Exposition der Schienen benutzten die Probanden ausschließlich ihre Zahnbürste und eine nicht-fluoridierte Zahnseide zur Mundhygiene.

Die Tragezeit der Schienen und somit die intraorale Exposition der Schmelzproben betrug für jeden Probanden 30 und 120 min. Um ein Verfälschen der Ergebnisse zu vermeiden, wurde während der Exposition der Schienen auf Nahrungsaufnahme und Mundhygienemaßnahmen verzichtet.

3.4. Vorbereitung für die TEM-Analyse

Direkt nach der Entnahme aus der Mundhöhle wurden die Schienen mit destilliertem, pyrogenfreiem Wasser abgespült, um Speichelreste zu entfernen. Nach Entfernung der Proben aus dem Abdruckmaterial wurden diese für zwei Stunden bei 4° C fixiert (Fixierlösung: 4% Paraformaldehyd und 0,1% Glutaraldehyd in 0,1 mol Sörensen-Phosphatpuffer, pH= 7,4). Anschließend erfolgte das Spülen der Proben mit Phosphatpuffer für 2 x 15 min. Die Präparate wurden bis zur Einbettung in Phosphatpuffer bei 4°C gelagert. Am ersten Tag der Einbettung erfolgte zu Beginn eine Entwässerung der Schmelzkörper. Für jeweils 2 x 15 min wurden die Proben je Alkoholschritt bei Raumtemperatur gelagert (50%/ 70%/ 80%/ 90%/ 96%). Abschließend fand die Exposition der Schmelzkörper in 100%-igem

Ethanol (absolut) für 3 x 30 min statt. Direkt im Anschluss an die Exposition in 100%-igem Ethanol (absolut) wurden die Proben in LR-White Resin (London Resin Company, Berkshire, UK), für 30 min bei Raumtemperatur überführt. Nachfolgend wurden die Proben für eine Stunde in reinem LR-White gelagert. Abschließend erfolgte die Lagerung in reinem LR-White über Nacht bei 4-8° C.

Zu Beginn des zweiten Tages wurden die Proben nochmals in frischem LR-White bei Raumtemperatur für 60 Minuten gelagert, bevor die endgültige Einbettung der Proben in LR-White Resin erfolgte. Abgeschlossen wurde die Einbettung mit der Auspolymerisierung der Probekörper bei 58° C für zwei Tage.

Die Probekörper wurden als nächstes von der pellikelabgewandten Seite, über das Dentin bis in die jeweilige Schmelzregion zurückgetrimmt. Durch die Lagerung der Probekörper in einer 1M-HCL Lösung für vier Stunden wurde der restliche Schmelz herausgelöst. Die Gegenbettung erfolgte mit Araldit CY 212 (Serva, Heidelberg, Deutschland). Um einer Verwechslung der Pellikelseiten vorzubeugen, wurden die Probekörper in eine charakteristische Form getrimmt, zusätzlich wurden Ober- und Unterseite mit einer Markierung versehen.

Die nun fertig eingebetteten Pellicelproben wurden mittels einem Microstar 45 Diamantmessers (Mikrotechnik, Bensheim, Deutschland) im Ultracut E Mikrotom (Reichert, Heidelberg, Deutschland) in 90 nm starke Ultradünnschnitte geschnitten und auf 300er Nickel Mesh grids (Plano, Wetzlar, Germany) aufgebracht.

3.5. Gold-Immunolabeling der Ultradünnschnitte

Folgende Reagenzien wurden hierfür benötigt:

1. PBS (pH 7,4): 1 Liter 0,1 M Sörensen- Puffer (Na^2HPO_4 ; KH^2PO_4)
 - + 8 g NaCl
 - + 0,2 g KCl
2. 0,05 m NH_4Cl in PBS: 0,002675 g in 1 ml PBS
3. 2% BSA in PBS: 0,1 g in 5 ml PBS oder 0,04 g in 2 ml PBS
4. 1%- Glutardialdehyd: 480 μl aqua bidest + 20 μl Glutardialdehyd (25%)
5. 2%- Uranylacetat: 2 g auf 100 ml aqua bidest

Alle Reagenzien mußten vor Gebrauch zentrifugiert werden (8000 U/min für 3 min). Die mit Ultradünnschnitten versehenen Nickel Mesh-Grids wurden Gold-immunogelabelt. Dabei handelt es sich um ein Immunolabelingverfahren in zwei Schritten. Die Antikörper wurden kommerziell (Primärer AK, Biotrend, Köln, Deutschland; Sekundärer AK, Aurion, Wangeningen, Holland) erworben. Es handelte sich hierbei um polyklonale Antikörper (Wirtstiere: Schaf, Kaninchen) (**Tab. 3**). Pro Grid wurde eine Antikörper-Verdünnung von 20 μl angesetzt. Die primären Antikörper waren jeweils spezifisch gegen Carboanhydrase I, Carboanhydrase II, Lactoferrin, Lysozym und IgA gerichtet. Diese trugen keinen Marker. Um ein Sichtbarwerden für die Elektronenmikroskopie zu erreichen, wurde nun ein sekundärer mit 10-nm-Gold-gelabelter Anti-Antikörper zugegeben. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle ein Ultradünnschnitt ausschließlich mit dem markierten zweiten Antikörper versehen.

Tabelle 3 : Primärer und Sekundärer Antikörper für das Zweischritt Gold-immunolabeling

| Proteine | Primärer Antikörper (Biotrend, Köln, Deutschland) | Sekundärer Antikörper (Aurion, Wangeningen, Holland) |
|-------------|---|--|
| slgA | Anti-slgA (human), polyklonal, Wirt: Schaf | Anti Sheep, 10-nm gold-labeled IgG; Wirt: Kaninchen |
| Lysozym | Anti-lysozym (human), polyklonal, Wirt: Schaf | Anti Sheep, 10-nm gold-labeled IgG; Wirt: Kaninchen |
| Lactoferrin | Anti-lactoferrin (human), polyklonal, Wirt: Schaf | Anti Sheep, 10-nm gold-labeled IgG; Wirt: Kaninchen |
| CA I | Anti-CA I (human), polyklonal, Wirt: Schaf | Anti Sheep, 10-nm gold-labeled IgG; Wirt: Kaninchen |
| CA II | Anti-CA II (human), polyklonal, Wirt: Schaf | Anti Sheep, 10-nm gold-labeled IgG; Wirt: Kaninchen |

Der Versuch vollzog sich wie beschrieben. Zuerst wurden die Proben mit Ammoniumchlorid für fünf Minuten inkubiert, um Aldehydgruppen zu blockieren. Anschließend erfolgte eine zweimalige Waschung mit PBS. Es wurde darauf geachtet, dass Überschüsse auf den Mesh-Grids zwischen den jeweiligen Schritten mittels Filterpapier entfernt, respektive abgesaugt wurden.

Daraufhin wurden die Ultradünnschnitte für zehn Minuten mit 2% BSA inkubiert. Das Labeling mit dem Primär-Antikörper erfolgte für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank (4° C). Um ein Verdunsten der 20 µl Ak-Lösung-Tropfen zu verhindern, erfolgte die AK-Inkubation in einer feuchten Kammer. Nach der Ak-Reaktion wurde eine fünfmalige PBS-Waschung vorgenommen. Diese sollte eine Gesamtzeit von 5 min nicht unterschreiten. Die Inkubation mit den Gold-markierten sekundären Antikörpern wurde für zwei Stunden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Grids wurden im Anschluss dreimalig in PBS gewaschen und für eine Minute mit 1% Glutardialdehyd fixiert. Es folgten drei Waschungen mittels aqua bidest, bevor die Proben mit 2% Uranylacetat für 5-10 min kontrastiert wurden.

Nach abschließender Waschung mit aqua bidest wurden die Grids mit Filterpapier getrocknet und zurück in die Präparatebox gegeben.

3.6. Transmissionselektronenmikroskopische Analyse

Die Analyse der In-situ geformten Pellikel erfolgte mit Hilfe des EM 902 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei einer gewählten Vergrößerung von 80.000-fach. Die Nickel-Mesh-Grids wurden zur Analyse der aufgetragenen Dünnschnitte in das TEM eingebracht. Dabei wurden die 10 nm großen Gold-Globuli, die an der Pellikel visualisiert wurden, auf einer festgelegten Gesamtlänge von 100 µm ausgezählt. Die Zählung vollzog sich bei 80.000-facher Vergrößerung in 2-µm Schritten, die der Breite des TEM-Bildschirm entsprach. Charakteristische und repräsentative Ausschnitte der Pellikel wurden bei einer Vergrößerung von 80.000-fach und 35.000-fach fotodokumentiert.

3.7. Statistische Auswertung

Aus den erhobenen Werten wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Goldpartikelzahlen der fünf untersuchten Pellikelkomponenten jeweils in der 30 min- und 120 min- palatinalen sowie in der 30 min- und 120 min- bukkalen Pellikel bestimmt. Die Daten wurden statistisch mit Hilfe der zweiseitigen Varianzanalyse ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

Sechs gesunde Probanden (5 Frauen und 1 Mann) im Alter zwischen 28 und 30 wurden für diese Untersuchung ausgewählt. Nach intraoraler Exposition der bovinen Schmelzproben (30 bzw. 120 min) in den Mundhöhlen der Probanden waren die Prüfkörperoberfläche von einer Pellikel überzogen (**Abb. 1**).

4.1. Struktur und Dicke der In-situ gebildeten Pellikel

Die Betrachtung der Pellikel unter dem TEM ergab, dass die Heterogenität der Morphologie mit der Zeit, d.h. mit dem Alter der Pellikel, zunahm (**Abb. 1**). Ebenso erwies sich die Pellikeldicke als zeitabhängig (**Abb. 1**). Auf den palatinal exponierten Schmelzproben bildete sich nach 30 Minuten eine 5 bis 30 nm messende Pellikel und nach 120 Minuten eine 5 bis 50 nm dicke, homogene und vorwiegend granulär strukturierte Pellikel. Die Dicke der bukkalen Pellikel variierte nach 30 min zwischen 20 nm und 160 nm und nach 120 min zwischen 20 und 350 nm. Die bukkale Pellikel zeigte eine eher globuläre Struktur.

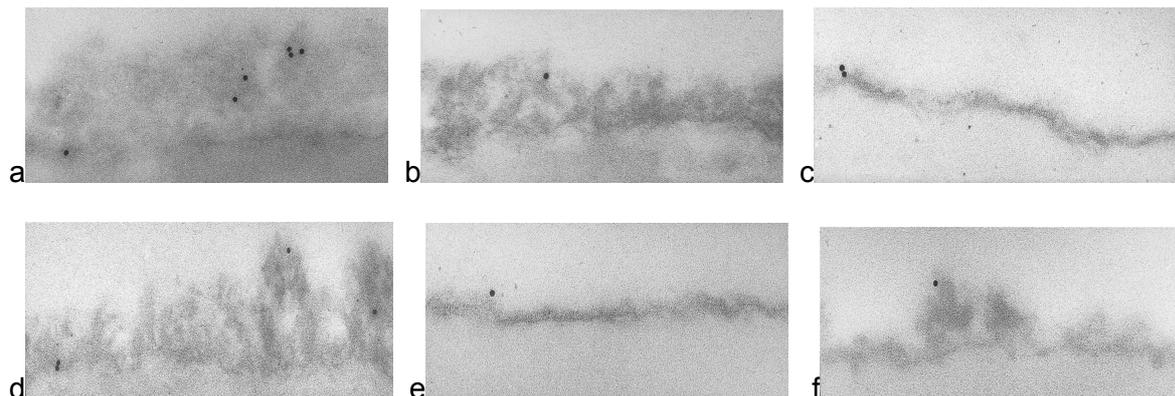


Abbildung 1. Transmissionselektronenmikroskopische Abbildungen der In-situ gebildeten Pellikel bukkal (a,b,d,f) und palatinal (c,e) nach 30 min (c,d,f) und 120 min (a,b,e). Alle Pellikel zeigen eine feine granuläre Struktur und bedecken die komplette Schmelzoberfläche mit einer durchgängigen Schicht. Die Pellikeldicke ändert sich mit der intraoralen Expositionszeit und der Lokalisation in der Mundhöhle. Die Pellikeldicke variiert zwischen 5nm und 350 nm. Die 10-nm Goldpartikel zeigen das Vorhandensein der getesteten Proteine: **CA I** in **a**; **CA II** in **b**; **Laktoferrin** in **c**; **Lysozym** in **d**; **Lysozym** in **e**; **slgA** in **f**. (Original Vergrößerung 85000-fach, Goldglobuli: Durchmesser =10 nm).

4.2. Detektion von IgA, Lactoferrin, Lysozym, CA I und CA II innerhalb der In-situ gebildeten Pellikel.

Die Proteine IgA, Lactoferrin, Lysozym, CA I und CA II konnte in allen In-situ gebildeten Pellikel Proben nachgewiesen werden (**Abb. 1-6**). Signifikante Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Goldpartikel in Bezug auf die Lokalisation (bukkal vs. palatinal) ergaben sich für Lactoferrin und Lysozym. CA I, CA II und IgA wiesen diesbezüglich keine Signifikanz auf (**Abb. 2-6**)

Bei allen sechs Probanden zeigte die statistische Auswertung eine signifikante Zunahme der detektierten Pellikelkomponenten in Abhängigkeit von den jeweiligen Tragezeiten. Bis auf das Lactoferrin zeigte sich für die untersuchten Proteine sowohl bukkal als auch palatinal eine deutliche zeitabhängige Zunahme der detektierbaren Goldpartikel (**Abb. 2-6**). Sowohl nach 30 min als auch nach 120 min intraoraler Exposition konnten bukkal mehr gelabelte Proteine detektiert werden als palatinal. Die durchgeführten Negativ-Kontrollen zeigten nur vereinzelt Gold-Globuli, diese waren ohne spezifische Bindung auf dem Einbettkunststoff verteilt

4.2.1 Häufigkeitsverteilung von Immunglobulin A

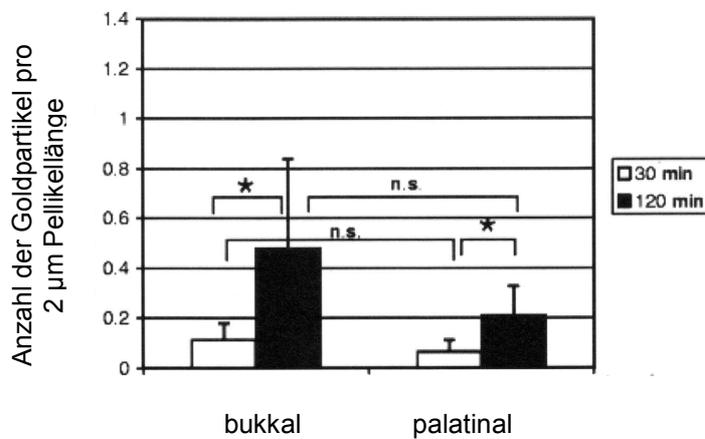


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung von Immunglobulin A (Anzahl der Goldpartikel) in der bukkalen und palatinalen Pellikel, jeweils nach 120 und 30 min intraoraler Exposition. * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$).

Das sekretorische Immunglobulin A wurde sowohl in der palatinal als auch in der bukkalen Pellikel nach 120 min und 30 min nachgewiesen. Es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Häufigkeit der Goldpartikel zu den Expositionszeiten der Schmelzproben. Der Anteil detektierter Proteine stieg mit zunehmender Zeit deutlich an. Gold-Globuli wurden sowohl in den schmelznahen als auch in den äußeren Schichten der Pellikel gezählt.

4.2.2 Häufigkeitsverteilung von Lysozym

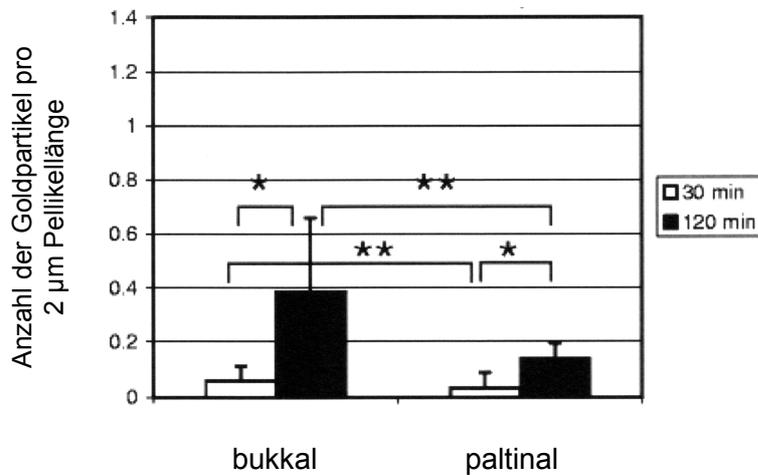


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung von Lysozym (Anzahl der Goldpartikel) in der bukkalen und palatinalen Pellikel, jeweils nach 120 und 30 min intraoraler Exposition. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0.01$.

Lysozym konnte durch das Gold-Immunolabeling Verfahren in allen Schichten der In-situ geformten Pellikel nachgewiesen werden. Die Menge detektierbarer Goldpartikel erhöhte sich signifikant mit der intraoralen Expositionszeit der Schmelzproben ($p < 0.05$).

4.2.3 Häufigkeitsverteilung von Lactoferrin

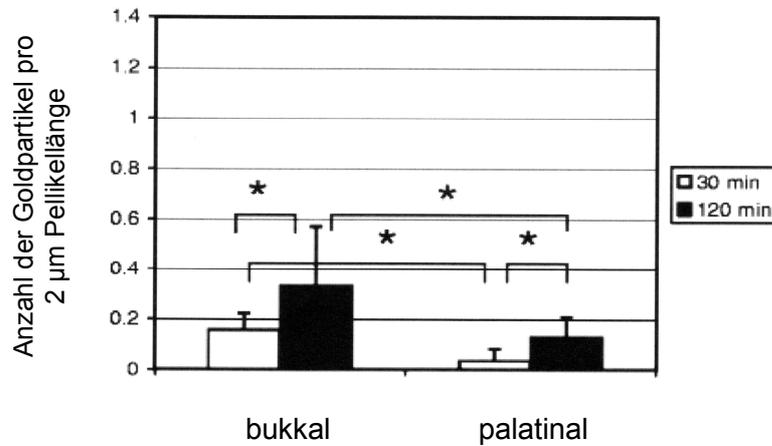


Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung von Lactoferrin (Anzahl der Goldpartikel) in der bukkalen und palatinalen Pellikel, jeweils nach 120 und 30 min intraoralen Exposition. * = $p < 0,05$

Auch Lactoferrin konnte in allen Schichten der In-situ geformten Pellikel nachgewiesen werden. Die Zahl der detektierbaren Goldpartikel stieg in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Pellikelbildung signifikant an ($p < 0,05$).

4.2.4 Häufigkeitsverteilung von Carboanhydrase I

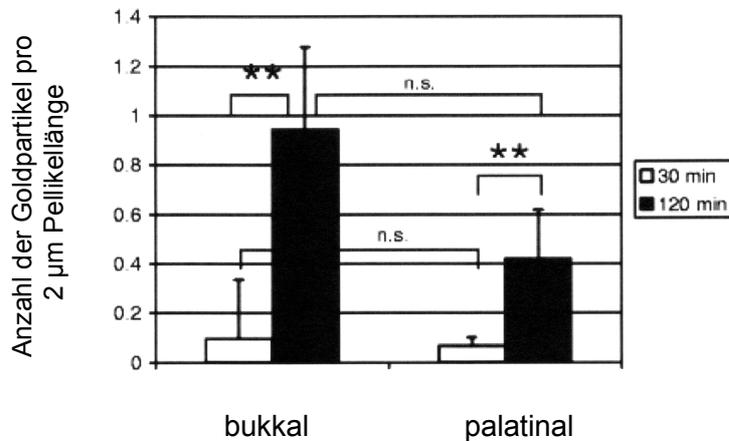


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung von Carboanhydrase 1 (Anzahl der Goldpartikel) in der bukkalen und palatinalen Pellikel, jeweils nach 120 und 30 min intraoralen Exposition. ** = $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$).

Carboanhydrase I konnte sowohl in der bukkalen als auch in der palatinalen 120 min- bzw. 30 min- Pellikel nachgewiesen werden. Die TEM-Analyse zeigte für die 30 min- Pellikel nur geringe Mengenunterschiede der Goldpartikel für den Vergleich der bukkalen und der palatinalen Pellikel. In der bukkalen 120 min- Pellikel wurden jedoch weitaus mehr Goldpartikel als in der palatinalen 120 min- Pellikel gezählt.

4.2.5 Häufigkeitsverteilung von Carboanhydrase II

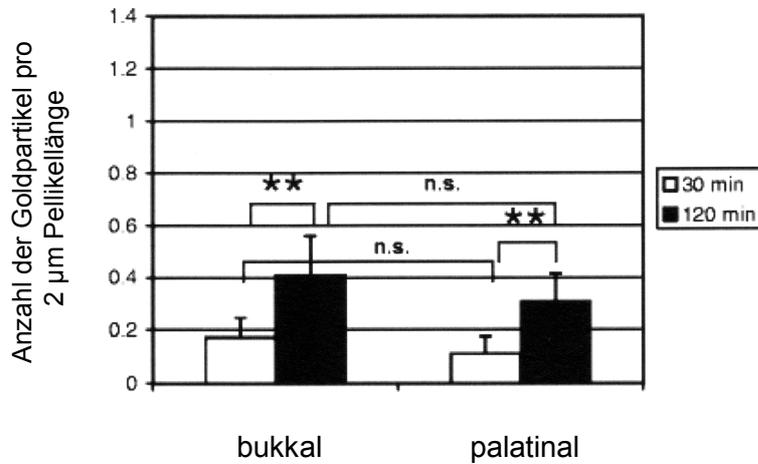


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung von Carboanhydrase II (Anzahl der Goldpartikel) in der bukkalen und palatinalen Pellikel, jeweils nach 120 und 30 min intraoralen Exposition. ** = $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$).

Carboanhydrase 2 wurde in allen Schichten der In-situ geformten Pellikel nachgewiesen. Sowohl in der bukkalen als auch in der palatinalen Pellikel nahm die Menge an detektierten Gold-Partikel zeitabhängig signifikant zu ($p < 0,01$).

5. Diskussion

Die Adhärenz oraler Bakterien an die pellikelbedeckende Zahnoberfläche und die anschließende Proliferation der Mikroorganismen führen zur Ausbildung des mikrobiellen Zahnbelags, der Plaque. Sowohl Karies als auch die häufigsten Parodontopathien lassen sich auf die Existenz von Plaque zurückführen. Die Suche nach präventiven Ansätzen, außer der Plaquereduktion durch antimikrobielle Agenzien, wäre in Zukunft auch im Sinne einer Modulation der Pelikelbildung denkbar.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Adhärenz von Bakterien an die pellikelbedeckte Zahnoberfläche der wohl entscheidende Faktor für die Pathogenität des dentalen Biofilms ist, gilt es, Untersuchungen hinsichtlich Struktur und Zusammensetzung der Pellikel durchzuführen. Wenn es gelänge, den adsorbierten Speichelproteinfilm in seiner Struktur und Zusammensetzung dauerhaft zu verändern, wäre eine Beeinflussung der bakteriellen Adhärenz denkbar. Die vorliegende Untersuchung fokussiert auf die elektronenmikroskopische Detektion und Visualisierung des Verteilungsmusters von protektiven Proteinen/ Komponenten in der In-situ gebildeten Pellikel.

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1. Auswahl der Probanden

Um vergleichbare Rahmenbedingungen für die Bildung der In-situ-Pelikel zu gewährleisten, wurde in die vorliegende Studie sechs allgemeinmedizinisch gesunde Probanden involviert, Alkoholkonsum, Nikotinabusus und die Einnahme von Medikamenten wurden anamnestisch ausgeschlossen. Erkrankungen und/ oder Funktionsstörungen der Speicheldrüsen lagen nicht vor. Die Probanden verfügten über eine ausgezeichnete Mundhygiene. Es bestanden

gesunde Mundschleimhautverhältnisse und keinerlei Kariesaktivität bzw. ein suffizient versorgte Gebisse.

Da jedes Individuum seinen individuellen Speichel bildet, weist auch die Pellikel individualspezifische Eigenschaften auf (HANNIG 1994). Diese kommen durch charakteristische Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung des Speichels, der Sekretionsrate und der biologischen Aktivität der großen Speicheldrüsen zu Stande (VERMAN et al. 1996). Unterschiede in der biochemischen Zusammensetzung der Pellikel von kariesaktiven und inaktiven Personen sind ein Indiz für individualspezifischen Differenzen in der Pellikelzusammensetzung (SLOMIANY et al. 1986). Slomniany et al. (1986) konnten nachweisen, dass Probanden mit einer hohen Kariesaktivität eine signifikant andere Lipidzusammensetzung der Pellikel aufweisen als Probanden mit einer geringen Kariesaktivität. Weiterhin besteht keine gleichmäßige Sekretion der Speicheldrüsen. Diese Tatsache lässt auf topische Unterschiede in der Verfügbarkeit von Speichelbiopolymeren zur Pellikelbildung schließen (HANNIG 1997; CARLEN et al. 1998; HANNIG 1999). Modifizierend auf die Pellikelmorphologie und Funktion könnten sich demnach Sekretionsstörungen (Hyposialie, Xerostomie, z.B. nach Radiatio im Kiefer- und Gesichtsbereich) auswirken.

Um reproduzierbare Bedingungen für die Pellikelbildung sicherzustellen, wurden letzte Mundhygienemaßnahmen zwölf Stunden vor Versuchsbeginn, mittels Zahnbürste und unbehandelter Zahnseide, durchgeführt. Auf Zahnpasta und Mundspüllösungen wurde dabei verzichtet, um auszuschließen, dass die Pellikelzusammensetzung und Adhäsion durch zugesetzte Detergentien beeinflusst wird. Während des Versuches wurde auf eine Nahrungskarenz geachtet. Aus früheren Untersuchungen ist ein Einfluss von Nahrungsbestandteilen auf die Pellikelzusammensetzung bekannt (RYKKE und SÖNJU 1991; SCHÜPBACH et al. 1996). In der Vorliegenden Studie erfolgte die Pellikelbildung aus unstimuliertem Speichel, dessen Zusammensetzung für das Ergebnis des Versuches bedeutsamer ist, da dieser Speichel die überwiegende Zeit im Mundhöhlenmilieu vorherrscht.

5.1.2. Trageschienen für Prüfkörper

Die verwendeten partiellen Minioplastschienen haben den Vorteil, dass diese nicht den harten Gaumen bedecken und somit die störungsfreie Sekretion der Glandulae palatinales ermöglichen (VEERMAN et al. 1996). Da die Schienen im Bereich des Gingivarandes jedoch einige Millimeter die angrenzende Schleimhaut bedeckten, muss berücksichtigt werden, dass evtl. weniger Sulkusflüssigkeit in die Mundhöhle gelangt. Das somit veränderte lokale Angebot an Biopolymeren könnte zu einer veränderten Pellikelzusammensetzung führen. Bei unserem Versuch sind durch die Minioplastschiene nur acht Parodontien bedeckt worden, dies entspricht ca. 30%. Da nur etwa 2% des Speichels Sulkusflüssigkeit sind, erscheint die Wahrscheinlichkeit gering, dass es hierdurch zu einer Veränderung der Pellikelzusammensetzung gekommen ist.

Da die Probekörper direkt an der herausnehmbaren Schiene fixiert sind, birgt diese Methode gegenüber anderer Methoden (Inlays, Kronen, zementierte Splints) jedoch den Vorteil der nicht invasiven Pellikelgewinnung.

Für die Anbringung der Schmelzkörper wurde die Region der ersten Molaren im Oberkiefer jeweils bukkal und palatinal als Versuchsregion definiert. Die Pellikelbildung jeweils bukkal und palatinal im Bereich der ersten Molaren berücksichtigt die regionalen Unterschiede in der Verteilung der puffernden und antibakteriellen Komponenten und trägt den regionsabhängigen Unterschieden in Ultra-Struktur und Dicke der Pellikel Rechnung (HANNIG C. et al. 2006; HANNIG M. 1997; HANNIG M. et al. 2005). Dabei wurde auf lokaldisponierende Faktoren wie Speichelfluss, Speichelzusammensetzung und intraorale Abscherkräfte besonderes Augenmerk gelegt, da sie die Bildung der zu untersuchenden Pellikel beeinflussen. Mit immunologischen und elektronenmikroskopischen Methoden konnte gezeigt werden, dass sowohl die Ultrastruktur als auch die biochemische Zusammensetzung der Pellikel in Abhängigkeit von der Lokalisation differieren (HANNIG

1997; CARLEN et al. 1998; HANNIG 1999a, b; DEIMLING et al. 2004; DEIMLING et al. 2007; HANNIG C. et al. 2007; HANNIG C. 2008).

5.1.3. Probekörper

Als Substrat zur Gewinnung von Pellikelproben werden in der Literatur diverse Materialien beschrieben.

5.1.3.1 Hydroxylapatit

In einigen Studien diente für die In-vitro-Pellikelbildung als Modellsubstanz für den Zahnschmelz synthetisches Hydroxylapatit, das aufgrund seiner großen spezifischen Oberfläche (60-80 m²/g) genügend Protein anlagern kann. Oberflächen wie das Hydroxylapatit weisen jedoch Unterschiede zum humanen bzw. bovinen Schmelz auf. Nur bestimmte Proteine des Speichelspektrums adsorbieren an das synthetische Hydroxylapatit In-vitro. Ungeklärt ist, ob Hydroxylapatit aufgrund seiner Polarität und der selektiv adsorbierenden Speichelproteine eine einheitliche Pellikel entstehen lässt oder das individuelle Angebot an Speichelproteinen über die Zusammensetzung und die Eigenschaften der Pellikel entscheidet. Ob Unterschiede in der Zusammensetzung von In-vitro- und In-vivo-Pellikel durch andere Vorgänge verursacht werden, die durch das In-vitro Vorgehen bzw. durch Proteolyse oder thermische Bedingungen beeinflusst sind, bleibt noch zu beantworten.

5.1.3.2. Menschlicher Schmelz

Bei der In-vivo, d.h. auf der natürlichen Schmelzoberfläche gebildeten Pellikel stellt sich zum einen das Problem der Pellikelgewinnung und zum anderen ist die abgelöste Proteinmenge für die analytische Bestimmung häufig zu gering. Der direkte Vergleich zwischen auf bovinem und humanem Schmelz gebildeter Pellikel steht noch aus. Es muss darauf hingewiesen werden, dass Rinderschmelz nicht mit humanen Schmelz identisch ist.

5.1.3.3. Boviner Schmelz

Für die Verwendung von Rinderzähnen als Substrat zur Pellikelgewinnung gibt es mehrere Gründe. Zum einen stehen sie in beliebiger Menge mit einer intakten Oberfläche zur Verfügung (Amaechi et al. 1999). Zum anderen kann im Vergleich zu menschlichen Zähnen eine größere, plane Schmelzoberfläche gewonnen werden.

Rinderzähne wurden schon in zahlreichen Untersuchungen zur Herstellung von Schmelzproben für die Pellikelbildung benutzt (MEURMAN und FRANK 1991; DEIMLING et al. 2004; HANNIG C. et al. 2004; HANNIG C. et al. 2005; HANNIG M. 1997; HANNIG M. et al. 2005; HANNIG C. 2004, 2005, 2006).

Es wurde deutlich, dass man mit Untersuchungen über die Aktivität der Enzyme in der Pellikel auf bovinen Schmelzproben in vielen Studien Erfolg hatte (HANNIG C. et al. 2004; HANNIG C. 2006; HANNIG C. 2006; HANNIG C. 2008). In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass verschiedene Dentalmaterialien, die als Substrat zur Pellikelbildung eingesetzt wurden, keinen Einfluss auf Enzymaktivität in der Pellikel haben (HANNIG C. et al. 2006).

Bis auf die Tatsache, dass der Schmelz der Rinderzähne etwas weicher (ARENDS et al. 1979) und weniger dicht als der menschliche Zahnschmelz ist, entspricht die Zusammensetzung des Rinderschmelzes annähernd der des menschlichen Schmelzes. In

einer elektronenmikroskopischen Untersuchung an prismatischem Zahnschmelz konnte bewiesen werden, dass die Oberfläche eines durch Erosion veränderter Rinderzahnschmelzes sich nicht vom menschlichem erodiertem Zahnschmelz unterscheiden lässt (MEURMAN und FRANK 1991). Diese Fakten führten, wie auch schon in früheren Studien (AMAECCHI et al. 1999; DEIMLING 2004; HANNIG C. 2004; HANNIG C. 2005; HANNIG M. 1999; HANNIG M. 2005) dazu, dass in der vorliegenden Untersuchung boviner Zahnschmelz als Ersatz für humane Schmelzproben verwendet wurde.

5.1.4. Gold-Immunolabeling

Die vorliegende TEM-Studie der In-situ gebildeten Pellikel erlaubt nicht nur den Nachweis von Lactoferrin, Lysozym, IgA, Carboanhydrase I und II, sondern auch die Visualisierung deren Verteilung innerhalb der Pellikel.

Möglich war dies durch die Methode des Gold-Immunolabelings und die nachfolgende TEM-Untersuchung. Diese Technik ermöglicht den Nachweis verschiedener Proteine in der Pellikel, ohne sich chemisch-mechanischer Methoden zu bedienen (HANNIG et al. 2005). Sie hat sich mittlerweile etabliert, um verschiedene Proteine in der Pellikel zu detektieren (DEIMLING et al. 2004, 2007; HANNIG C. et al. 2007, 2008a, 2008b).

Es muss allerdings beachtet werden, dass nicht alle Moleküle der zu untersuchenden Proteine in der Pellikel durch dieses Verfahren detektiert werden können. Einige Bindungsstellen können bei der Einbettung blockiert werden und stehen somit für die Anlagerung der Antikörper nicht zur Verfügung.

Außerdem ist durch den Vorgang der Fixierung durch Paraformaldehyd und Glutaraldehyd und die Dehydrierung der Pellikel mit Ethanol eine Konformationsänderung der Bindungsstellen möglich. Neben diesen methodischen Aspekten kann es während der Adsorption der Proteine an die Pellikel zu Konformationsänderung der Bindungsstellen der Proteine selbst kommen.

Trotzdem zeigt unsere Studie, dass sich eine signifikante Menge von Antikörpern gegen Lactoferrin, Lysozym, IgA, CA I bzw. CA II an die In-situ geformte Pellikel bindet. Zum ersten Mal wird die Verteilung dieser anti-mikrobiellen und puffernden Proteine in allen Schichten der In-situ geformten Pellikel aufgezeigt. Eine zeitabhängige Zunahme der gelabelten Proteine stützt diese Aussage.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Pellikelultrastruktur

Mit zunehmender Pellikelbildungszeit nahm die Heterogenität der Pellikel-Morphologie zu, auch die Pellikeldicke erwies sich als zeitabhängig. Auf den Palatinalflächen der Zähne bildete sich nach ca. 30 min eine 5 nm bis 30 nm dicke Pellikel und nach zwei Stunden eine 5 bis 50 nm dicke, homogene und vorwiegend granulär strukturierte Pellikel, wohingegen die Dicke der bukkalen Pellikel nach 30 min zwischen 20 nm und 160 nm und nach 120 min 20 bis 350 nm betrug. Die bukkale Pellikel war dicht und eher globulär strukturiert.

Diese TEM- Resultate befinden sich in guter Übereinstimmung und stehen im Einklang mit früheren TEM- Untersuchungen zur Ultrastruktur der Pellikel (HANNIG 1997,1999). Generell unterscheiden sich die palatinale und die bukkale Pellikel in ihrer Struktur und in ihrem Proteingehalt, schon allein aufgrund der äußeren Einflüsse. Das sind zum einen die umliegenden Speicheldrüsen, deren unterschiedlichen Lage und Aktivität, und zum anderen Einflüsse wie die Bewegung der Zunge (palatinal) und der Schutz durch die Wange (bukkal).

5.2.2 Immunglobulin A

Das sekretorische Immunglobulin A wurde sowohl palatinal als auch bukkal nach 120 min und 30 min nachgewiesen. Es zeigt sich somit als ein „frühes“ Protein in der Pellikel und macht seine Aufgabe als Primärantwort des Organismus gegen infektiöse Partikel wie Bakterien und Viren deutlich. Mehr gelabeltes IgA wurden in der breiteren bukkalen Pellikel nachgewiesen, was auf die Lage zu den großen Speicheldrüsen zurückzuführen ist. Verschiedene **Immunglobuline** sind in der Pellikel und im Speichel nachgewiesen worden (AL-HASHIMI und LEVINE 1989). Auch das **IgG** und **IgM** konnten von SMITH et al. (1991) in der Pellikel nachgewiesen werden.

5.2.3 Carboanhydrase

Die **Carboanhydrase I** konnte sowohl in der bukkalen als auch in der palatinalen 120 min-Pellikel und 30 min- Pellikel nachgewiesen werden. In der TEM-Analyse zeigte sich, dass nach 30 Minuten nur wenig gelabelte Carboanhydrase in der palatinalen als auch bukkalen Pellikel zu finden war. Nach 120 Minuten konnte in der bukkalen Pellikel eine deutliche Steigerung, der detektierbaren Goldpartikel, im Vergleich zur palatinalen Pellikel aufgezeigt werden.

Auch die **Carboanhydrase II** konnte in der In-situ geformeten Pellikel nachgewiesen werden.

Hierbei konnte jedoch eine größere Anzahl von gelabelten Protein schon in der 30 min-Pellikel nachgewiesen werden.

Im Allgemeinen beteiligt sich die Carboanhydrase an der Aufrechterhaltung der pH-Homeostase an verschiedenen Oberflächen (KADOYA Y. et al. 1987, PARKKILA S. 1990,

1994) Die Pufferwirkung des im Speichel enthaltenem Hydrogencarbonates bzw. Carbonates begünstigt eine Neutralisierung der von den Plaquebakterien gebildeten organischen Säuren. Somit scheint es, als könnte die Carboanhydrase ihre Pufferwirkung in der Pellikel erst nach einiger Zeit, d.h. nach 120 Minuten Pellikelbildungszeit, völlig entfalten. Bei der "frühen" 30 min- Pellikel war die detektierbare Carboanhydrase-Menge sehr gering, so dass möglicherweise keine vollständige Elimination der Säuren in der Pellikel erfolgen kann. Es könnte interessant sein, eine vergleichbare Untersuchung zur Detektion von Carboanhydrase an Kinder-Pellikeln durchzuführen, da eine besonders hohe Aktivität der Carboanhydrase im Speichel von Kinder mit kariesfreiem Gebiss ermittelt werden konnte. Dieser Wert korreliert negativ mit den DMFT (KIVELA et al. 1999; SZABO 1974). Neben der Carboanhydrase I und II wurde auch die Carboanhydrase VI in der In-situ geformten Pellikel nachgewiesen (LEINONEN et al. 1999). Aufgrund einer intrinsischen Kreuzreaktion von Antikörpern gegen CA I und CA II mit Carboanhydrase VI könnten positiv markierte Proteine in der Pellikel auch Carboanhydrase VI darstellen.

5.2.4 Lactoferrin

Das **Lactoferrin** konnte in allen Schichten der Pellikel nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch bevorzugt in der bukkalen Pellikel, wobei schon nach 30 Minuten eine größere Menge Lactoferrin detektiert werden konnte als in der palatinalen 120 Minuten- Pellikel. Das im Speichel und der Pellikel vorhandene eisenbildende Protein **Lactoferrin** vermag mit Mikroorganismen erfolgreich um das Fe^{3+} zu konkurrieren sodaß das für Bakterienwachstum notwendige Eisen nicht mehr zu Verfügung steht.

5.2.5 Lysozym

Die immuno-elektronenmikroskopische Analysen zeigen, dass Lysozym randomisiert in der In-situ-Pellikel verteilt ist.

Das **Lysozym** des Speichels ist ein säurehaltiges Protein. Es vermag bei längerer Einwirkung, das Muringerüst der Bakterienzellwand zu spalten und kann damit die völlige Auflösung eines Bakteriums herbeiführen. Das Lysozym ist damit in die Abwehr bakterieller Infektionen eingeschaltet (BUDDECKE 1981). Trotzdem sind manche grampositive Bakterien, wie auch *S. mutans*, resistent gegen die Spaltung durch Lysozym (LAIBLE; GERMAINE 1984). Lysozym wurde sowohl in experimentellen Studien zur Pellikelbildung (RÖLLA 1983; PRUITT 1969), wie auch in der In-situ-Pellikel nachgewiesen (VACCA SMITH; BOWEN 2000; TENOVUO 1989; LAIBLE 1985; HANNIG C. et al. 2005, 2006, 2009). Es zeigt bereits nach 5 min in der In-situ geformten Pellikel eine konstante enzymatische Aktivität (VACCA SMITH; BOWEN 2000). Es ist beachtlich, dass Lysozym an bestimmte Bakterien binden kann um zu einer Aggregation dieser führen und andererseits eine Anlagerung von *Streptococcus* an das speichelüberzogene Hydroxylapatit inhibieren kann (ROGER et al. 1984). Im Gegensatz zur alpha- Amylase, die hauptsächlich durch die *G. parotidea* sezerniert wird, wird das Lysozym von den sublingualen und submandibulären Speicheldrüsen sezerniert. Hierbei zeigt die Pellikel an verschiedenen Seiten der Zähne eine unterschiedliche enzymatische Aktivität von Lysozym (HANNIG M. und HANNIG C. 2009).

5.3 Schlussfolgerung

Im Rahmen der vorliegenden Studie gelang erstmals die immuno-elektronenmikroskopische Visualisierung von Carboanhydrase I und II, Lysozym, Laktoferrin und IgA in der In-situ gebildeten Pellikel.

Sowohl in der bukkalen als auch in der palatinalen Pellikel aller sechs Probanden konnten die fünf untersuchten protektiven Komponenten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden immuno-elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigen, dass die untersuchten protektiven Proteine aufgrund des randomisierten Verteilungsmusters innerhalb der Pellikel wichtige Strukturkomponenten der In-situ gebildeten Pellikelschicht darstellen. Somit kann die Hypothese dass Lysozym, Lactoferrin, IgA sowie Carboanhydrase I und II gleichmäßig in der Pellikel verteilt sind, bestätigt werden. Die Resultate der vorliegenden Studie bestätigen auch die Hypothese, dass die Gesamtmenge der in der Pellikel immobilisierten protektiven Speichelproteine mit zunehmender Pellikelbildungszeit ansteigt. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass auch das protektive Potential der Pellikel mit steigender Pellikelbildungszeit zunimmt. Lokalisationsabhängige Unterschiede in der Menge der detektierbaren Goldglobuli ließen sich für Lysozym und Lactoferrin aufzeigen, während für Carboanhydrase I und II sowie IgA keine signifikanten Unterschiede zwischen den bukkal und palatinal getragenen Proben hinsichtlich der Häufigkeit detektierbarer Goldpartikel bestanden. Die Hypothese, dass die intraorale Lokalisation einen Einfluss auf das Vorkommen und die Nachweisbarkeit protektiver Pellikelkomponenten ausüben könnte, kann folglich nur partiell bestätigt werden.

6. Literaturverzeichnis

AALTONEN A.S., TENOVUO J., LEHTONEN O.P., SAKSALA R., MEURMAN O. (1985)

Serum antibodies against oral *Streptococcus mutans* in young children in relation to dental caries and maternal close-contacts.

Arch Oral Biol 30(4): 331-335.

AL-HASHIMI J., LEVINE M.J. (1989)

Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle.

Arch Oral Biol 34(4): 289-295.

AMAECHI B.T., HIGHAM S.M., EDGAR W.M., MILOSEVIC A. (1999)

Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion.

J Dent Res 78(12): 1821-1828.

ARENDS J., SCHUTHOF J., CHRISTOFFERSEN J. (1986)

Inhibition of enamel demineralization by albumin in vitro.

Caries Res 20(4): 337-340.

ARMSTRONG W.G. (1966)

Amino-acid composition of the acquired pellicle of human tooth enamel.

Nature 210(19): 197-198.

ARMSTRONG W.G. (1967)

The composition of organic films formed on human teeth.

Caries Res 1(2): 89-103.

ARMSTRONG W.G. (1971)

Characterisation studies on the specific human salivary proteins adsorbed in vitro by hydroxyapatite.

Caries Res 5(3): 215-227.

ARMSTRONG W.G., HAYWARD A.F. (1968)

Acquired organic integuments of human enamel: a comparison of analytical studies with optical, phase-contrast and electron microscope examinations.

Caries Res 2(4): 294-305.

BEELY J.A. (1991)

Clinical applications of electrophoresis of human salivary proteins.

J Chromatography 569: 261-280.

BENNICK A., CANNON M., MADAPALLIMATTAM G. (1981)

Factors affecting the adsorption of salivary acidic proline-rich proteins to hydroxyapatite.

Caries Res 15(1): 9-20.

- BENNICK A., CHAU G., GOODLIN R., ABRAMS S., TUSTIAN D., MADAPALLIMATTAM G. (1983)
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(1): 19-27.
- BERNARDI G., GIRO M.G., GAILARD C. (1972)
Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns: some new developments.
Biochem Biophys Acta 278: 409-420.
- BERGMANN J.E., GÜLZOW H.J. (1995)
Detection of binding of denatured salivary α -amylase to *Streptococcus sanguis*.
Arch Oral Biol 40: 973-974.
- BERTHOLD P. (1979)
Formation of salivary coatings and dental plaque on two different supporting materials. An electron microscopic study.
J Periodontol 50: 397-399.
- BÖßMANN K., HOPPE W.F. (1974)
Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Funktion des Zahnoberhäutchens.
Dtsch Zahnärztl Z 29: 1030-1035.
- BUDDECKE E. (1981)
Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin.
de Gruyter, Berlin; New York.
- BUSSCHER H.J., WEERKAMP A.H., VAN DER MEI H.C., VAN PELT A.W., DE JONG H.P., ARENDS J. (1984)
Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion.
Appl Environ Microbiol 48(5): 980-983.
- CARLEN A., BORJESSON A.C., NIKDEL K., OLSSON J. (1998)
Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite.
Caries Res 32(6): 447-455.
- CARLEN A., OLSSON J., BORJESSON A.C. (1996)
Saliva-mediated binding in vitro and prevalence in vivo of *Streptococcus mutans*.
Arch Oral Biol 41(1): 35-39.
- COLE A.S., EASTOE J.E. (1998)
The oral environment.
In: *Biochemistry and oral biology*, 2nd ed. Bristol: Wright, (1988) pp 475-489.

DAWES C., JENKINS G.N., TONGE C.N. (1963)

The nomenclature of the integuments of the enamel surface of the teeth.
Br Dent J 115: 65-68.

DAWES C. (1996)

Clearance of substances from oral cavity-implications for oral Health. In: Edgar WM, O`Mullane DM (Eds): Saliva and oral health. Second Ed, Thanet Press-LTD., Margate pp 67-79.

DEIMLING D., BRESCHI L., HOTH-HANNIG W., RUGGERI A., HANNIG C., NEKRASHEVYCH Y., PRATI C., HANNIG M. (2004)

Electron microscopy detection of salivary alpha-amylase in the pellicle formed in situ.
Eur J Oral Sci 112: 503-509.

DOUGLAS C.W. (1994)

Bacterial-protein interactions in the oral cavity.
Adv Dent Res 8: 254-262.

EGGEN K.H., RÖLLA G. (1982)

Gel filtration, ion exchange chromatography and chemical analysis of macromolecules present in acquired enamel pellicle (2-hour pellicle).
Scand J Dent Res 90(3): 182-188.

EGGEN K.H., RÖLLA G. (1983)

Further studies on the composition of the acquired enamel pellicle.
Scand J Dent Res 91(6): 439-446.

EMBERY G., HEANEY T.G., STANBURY J.B. (1986)

Studies on the organic polyanionic constituents of human acquired dental pellicle.
Arch Oral Biol 31(9): 623-625.

ERICSON T., PRUITT K.M., ARWIN H., LUNDSTROM I. (1982)

Ellipsometric studies of film formation on tooth enamel and hydrophilic silicon surfaces.
Acta Odontol Scand 40(4): 197-201.

ERICSSON Y. (1959)

Clinical investigation of the salivary buffering action.
Acta Odontol Scand 17: 131-165.

FISHER S.J., PRAKOBPHOL A., KAJISA L., MURRAY P.A. (1987)

External radiolabeling of components of pellicle on human enamel and cementum.
Arch Oral Biol 32(7): 509-517.

FRANK R. (1949)

Recherches sur la membrane de Nasmyth.
Comptes Rendues des Séances de la Societé de Biologie 143: 1243-1245.

- FRANK R.M., BRENDDEL A. (1966)
Ultrastructure of the approximal dental plaque and the underlying normal and carious enamel.
Arch Oral Biol 11: 883-912.
- GERMAINE G.R., TELLEFSON L.M. (1986)
Potential role of lysozyme in bacterial activity of in vitro-acquired salivary pellicle against *Streptococcus faecium* 9790.
Infect Immun 54(3): 846-854.
- GIBBONS R.J., HAY D.I. (1988)
Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *actinomyces viscosus* LY 7 to apatitic surfaces.
Infect Immun 56: 439-445.
- GIBBONS R.J., HAY D.I. (1989)
Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces.
J Dent Res 68(9): 1303-1307.
- HANNIG C., ATTIN T., HANNIG M., HENZE E., BRINKMANN K., ZECH R. (2004)
Immobilisation and activity of human alpha-amylase in the acquired enamel pellicle.
Arch Oral Biol 49: 469-475.
- HANNIG C., HANNIG M., ATTIN T. (2005)
Enzymes in the acquired enamel pellicle.
Eur J Oral Sci 113: 2-13.
- HANNIG C., HANNIG M. (2009)
Enzyme in der Pellikel- eine Synopsis
Dtsch Zahnärztl Z 64(9): 533-547.
- HANNIG C., HUBER K., LAMBRITCHS I., GRÄSER J., D'HAEN J., HANNIG M (2007)
Detection of salivary alpha-amylase and lysozym exposed on the pellicle formed in situ on different materials.
J Biomed Mater Res A 83: 98-103.
- HANNIG C., RUGGERI A., AL-KHAYER B. SCHMITZ P., SPITZMÜLLER B., DEIMLING D., HUBER K., HOTH-HANNIG w., BOWEN W.H., HANNIG M. (2008)
Electron miscroscopic detection and aktivty of Glykosyltransferase B, C and D in the in situ formend pellicle.
Arch Oral Biol 53: 1003-1010.
- HANNIG C., HANNIG M., REHMER O., BRAUN G., HELLWIG E., AL-AHMAD A. (2007)
Fluorescence microscopic visualization and quantiation of initial bacterial colonization on enamel in situ.
Arch Oral Biol 52: 1048-1056.

HANNIG C., HOCH J., BECKER K., HANNIG M., ATTIN T. (2005)
Lysozym activity in the initially formed in situ pellicle.
Arch Oral Biol 50: 821-828.

HANNIG C., SPITZMÜLLER B., AL-AHMAD A., HANNIG M. (2008a)
Effects of Cistus-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle.
J Dent 36: 540-545.

HANNIG C., SPITZMÜLLER B., HANNIG M. (2009)
Characterisation of lysozyme activity in the in situ pellicle using a fluorimetric assay.
Clin Oral Invest 13: 15-22.

HANNIG C., SPITZMÜLLER B., MILLER M., HELLWIG E., HANNIG M. (2008b)
Intrinsic enzymatic crosslinking and maturation of the in situ pellicle.
Arch Oral Biol 53: 416-422.

HANNIG C., SPITZMÜLLER B., KNAUSENBERGER S., HOTH-HANNIG W., HELLWIG E., HANNIG M. (2008)
Detection and activity of peroxidase in the in situ formed enamel pellicle.
Arch Oral Biol 53: 849-858.

HANNIG C., SPITZMÜLLER B., HANNIG M. (2009)
Characterisation of lysozyme activity in the in situ pellicle using a fluorimetric assay.
Clin oral Invest 13: 15-21.

HANNIG C, WASSER M, BECKER K, HANNIG M, HUBER K, ATTIN T (2006)
Influence of different restorative materials on lysozyme and amylase activity of the salivary pellicle in situ.
J Biomed Mater Res A 78: 755-761.

HANNIG, M. (1994)
Bildung, Funktion und Bedeutung der Pellicle Biochemische ,bakteriologische und strukturelle Aspekte.
Oralprophylaxe 16: 39-46.

HANNIG, M. (1997)
Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials.
Eur J Oral Sci 105(5): 422-433.

HANNIG, M. (1998)
Die protektive Wirkung der Pellicel bei der Schmelzerosion durch verschiedene Säuren.
Zahnärztliche Welt 107: 421-426

HANNIG, M. (1999a)
Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo.
Eur J Oral Sci 107(1): 55-64.

- HANNIG, M. (1999b)
Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period.
Clin Oral Investig 3(2): 88-95.
- HANNIG, M., BALZ, M. (1999)
Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion.
Caries Res 33(5): 372-379.
- HANNIG M., BÖßMANN K. (1989)
Pellicula dentis- Ultrastrukturelle Vielfalt als Ausdruck komplexer Bildung und Reifung.
Teil I und II. Quintessenz 40: 1329-1327 bzw. 1485-1489.
- HANNIG M. (2002)
The protective nature of salivary pellicle.
Int Dent J 52 (2): 7-13.
- HANNIG M., FIEBINGER M., GÜNTZER M., DÖBERT A., ZIMEHL R., NEKRASHEVYCH Y. (2004)
Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle.
Arch Oral Biol 49: 903-910.
- HANNIG M., JOINER A. (2006)
The structure, function and properties of the acquired pellicle. In: Duckworth RM (ed) The teeth and their environment.
Monogr Oral Sci, Basel, Karger pp 29-64.
- HANNIG M., KAHNAFER A.K., HOTH-HANNIG W., AL-MARRAWI F., ACIL Y. (2005)
Transmission electron microscopy comparison of methods for collection in situ formed enamel pellicle.
Clin Oral Investig 9: 30-37.
- HATTON M.N., LOOMIS R.E., LEVINE M.J., TABAK L.A. (1985)
Masticatory lubrication. The role of carbohydrate in the lubricating property of a salivary glycoprotein-albumin complex.
Biochem J 230: 817-820.
- HAY, D.I. (1967)
The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel.
Arch Oral Biol 12(8): 937-946.
- HAY, D.I. (1969)
Some observations on human saliva proteins and their role in the formation of the acquired enamel pellicle.
J Dent Res 48(5): 806-810.

HAY, D.I. (1973)

The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite.
Arch Oral Biol 18(12): 1517-1529.

HAY D.I., MORENO E.C. (1979)

Differential adsorption and chemical affinities of proteins for apatite surfaces.
J Dent Res 58: 930-940.

HELLWIG E., KLIMEK J., ATTIN T. (1999)

Einführung in die Zahnerhaltung. 2.
Auflage, Urban und Fischer, München – Jena

JURIAANSE, A.C., BOOIJ, M. (1979)

Isolation and partial characterisation of three acidic proteins from human submandibular saliva.
Arch Oral Biol 24(8): 621-625.

KADOYA Y., KUWAHARA H., SHIMAZAKI M., OGAWA Y., YAGI T. (1987)

Isolation of a novel carbonic anhydrase from human saliva and immunohistochemical demonstration of its related isozymes in salivary gland.
Osaka City Med J 33: 99-109

KAUTSKY M.B., FEATHERSTONE J.D. (1993)

Effect of salivary components on dissolution rates of carbonated apatites.
Caries Res 27(5): 373-377.

KÖNIG K.G. (1987)

Karies und Parodontopathien.
Thieme Verlag Stuttgart.

KOUSVELARI E.E., BARATZ R.S., BURKE B., OPPENHEIM F.G. (1980)

Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle, and glandular tissue specimens.
J Dent Res 59(8): 1430-1438.

KRAUS F.W., ÖRSTAVIK D., HURST D.C., COOK C.H. (1973)

The acquired pellicle: variability and subject-dependence of specific proteins.
J Oral Pathol 2(3): 165-173.

KUBOKI Y., TERAOKA K., OKADA S. (1987)

X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel.
J Dent Res 66: 1016-1019.

LAIBLE N.J., GERMAINE G.R. (1985)

Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides.
Infect Immun 48(3): 720-728.

- LAMKIN M.S., ARANCILLO A.A., OPPENHEIM F.G. (1996)
Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hydroxyapatite.
J Dent Res 75(2): 803-808.
- LEACH S.A. (1967)
The acquired integuments of the teeth. A biochemical review.
Br Dent J 122(12): 537-544.
- LEACH S.A., CRITCHLEY P., KOLENDO A.B., SAXTON C.A. (1967)
Salivary glycoproteins as components of the enamel integuments.
Caries Res 1(2): 104-111.
- LEINONEN J., KIVELA J., PARKKILA S., PARKKILA A.K., RAJANIEMI H. (1999)
Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle.
Caries Res 33(3): 185-190.
- LENDENMANN U., GROGAN J., OPPENHEIM F.G. (2000)
Saliva and dental pellicle-a review.
Adv Dent Res 14: 22-28.
- LENZ H. (1967)
Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Schmelzoberhäutchen (SOH): 2. Das Schmelzoberhäutchen von durchgebrochenen Zähnen.
Dtsch Zahnärztl Z 22: 1466-1482.
- LI J., HELMERHORST E.J., TROXLER R.F., OPPENHEIM F.G. (2000)
Identification of in vivo pellicle constituents by analysis of serum immune responses.
J Dent Res 83: 60-64.
- LIE T. (1977)
Scanning and transmission electron microscope study of pellicle morphogenesis.
Scand J Dent Res 85(4): 217-231.
- LIE T. (1979)
Morphological studies on dental plaque formation.
Acta Odontol Scand 37: 73-85.
- LÖFFLER E.P., PETRIDES P.E. (1997)
Biochemie und Pathobiochemie.
5. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- MANDEL I.D., THOMPSON R.H., ELLISON S.A. (1963)
Carbohydrat components of submaxillary saliva.
41st Gener. Meet. IADR, Pittsburgh.

- MAYHALL C.W. (1970)
Concerning the composition and source of the acquired enamel pellicle of human teeth.
Arch Oral Biol 15(12): 1327-1341.
- MAYHALL C.W. (1975)
Studies on the composition of the enamel pellicle.
Alabama J Med Sci 12(3): 252-271.
- MAYHALL C.W. (1977)
Amino acid composition of experimental salivary pellicles.
J Periodontol 48(2): 78-91.
- MAYHALL C.W., BUTLER W.T. (1976)
The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles.
J Oral Pathol 5(6): 358-370.
- MEURMAN J.H., FRANK R.M. (1991)
Progression and surface ultrastructure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel.
Caries Res 25(2): 81-87.
- MORENO E.C., KRESAK M., HAY D.I. (1984)
Adsorption of molecules of biological interest on to hydroxyapatite.
Calcif Tissue Int 36(1): 48-59.
- MOSS S.J. (1998)
Dental erosion.
Int Dent J 48(6): 529-539.
- NASMYTH A. (1839)
On the structure, physiologie, and pathologie of the persistent capsular investments and pulp of the tooth.
Trans Royal Med Chir Soc Lond 22: 310-328.
- NIEUW AMERONGEN A.V., ODERKERK C.H., DRIESSEN A.A. (1987)
Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro.
Caries Res 21(4): 297-309.
- NYVAD B., FEJERSKOV O. (1987)
Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo.
Scand J Dent Res 95(4): 297-307.
- ÖRSTAVIK D., KRAUS F.W. (1973)
The acquired pellicle: immunofluorescent demonstration of specific proteins.
J Oral Pathol 2(1): 68-76.

ÖSTE R., RÖNSTROM, A., BIRKHED D., EDWARDSSON S., STENBERG M. (1981)

Gas-liquid chromatographic analysis of amino acids in pellicle formed on tooth surface and plastic film in vivo.

Arch Oral Biol 26(8): 635-641.

PARKKILA S., KAUNISTO K., RAJANIEMI L., KUMPULAINEN T., JOKINEN K., RAJANIEMI H. (1990)

Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands.

J Histochem Cytochem 38(7): 941-947.

PARKILLA S., PARKILLA A.K., JUVONEN T. RAJANIEMI H. (1994)

Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II and IV in the human alimentary tract.

Gut 35: 646-650.

PRUITT K.M., CALDWELL R.C., JAMIESON A.D. and TAYLOR R.E. (1969)

The interaction of salivary proteins with tooth surface.

J Dent Res 48: 818-823.

RÖLLA G., CIARDI J.E., BOWEN W.H. (1983)

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(3): 186-190.

RUAN M.S., DI PAOLA C., MANDEL I.D. (1986)

Quantitative immunochemistry of salivary proteins adsorbed in vitro to enamel and cementum from caries-resistant and caries-susceptible human adults.

Arch Oral Biol 31(9): 597-601.

RÜDIGER S.G., CARLEN A., MEURMAN J.H., KARI K., OLSSON J. (2002)

Dental biofilms at healthy and inflamed gingival margin.

J Clin Periodontol 29: 524-530.

RYKKE M., SÖNJU T. (1991)

Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected in vivo after 2 hours and after 24 hours.

Scand J Dent Res 99(6): 463-469.

RYKKE M., SÖNJU T., RÖLLA G. (1990)

Interindividual and longitudinal studies of amino acid composition of pellicle collected in vivo.

Scand J Dent Res 98(2): 129-134.

SCANNAPIECO F.A., TORRES G., LEVINE M.J. (1993)

Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation.

Crit Rev Oral Biol Med 4(3-4): 301-307.

- SCANNAPIECO F.A., TORRES G.I. and LEVINE M.J. (1995)
Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite.
J Dent Res 74: 1360-1366.
- SCHÜPBACH P., OPPENHEIM F.G., LENDENMANN U., LAMKIN M.S., YAO, Y., GUGGENHEIM B. (2001)
Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin, and histatins in acquired enamel pellicles in vitro.
Eur J Oral Sci 109(1): 60-68.
- SIQUEIRA W.L., OPPENHEIM F.G. (2009)
Small molecular weight proteins/peptides present in the in vivo formed human acquired enamel pellicle.
Arch Oral Biol 54(5): 437-44
- SIQUEIRA W.L., ZHANG W., HELMERHORST E.J., OPPENHEIM F.G. (2008)
Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS
J Proteome Res 6(6): 2152-60
- SKJÖRLAND K.K., RYKKE M., SÖNJU T. (1995)
Rate of pellicle formation in vivo.
Acta Odontol Scand 53(6): 358-362.
- SLOMIANY B.L., MURTY V.L., MANDEL I.D., SENGUPTA S., SLOMIANY A. (1990)
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(3): 175-180.
- SLOMIANY B.L., MURTY V.L., ZDEBSKA E., SLOMIANY A., GWOZDZINSKI, K., MANDEL I.D. (1986)
Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man.
Arch Oral Biol 31(3): 187-191.
- SMITH P.M. (1996)
Mechanisms of Secretion by Salivary Glands. In: Edgar WM, O`Mullane DM (eds.): Saliva and Oral Health. 2. Aufl.,
Thanet Press Limited, London pp 9-25.
- SMITH D.J., TAUBMAN M.A., ALI-SALAAM P. (1991)
Immunoglobulin isotypes in human minor gland saliva.
J Dent Res 70(3): 167-170.

- SÖNJU T., CHRISTENSEN T.B., KORNSTAD L., RÖLLA G. (1974)
Electron microscopy, carbohydrate analyses and biological activities of the proteins adsorbed in two hours to tooth surfaces in vivo.
Caries Res 8(2): 113-122.
- SÖNJU T., GLANTZ P.O. (1975)
Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics.
Arch Oral Biol 20(10): 687-691.
- SÖNJU T., RÖLLA G. (1973)
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(1): 30-38.
- SÖNJU T., THYLSTRUP A., FEJERSKOV O. (1986)
Textbook of cariology.
1. Auflage, Munksgaard, Copenhagen.
- TENOVUO J., LUMIKARI M., SOUKKA T. (1991)
Salivary lysozyme, lactoferrin and peroxidases: antibacterial effects on cariogenic bacteria and clinical applications in preventive dentistry.
Proc Finn Dent Soc 87(2): 197-208.
- TWETMAN S., LINDQVIST L., SUND M.L. (1986)
Effect of human lysozyme on 2-deoxyglucose uptake by Streptococcus mutans and other oral microorganisms.
Caries Res 20(3): 223-229.
- VACCA SMITH A.M., BOWEN W.H. (2000a)
The effects of milk and kappa-casein on salivary pellicle formed on hydroxyapatite discs in situ.
Caries Res 34: 88-93.
- VACCA SMITH A.M., BOWEN W.H. (2000b)
In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs.
Arch Oral Biol 45: 277-291.
- VACCA SMITH A.M., SCOTT-ANNE K.M., WHELEHAN M.T., BERKOWITZ R.J., FENG C., BOWEN W.H. (2007)
Salivary glycosyltransferase B as a possible marker for caries activity.
Caries Res 41: 445-50.
- VAN NIEUW AMERONGEN A., BOLSCHER J.G., VEERMAN E.C. (2004)
Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology?
Caries Res 38: 247-253.

VITORINO R., CALHEIROS-LOBO M.J., DUARTE J.A., DOMINGUES P.M., AMANDO F.M. (2008)

Peptide profile of human acquired enamel pellicle using MALDI tandem MS.

J Sep Sci 31(3): 523-37.

VITORINO R., CALHEIROS-LOBO M.J., WILLIAMS J., FERRER-CORREIA A.J., TOMER K.B., DUARTE J.A., DOMINGUES P.M., AMANDO F.M. (2007)

Peptidomic analysis of human acquired enamel pellicle.

Biomed Chromatogr 21(11): 1107-17.

WHELTON H. (1996)

Introduction: The anatomy and physiology of salivary glands. In: Edgar WM, O`Mullane DM (eds.): Saliva and oral health, 2. Auflage,

London: British dental association pp 1-8.

WOLINSKI L. (1994)

Caries and cariology.

In: Nisengard R, Newman M (eds) Oral microbiology and immunology.

Saunders, Philadelphia, pp 341-359.

YAO Y., GROGAN J., ZEHNDER M., LENDENMANN U., NAM B., WU Z., COSTELLO C.E., OPPENHEIM F.G. (2001)

Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry.

Arch Oral Biol 46(4): 293-303.

YAO Y., LAMKIN M.S., OPPENHEIM F.G. (1999)

Pellicle precursor proteins: acidic proline-rich proteins, statherin, and histatins, and their crosslinking reaction by oral transglutaminase.

J Dent Res 78(11): 1696-1703.

ZAHRADNIK R.T., MORENO E.C., BURKE E.J. (1976)

Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro.

J Dent Res 55(4): 664-670.

ZAHRADNIK R.T., PROPAS D., MORENO E.C. (1977)

In vitro enamel demineralization by Streptococcus mutans in the presence of salivary pellicles.

J Dent Res 56(9): 1107-1110.

7. Publikationen/ Dank

7.1 Publikationen

Auszüge aus der vorliegenden Arbeit wurden bereits in der Fachzeitschrift „Clinical Oral Investigations“ publiziert:

DEIMLING D., HANNIG, C., HOTH-HANNIG, W., SCHMITZ, P., SCHULTE-MÖNTING, J., HANNIG, M. (2007)
Non destruktive visulalisation of protective proteins in the in situ pellicle.
Clin Oral Invest 11: 211-216

7.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. M. Hannig für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die zahlreichen Hilfestellungen.

Mein zusätzlicher Großer Dank gilt Frau Dr. Daniela Deimling die sich mit mir in großer Gedult geübt und mich überdurchschnittlich unterstützt hat.

Vielen dank auch Frau Hoth-Hannig für die Unterstützung im Labor und am Mikroskop.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre stete Unterstützung in jeder Hinsicht Studium und Promotion ermöglicht haben.

8. Lebenslauf

Philipp Schmitz

Heißstrasse 55

80798 München

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 07.05.77

Geburtsort: Aachen

Familienstand: ledig, keine Kinder

Nationalität: Deutsch

Schulbildung

1983-1987: Katholische Grundschule, Köln

1987-1996: Integrierte Gesamtschule, Bergisch Gladbach

seit 1997: Studium an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

2003 Examen Zahnmedizin

Beruflicher Werdegang

2004-2007: Assistenzzeit, Praxis Dr. M. Sievers, Düsseldorf.

2007-2008: Angestellter Zahnarzt, Praxisgemeinschaft, Dres. Kaefer, Ongyerth, Heine

2008-2011: Partner in Überörtlicher Berufsausübungsgesellschaft, Dr. Kaefer und Partner.