

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

# **Proteomanalyse der *In-situ*-Pellikel auf Dentin unter erosiven Einflüssen**

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

2021

Vorgelegt von:

Kiriaki Katerina Papadopoulou

geb. am: 02.03.1992 in Karlsruhe

Tag der Promotion: 04.11.2021

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Mick

# Abkürzungsverzeichnis

iBAQ:	Intensitätsbasierte absolute Quantifikation (engl. intensity-based absolute quantification)
RIPA:	Radioimmuno Präzipitationsassay (engl. radioimmunoprecipitation assay)
emPAI:	Exponentiell modifizierter Protein-Häufigkeits-Index (engl. exponentially modified Protein Abundance Index)
DTT:	Dithiothreitol
LC-ESI-MS/MS:	Flüssigkeitschromatographie-Elektronensprayionisation-Tandem Massenspektrometrie
LDS:	Lithiumdodecylsulfat
MALDI-TOF:	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse (engl. time of flight, TOF)
SDS:	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PRP:	Prolin-reiche Proteine (engl. proline-rich protein)
TCA:	Trichloressigsäure (engl. trichloroacetic acid)
TRIS:	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Deutsche Zusammenfassung .....	1
1.2	Abstract.....	3
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
2.1	Bildung, Zusammensetzung und Struktur der Pellikel .....	4
2.2	Erosion des Dentins .....	6
2.3	Fragestellung.....	8
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>9</b>
3.1	Material.....	9
3.2	Grundlagen für die Gewinnung der <i>In-situ</i> -Pellikel .....	10
3.2.1	Herstellung, Reinigung und Lagerung der Prüfkörper .....	10
3.3	Gewinnung der <i>In-situ</i> -Pellikel.....	12
3.3.1	Probanden .....	12
3.3.2	<i>In-situ</i> -Pellikelbildung .....	13
3.3.3	<i>Ex-vivo</i> Erosion der Dentinprüfkörper.....	13
3.3.4	Chemische Elution und Proteinfällung .....	14
3.4	Probenvorbereitung für die nano-LC-ESI-MS/MS .....	15
3.4.1	LDS-PAGE, Entfärbung, Reduktion und Alkylierung der Proben.....	15
3.4.2	In-Gel-Verdau und Extraktion der Peptide .....	16
3.5	Massenspektrometrische Analysen.....	17
3.6	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Prüfkörper .....	19

<b>3.7</b>	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der Prüfkörper .....	19
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>21</b>
4.1	Proteomanalyse der 3 min-Pellikel auf Dentin .....	21
4.2	Proteomanalyse der 3 min-Pellikel auf Dentin nach Ätzung mit Zitronensäure unterschiedlicher Konzentration .....	25
4.3	Transmissions- und rasterelektronenmikroskopische Resultate .....	33
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>46</b>
5.1	Diskussion der Methodik .....	46
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	52
5.3	Einordnen in den bisherigen Stand der Wissenschaft.....	58
5.4	Schlussfolgerungen.....	60
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>70</b>

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

### **Proteomanalyse der *In-situ*-Pellikel auf Dentin unter erosiven Einflüssen**

**Hintergrund:** Der initiale Biofilm, die Pellikel, bildet sich an der Grenzfläche zwischen Zahn und Speichel durch die Adsorption von Proteinen, Glykoproteinen, Lipiden und anderen Makromolekülen des Speichels. Die Pellikel verleiht dem Zahn schützende Eigenschaften gegen mechanische und chemische Einflüsse. Das Ziel der vorliegenden *In-situ*-Studie bestand darin, das Proteom des initialen Biofilms auf dem Dentin unter erosiven Einflüssen zu analysieren.

**Material und Methoden:** Im Rahmen dieser *In-situ*-Untersuchungen trugen zwei Probanden an insgesamt drei unterschiedlichen Untersuchungstagen bovine Dentinprüfkörper für jeweils drei Minuten. Somit konnte sich eine 3 min *In-situ*-Pellikel auf insgesamt vier 8 cm<sup>2</sup> Dentinprüfkörperoberfläche je Proband bilden. Anschließend wurden drei dieser Probegruppen mit 0,1%, 1% oder 5% Zitronensäure für 30 s oder 60 s geätzt. Durch ein chemisches Elutionsverfahren wurden die Pellikel und die residualen Pellikel von den Prüfkörpern abgelöst. Mittels eines SDS-Gels wurden die Proteine aufgetrennt und es erfolgte eine in-Gel-Trypsinierung. Die Proteine wurden massenspektrometrisch über die Flüssigkeitschromatographie-Elektronensprayionisation-Tandemmassenspektrometrie (nano LC-ESI-MS/MS) qualitativ und quantitativ analysiert. Ergänzend wurden Prüfkörper für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen getragen und entsprechende Untersuchungen wurden durchgeführt.

**Ergebnisse:** Insgesamt wurden 578 Pellikelproteine identifiziert, von denen sich 107 Proteine (18,38%) innerhalb dieser drei Probengruppen überschneiden. Die Anzahl der detektierten Proteine pro Proband verändert sich trotz der Säureeinwirkung nur geringfügig. In der Pellikel des Dentins sind vorwiegend Proteine mit einem Molekulargewicht von bis zu 100 kDa aufzufinden. Deren molekularen Funktionen werden zu 45% durch die Eigenschaften „Bindung“, „Strukturelle Aktivität“ und „Enzym-regulierende Aktivität“ abgebildet. Durch die Ätzung mit Zitronensäure unterschiedlicher Konzentration wurden das Verteilungsmuster der Molekulargewichte und die Verteilung molekularen Funktionen der detektierten Proteine nur geringfügig verändert. Diese Resultate korrelieren mit den elektronenmikroskopischen Befunden, die auch nach der Säureapplikation noch eine Pellikelschicht auf der Dentinoberfläche

zeigen. Quantitative Untersuchungen ergaben, dass von den 13 abundantesten Proteinen insgesamt elf Proteine in allen Proben Gruppen aufzufinden sind.

**Schlussfolgerung:** Es konnte eine unerwartet hohe Proteinviefalt des initialen Biofilms auf Dentin identifiziert werden, die weitaus komplexer zusammengesetzt ist, als bisher angenommen wurde. Zum ersten Mal konnten individuelle Pellikelproteome auf Dentin für einzelne Probanden erstellt und miteinander verglichen werden. Die Ätzung mit Zitronensäure verschiedener Konzentrationen hat nur einen geringen Einfluss auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Pellikelproteoms und somit ist die Protektivität der Pellikel durch eine Vielzahl an Proteinen definiert.

## 1.2 Abstract

### **Proteomic analysis of *in-situ*-pellicle layer formation on dentin under erosive challenges**

**Objectives:** The initial biofilm, the pellicle, is formed at the saliva-tooth-interface through adsorption of salivary proteins, glycoproteins, lipids and other macromolecules on the dental surface. The pellicle confers protective properties against mechanical and chemical damages. The aim of this *in-situ* study was to analyse the pellicle proteome on dentin under erosive challenges.

**Material and Methods:** Bovine dentin specimen were carried buccally in the vestibule of the lower jaw for 3 min, forming an *in-situ* pellicle on 8 cm<sup>2</sup> dentin surface for each experimental group. Three of the four examination groups were etched with 0,1%, 1% or 5% citric acid for 30 s or 60 s. Using a chemical elution protocol the pellicle and the residual pellicle were detached from the dentinal specimen, separated by an SDS-Gel and modified by an in-gel-trypsination. Finally qualitative and quantitative mass spectromic analysis (nano-LC-ESI-MS/MS) and electron microscopic examinations were carried out.

**Results:** A total of 578 pellicle proteins were identified on dentin, with an overlap of 107 proteins (18,38%). There was only a minimal change between the identified pellicle proteins of the unetched and etched experimental groups. Most of the proteins have a molecular weight up to 200 kDa. Molecular functions are mainly defined by properties „binding“, „catalytic activity“ and „enzyme regulator activity“. The influence of the citric acid with varying concentrations has only little impact on the distribution pattern of the molecular weight and on the distribution pattern of the molecular functions of the pellicle proteins. These results correlate with the electron microscopic findings, depicting a pellicle on the dentinal surface after the influence of citric acid. Quantitative analysis showed that of the 13 most abundant proteins 11 were identified in all experimental groups.

**Conclusion:** The proteome of the 3 min *in-situ*-pellicle on dentin is more complex than known from literature. For the first time, an individual pellicle proteome on dentin could be provided and comparisons between the examination groups could be carried out. Citric acid in different concentrations has only little impact on the qualitative and quantitative proteome composition of 3 min biofilm on dentin. Therefore, a multiplicity of proteins seems relevant for the protective properties of the initial biofilm.

## 2 Einleitung

### 2.1 Bildung, Zusammensetzung und Struktur der Pellikel

Der initiale Biofilm, die Pellikel, wird auf dem Zahn und anderen oral exponierten Materialien durch die selektive Adsorption von Proteinen, Glykoproteinen, Lipiden und anderen Makromolekülen des Speichels, der Sulkusflüssigkeit, von Plasmabestandteilen und zufällig angeordneten Bakterienaggregaten gebildet (Hannig et al., 2007b; Hannig und Joiner, 2006). Dabei adsorbieren aufgrund von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräften in wenigen Sekunden selektiv einzelne Proteine auf die Zahnoberfläche (Hannig und Joiner, 2006). In der zweiten Phase findet eine kontinuierliche Adsorption von Proteinaggregaten aufgrund von Protein-Protein-Interaktionen an der bereits gebildeten Pellikel statt. Somit verbleibt die nach 2-3 min initial gebildete Schicht für weitere 30 min und wächst daraufhin auf das bis zu 3fache ihrer initialen Dicke an (Skjørland et al., 1995). Dadurch ergeben sich auch bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen zwei voneinander abgegrenzte Schichten: eine zahnoberflächennahe, elektronendichte Schicht und eine darüber gelegene, aufgelockerte Pellikelschicht (Hannig, 1999).

Durch das Fehlen einer Abschilferung des Biofilms von den Zähnen kann dieser sich zur Plaque ausformen, einem dreidimensional organisierten bakteriellen Biofilm (Hannig und Joiner, 2006). Diesem kommt bei der pathophysiologischen Entstehung von Erosionen, Karies und Parodontopathien eine besondere Rolle zu (Hannig und Hannig, 2007). Demgegenüber stehen weitere, nicht pathophysiologische Eigenschaften, die der Pellikel zuzuschreiben sind: Einerseits fungiert sie als Lubrikant und setzt somit die Reibungskräfte zwischen dem Zahn und der Mundschleimhaut und auch zwischen antagonistischen Zähnen herab (Berg et al., 2003; Buzalaf et al., 2012). Andererseits besitzt die Pellikel antibakterielle Eigenschaft aufgrund des Vorhandenseins von Immunglobulinen, Lysozym, Histatinen und Cystatinen (Hannig und Hannig, 2007; Lee et al., 2013; Siqueira et al., 2007; Yao et al., 2003). Diese Proteine, Immunglobuline und Enzyme sind als aktive Form in der Pellikel aufzufinden und können dadurch ihre protektiven Eigenschaften entfalten. Zudem agiert die Pellikel als semi-permeable Membran und reguliert dadurch die Diffusion von Calcium und Phosphat sowie De- und Remineralisationsprozesse (Buzalaf et al., 2012; Hannig und Hannig, 2007). Dadurch wird der direkte Kontakt der Säuren mit der Zahnoberfläche verhindert, und die Demineralisation der Zahnoberfläche fällt geringer aus, wobei aber kein kompletter Schutz der Zahnsu-

stanz möglich ist (Hannig et al., 2007a; Hara et al., 2006; Wiegand et al., 2008). Somit spielt die Pellikel eine wichtige Rolle in der Ätiologie von dentalen Erosionen.

Durch den Einsatz von massenspektrometrischen Untersuchungen, insbesondere der nano LC-ESI-MS/MS, ist in den letzten Jahren die Identifikation des humanen Pellikelproteoms auf verschiedenen Zahnsubstanzen stark vorangeschritten. Auch ist die Quantifizierung der Pellikelproteine und der Vergleich der identifizierten Pellikelproteine mit Speichelproteinen möglich geworden. Während Yao et al. (2003) bei der Analyse der Schmelzpellikel mittels Matrix-assistierter Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF) insgesamt 14 verschiedene Proteine detektierten, identifizierten Siqueira et al. (2007) anhand von drei Probanden aus der 2 h-Pellikel des Schmelzes bereits 130 Proteine unter Verwendung der LC-ESI-MS/MS. Dabei verwendeten beide Arbeitsgruppen getränkte Wattestäbchen bzw. Filterpapier, um die *in-vivo* gebildete Pellikel vom Schmelz zu lösen. Durch diese Methodik entsteht ein Pool der identifizierten Proteine und es kann kein Rückschluss auf das individuelle Pellikelproteom gezogen werden.

Dem steht die *in-situ* Ablösung der Pellikel mittels eines chemischen Elutionsprotokolls gegenüber. Mittels dieser Methodik konnte elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, dass die Pellikel vollständig vom Prüfkörper abgelöst wurde (Kratz et al., 2015). Delius et al. (2017) stellten als erstes ein individuelles Pellikelproteom der 3 min-Pellikel auf Keramikprüfkörpern mit insgesamt 72 identifizierten Proteinen dar. Somit konnten vergleichende Untersuchungen des Pellikelproteoms von kariesfreien und kariesaktiven Probanden ermöglicht werden (Trautmann et al., 2019). Weiterhin konnte durch diese neue Methodik die individuelle Adsorption der Speichelproteine auf die Schmelzoberfläche untersucht werden (Trautmann et al., 2020). Damit war die Identifikation von bisher 1188 verschiedenen Schmelz-Pellikelproteinen innerhalb einer Arbeitsgruppe durchführbar, wobei bis zu 546 Pellikelproteine im Pellikelproteom eines einzelnen Probanden detektiert wurden (Trautmann et al., 2019).

Jedoch können bei der Erstellung dieses individuellen Pellikelproteoms aufgrund der Methodik nur *In-situ*-Untersuchungen durchgeführt werden, bei *In-vivo*-Untersuchungen werden bis zum heutigen Zeitpunkt weiterhin getränkte Filterpapiere verwendet. Das Pellikelproteom des Dentins wurde bisher einmalig massenspektrometrisch untersucht, um säureresistenten Pellikelproteine zu identifizieren (Delecrode et al., 2015a). Bei diesen Untersuchungen wurde aber ein Pool aus Pellikelproteinen aller Probanden erstellt, weshalb bis zum heutigen Zeitpunkt noch kein individuelles Pellikelproteom des Dentins erstellt wurde. Daher konnten bisher noch keine vergleichenden Untersuchungen des individuellen Pellikelproteoms auf Dentin zu

verschiedenen Fragestellungen durchgeführt werden. Somit fehlen noch Untersuchungen der Speichel- und Pellikelproteombildung unterschiedlicher Probanden, die weiteren Aufschluss auf die initiale Pellikeladsorption auf Dentin geben würden. Auch ist beispielsweise noch unbekannt, ob kariesfreie und kariesaktive Individuen eine unterschiedliche Pellikeladsorption auf Dentin haben oder ob erosionsgeschädigte Probanden eine andere Pellikelzusammensetzung auf Dentin besitzen als gesunde Probanden.

## 2.2 Erosion des Dentins

Erosion ist der oberflächliche Verlust von Zahnhartgewebe als Resultat eines chemischen Prozesses durch extrinsische oder intrinsische Säuren ohne die Beteiligung von Mikroorganismen (Eccles, 1979). Extrinsische Säuren können industrieller Natur, beispielsweise atmosphärische Säuren am Arbeitsplatz, oder durch die Nahrung aufgenommenen Säuren sein, beispielsweise Früchte oder säurehaltige Getränke. Eine intrinsische Säure ist die Magensäure, welche über den Reflux bei erkrankten Patienten oder bei Patienten mit einer Essstörung vermehrt in die Mundhöhle gelangt. Ob eine Säure zum Verlust von Zahnhartsubstanz führt, hängt von ihrem pH-Wert ab. Der kritische pH-Wert ist definiert als der pH-Wert, bei dem die Lösung gegenüber einem spezifischen Festkörper, beispielsweise Dentin, gesättigt ist. Wenn der pH-Wert der Lösung unterhalb des kritischen pH-Wertes liegt, ist die Lösung untersättigt und kann den Festkörper auflösen. Wenn die Lösung aber übersättigt ist, wenn also der pH-Wert über dem des kritischen pH-Wertes liegt, können anorganische Bestandteile präzipitieren (Lussi et al., 2011).

Bisher existiert kein einheitliches System, welches die Erosion und ihr Voranschreiten klassifiziert (Lussi et al., 2011). Somit ist ihr klinisches Erscheinungsbild bisher das einzige Merkmal zur Diagnose. Auch die Patientenanamnese ist ein wichtiger Hinweis, denn es gilt die Erosion von der Attrition und Abrasion abzugrenzen.

Durch das Einwirken von erosiven Agenzien wird die Schmelzoberfläche erweicht und in der Folge findet eine kontinuierliche Auflösung der Schmelzkristalle statt (Lussi et al., 2011). Durch diesen Vorgang kann der Schmelz an einigen Stellen vollständig aufgelöst und die Dentinoberfläche sichtbar werden. Dadurch kann es zu Hypersensibilitäten des Dentins und damit zu einer erhöhten Schmerzempfindlichkeit der Zähne kommen. Die Erosion auf Dentin verläuft anders als auf Schmelz: die anorganische Matrix löst sich leichter auf, wohingegen die organische Matrix elektronenmikroskopisch als komplexes, fibrilläres, kollagenes Netz-

werk sichtbar bleibt (Breschi et al., 2002). Diese organische Matrix bleibt sogar beim Zähneputzen mit Kräften bis zu 2N erhalten (Ganss et al., 2007). Die Größe dieser demineralisierten Zone ist abhängig vom sauren Agens und der Dauer der Erosion. Unterhalb dieser Zone befindet sich wieder solides, klinisch gesundes Dentin (Kinney et al., 1995). Erreicht die demineralisierte Zone eine bestimmte Dicke, nimmt die Demineralisationsrate jedoch bei kontinuierlicher Erosion ab. Als Ursache wird die puffernde Wirkung des Kollagens oder die Sättigung der flüssigen Phase auf der Oberfläche des Dentins durch die gelösten Mineralien diskutiert (Ganss et al., 2007; Hara et al., 2005; Kleter et al., 1994).

Bisherige Erosions-Studien konzentrierten sich auf den Schmelz, dessen Pellikel und deren protektive Eigenschaften gegenüber verschiedenen Säuren, denen der Zahn ex- und intrinsisch ausgesetzt sein kann. Lediglich wenige Studien befassten sich mit den protektiven Eigenschaften der Pellikel auf Dentin und dem Versuch, diese zu analysieren (Bauer, 2012; Delecrode et al., 2015a; Hall et al., 1999; Hannig et al., 2007a; Hara et al., 2006; Wetton et al., 2006; Wiegand et al., 2008; Wiegand et al., 2019).

Der Großteil dieser Studien befasste sich mit der Frage, wie groß der Erosionsschutz der Pellikel auf dem Dentin ist und untersuchte in dem Zuge die Calcium-Freisetzung (Hannig et al., 2007a; Wiegand et al., 2008; Wiegand et al., 2019), den Mineralverlust (Hall et al., 1999; Hara et al., 2006), oder den Substanzverlust (Wetton et al., 2006); die Mikrohärt-Änderung des Dentins wurde ebenfalls analysiert (Hara et al., 2006). Allen Studien gemeinsam war folgendes Ergebnis: Die Pellikel fungiert als ionenpermeable Membran und schützt das Dentin zwar bereits ab einer Pellikelbildungszeit von wenigen Minuten, dennoch reagiert es auf den Säureangriff viel empfindlicher als der Schmelz. Zusätzlich wurde in all diesen Studien das protektive Potential der Pellikel indirekt über das Dentin und dessen Veränderungen gemessen. Ausschließlich Delecrode et al. (2015a) befassten sich mit der Pellikelproteomänderung unter erosiven Einflüssen verschiedener saurer Agenzien, um protektive Pellikelproteine zu identifizieren. Bei diesen Untersuchungen wurden an neun Probanden insgesamt 223 Pellikelproteine detektiert, welche durch die Säureexposition mit Zitronensäure reduziert wurden.

## 2.3 Fragestellung

Die bisherigen Untersuchungen der Pellikel beruhen größtenteils auf Daten, die anhand der auf Zahnschmelz gebildeten Pellikel generiert wurden. Untersuchungen zur Pellikelbildung auf der Zahnhartsubstanz Dentin befassen sich überwiegend mit der direkten Auswirkung von erosiven Angriffen auf das Dentin. In Anbetracht dessen, dass Erosionen an der Dentinoberfläche klinisch relevante Auswirkungen haben, befasst sich die vorliegende Untersuchung mit:

- der Proteomanalyse der initialen Pellikel auf Dentin,
- der Untersuchung des Pellikelproteoms vor und nach der Behandlung mit einem erosiven Agens,
- der Identifizierung von protektiven Proteinen in der Pellikel.

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Material

Tabelle 1: Enthält die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Materialien und den Sitz der entsprechenden Firma.

Aceton	VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Araldit	Science Services GmbH, München, Deutschland
Bleicitrat	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G-250	VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
destilliertes Wasser (H <sub>2</sub> O dest.)	BRAUN, Melsungen, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Essigsäure	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethanol	Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes
Glutaraldehyd 25%	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Hexamethyldisilazan	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol 70%	Hedinger, Stuttgart, Deutschland
Methanol	VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhypochlorit (NaOCl) 3%	Hedinger, Stuttgart, Deutschland
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
NuPAGE MES SDS Running BufferEthanol	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Osmiumsäure	Science Services GmbH, München, Deutschland

Paraformaldehyd	Science Services GmbH, München, Deutschland
Phosphorsäure	Science Services GmbH, München, Deutschland
Proteaseinhibitor (EDTA-frei)	Roche, Mannheim, Deutschland
RIPA-Puffer	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Thymol	Apotheke am Universitätsklinikum des Saarlandes
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin	Promega, Madison, WI, USA
Trypsin Resuspension Buffer	Promega, Madison, WI, USA
Uranylacetat	Science Services GmbH, München, Deutschland
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 3.2 Grundlagen für die Gewinnung der *In-situ*-Pellikel

In der vorliegenden experimentellen Studie trugen zwei Probanden bovine Dentinprüfkörper (mit einer Schichtstärke von 1,5 mm und einer Gesamtoberfläche von 8 cm<sup>2</sup> pro Versuchsreihe) für vier Versuchsreihen intraoral im Unterkiefervestibulum für 3 min, damit sich der initiale Biofilm bilden konnte. Zur Kontrolle wurde eine bovine Dentinkontrolle ohne Pellikel eingeführt, die ebenfalls eine Dentinoberfläche von 8 cm<sup>2</sup> besaß, aber nicht intraoral exponiert wurde.

Die Probanden stimmten schriftlich der Teilnahme an dieser Studie zu. Das Studien-Protokoll wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Ethikvotum: 238/03 (2012, 2016)) genehmigt.

#### 3.2.1 Herstellung, Reinigung und Lagerung der Prüfkörper

Verwendet wurden permanente Inzisivi von Rindern des Schlachthofs Zweibrücken, die maximal 2 Jahre alt waren. Es fand eine sofortige Lagerung in 0,1% Thymol nach der Extraktion statt.

Die Wurzel und orale Seite der bovinen Inzisivi wurden mittels einer Diamanttrennscheibe unter Wasserkühlung abgetrennt und die vestibuläre Schmelzfläche mittels eines Poliermotors

(PHOENIX 3000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) abgetragen, sodass ausschließlich Dentinprüfkörper (n=60) entstanden. Für die Dentinkontrolle ohne Pellikel und für jeden Probanden wurden pro Trageversuch Dentinprüfkörper mit einer Gesamtoberfläche von 8 cm<sup>2</sup> angefertigt, wobei jeder einzelne eine Stärke von 1,5 mm aufwies, um die Durchgängigkeit der Dentintubuli auszuschließen. Zur Standardisierung wurden diese auf jeder Seite, einschließlich der Kanten, mittels des Poliermotors unter permanenter Wasserkühlung mit Korundpapier aufsteigenden Körnungsgrades (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) bis zu einem Körnungsgrad von 4.000 bei maximal 500 Umdrehungen pro Minute poliert und unter einem Auflichtmikroskop (75facher Vergrößerung) auf Unregelmäßigkeiten kontrolliert.

Zusätzlich wurden weitere Prüfkörper (n=24) für die bildgebenden Analysen (TEM, REM) der Ätzversuche der 3 min-Pellikel und der Dentinkontrolle ohne Pellikel hergestellt und in demselben Verfahren aufpoliert.

Um eine bakterienfreie Oberfläche zu erhalten, wurden die Prüfkörper 30 s in 3% NaOCl inkubiert, mit H<sub>2</sub>O dest. gewaschen, 15 min in 70%iger Isopropanollösung desinfiziert und abschließend in H<sub>2</sub>O dest. für mindestens acht Stunden über Nacht bei 4 °C gelagert. Die intraoralen Trageversuche begannen am darauffolgenden Tag. Eine schematische Darstellung des Versuchsdurchlaufs ist in Abbildung 1 veranschaulicht.

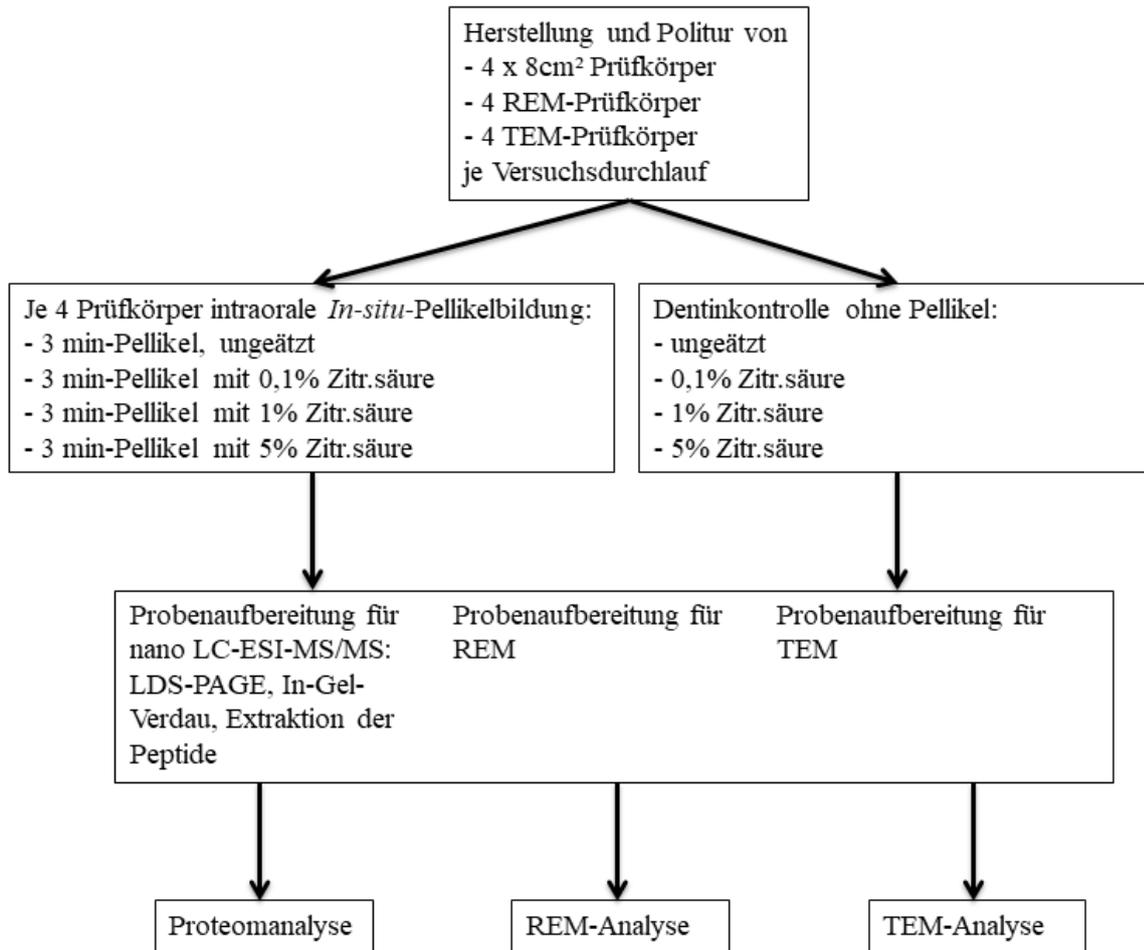


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsdurchlaufs. Für jeden Versuchsdurchlauf wurden vier 8cm<sup>2</sup> Prüfkörper für die Proteom-Analysen, und je vier Prüfkörper für die REM- und TEM-Analysen angefertigt. Diese wurden von jedem Probanden zur Pellikelbildung nacheinander intraoral platziert. Zudem wurden Dentinkontrollproben ohne 3 min-Pellikel erstellt. Die folgenden Schritte der Probenaufbereitung und der entsprechenden Analysen waren für jeden Versuchsdurchlauf gleich.

### 3.3 Gewinnung der *In-situ*-Pellikel

#### 3.3.1 Probanden

Zwei Probanden (1 weiblich, 1 männlich, Alter 23 bzw. 25 Jahre) wurden auf orale Krankheiten inspiziert, um kariöse Läsionen und Parodontalerkrankungen auszuschließen. Die allgemeine und spezielle Anamnese ergab hinsichtlich der Medikamenteneinnahme und Vorerkrankungen nichts Auffälliges. Die Probanden wurden über das Studiendesign und den Studienablauf aufgeklärt und darauf hingewiesen, ihre gewohnte Ernährungsweise beizubehalten, um eine Veränderung der Speichelzusammensetzung zu verhindern.

### 3.3.2 *In-situ*-Pellikelbildung

Die intraoralen Trageversuche fanden immer zwischen 9 und 10 Uhr statt, um den Einfluss zirkadianer Veränderungen der Speichelzusammensetzung auszuschließen. Die Zähne wurden nach dem Frühstück mittels Zahnpasta und eigener Zahnbürste in gewohnter Routine geputzt und 30 min vor Beginn der Tragerunde abermals mit einer ausgehändigten Einmalzahnbürste ohne Zahnpasta für 2 min geputzt, um den anhaftenden Biofilm zu reduzieren.

Die zwischen fusselfreiem Filterpapier (VWR, Darmstadt, Deutschland) getrockneten Prüfkörper wurden durch den Probanden mit latex- und puderfreien Handschuhen (ABENA, Oberderdingen-FleHINGen, Deutschland) so in sein Unterkiefer-Vestibulum eingebracht, dass die Prüfkörper sich nicht überlappen konnten. Nach der Tragezeit von 3 min wurden die Prüfkörper aus der Mundhöhle entnommen, in H<sub>2</sub>O dest. gegeben und jeweils zusätzlich für weitere 30 s mit destilliertem Wasser aus einer Drucksprühflasche (Bürkle, Bad Bellingen, Deutschland) von jeder Seite gespült, um anhaftende, nicht adsorbierte Speichelreste zu entfernen und damit die weitere Pellikelbildung zu unterbrechen.

Jeder Proband trug die jeweiligen Dentinprüfkörper für die vier Versuchsreihen der Proteomanalyse und der TEM- und REM-Analysen am selben Tag hintereinander intraoral, um eine Veränderung der Proteinzusammensetzung, die an unterschiedlichen Tagen auftreten könnte, zu minimieren. Pro Versuchsreihe der Proteomanalyse waren je fünf bis sechs Prüfkörper für eine Dentinoberfläche von insgesamt 8 cm<sup>2</sup> notwendig, für die TEM- und REM-Analysen war pro Versuchsreihe ein Prüfkörper notwendig. Somit konnte ein direkter Vergleich zwischen dem Proteom auf ungeätzttem und geätzttem Dentin hergestellt werden.

### 3.3.3 *Ex-vivo* Erosion der Dentinprüfkörper

Um erosive Angriffe auf die Dentinoberfläche zu simulieren, wurden die getrockneten Prüfkörper von drei Tragerunden nach der Pellikelbildung *ex-vivo* mit unterschiedlichen Konzentrationen von Zitronensäure geätzt (Tabelle 2). Um eine Sättigung der Zitronensäure auszuschließen und ein vollständiges Umfließen des Prüfkörpers zu gewährleisten, wurde jeder einzelne Prüfkörper in jeweils 1 ml Zitronensäure der jeweiligen Konzentration für 1 min (für 0,1%ige Zitronensäure) bzw. 30 s (für 1%ige und 5%ige Zitronensäure) inkubiert. Daraufhin wurde jeder Prüfkörper drei Mal in je 1 ml destilliertes Wasser getaucht, um die weitere Erosion zu stoppen und abschließend für 15 s mit destilliertem Wasser aus einer Drucksprühflasche von jeder Seite gespült, um jegliche Säurereste zu entfernen. Dasselbe galt für jeweils

drei der Prüfkörper für die REM- und TEM-Untersuchungen. Tabelle 2 zeigt zusätzlich die pH-Werte der jeweils verwendeten Zitronensäurekonzentrationen.

Tabelle 2: Schema der Ätzzeiten mit Zitronensäure unterschiedlicher Konzentration und dem dazugehörigen pH-Wert der jeweiligen Zitronensäurekonzentration.

Konzentration Säure	Ätzzeit	pH-Wert
ohne	keine	
0,1%	1 min	3,13
1%	30 s	2,13
5%	30 s	1,75

### 3.3.4 Chemische Elution und Proteinfällung

Das Ablösen der Pellikel für die Proteomanalysen geschah durch ein neu etabliertes chemisches Elutionsprotokoll mit Hilfe von 1% (v/v) Triton X-100 in TRIS-HCl-Puffer (0,02 M TRIS, 0,15 M NaCl, pH 7,5 mit 37% HCl) und einem RIPA-Puffer (Radioimmuno Präzipitations Assay). Beiden Pufferlösungen wurde EDTA-freier Proteaseinhibitor zugesetzt.

Die Prüfkörper einer Tragerunde, welche gemeinsam 8 cm<sup>2</sup> Oberfläche ergeben, wurden hintereinander in dasselbe Eppendorf Tube (Hamburg, Deutschland) mit dem Triton X-100- und danach dem RIPA-Puffer gegeben. Somit entstand für jede Versuchsreihe der beiden Probanden ein Eppendorf Tube und eins für die Dentinkontrolle ohne Pellikel. Im Triton X-100-Puffer wurden sie nach gutem Durchmischen für jeweils 5 min auf Eis, im RIPA-Puffer für 5 min im Ultraschallbad (Sonorex Super, Bandelin, Berlin, Deutschland) inkubiert. Durch die abschließende Zentrifugation nach der Inkubation auf Eis bzw. im Ultraschallbad konnten anhaftende Lösungsreste in das jeweilige Eppendorf Tube zurückgeführt werden, um den Proteinverlust so gering wie möglich zu halten. Abschließend wurden die beiden Pufferlösungen einer Tragerunde gepoolt, um die gesamte Proteinausbeute einer Versuchsreihe eines Probanden zu erhalten. Die Hälfte der Ansätze wurde mit demselben Volumen an 40%iger TCA gefällt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis und einer 10 min Zentrifugation bei 15.000 x g bei 2 °C wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde durch zweifaches Waschen mit dem doppelten Volumen an Aceton gereinigt. Nach einer abschließenden 10-minütigen Zentrifugation bei 15.000 x g und 2 °C wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet luftgetrocknet. Die abschließende Lagerung der Prüfkörper fand bei 4 °C statt.

### 3.4 Probenvorbereitung für die nano-LC-ESI-MS/MS

#### 3.4.1 LDS-PAGE, Entfärbung, Reduktion und Alkylierung der Proben

Das Proteinpellet wurde für die Vorbereitung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in 20 µl 2x NuPolyacrylamid-Gelelektrophorese (Page) Lithiumdodecylsulfat (LDS)-Probenpuffer (50% NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X), 20% NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X), 30% H<sub>2</sub>O dest.) gelöst und für 20 min bei 60 °C denaturiert. Anschließend wurden die einzelnen Proben nebeneinander auf ein Gel (NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Gel, 1 mm, 10 Wells) aufgetragen und die Kammern mit einem MES-Puffer (5% NuPAGE® MES Natriumdodecylsulfat (SDS) Running Buffer (20X), 95% H<sub>2</sub>O dest.) und 500 µl NuPAGE® Antioxidans aufgefüllt, um die Proteine in einem reduzierten Zustand zu halten, und für 10 min bei 80 V einlaufen lassen. Nach der Trennung der Proteine über das elektrische Feld wurde das Gel für 30 min unter leichten Bewegungen in einer Fixierlösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure) inkubiert und drei Mal für 10 min mit jeweils 300 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Gefärbt wurde das Gel für drei Stunden mittels Coomassie Blue Silver (10%ige Phosphorsäure, 10% Ammoniumsulfat, 0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250, 20% Methanol, H<sub>2</sub>O).

Nach der Entfärbung über Nacht in destilliertem H<sub>2</sub>O, wurden einzelne Banden nach dem Schema in Abbildung 2 aus dem Gel unter der Sterilbank (MSC-Advantage, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) ausgeschnitten. Aus jeder Probe wurden drei Banden geschnitten und zusätzlich drei entsprechende Kontrollbanden in einer leeren Spur des Gels, um putative Kontaminationen der Lösungen im Nachhinein herauszufiltern. Jede Bande wurde in ein Eppendorf Tube mit 300 µl Lösung A (50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)) überführt und bei Raumtemperatur für 5 min unter Schütteln inkubiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde 300 µl Lösung B (1:1 Lösung A zu 100% Acetonitril) hinzugegeben und abermals für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit Hilfe dieser Lösungen wurden die einzelnen Banden entfärbt, da dies die folgende Massenspektrometrie gestört hätte.

Die in den Proben potentiell enthaltenen Cysteine wurden durch die Gabe von 300 µl der Reduktionslösung (10 mM DTT in Lösung A) bei 56 °C für 30 min reduziert und die daraus entstandenen Thiole mittels 300 µl Alkylierlösung (5 mM Iodacetamid in Lösung A) bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 min irreversibel in das stabile S-Carboxyamidomethylcystein überführt. Anschließend wiederholten sich die Schritte der Lösungen A und B, bis eine vollständige Entfärbung der Gelbanden vollzogen war. Bei voll-

ständiger Farblosigkeit wurde für 5 min 300 µl 100%iges Acetonitril zugegeben, um die Banden zu dehydrieren.

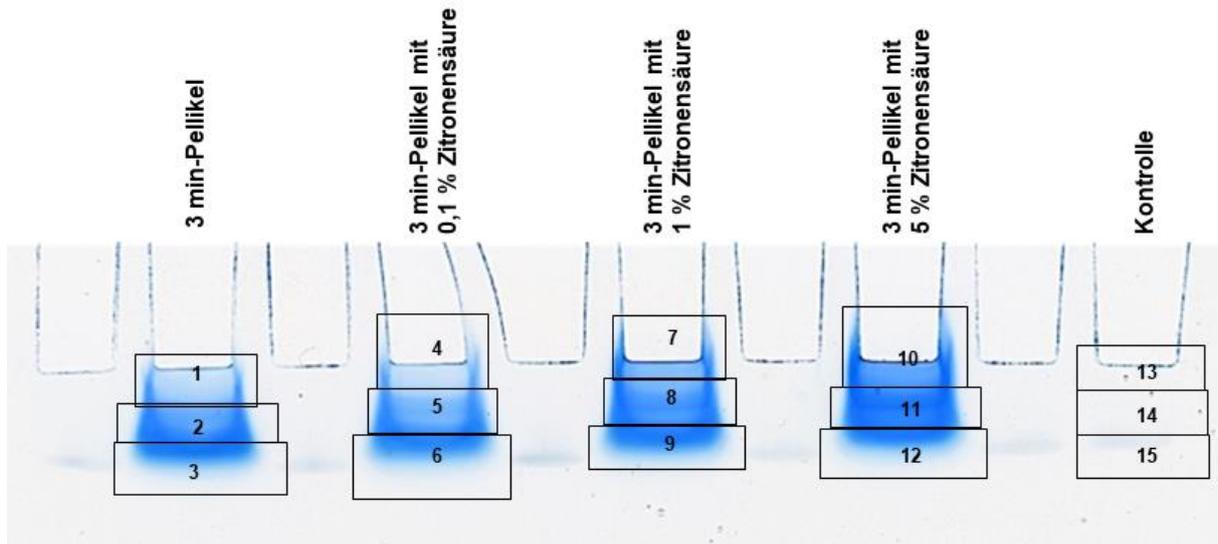


Abbildung 2: Einzelne Banden eines Gels, die für die weitere Vorbereitung für die nano-MS wie dargestellt zugeschnitten wurden.

### 3.4.2 In-Gel-Verdau und Extraktion der Peptide

Nach dem Entfernen des Acetonitrils und dem vollständigen Trocknen der Banden wurden 15-20 µl Trypsinlösung (10 ng/µl lyophilisiertes Trypsin in 10% Trypsin Resuspensions-Puffer und 90% Lösung A) zugegeben, um das jeweilige Gelstück vollständig zu bedecken. Die Proben wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Extraktion in zwei Schritten erfolgte durch die jeweilige Zugabe von 20 µl Extraktionspuffer (2,5% Ameisensäure, 50% Acetonitril), anschließender Inkubation im Ultraschallbad und Überführen des Überstandes in ein neues Eppendorf Tube. Die Lösungen wurden daraufhin in einem Vakuumkonzentrator (Savant DNA-SpeedVac, ThermoFisher Scientific) bei 43 °C bis zur vollständigen Trockenheit eingedampft. Die Peptidpellets wurden zum vollständigen Lösen in 21 µl 0,1%iger Ameisensäure für 10 min im Ultraschallbad inkubiert. Abschließend wurden jeweils 20 µl der Proben in ein Glasgefäß überführt, diese verplombt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

### 3.5 Massenspektrometrische Analysen

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der Dentinproben der Probanden und der Dentinkontrollprobe ohne Pellikel wurden am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie an der Universität des Saarlandes durchgeführt. Diese erfolgten durch eine auf hydrophobe Wechselwirkungen basierende Auftrennung mittels Flüssigkeitschromatographie, einer Elektronenspray-Ionisation und anschließender Tandem-Massenspektrometrie (nano LC-ESI-MS/MS) (Ultimate 3000 RSLC nano UHPLC-System gekoppelt an LTQ Orbitrap Velos Pro, ThermoFisher Scientific) (Abbildung 3). Dabei wurde von jeder Probe ein Aliquot (1-10  $\mu\text{l}$ ) der trypsinisierten Peptidextrakte über eine hydrophobe Vorsäule angereichert und über eine C18-Trennsäule chromatographisch mit einer nano Hochdruckflüssigkeitschromatographie aufgetrennt. Über diese 3 Stunden dauernde Auftrennung wurde der Anteil des organischen Lösungsmittels Acetonitril kontinuierlich erhöht. Das Endprodukt der Chromatographie wurde unter Hochspannung mittels der ESI bei 2,2 kV ionisiert und direkt in das Massenspektrometer geleitet. Dort wurde das Masse/Ladung- ( $m/z$ -) Verhältnis ermittelt und die Peptidionen mit einer Ladung  $> +1$  wurden zusätzlich fragmentiert. Über die Ionenfalle (Quadrupol) und den Orbitrapmassenanalysator erfolgte die Detektion der intakten Peptidionen und deren Fragmente.

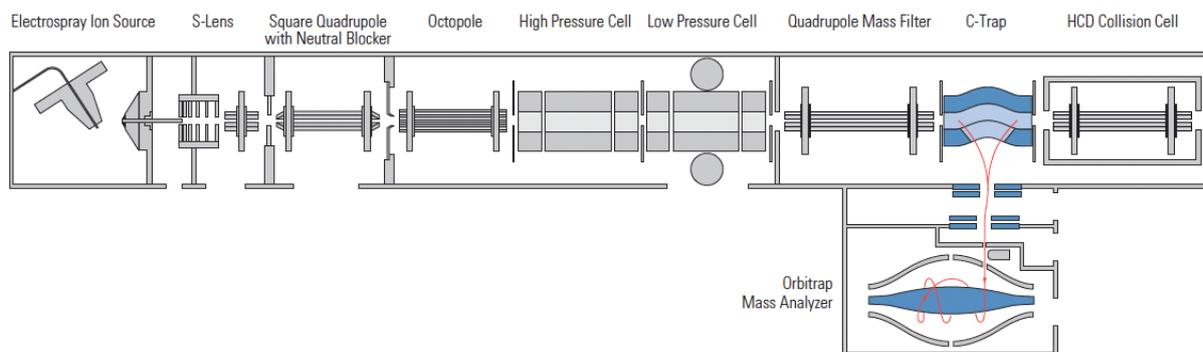


Abbildung 3: Schema der Tandem-Massenspektrometrie des Orbitrap Elite™ ab der Elektronenspray-Ionisation (Quelle: <http://planetorbitrap.com/orbitrap-elite>, Abrufdatum: 15.08.2017).

Die daraus entstandenen Fragmente wurden mittels der SWISS-Prot Datenbank für humane Proteine aufgrund des spezifischen Musters durch die Trypsin-Spaltung und des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses in der Software Proteome Discoverer 1.4 (ThermoFisher Scientific) analysiert. Diese Software greift auf den Datenbanksuch-Algorithmus *Mascot* zu.

Folgende Parameter wurden bei dieser Suche festgelegt:

- Referenzdatenbank: SwissProt 2015
- Taxonomie: human
- Enzym: Trypsin
- Übersehene Schnittstellen: 2
- dynamische Modifikation: Deamidierung (N, Q), Oxidation (M), Acetylierung (K)
- feste Modifikation: Carbamidomethylation (C).

Die endgültige Auswertung der Daten wurde mit der Proteom Software Scaffold 4 (Proteome Software, Inc, Portland, OR, USA) mit folgenden Einstellungen durchgeführt: einem Protein-Identifikationsschwellenwert von 90%, einem Peptid-Identifikationsschwellenwert von 95% und einer Mindestanzahl von zwei unabhängigen Peptiden für eine Proteinidentifikation. Die in der Kontrollprobe identifizierten Proteine wurden zum Ausschluss von Verunreinigungen der Versuchsproben genutzt. Dabei wurde jedes Protein, das im Anzeigemodus „Unique Peptide Count“ in der Kontrolle doppelt so häufig wie in der Versuchsprobe selbst gefunden wurde, aus den Datensätzen entfernt.

Anschließend fanden bioinformatische Auswertungen auf Grundlage der Ergebnisse statt. Zugehörige Daten für die Auswertung der Proteine, ihrer Molekulargewichte und ihren molekularen Funktionen wurden dem Scaffold Programm entnommen und basieren im letzteren Fall auf dessen Gene Ontology (GO) Annotationen.

Die relative Quantität der Proteine wurde ebenfalls durch das Unterprogramm „precursor ion area detection“ des Proteom Discoverer 1.4 errechnet. Durch dieses Unterprogramm werden die Peakflächen von unfragmentierten Peptiden (Precursor Ion) ermittelt: Diese Peakfläche ergibt sich aus dem Mittelwert der drei am stärksten ionisierten, zu einem Protein zugehörigen Peptide. Diese Peptide werden separat für jeden Versuchsdurchlauf bestimmt, sodass auch unterschiedliche Peptide eines Proteins in den unterschiedlichen Versuchen benutzt werden könnten. Dieses Verfahren wurde von Silva et al. (2006) als TOP<sup>3</sup> Peak Area Methode beschrieben.

### 3.6 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Prüfkörper

Drei der vier REM-Prüfkörper pro Proband bzw. der Dentinkontrollprobe ohne Pellikel wurden anschließend mit 1 ml Zitronensäure der jeweiligen Konzentration für 1 min (für 0,1%ige Zitronensäure) bzw. 30 s (für 1%ige und 5%ige Zitronensäure) inkubiert. Nach der Entfernung jeglicher Säurereste wurden die teilweise erodierten Prüfkörper für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen mit einer 2,5%igen Glutaraldehyd-Lösung (in 0,01 M Cacodylat-Puffer, pH7,2) für eine Stunde fixiert und anschließend vier Mal für jeweils 10 min mit Cacodylat-Puffer gewaschen und in der fünften Lösung bei 4 °C aufbewahrt.

Abschließend erfolgte eine Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zu 100%igem Ethanol. Anschließend wurden die Prüfkörper für 30 min in 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HDMS) inkubiert und luftgetrocknet.

Nach der vollständigen Trocknung wurden die Prüfkörper mittels Leit-Tabs (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) auf Probeteller aus Aluminium (Specimen Stubs, Agar Scientific Ltd, Essex, England) montiert und mit einer Kohlebedampfung beschichtet (SCD 030, Oerlikon Balzers, Balzers, Liechtenstein). Die anschließenden Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop (FEI/Philips XL 30 ESEM Eindhoven, Niederlande) fanden bei bis zu 50.000facher Vergrößerungen statt und einzelne charakteristische Bereiche wurden digitalfotografisch festgehalten. Auf allen Bildern wurde darauf geachtet, einen Anschnitt eines Dentintubulus zu erfassen, um einen Vergleich der Dentinproben zu ermöglichen.

### 3.7 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der Prüfkörper

Die vier, teilweise erodierten Dentinprüfkörper pro Proband und die Dentinkontrollprobe ohne Pellikel wurden für eine Stunde bei 4 °C in Fixierlösung (1% Glutaraldehyd, 1% Paraformaldehyd, 0,1 M Cacodylat-Puffer) fixiert und anschließend vier Mal mit Cacodylat-Puffer gewaschen und in der fünften Lösung bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend fand eine Nachfixierung für 1 h mit 2% Osmiumtetroxid (1:1 zu 0,2 M Cacodylat-Puffer) statt. Nach dem fünfmaligen Auswaschen für jeweils 10 min mit H<sub>2</sub>O dest. wurden die Prüfkörper in 50%igem Ethanol gelagert.

Die dreitägige Araldit-Einbettung mit Ethanol/Aceton begann mit der Entwässerung der Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe bis zu 100%igem Ethanol. Abschließend fand eine

zweimalige 20-minütige Inkubation mit Aceton statt und die Lagerung über Nacht erfolgte in einem 1:1 Araldit-Aceton-Gemisch (3% Beschleuniger). Am darauffolgenden Tag folgte das Umsetzen der Präparate in ein reines Araldit-Gemisch (2% Beschleuniger). Zum Schluss folgte die Umsetzung der Präparate in ein reines Araldit-Gemisch (2% Beschleuniger) in Silikonformen und das Auspolymerisieren bei 65 °C für zwei Tage.

Die auspolymerisierten Präparate wurden mittels eines Ultramikrotoms (Ultracut E, Benzheim, Deutschland) und einem Diamantmesser ultradünn geschnitten, auf einer pioloformbeschichteten Kupferlochblende aufgefangen und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

Die geschnittenen Präparate wurden mit dem Elektronenmikroskop TECNAI 12 Biotwin (FEI, Eindhoven, Niederlande) bei bis zu 100.000facher Vergrößerung analysiert und einzelne charakteristische Bereiche wurden digitalfotografisch festgehalten.

## 4 Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden zur besseren Übersichtlichkeit und Darstellung in drei Teile gegliedert. Der erste Teil befasst sich mit der Proteomanalyse der Pellikel zweier Probanden, im zweiten Teil wird auf das Pellikelproteom nach der Ätzung mit Zitronensäure eingegangen. Im dritten Teil werden die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Analysen dargestellt. Die bovine Dentinprobe diente als Kontrolle und wurde im Gegensatz zu den anderen Proben nicht oral exponiert und nicht mit Zitronensäure geätzt. Diese erscheint in den Auflistungen und Beschreibungen als „Dentinkontrolle ohne Pellikel“.

### 4.1 Proteomanalyse der 3 min-Pellikel auf Dentin

Die in diesen drei Versuchsdurchläufen identifizierten Pellikelproteine auf Dentin der ungeätzten und oral für 3 min exponierten Proben belaufen sich auf eine Gesamtanzahl von 467 Proteinen. Diese wurden durch zwei Versuche am Proband 1, aus Gründen der Reproduzierbarkeit und des Vergleichs untereinander, und durch einen Versuch am Proband 2 registriert. Eine Auflistung der Anzahl der detektierten Pellikelproteine in Abhängigkeit vom Versuchsdurchlauf ist in Tabelle 3 aufgeführt. Die genaue Auflistung aller identifizierten Pellikelproteine mit Hinweis auf die jeweilige Versuchsreihe befindet sich im Anhang (Tabelle 6). Bei den insgesamt 578 identifizierten Proteinen handelt es sich um alle Proteine aller Versuchsreihen von zwei Probanden und die Proteine der Dentinkontrollprobe ohne Pellikel.

Tabelle 3: Anzahl der identifizierten Pellikelproteine auf Dentin aus drei Versuchen an zwei Probanden und der Dentinkontrolle ohne Pellikel. Die Dentinkontrolle ohne Pellikel wurde von keinem Probanden getragen und stellt die identifizierten humanen Proteine auf den gereinigten bovinen Dentinprüfkörpern dar.

Gesamtes Proteom	578
Proteine der 3 min-Pellikel, ungeätzt	467
Proteine der Dentinkontrollprobe (ohne Pellikel)	63

Die Dentinkontrollprobe ohne Pellikel wurde mittels der humanen Datenbank analysiert, um die dabei identifizierten bovinen Dentinproteine mit den Pellikelproteinen der Probanden abzugleichen und dadurch falsch-positive Identifikationen zu erkennen. Jedoch zeigte sich, dass

alle identifizierten Proteine der Dentinkontrollprobe auch in den Auflistungen der 3 min-Pellikel der anderen Versuche erscheinen. Darüber hinaus sind diese identifizierten Proteine der Dentinkontrollprobe Bestandteil der humanen Pellikel, weshalb sie weiterhin in den Auflistungen verbleiben.

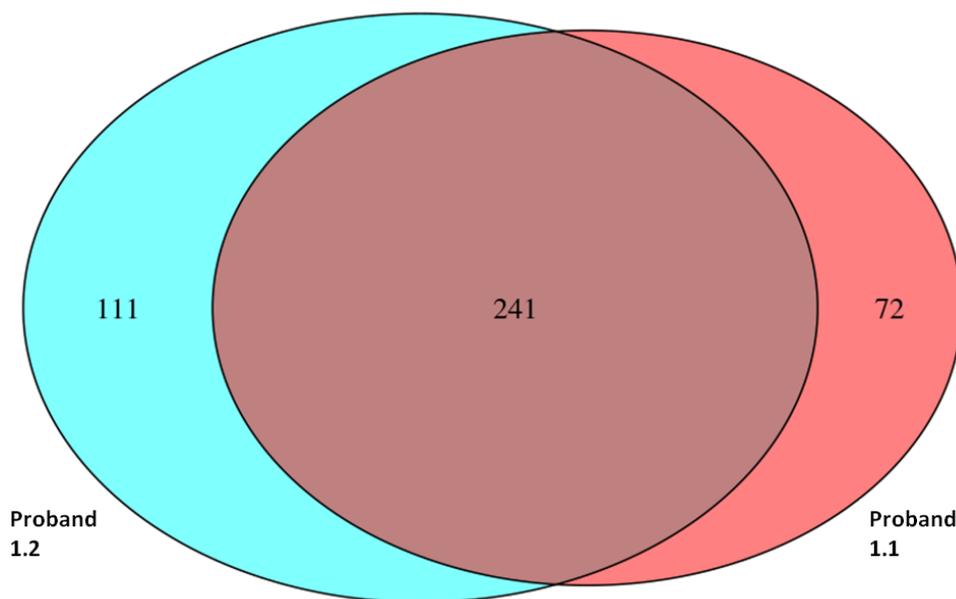


Abbildung 4: Venn-Diagramm mit Anzahl und Überschneidung der identifizierten Proteine der 3 min-Pellikel des Probanden 1 an zwei unterschiedlichen Versuchstagen.

Um die Reproduzierbarkeit der detektierten Proteine festzustellen, wurde ein Vergleich der identifizierten Pellikelproteine am Probanden 1 an verschiedenen Versuchstagen durchgeführt. Alle anderen Versuchsparameter wurden konstant gehalten. Das Mengendiagramm nach Venn in der Abbildung 4 zeigt eine Überschneidung der detektierten Proteine der 3 min-Pellikel des Probanden 1 an zwei verschiedenen Versuchstagen: 241 Pellikelproteine (57%) wurden an beiden Versuchstagen detektiert, die restlichen insgesamt 183 Pellikelproteine jeweils nur an einem der beiden Tage.

Um weitere Informationen zu den identifizierten Proteinen zu erhalten, wurden bioinformatische Auswertungen durchgeführt.

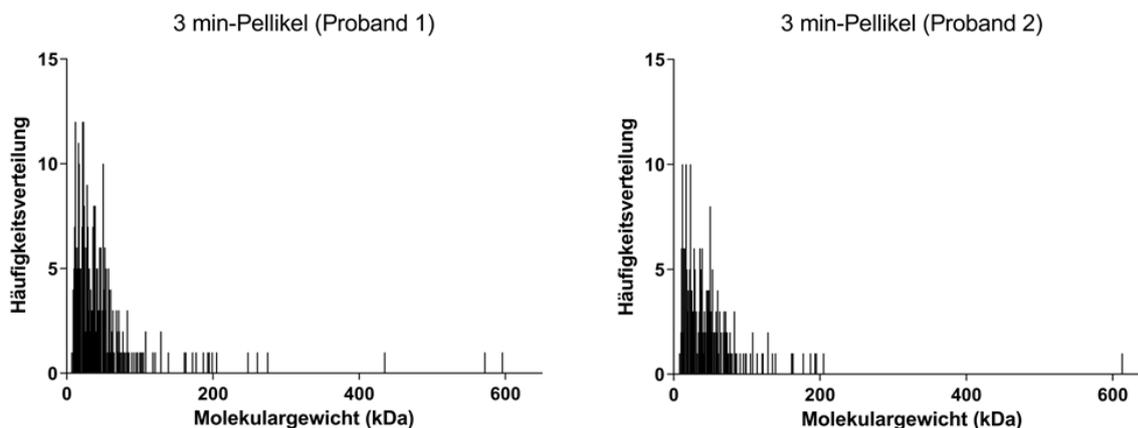


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilungen der Molekulargewichte aller im Pellikelproteom identifizierten Pellikelproteine der Probanden 1 und 2. Der Großteil der identifizierten Pellikelproteine hat ein Molekulargewicht < 200 kDa.

In den Histogrammen von Abbildung 5 sind die einzelnen Pellikelproteine der Probanden 1 und 2 nach ihrem Molekulargewicht in Kilodalton aufgeteilt. Dabei wurde jedes einzelne Pellikelprotein jedes Probanden aufgelistet und in dem Diagramm wiedergegeben. Die Häufigkeitsverteilung gibt an, wie häufig das jeweilige Molekulargewicht detektiert wurde. In den durchgeführten Versuchen wurden vor allem niedermolekulare Proteine detektiert. Der Großteil der identifizierten Proteine besitzt ein Molekulargewicht kleiner als 100 kDa. Einige wenige sind im mittleren Molekulargewichtsbereich zwischen 100 kDa und 200 kDa angesiedelt und sehr wenige Proteine besitzen ein hohes Molekulargewicht von über 200 kDa. Dieses Ergebnis wurde probandenunabhängig in allen Versuchen vorgefunden.

Zusätzlich wurde eine bioinformatische Auswertung basierend auf den Gene Ontology Annotationen durchgeführt. Die Gene Ontology dient dazu, Gene und Proteine aufzulisten, ihnen bekannte Funktionen zuzuordnen, die Beziehung dieser zueinander zu finden und daraus eine Datenbank zu erstellen. Diese deckt drei Bereiche ab: „Zelluläre Komponenten“, „Biologischer Prozess“ und „Molekulare Funktion“. Aufgrund der Tatsache, dass die Pellikel eine Schicht aus adsorbierten Speichelproteinen darstellt, sind die beiden Bereiche „Zelluläre Komponente“ und „Biologischer Prozess“ in den vorliegenden Untersuchungen nicht berücksichtigt. Somit wurde der Fokus auf die „Molekulare Funktion“ gelegt. In Abbildung 6 sind die molekularen Funktionen der identifizierten Proteine in Form von Kreisdiagrammen dargestellt. Diese wurden mit Hilfe des Programms Scaffold 4 erstellt und basieren auf den annotierten molekularen Funktionen der identifizierten Proteine.

Da jedes Protein mehrere Funktionen in sich tragen kann, sind alle annotierten Funktionen jedes Pellikelproteins aufgezeigt. So besteht die Möglichkeit, dass ein Pellikelprotein in jeder dieser Gruppen vertreten ist. Probanden- und tagesunabhängig sind ca. zwei Drittel dieser Funktionen auf die Kategorien „Bindung“, „Katalytische Aktivität“ und „Enzym-regulierende Aktivität“ aufgeteilt. Dabei stellt die Kategorie „Bindung“ mit mindestens 42% immer den größten Anteil des Kreisdiagramms dar. Darauf folgt die Kategorie „Katalytische Aktivität“ mit circa 21% und mit mindestens 9% die Kategorie „Enzym-regulierende Aktivität“.

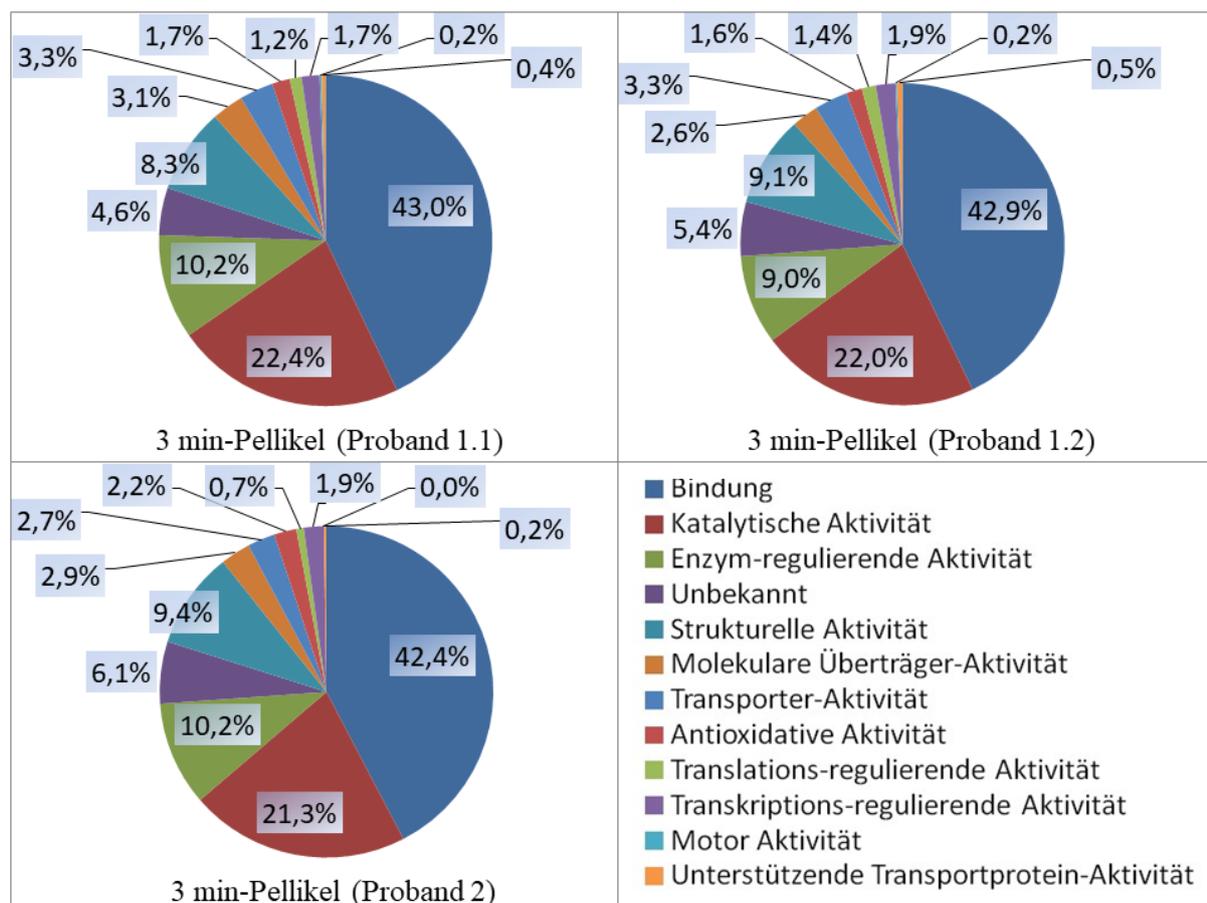


Abbildung 6: Verteilungsmuster der molekularen Funktionen der 3 min-Pellikel von drei unterschiedlichen Versuchstagen und zwei unterschiedlichen Probanden (basierend auf Daten der Gene Ontology).

Daraus resultiert, dass jeder Proband eine individuelle Pellikel-Zusammensetzung hat, die tagesabhängigen Schwankungen unterliegt. Jedoch zeigte sich, dass sowohl die molekularen Funktionen der detektierten Pellikelproteine als auch die Häufigkeitsverteilung der Molekulargewichte der beiden Probanden ähnliche Werte ergaben. Der direkte Vergleich der Diagramme des Probanden 1 zeigte ebenfalls dieses Ergebnis.

## 4.2 Proteomanalyse der 3 min-Pellikel auf Dentin nach Ätzung mit Zitronensäure unterschiedlicher Konzentration

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die Effekte der Säureeinwirkung auf Dentin unter Anwesenheit des initialen Biofilms mit Hilfe von Zitronensäure untersucht. Sowohl die Veränderung der Pellikelzusammensetzung als auch die daraus resultierenden Abweichungen in den bioinformatischen Auswertungen wurden ein weiteres Mal analysiert.

Tabelle 4 zeigt eine Auflistung der Anzahl identifizierter Proteine der 3 min-Pellikel ohne und mit Zitronensäureätzung verschiedener Konzentrationen der Probanden 1 und 2.

Beim Versuchsdurchlauf des Probanden 1.2 wurden von den insgesamt 463 detektierten Pellikelproteinen 351 Proteine in der 3 min-Pellikel detektiert. 322 Pellikelproteine sind in der 3 min-Pellikel nach Ätzung mit Zitronensäure von 0,5% für 1 min vorhanden, 305 Pellikelproteine finden sich nach einer 30 s Ätzung mit 1%iger Zitronensäure und 323 Pellikelproteine sind nach der Ätzung mit 5%iger Zitronensäure für ebenfalls 30 s zu detektieren. Insgesamt 206 dieser Pellikelproteine sind in allen vier Versuchsdurchläufen zu finden.

Von den insgesamt 346 identifizierten Pellikelproteinen des Probanden 2 wurden 257 Proteine in der 3 min-Pellikel detektiert. 243 Pellikelproteine waren auf der 3 min-Pellikel nach Ätzung mit einer Zitronensäure-Konzentration von 0,1% für 1 min vorhanden, 238 Pellikelproteine sind nach einer Ätzung mit 1%iger Zitronensäure für 30 s und noch 218 Pellikelproteine sind nach der 30 s Ätzung mit 5%iger Zitronensäure zu finden. Insgesamt 133 dieser Pellikelproteine waren in allen vier Versuchsdurchläufen detektierbar.

Die Prozentzahlen innerhalb der Tabelle geben an, welche prozentualen Anteile diese identifizierten Pellikelproteine einer Versuchsgruppe an der Gesamtmenge an Proteinen eines Versuchsdurchlaufs des jeweiligen Probanden ausmachen. Jeweils ca. 75% des Pellikelproteoms eines Probanden wurde in der 3 min-Pellikel gefunden. Diese Zahl nimmt, mit Ausnahme der Probe, bei der beim Probanden 1 die 3 min-Pellikel mit 5%iger Zitronensäure geätzt wurde, stetig ab. Die Schnittmenge aller Pellikelproteine eines Probanden innerhalb seines Gesamtversuchsdurchlaufes beträgt bei Proband 1.2 44,49% und bei Proband 2 38,44%.

Eine vollständige alphabetische Auflistung aller im Rahmen der vorliegenden Studie detektierten Proteine befindet sich im Anhang (Tabelle 6).

Tabelle 4: Anzahl der identifizierten Proteine auf Dentin der Probanden 1 und 2 vor und nach Ätzung mit Zitronensäure unterschiedlicher Konzentrationen nach einer Tragezeit von 3 min. Die Prozentzahlen in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der innerhalb eines Probanden identifizierten Proteine.

Identifizierte Proteine: 578			
Proband	Proband 1.1	Proband 1.2	Proband 2
3 min-Pellikel	312 (100%)	351 (75,81%)	257 (74,28%)
3 min-Pellikel mit 0,1% Zitronensäure	-	322 (69,55%)	243 (70,23%)
3 min-Pellikel mit 1% Zitronensäure	-	305 (65,87%)	238 (68,79%)
3 min-Pellikel mit 5% Zitronensäure	-	323 (69,76%)	218 (63,01%)
Schnittmenge je Versuchsdurchlauf	-	206 (44,49%)	133 (38,44%)
Pellikelproteom der Probanden	312	463	346
Schnittmenge der Probanden	140 (26,77%)		115 (21,06%)
Schnittmenge aller identifizierter Pellikelproteine	107 (18,38%)		

Aus dieser Gesamtliste an Pellikelproteinen wurden weitere Schnittmengen der 3 min-Pellikel unter unterschiedlichen Gesichtspunkten herausgearbeitet: Von allen identifizierten Pellikelproteinen des Probanden 1.1 und 1.2 sind insgesamt 140 Pellikelproteine in allen Versuchsdurchläufen an beiden Versuchstage zu finden. Beim Vergleich des Pellikelproteoms der Probanden 1.2 und 2 findet sich eine Überschneidung von 115 der Pellikelproteinen. Von der Gesamtmenge von 578 Proteinen sind 107 Pellikelproteine in allen Versuchsdurchläufen an allen Probanden zu finden, was 18,38% des gesamten Pellikelproteoms entspricht. Diese Proteine sind gesondert in Tabelle 5 im Anhang zu finden.

Zu diesen Versuchsreihen wurden ebenfalls bioinformatische Auswertungen durchgeführt, um mögliche Veränderungen durch die Ätzung mit Zitronensäure festzustellen.

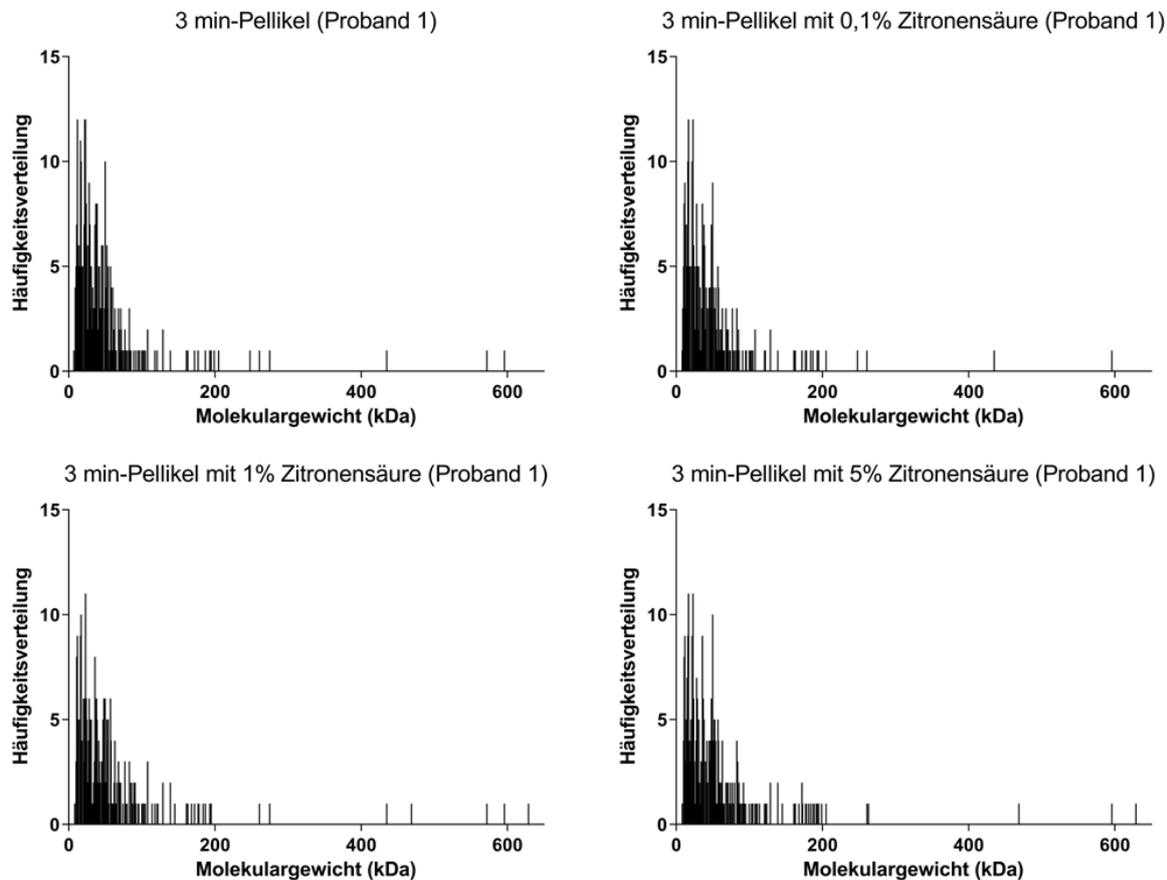


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der Molekulargewichte aller im Pellikelproteom identifizierten Proteine des Probanden 1 nach einer Tragezeit von 3 min vor und nach Ätzung mit Zitronensäure unterschiedlicher Konzentration.

Abbildung 7 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Molekulargewichte aller im Pellikelproteom identifizierten Proteine des Probanden 1 innerhalb der Versuchsreihe mit anschließender Zitronensäure-Ätzung verschiedener Konzentrationen und Einwirkzeiten. Wie bereits in Abbildung 5 ersichtlich, finden sich auch hier überwiegend Pellikelproteine mit geringem Molekulargewicht. Auch die maximale Anzahl an Pellikelproteinen mit gleichem Molekulargewicht befindet sich in diesem Bereich und liegt zwischen 10-15. Das gesamte Pellikelproteom der Versuchsdurchläufe findet in diesen Diagrammen seine Darstellung, außer Titin, da es mit seinem Molekulargewicht von 3816 kDa außerhalb des gewählten Ausschnittes des Molekulargewichtes liegt. Dieses wurde in der Probe von Proband 1 nach einer Ätzung mit 1%iger Zitronensäure gefunden.

Dasselbe Bild stellt sich in Abbildung 8 dar, welches die Häufigkeitsverteilung der Molekulargewichte des Probanden 2 aufzeigt. Hier sind ebenfalls vorwiegend niedermolekulare Pellikelproteine zu finden. Auch die maximale Anzahl an Pellikelproteinen eines Molekulargewichtes liegt unter 15.

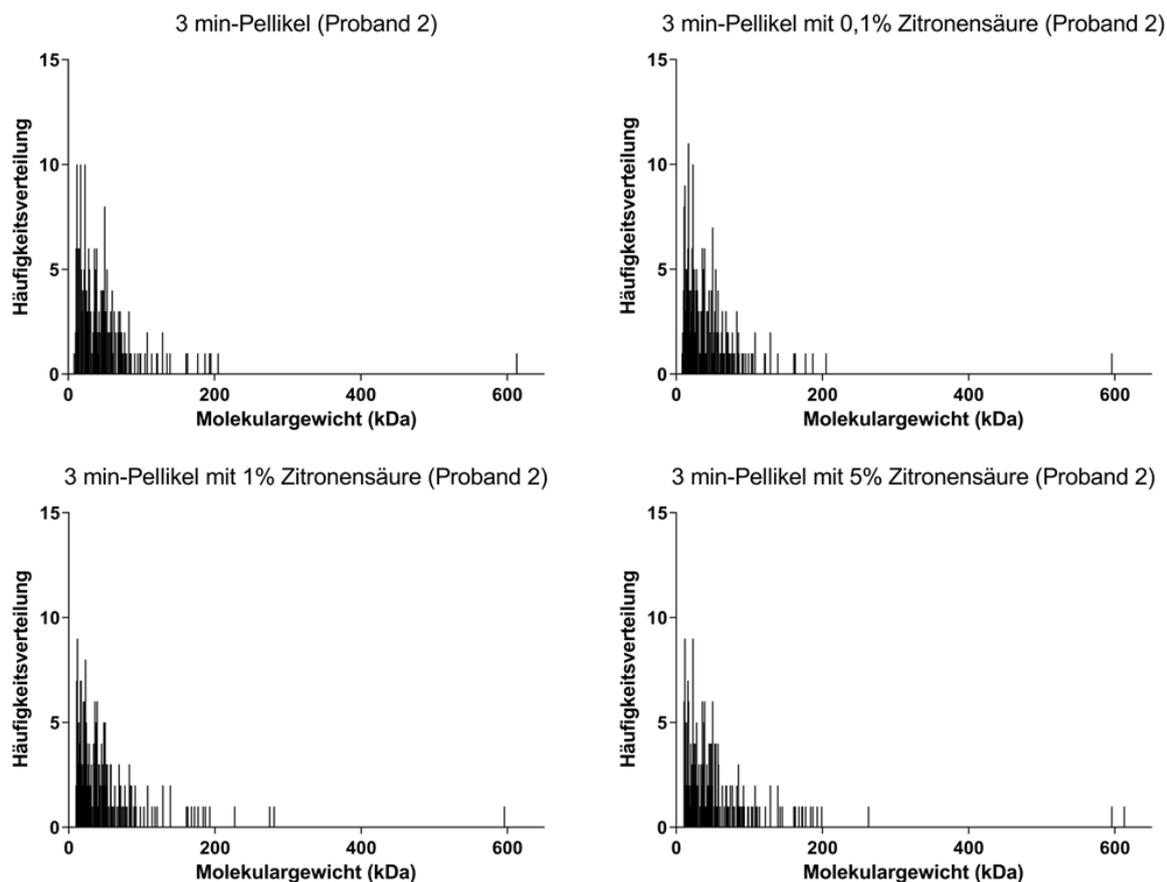


Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung der Molekulargewichte aller im Pellikelproteom identifizierten Proteine des Probanden 2 nach einer Tragezeit von 3 min vor und nach der Ätzung mit Zitronensäure unterschiedlicher Konzentrationen.

Die Ätzung mit Zitronensäure hat bei beiden Probanden keinen nennenswerten Einfluss auf das Herauslösen von Proteinen eines bestimmten Molekulargewichtes. Auch die Häufigkeitsverteilung wird nicht bedeutend verändert (Abbildung 7, Abbildung 8).

- Bindung
- Enzym-regulierende Aktivität
- Strukturelle Aktivität
- Transporter-Aktivität
- Translations-regulierende Aktivität
- Motor Aktivität
- Katalytische Aktivität
- Unbekannt
- Molekulare Überträger-Aktivität
- Antioxidative Aktivität
- Transkriptions-regulierende Aktivität
- Unterstützende Transportprotein-Aktivität

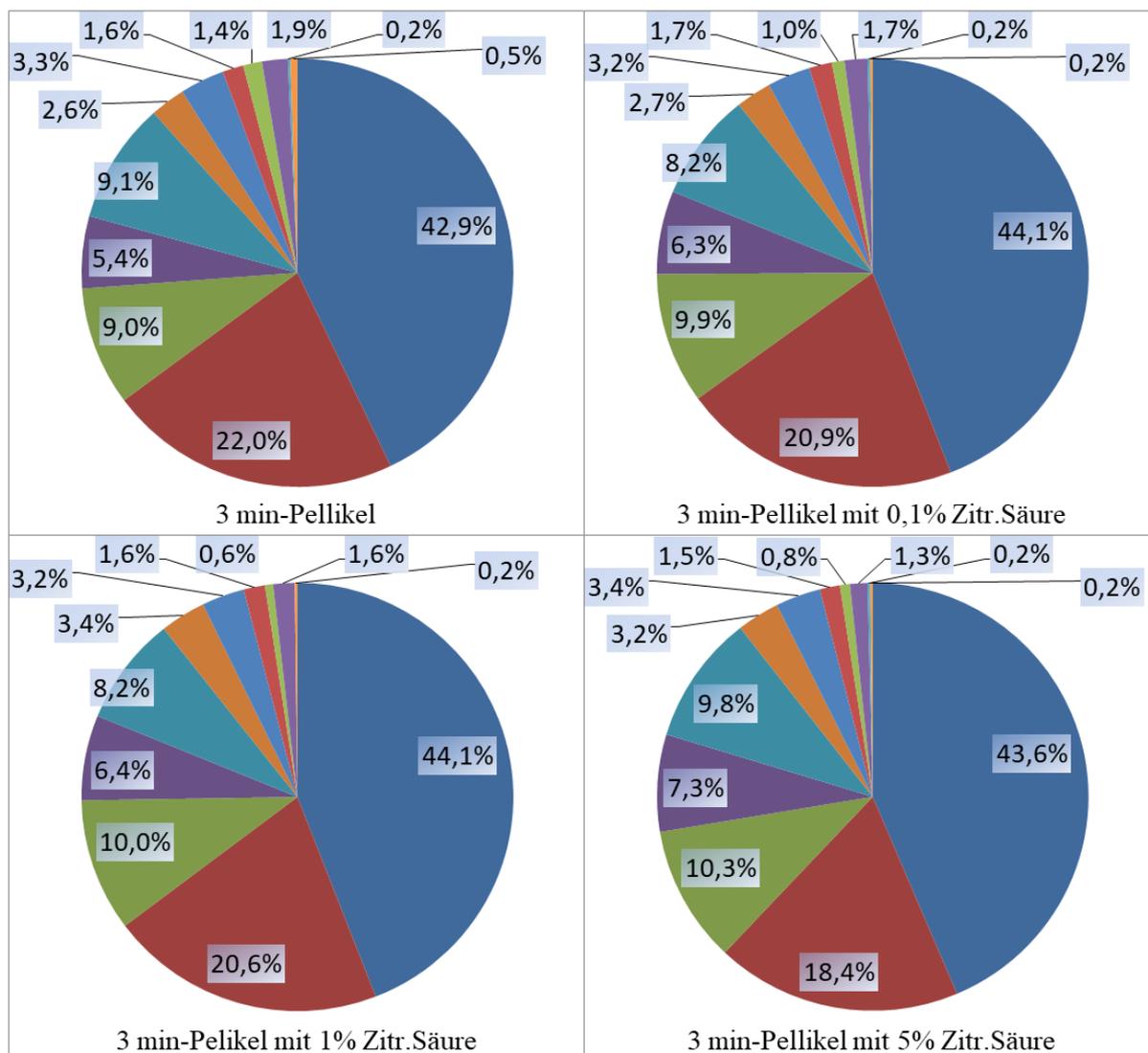


Abbildung 9: Verteilungsmuster der molekularen Funktionen der Pellicelproteine (basierend auf Gene Ontology). Es handelt sich um einen einzigen Versuchstag und um die Versuchsreihe des Probanden 1.2. Die Proben wurden entweder unbehandelt oder nach Ätzung mit Zitronensäure verschiedener Konzentrationen analysiert.

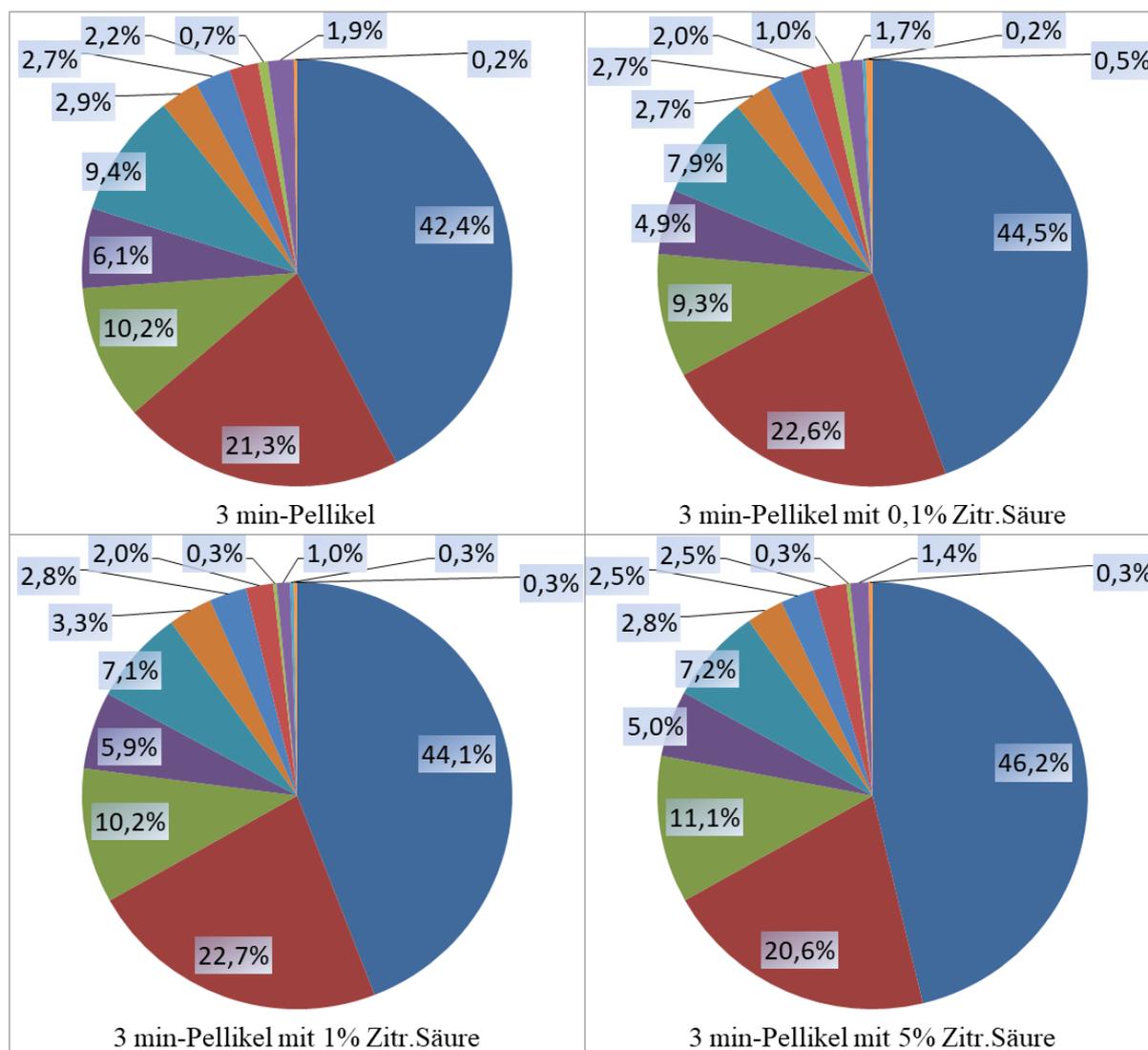


Abbildung 10: Verteilungsmuster der molekularen Funktionen im Proteom der 3 min-Pellikel auf Dentin (basierend auf Gene Ontology). Es handelt sich um einen einzigen Versuchstag und den Probanden 2. Die Proben wurden entweder unbehandelt oder nach Ätzung mit Zitronensäure verschiedener Konzentrationen analysiert.

Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen Diagramme zu den molekularen Funktionen der detektierten Pellikelproteine der Probanden 1 und 2. Wie bereits in Abbildung 6 zu sehen ist, nehmen die prozentualen Anteile der Funktionen „Bindung“, „Katalytische Aktivität“ und „Enzym-regulierende Aktivität“ ungefähr drei Viertel des Diagrammes ein. Dieses Bild ändert sich trotz der Ätzung mit Zitronensäure verschiedener Konzentrationen und verschiedener Einwirkzeiten nicht. Bei beiden Probanden schwanken die Prozentzahlen der Funktionen „Bindung“ (41,4-46,2%), „Katalytische Aktivität“ (18,4-22,7%) und „Enzym-regulierende Aktivität“ (9,0-11,3%) nur in geringen Maßen, ohne dass dabei eine Tendenz erkennbar wäre, ob die Prozentzahlen durch die Ätzung eher zu- oder abnehmen.

Die bioinformatischen Auswertungen zeigen, dass die Zitronensäureätzung auf das Molekulargewicht und die molekularen Funktionen des Proteoms keinen Einfluss hat. Lediglich die Anzahl der Proteine ändert sich, das Proteom selbst aber behält nach diesen bioinformatischen Erkenntnissen seine grundlegende Zusammensetzung.

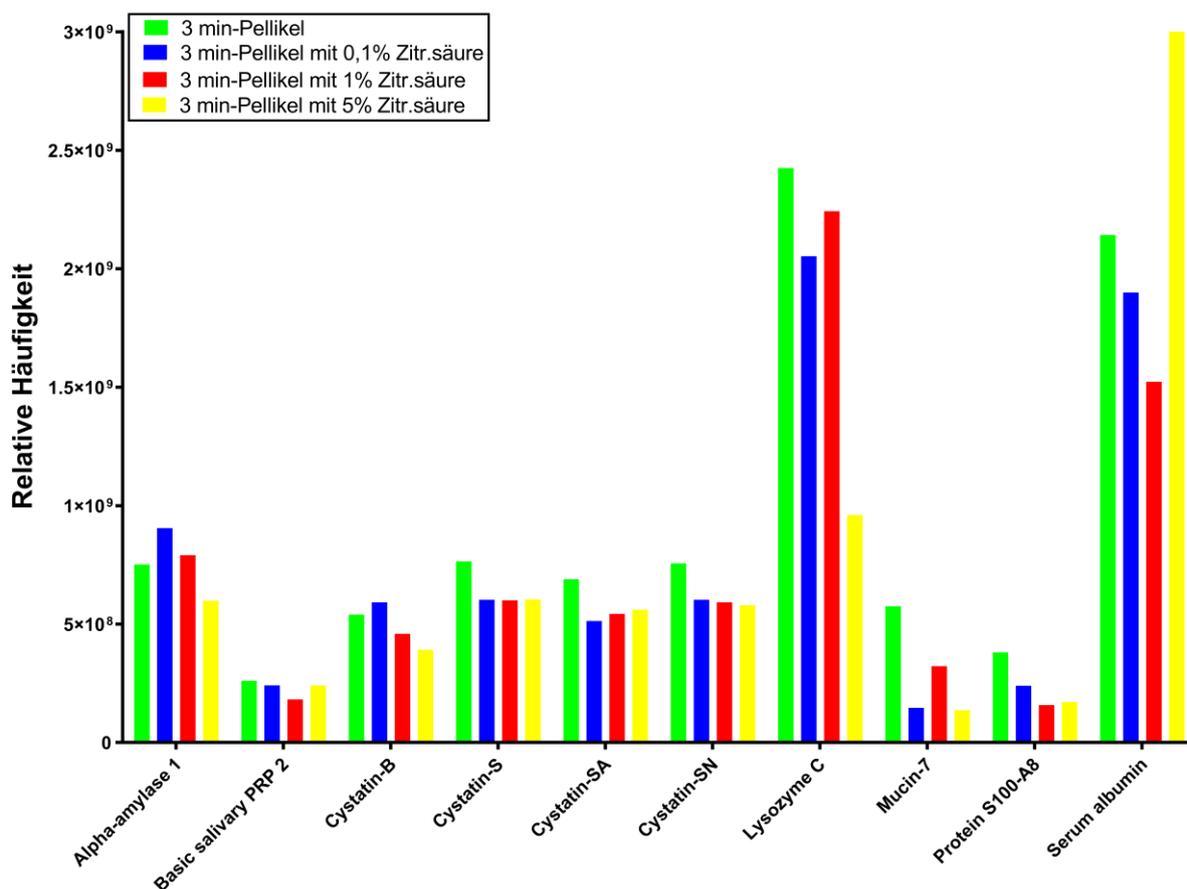


Abbildung 11: Relative Häufigkeit der 10 abundantesten im Pellicelproteom identifizierten Proteine ohne erosiven Einfluss, sowie nach Ätzung mit 0,1%, 1% und 5% Zitronensäure. Proband 1.2

Eine weitere Analyse diente der quantitativen Bestimmung der einzelnen Proteine des Proteoms der jeweiligen Versuchsreihen. Aufgrund der Vielzahl von Proteinen wurde eine Methode angewendet, welche auf eine vorherige Markierung einzelner Proteine verzichtet: die TOP3 Methode. Diese Methode basiert auf der Annahme, dass die Quantität eines Proteins über seine drei abundantesten ionisierten Peptide während der nano-MS bestimmt werden kann. Dies geschieht rechnerisch über die Integration der gemittelten Flächen der Peaks der drei häufigsten Peptide eines Proteins, weswegen die Skaleneinteilung einheitslos ist. Somit können Proteine mit kleiner und großer Peptidanzahl direkt miteinander verglichen werden und auf eine Markierung über Referenzproteine kann verzichtet werden.

In Abbildung 11 und Abbildung 12 sind die jeweils quantitativ häufigsten Pellikelproteine des Proteoms der beiden Probanden aufgezeigt. Dabei sind die jeweiligen Versuche – 3 min-Pellikel und 3 min-Pellikel geätzt mit Zitronensäure unterschiedlicher Konzentration – eines jeden Proteins direkt gegenübergestellt.

Beim Probanden 1 (Abbildung 11) sind die häufigsten Proteine *Alpha-amylase 1*, *Basic salivary proline-rich protein* (Prolin-reiche Proteine, *PRP*) 2, *Cystatin-B*, *Cystatin-S*, *Cystatin-SA*, *Cystatin-SN*, *Lysozyme C*, *Mucin-7*, *Protein S100-A8(4)* und *Serum albumin*, wobei *Lysozyme* und *Serum albumin* die größte Häufigkeit aufzeigen. Anhand dieser Auswertungen ist zu sehen, dass trotz der Zitronensäure-Ätzung nicht immer eine Abnahme der relativen Häufigkeit der Proteine vorzufinden ist. *Cystatin-S* und *Cystatin-SN* zeigen Tendenzen, wie sie nach den vorhergehenden Ergebnissen zu erwarten wären: eine stetige Abnahme der Proteinanzahl mit zunehmender Zitronensäurekonzentration. Die anderen Proteine zeigen diesen Trend jedoch nicht. Bei diesen kommt es zu dem Anstieg von einem oder mehreren Proteinen der geätzten Pellikelproben. Besonders *Serum albumin* fällt aus der Reihe, da sich dort die Probe mit der 5%-Ätzung weit über der Häufigkeit der ungeätzten Probe darstellt.

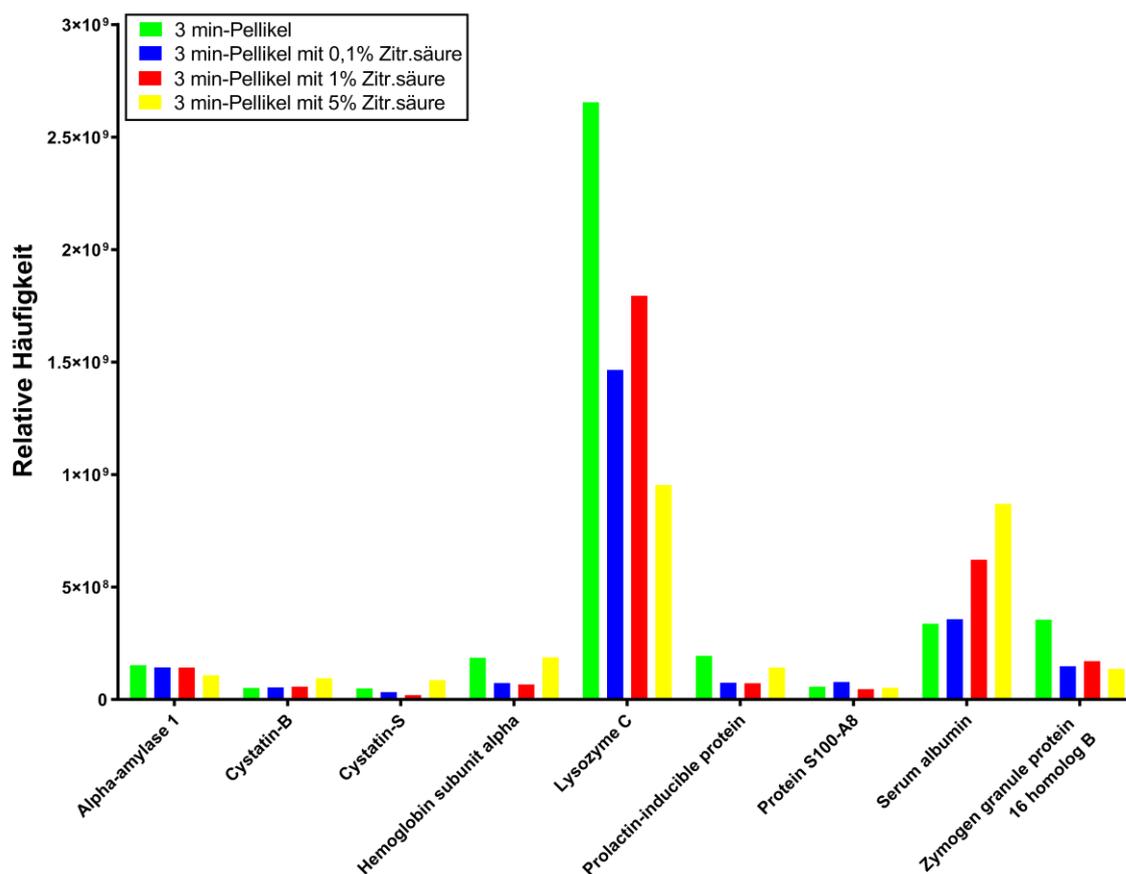


Abbildung 12: Relative Häufigkeit der 9 häufigsten im Pellikelproteom identifizierten Pellikelproteine ohne erosiven Einfluss, sowie nach Ätzung mit 0,1%, 1% und 5% Zitronensäure. Proband 2

Bei Proband 2 zeigt sich in Abbildung 12 ein ähnliches Bild. Hier sind die neun häufigsten Proteine *Alpha-amylase 1*, *Cystatin-B*, *Cystatin-S*, *Hemoglobin subunit alpha*, *Lysozyme C*, *Prolactin-inducible protein*, *Protein S100-A8*, *Serum albumin* und *Zymogen granule protein 16 homolog B*. Die Proteine *Alpha-amylase 1*, *Cystatin-B* und *-S*, *Lysozyme C*, *Protein S100-A8* und *Serum albumin* sind bei beiden Probanden zu finden. Jedoch zeigt nur *Alpha-amylase 1* den zu erwartenden Trend der immer weiter abnehmenden Häufigkeit durch die Ätzung mit Zitronensäure. Bei allen anderen Proteinen zeigen sich Anstiege in mindestens einer der Proben. Vor allem die 3 min-Pellikel geätzt mit 5%iger Zitronensäure fällt aus dem Muster: Insgesamt fünf der neun Proteine zeigen dort einen Anstieg, nämlich *Cystatin-B*, *Cystatin-S*, *Hemoglobin subunit alpha*, *Prolactin-inducible protein* und *Serum albumin*.

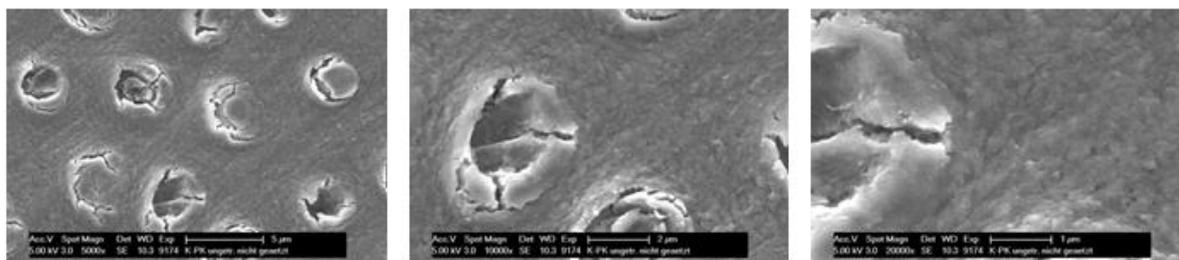
Alle diese Proteine finden sich, mit Ausnahme von *Cystatin-S*, in allen Versuchsreihen sowohl beim Probanden 1.2, als auch beim Probanden 2 wieder. Unter Hinzunahme des Probanden 1.1 fällt lediglich das Protein *Basic salivary PRP 2* heraus. Somit sind von den 13 häufigsten Proteinen elf Proteine bei allen Probanden in allen Versuchsdurchführungen zu finden.

### 4.3 Transmissions- und rasterelektronenmikroskopische Resultate

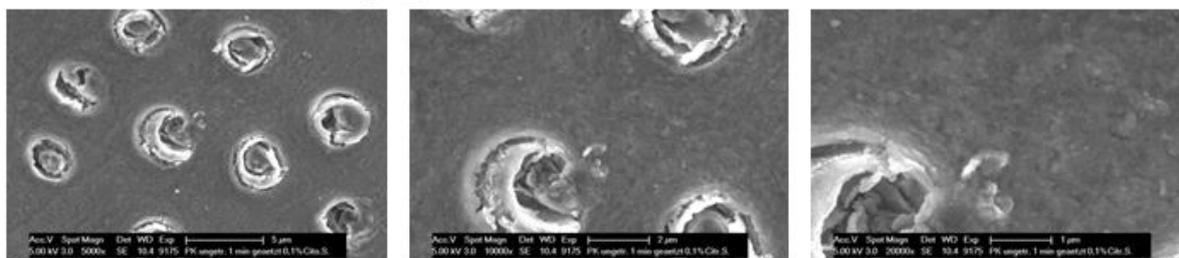
In den Abbildungen 13 bis 15 sind die REM-Bilder der Dentinkontrollprobe ohne Pellikel sowie die 3 min-Pellikelproben der Probanden 1 und 2 vor und nach Zitronensäureätzung verschiedener Konzentrationen in 5.000-, 10.000-, und 20.000facher Vergrößerung dargestellt. Auf allen Bildern ist ein Anschnitt mindestens eines Dentintubulus für den besseren Vergleich untereinander zu erkennen.

Die Dentintubuli zeigen sich auf den ungeätzten Bildern der Dentinkontrollprobe und der 3 min-Pellikelprobe teilweise verschlossen. In Abbildung 13 sind die Dentintubuli auch auf den Dentinkontrollproben mit 0,1%iger Zitronensäureätzung zum Teil verschlossen. Ab der Verwendung von 1%iger Zitronensäure auf der Dentinkontrollprobe ohne Pellikel zeigt sich ein anderes Bild: Die Dentinoberfläche erscheint deutlich geglättet und alle Dentintubuli sind vollständig eröffnet. Zusätzlich wurden sie durch die Säure bis in die Tiefe angegriffen. In den Bildern der Dentinkontrollprobe mit 5%iger Zitronensäurebehandlung sind die Dentintubuli noch stärker erodiert und es wurden durch die starke Säurekonzentration bereits Kollagenfibrillen freigelegt.

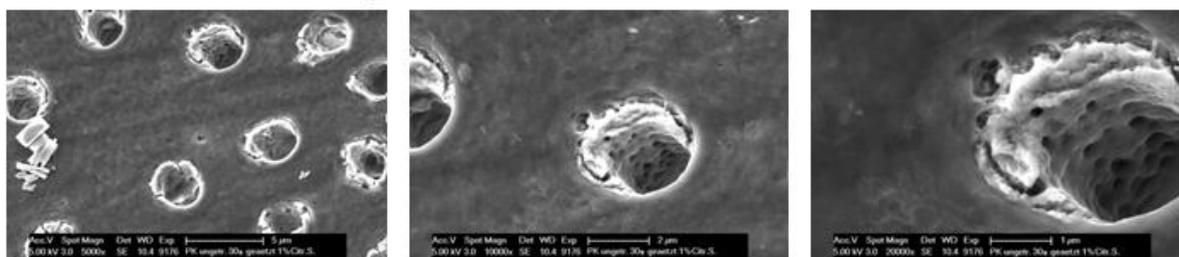
## Dentinkontrolle ohne Pellikel



## Dentinkontrolle ohne Pellikel, 0,1% Zittr.säure



## Dentinkontrolle ohne Pellikel, 1% Zittr.säure



## Dentinkontrolle ohne Pellikel, 5% Zittr.säure

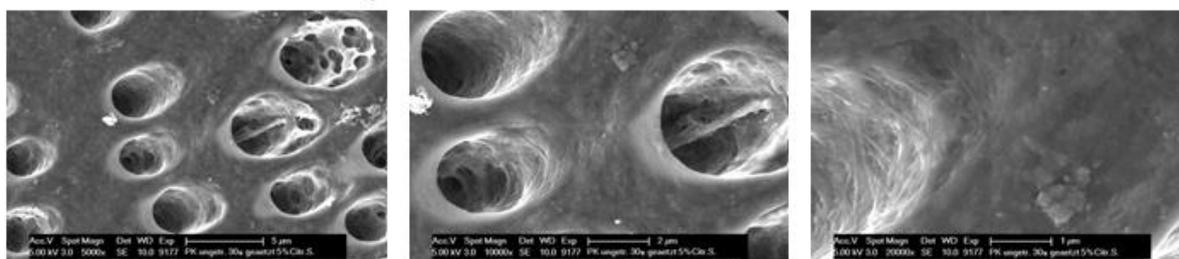


Abbildung 13: REM-Bilder der Dentinkontrollproben ohne Pellikel mit Zitronensäureätzung unterschiedlicher Konzentration. Zum besseren Vergleich wurden Bildausschnitte mit angeschnittenen Dentintubuli gewählt. Exemplarische Aufnahmen mit jeweils 5.000-, 10.000- und 20.000facher Vergrößerung (von links nach rechts).

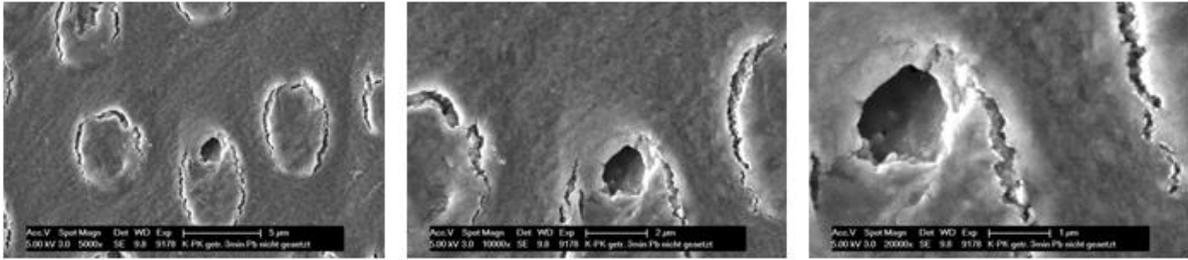
Beim Probanden 1 zeigt sich in Abbildung 14 beginnend mit der Ätzung der 3 min-Pellikel mit 0,1%iger Zitronensäure die Eröffnung der Dentintubuli und deren beginnende Erosion. Dieser Effekt der Zitronensäure wird mit zunehmender Konzentration deutlicher, sodass bei den Abbildungen der 3 min-Pellikel mit 5%iger Zitronensäure die Kontinuität der Tubuluswand stark aufgehoben ist. Jedoch sind die Dentintubuli in den 3 min-Pellikelproben mit

1%iger Zitronensäure immer noch teilweise verschlossen. Trotzdem ist die Tubuluswand bereits durch die Zitronensäure angegriffen. Auch wird ab dieser Säurekonzentration die Dentinoberfläche mit zunehmender Zitronensäurekonzentration immer glatter. Jedoch werden trotz zunehmender Säurestärke weniger Kollagenfibrillen freigelegt als in der Dentinkontrollprobe ohne Pellikel in Abbildung 13.

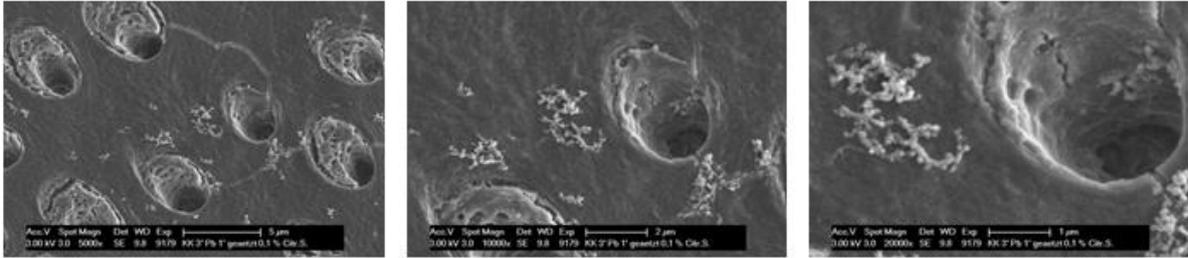
Beim Probanden 2 zeigt sich in Abbildung 15 folgendes Bild: Die okkludierten Dentintubuli werden ab einer Zitronensäureätzung der 3 min-Pellikelprobe mit 1% vollständig eröffnet. Zu diesem Zeitpunkt ist die Oberfläche des Dentins, die zuvor, wie beim Probanden 1, eine globuläre, feinkörnige Oberfläche besaß, ebenfalls wieder geglättet. Die Wände der Dentintubuli sind aber noch nicht stark angegriffen. Die deutliche Destruktion der Tubuluswände beginnt mit der Verwendung der 5%igen Zitronensäure auf der 3 min-Pellikelprobe des Probanden 2. Hier ist die Kontinuität der Tubuli stark unterbrochen.

Damit scheint die Zitronensäure ihren größten Effekt auf die Dentinkontrollprobe ohne Pellikel zu haben, da die Destruktion der Tubuluswände stärker ist als bei den Proben der 3 min-Pellikel der beiden Probanden, und da deutlich mehr Kollagenfibrillen freigelegt wurden.

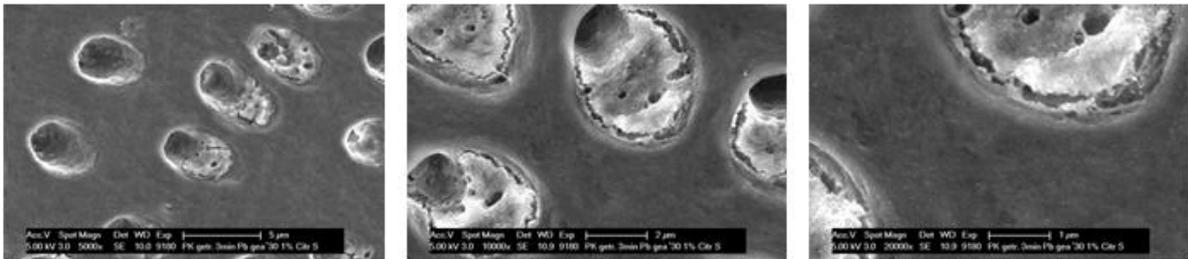
## 3 min-Pellikel Proband 1



## 3 min-Pellikel Proband 1, 0,1% Zittr.säure



## 3 min-Pellikel Proband 1, 1% Zittr.säure



## 3 min-Pellikel Proband 1, 5% Zittr.säure

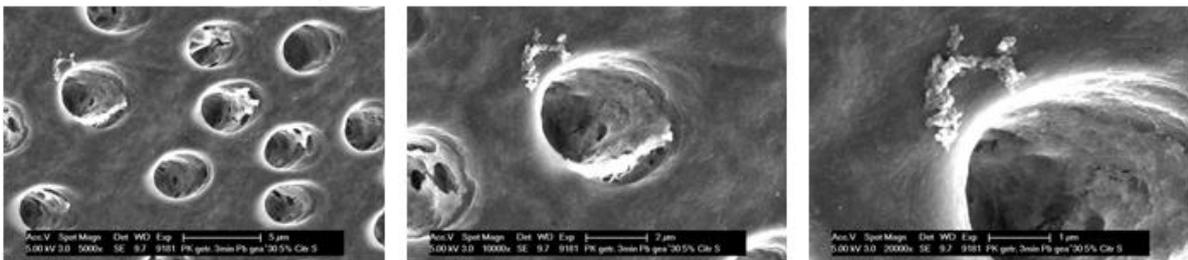
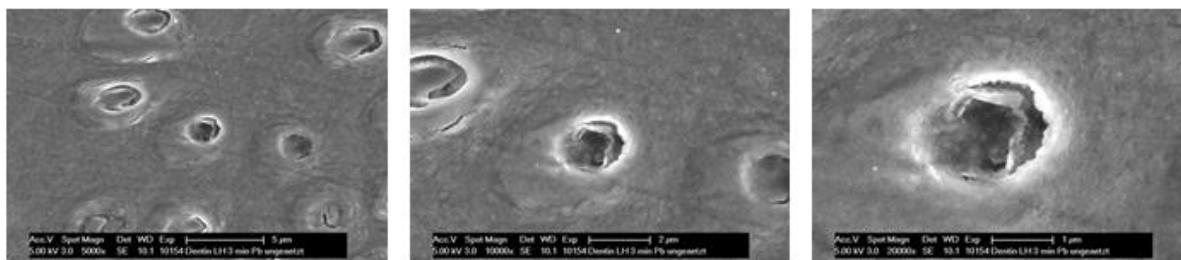
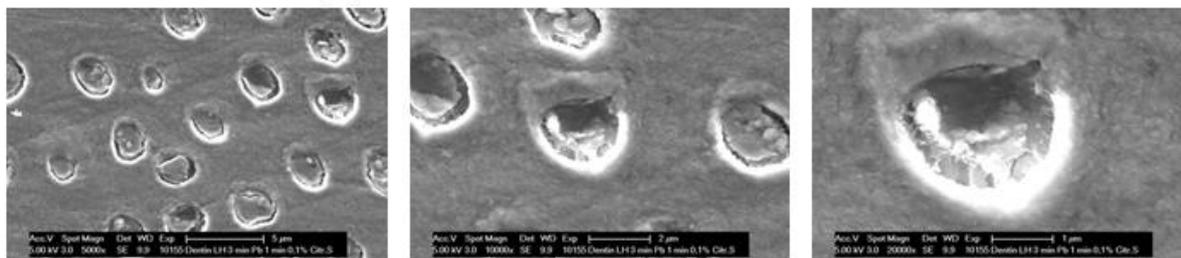


Abbildung 14: REM-Bilder der 3 min-Pellikelproben des Probanden 1 ohne und mit Zitronensäureätzung unterschiedlicher Konzentrationen. Exemplarische Aufnahmen mit jeweils 5.000-, 10.000- und 20.000facher Vergrößerung (von links nach rechts).

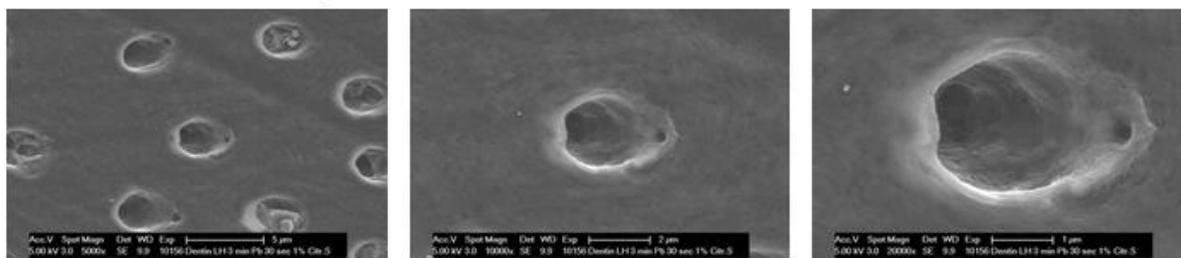
## 3 min-Pellikel Proband 2



## 3 min-Pellikel Proband 2, 0,1% Zittr.säure



## 3 min-Pellikel Proband 2, 1% Zittr.säure



## 3 min-Pellikel Proband 2, 5% Zittr.säure

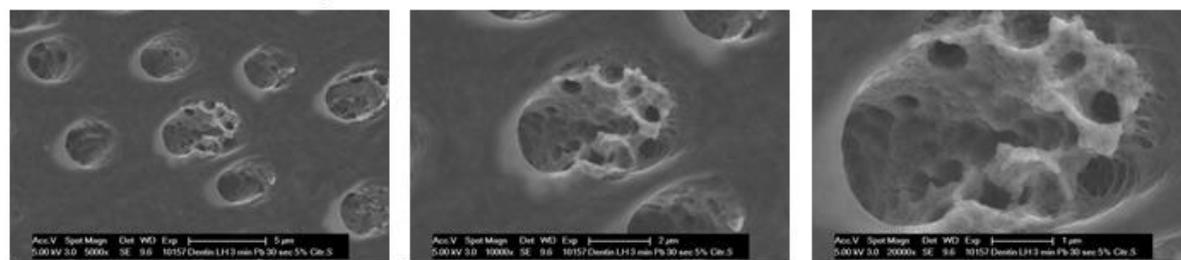
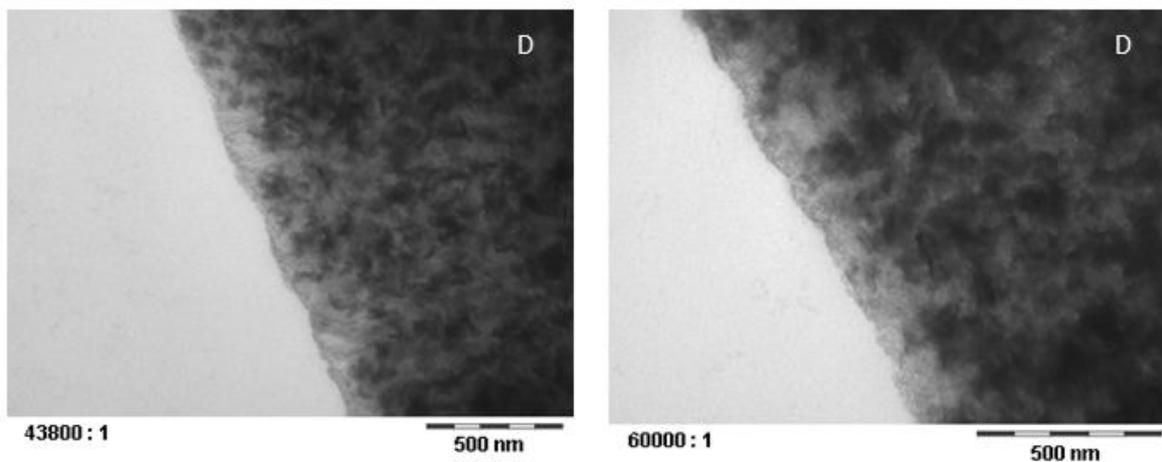


Abbildung 15: REM-Bilder der 3 min-Pellikelproben des Probanden 2 ohne und mit Zitronensäureätzung unterschiedlicher Konzentrationen. Exemplarische Aufnahmen mit jeweils 5.000-, 10.000- und 20.000facher Vergrößerung (von links nach rechts).

Die Abbildungen 16 bis 22 zeigen die TEM-Bilder der Dentinkontrollprobe ohne Pellikel, sowie die der 3 min-Pellikel der Probanden 1 und 2. Die folgenden Markierungen finden sich auf den Bildern: D = Dentin, Ddem = Demineralisiertes Dentin (Bereich ist mit Pfeilen markiert), P = Pellikel.

## Dentinkontrolle ohne Pellikel



## Dentin ohne Pellikel, 0,1% Zitronensäure

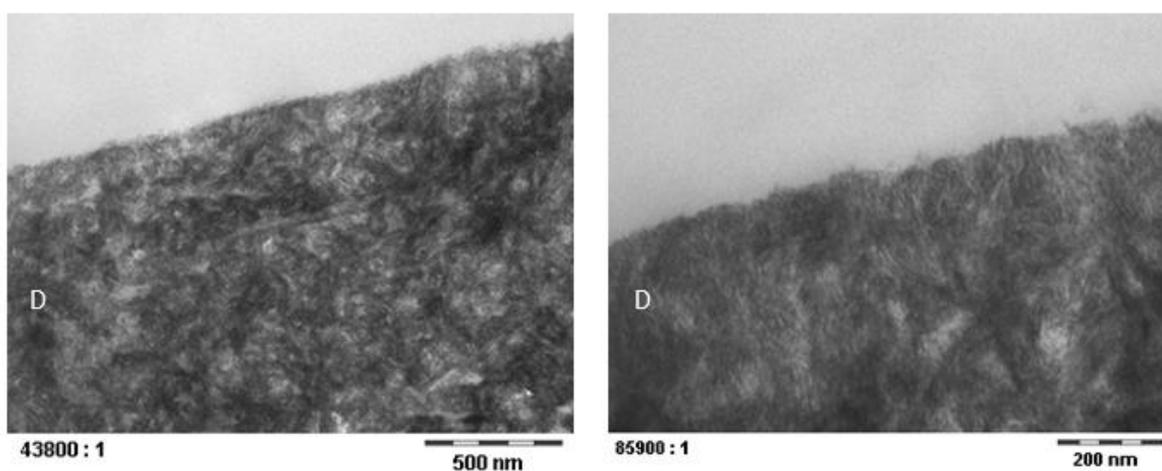


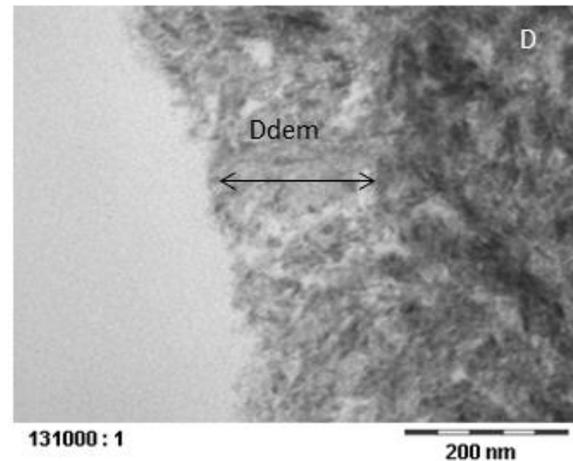
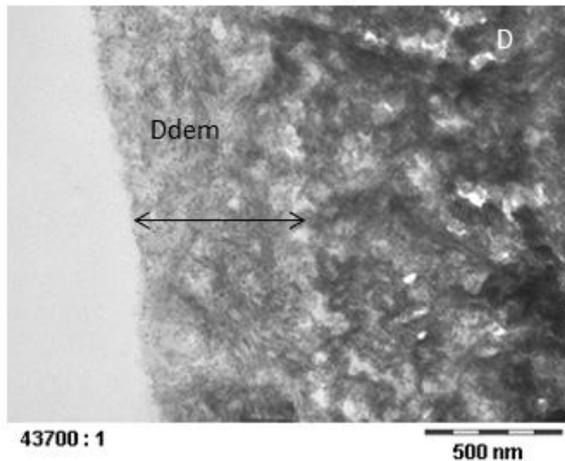
Abbildung 16: TEM-Bilder der Dentinkontrolle ohne Pellikel. Dargestellt sind die ungeätzte native Probe und die mit 0,1% Zitronensäure geätzte Dentinkontrolle. Mit D ist die Zahnhartsubstanz Dentin markiert. Angaben zur Vergrößerung sind unter dem jeweiligen Bild zu finden.

Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen die TEM-Bilder der Dentinkontrollprobe ohne Pellikel im nativen und im mit aufsteigender Zitronensäurekonzentration geätzten Zustand. Abbildung 16 zeigt jeweils eine unveränderte Dentinoberfläche, die trotz der Säureeinwirkung keine Veränderung der Dentinoberfläche aufweist.

Die in Abbildung 17 dargestellte Dentinkontrollprobe ohne Pellikel mit 1%iger und 5%iger Zitronensäure zeigt erstmalig einen demineralisierten Bereich an der Dentinoberfläche, welcher in der Abbildung mit Pfeilen markiert wurde. Dieser Bereich ist in der Abbildung der Dentinkontrollprobe mit 1%iger Säureätzung bereits scharf von dem nicht demineralisierten Dentinbereich abgegrenzt. Der Kontrast des demineralisierten Dentins im Vergleich zu dem nicht demineralisierten Dentinbereich ist aber noch nicht stark ausgeprägt. Dieser wird in den Abbildungen der Dentinkontrollprobe mit 5%iger Zitronensäureeinwirkung deutlicher. Der

deutlich veränderte demineralisierte Anteil grenzt sich scharfkantig von dem nicht demineralisierten Dentinbereich ab. Mit steigender Zitronensäurekonzentration nimmt auch der demineralisierte Dentinbereich zu.

Dentinkontrolle ohne Pellikel, 1% Zitronensäure



Dentin ohne Pellikel, 5% Zitronensäure

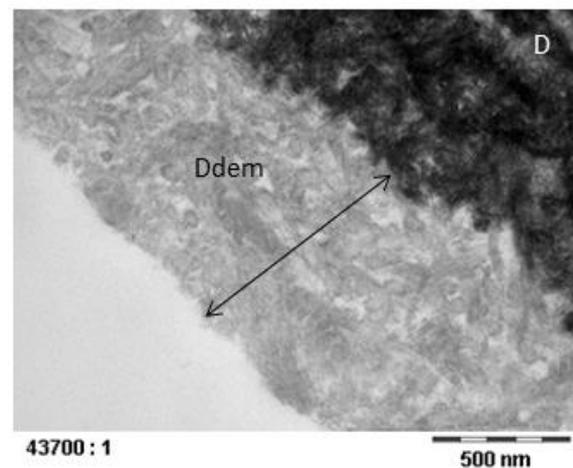
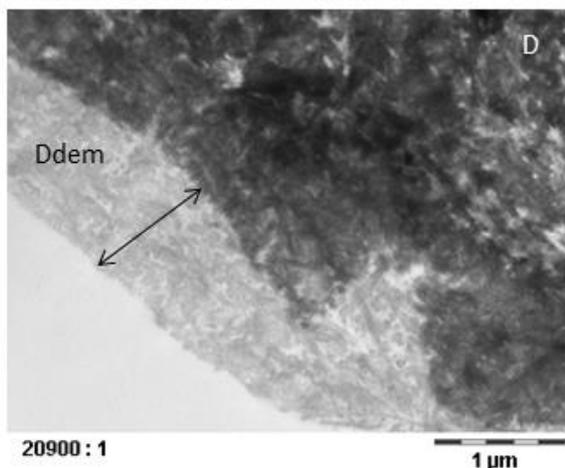
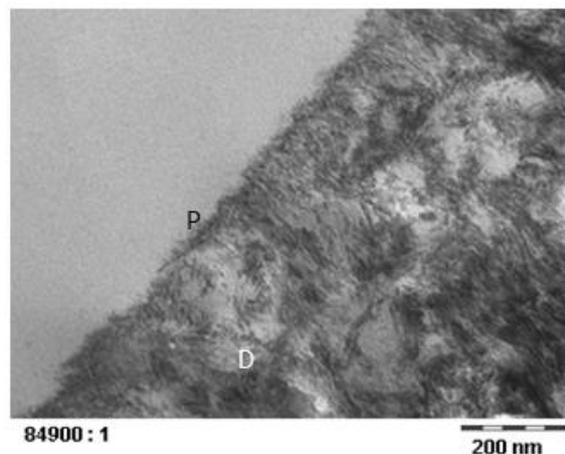
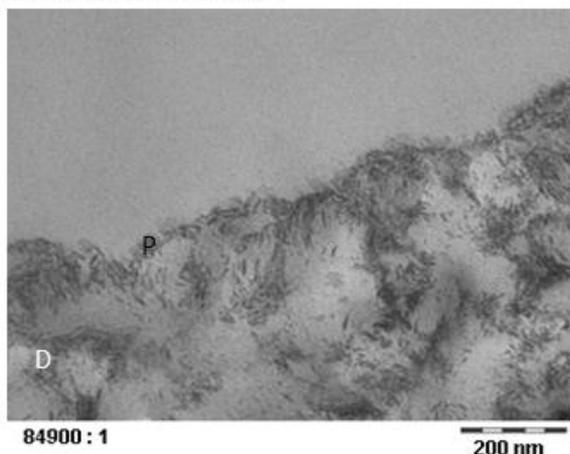


Abbildung 17: TEM-Bilder der Dentinkontrolle ohne Pellikel. Dargestellt sind die mit 1%iger und 5%iger Zitronensäure geätzten Dentinkontrollen. Mit D ist die Zahnhartsubstanz Dentin markiert, Ddem gibt den demineralisierten Dentinbereich an, der zusätzlich durch Pfeile markiert wird. Angaben zur Vergrößerung sind unter dem jeweiligen Bild zu finden.

Die TEM-Analysen der pellikelbedeckten Dentinprüfkörper des Probanden 1 vor und nach Zitronensäureätzung mit aufsteigender Konzentration werden in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt. Auf der ungeätzten 3 min-Pellikelprobe sieht man die durchgängig aufgelockerte Struktur der Pellikel auf der Dentinoberfläche. Man kann die dentinnahe elektronendichte Schicht erahnen, die von einer globulären, aufgelockerten Pellikelschicht zur Oberfläche hin abgegrenzt wird. Auch die 3 min-Pellikelprobe mit 0,1%iger Zitronensäure zeigt eine durch-

gängige Pellikelschicht mit diesen beiden Charakteristika, wobei die aufgelockerte Pellikelschicht in ihrer Höhe reduziert erscheint. Die Dentinbereiche unterhalb der Pellikel zeigen jedoch trotz der Säureeinwirkung keine demineralisierten Anteile.

### 3 min-Pellikel Proband 1



### 3 min-Pellikel Proband 1, 0,1% Zitronensäure

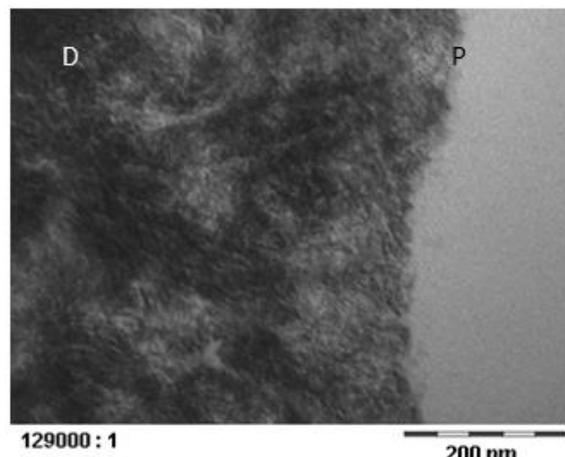
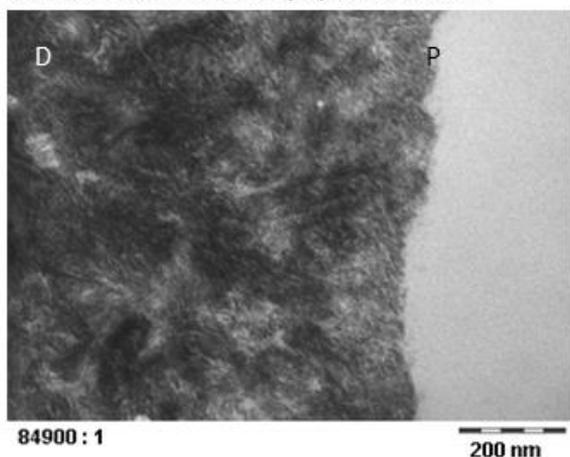


Abbildung 18: TEM-Bilder der 3 min-Pellikel des Probanden 1. Dargestellt sind die ungeätzten und die mit 0,1% Zitronensäure geätzten 3 min-Pellikelproben. Mit D ist die Zahnhartsubstanz Dentin markiert und P gibt die Pellikel an. Angaben zur Vergrößerung sind unter dem jeweiligen Bild zu finden.

Mit steigender Säurekonzentration verändert sich dieses Bild in der Abbildung 19 weiter: In der 3 min-Pellikelprobe mit 1%iger Zitronensäureätzung ist ein durchgängiger demineralisierter Dentinbereich erkennbar, der scharf vom nicht demineralisierten Dentinbereich abgegrenzt ist. Die basale elektronendichte Schicht der Pellikel weist Kontinuitätsunterbrechungen auf und die globuläre Pellikelschicht ist nicht mehr erkennbar. Die 3 min-Pellikelprobe mit 5%iger Zitronensäure zeigt eine sehr stark reduzierte Pellikel-Struktur, welche nur noch als diskontinuierliche basale elektronendichte Schicht zu erkennen ist. Jegliche aufgelockerte

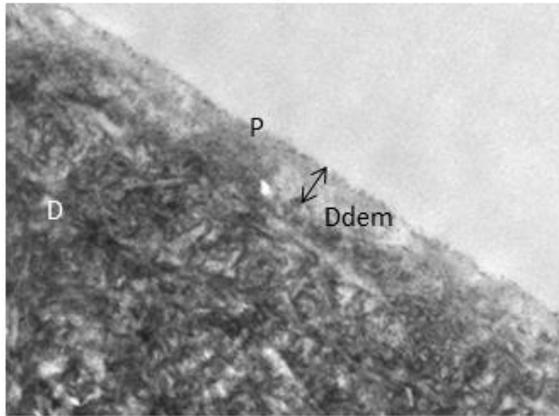
globuläre Pellikelschicht darüber wurde vollständig durch die Säureeinwirkung eliminiert. Jedoch wurde in diesen Proben kein durchgängig demineralisierter Bereich gefunden, es sind einzelne demineralisierte Bereiche unterschiedlichen Ausmaßes zu finden, die weiterhin scharf vom nicht demineralisierten Dentinbereich abgegrenzt sind.

In den Abbildungen 20 und 21 sind die TEM-Bilder des Probanden 2 der 3 min-Pellikel auf Dentin ohne und mit Zitronensäureätzung aufsteigender Konzentration dargestellt. In der ungeätzten 3 min-Pellikelprobe in Abbildung 20 lässt sich dem Dentin aufgelagert eine basale elektronendichte Pellikelschicht erahnen, der eine globuläre und teils granuläre aufgelockerte Pellikelschicht aufsitzt. Diese aufgelockerte Pellikelschicht scheint in einigen Bereichen stärker ausgeprägt zu sein. Die Ätzung mit 0,1%iger Zitronensäure der 3 min-Pellikelprobe des Probanden 2 zeigt keine Wirkung auf den Dentinproben: Die Pellikelschicht ist weiterhin deutlich sichtbar, auch die aufgelockerte globuläre, granuläre Schicht erscheint nicht diminuiert und es finden sich keine demineralisierten Dentinbereiche.

In Abbildung 21 zeigt die stärker konzentrierte Zitronensäure jedoch ihre Wirkung: Die Pellikel der 3 min-Pellikelprobe mit 1%iger Zitronensäure ist nur noch als eine diskontinuierliche Schicht der basalen elektronendichten Pellikel zu sehen. Der globuläre, aufgelockerte Anteil der Pellikel ist kaum noch zu erkennen. Die demineralisierten Anteile lassen sich teilweise scharf und teilweise diffus vom nicht demineralisierten Dentinbereich abgrenzen und weisen unterschiedliche Stärken auf. Die 5%ige Zitronensäure hinterlässt auf der 3 min-Pellikelprobe des Probanden 2 deutliche Spuren. Es ist ein deutlich demineralisierter Dentinbereich zu erkennen, der sich scharf vom nicht demineralisierten Dentin abgrenzt. Die Ausdehnung des demineralisierten Anteils hat im Vergleich zur Probe mit der 1%igen Zitronensäureätzung zugenommen. Die Pellikel ist nur noch als residuale Pellikelschicht erkennbar, die aufgelockerten Anteile wurden durch die Säurewirkung vollständig entfernt.

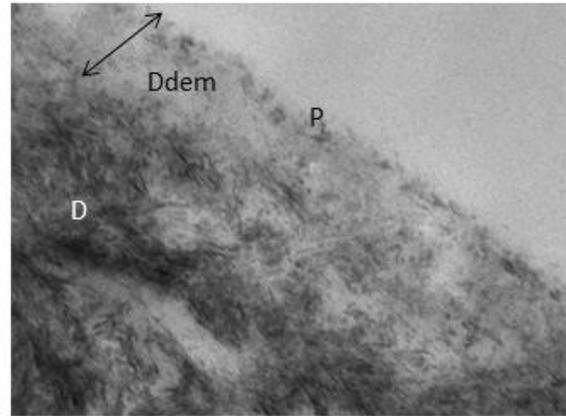
Die Vorgänge an den Dentintubuli sind anhand der TEM-Bilder in Abbildung 22 dargestellt. Dies sind charakteristische Bilder, wie sie bei beiden Probanden zu finden waren: Die 3 min-Pellikel legt sich durchgehend über die Öffnung des Tubulus. Nach Ätzung mit der 1%igen Zitronensäure wird dieser Verbund eröffnet und durch die Säure angegriffen. Dennoch löst er sich nicht vollständig auf bzw. ab, und residuale Anteile verbleiben im Tubulus. Die basale Pellikelschicht verbleibt als durchgehende Schicht und löst sich durch den Ätzvorgang nicht auf. Lediglich die aufgelockerte Schicht, die beim Proband 2 auf der ungeätzten 3 min-Pellikelprobe noch sichtbar ist, wird durch die Säureätzung vollständig entfernt.

## 3 min-Pellikel Proband 1, 1% Zitronensäure



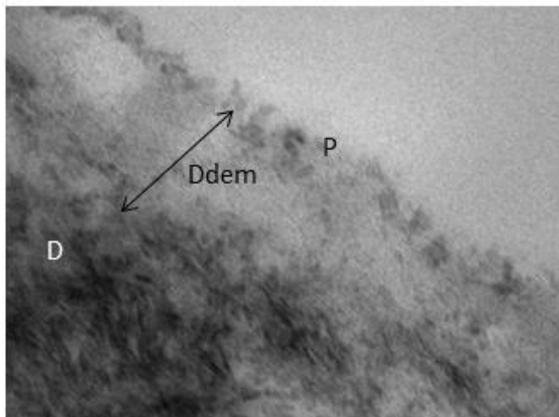
25400 : 1

1 µm



84900 : 1

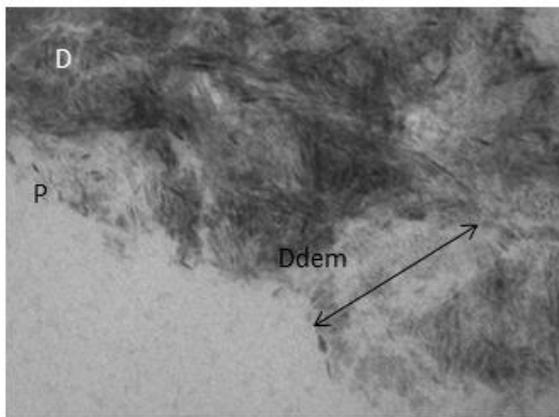
200 nm



129000 : 1

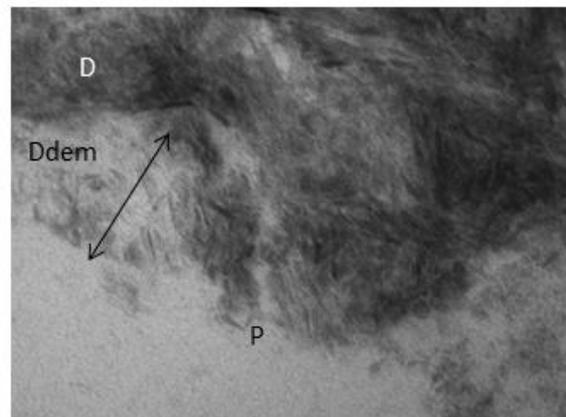
200 nm

## 3 min-Pellikel Proband 1, 5% Zitronensäure



84900 : 1

200 nm

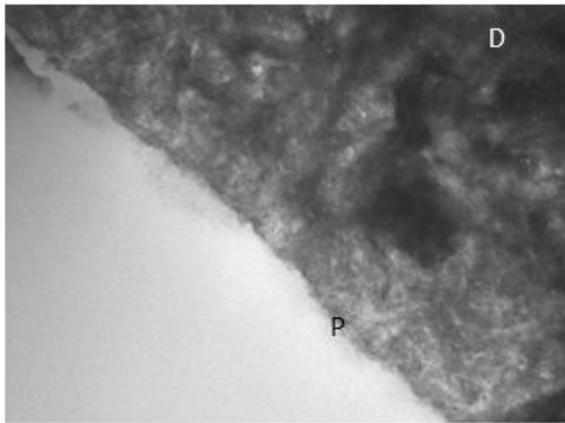


129000 : 1

200 nm

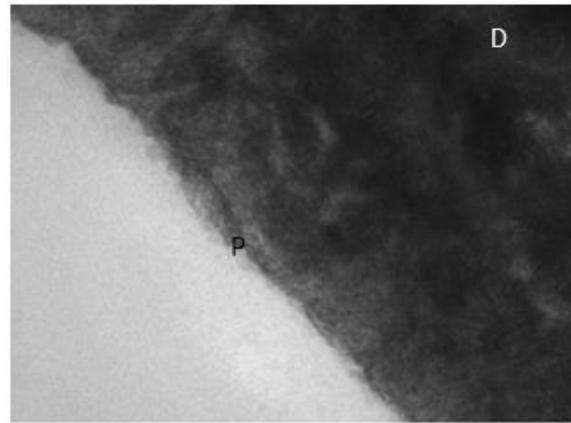
Abbildung 19: TEM-Bilder der 3 min-Pellikel des Probanden 1. Dargestellt sind die mit 1%iger und 5%iger Zitronensäure geätzten 3 min-Pellikelproben. Mit D ist die Zahnhartsubstanz Dentin markiert, Ddem gibt den demineralisierten Dentinbereich an, der zusätzlich durch Pfeile markiert wird und P gibt die Pellikel bzw. ihre Residuen an. Angaben zur Vergrößerung sind unter dem jeweiligen Bild zu finden.

## 3 min-Pellikel Proband 2



43800 : 1

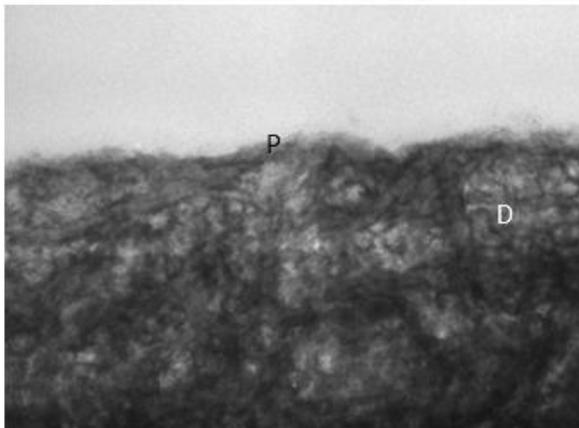
500 nm



84900 : 1

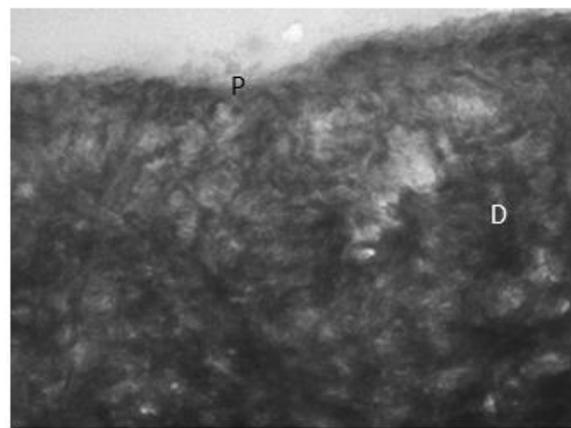
200 nm

## 3 min-Pellikel Proband 2, 0,1% Zitronensäure



43800 : 1

500 nm

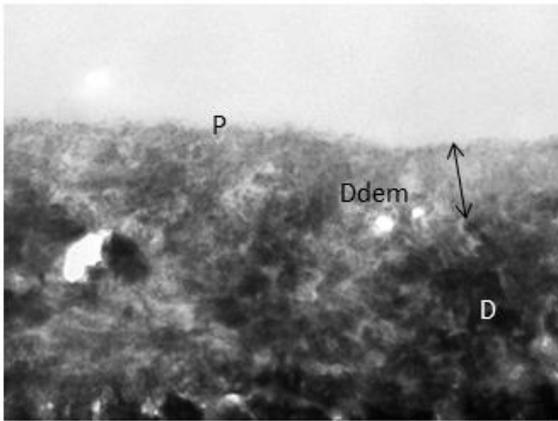


60000 : 1

500 nm

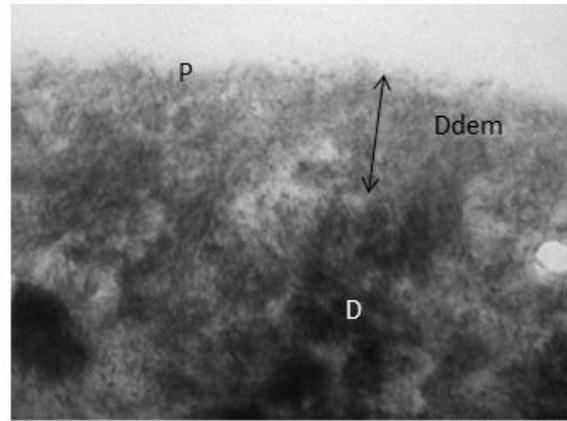
Abbildung 20: TEM-Bilder der 3 min-Pellikel des Probanden 2. Dargestellt sind die ungeätzte und die mit 0,1% Zitronensäure geätzten 3 min-Pellikelproben. Mit D ist die Zahnhartsubstanz Dentin markiert und P gibt die Pellicle an. Angaben zur Vergrößerung sind unter dem jeweiligen Bild zu finden.

## 3 min-Pellikel Proband 2, 1% Zitronensäure



43800 : 1

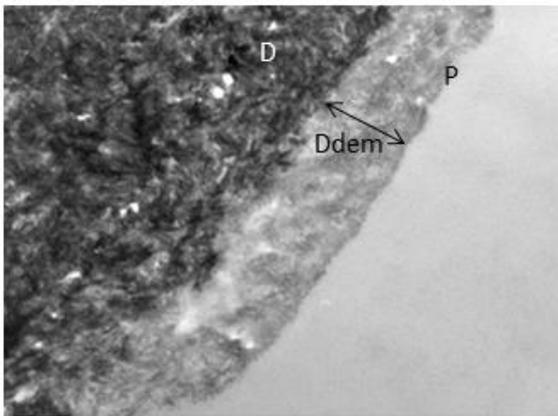
500 nm



84900 : 1

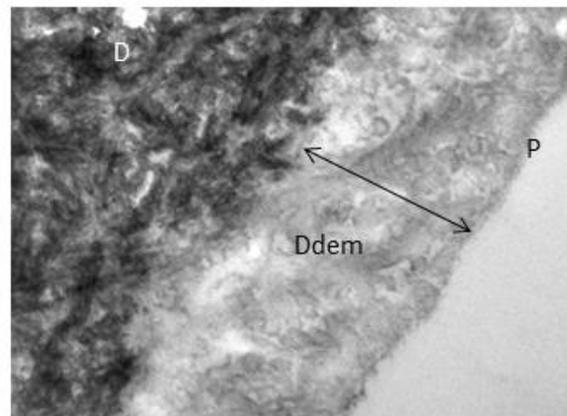
200 nm

## 3 min-Pellikel Proband 2, 5% Zitronensäure



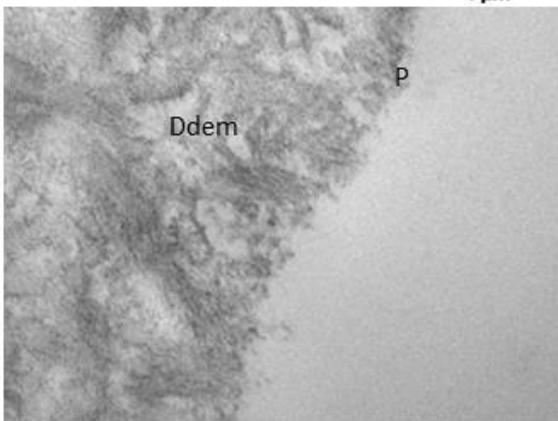
19900 : 1

1 µm



43800 : 1

500 nm

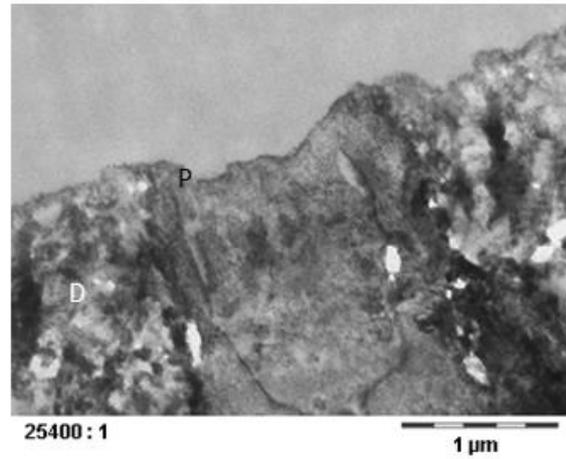
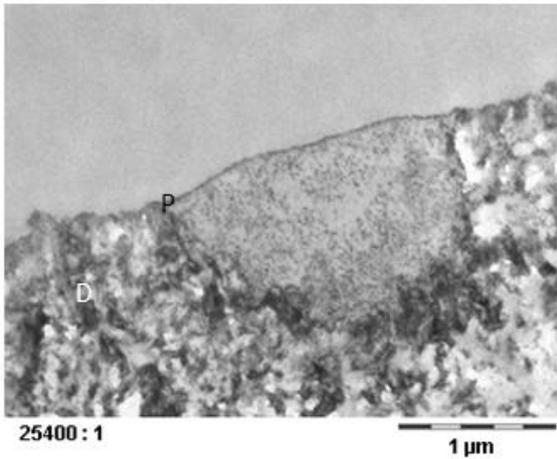


84900 : 1

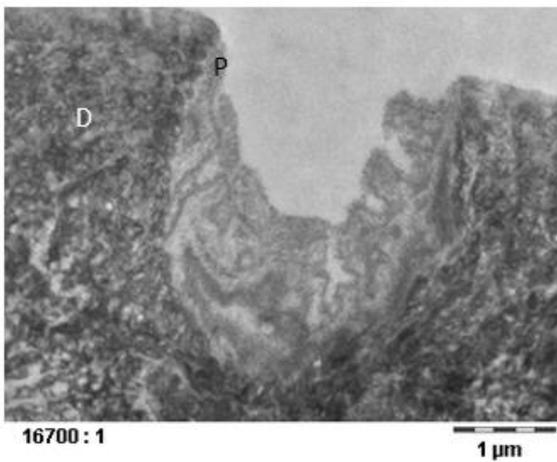
200 nm

Abbildung 21: TEM-Bilder der 3 min-Pellikel des Probanden 2. Dargestellt sind die mit 1%iger und 5%iger Zitronensäure geätzten 3 min-Pellikelproben. Mit D ist die Zahnhartsubstanz Dentin markiert, Ddem gibt den demineralisierten Dentinbereich an, der zusätzlich durch Pfeile veranschaulicht wird und P gibt die Pellikel bzw. ihre Residuen an. Angaben zur Vergrößerung sind unter dem jeweiligen Bild zu finden.

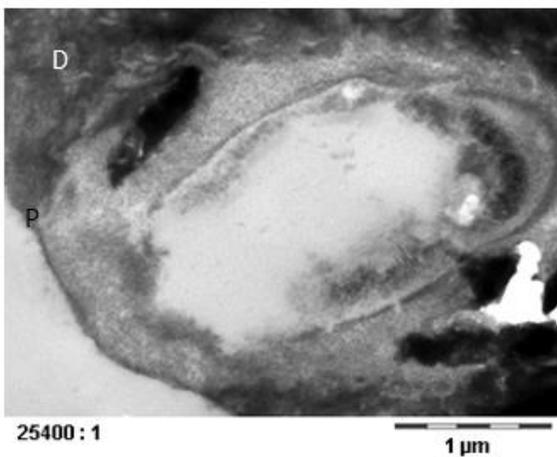
3 min-Pellikel Proband 1



3 min-Pellikel Proband 1, 1% Zittr.säure



3 min-Pellikel Proband 2



3 min-Pellikel Proband 2, 1% Zittr.säure

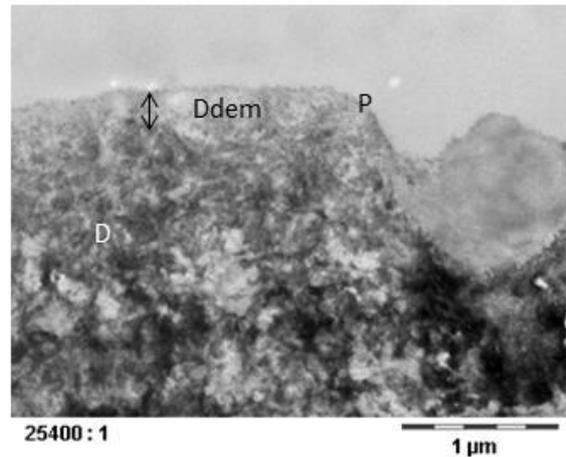


Abbildung 22: TEM-Bilder der 3 min-Pellikel der Probanden 1 und 2. Dargestellt sind die ungeätzten und mit 1%iger Zitronensäure geätzten 3 min-Pellikelproben. Mit D ist die Zahnhartsubstanz Dentin markiert, Ddem gibt den demineralisierten Dentinbereich an, der zusätzlich durch Pfeile veranschaulicht wird und P gibt die Pellicel bzw. ihre Residuen an. Angaben zur Vergrößerung sind unter dem jeweiligen Bild zu finden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methodik

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Proteom der initialen Pellikel auf Dentin analysiert und dessen protektive Eigenschaften gegenüber Zitronensäure untersucht. Eine solche Studie wurde bisher nur von einer anderen Arbeitsgruppe durchgeführt (Delecrode et al., 2015a).

Für die Bereitstellung der Pellikel zur Analyse mittels Tandem-Massenspektrometrie wurde ein *in-situ* Protokoll gewählt und durch die Verwendung von bovinen Zähnen konnte eine Dentinoberfläche von 8cm<sup>2</sup> pro Versuchsdurchlauf generiert werden. Die Möglichkeit, bovine statt humaner Zähne für zahnmedizinische Untersuchungen zu verwenden, wurde in der Literatur vielfach untersucht. Schilke et al. (2000) stellten fest, dass die Anzahl der Dentintubuli von bovinem Dentin des Kronen-Anteils und der von humanen Molaren keinen signifikanten Unterschied aufweisen, im Bereich des Wurzeldentins bestehen jedoch signifikante Unterschiede (Camargo et al., 2007). Bei Erosions/Abrasions-Untersuchungen wurde zwischen humanen Weisheitszähnen und bovinen Unterkiefer-Schneidezähnen kein signifikanter Unterschied in der Abnutzung gefunden (F. Wegehaupt et al., 2008). Bei isolierten Erosionsversuchen zeigte sich aber insgesamt ein limitierter Vergleich zwischen bovinem und humanem Dentin. Die Abrasionsstudie von F. J. Wegehaupt et al. (2010) zeigte aber zwischen dem Wurzeldentin von humanen Prämolaren und dem boviner Unterkiefer-Inzisivi keinen signifikanten Unterschied im Dentin-Verschleiß. Die Untersuchungen von Teruel Jde et al. (2015) stellten heraus, dass bovines Dentin, verglichen mit dem von Schweinen und Schafen, die größte Ähnlichkeit zu humanem Dentin aufweist. Dennoch haben sowohl der humane Schmelz als auch das Dentin ein höheres Calcium/Phosphat Verhältnis, enthalten größere Mengen an Chlor und Kupfer und kleinere Mengen an Magnesium, Schwefel und Zink als die tierischen Prüfkörper.

Letztendlich wurde innerhalb eines Workshops zur Methodik von Erosions-Versuchen in Zürich festgehalten, dass bovine Prüfkörper anstelle von humanen verwendet werden können (Shellis et al., 2011). Die am Dentin generierten Ergebnisse müssen aber hinsichtlich der Übertragung auf die humane Situation kritisch betrachtet und bewertet werden, da humane und bovine Prüfkörper nicht vollständig übereinstimmen. Unter Berücksichtigung dieser limi-

tierenden Rahmenbedingungen und den vorhandenen Analysemöglichkeiten wurden in der vorliegenden Studie koronale Anteile boviner Dentinprüfkörper gewählt.

Wie von Hannig und Joiner (2006) beschrieben, gewinnt die Pellikel in ihren ersten 2-3 min eine initiale Dicke und verbleibt in diesem Stadium über die nächsten 30 min. In den folgenden 60 min verdreifacht sich diese initiale Dicke und verbleibt abermals auf einem Plateau. Dieser große Anstieg der Pellikeldicke basiert höchstwahrscheinlich auf der Adsorption von Proteinaggregaten und nicht nur einzelner Proteine. Basierend auf der Tatsache, dass bereits eine initiale Pellikel die Zahnhartsubstanz Dentin gegenüber Erosionsangriffen schützt (Wetton et al., 2006), wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die initiale Pellikel analysiert. Um zirkadiane Änderungen der Speichelzusammensetzung und somit auch der Pellikelkomposition im Tagesverlauf sowie die daraus resultierenden Änderungen der physikalischen Eigenschaften bei der Adhäsion an verschiedene Materialien zu minimieren, wurde der Versuchsbeginn jedes Probanden auf dieselbe Uhrzeit gelegt (Dawes und Ong, 1973; Morge et al., 1989).

Die darauffolgende *ex-vivo* Ätzung wurde mit Zitronensäure durchgeführt. Andere extrinsische oder intrinsische Säuren, die einen Einfluss auf die orale Erosion haben können, werden durch die Nahrung aufgenommen, wie Apfel-, Essig-, Phosphor- und Milchsäure, oder können – wie im Falle von Salzsäure – durch den Reflux über den Magen in die Mundhöhle gelangen. Realistischere, zahnmedizinisch relevante Versuchsbedingungen würde man mit Getränken oder Speisen erhalten, die diese Säuren enthalten. Aufgrund einer nicht konstanten Zusammensetzung, der kurzen Haltbarkeit nach dem Öffnen sowie des Einflusses weiterer Inhaltsstoffe wie Zucker und Polyphenole auf die Pellikel unterliegt diese Vorgehensweise zu großen Schwankungen (Shellis et al., 2011). Der Säuregrad eines Naturproduktes wie Obst ist in demselben Maße schwankend, weshalb Säurelösungen die konstanteste Variante darstellen. Da all diese Säuren denselben Effekt auf die Kalziumfreisetzung der Prüfkörper haben, sofern diese denselben pH-Wert besitzen (Wiegand et al., 2008) und Zitronensäure laut der Ergebnisse von Delecrode et al. (2015a) den stärksten Effekt auf die Pellikel-Ätzung am Dentin aufwies, wurde in vorliegender Untersuchung das Ätzprotokoll mit Zitronensäure durchgeführt.

Im Anschluss an die jeweilige Ätzung mit Zitronensäure unterschiedlicher Konzentration fand die Ablösung der Pellikel bzw. der remanenten Pellikel vom Prüfkörper statt. Siqueira et al. (2007) etablierten eine Methode, bei der die Pellikel mittels zuvor in 3%iger Zitronensäure inkubierter Teststreifen aus Filterpapier abgelöst wird. Wie von den Autoren beschrieben, hat

diese Methode den Nachteil, dass bestimmte Proteine (*Histatin*, *Statherin*, *Proline-rich Proteins (PRP)*), die bereits mit der Pellikel in Verbindung gebracht wurden (Hannig und Joiner, 2006), in ihren Ergebnissen fehlen. Zusätzlich dazu fehlen Kontrolluntersuchungen, bei denen die Effizienz der Pellikelablösung analysiert wurde. Die von Siqueira et al. (2007) durchgeführten Kontrolluntersuchungen zeigen lediglich, dass die Proteine der Teststreifen vom Gel aufgenommen werden und weiter untersucht werden. Jedoch fehlt der Nachweis, dass die Teststreifen die Proteine vollständig von den Prüfkörpern lösen. Pelá et al. (2018) konnten zeigen, dass die mit Zitronensäure benetzten Filterpapiere eine effizientere Pellikelablösung erreichen als mit SDS benetzte Filterpapiere. Somit wird diese Methode weiterhin bei *in-vivo* Ablösungen der Pellikel angewendet. Basierend auf den Ergebnissen von Kratz et al. (2015) und Hannig et al. (2005) wurde in vorliegender Arbeit ein chemisches Elutionsprotokoll verwendet. Diese zeigten durch TEM-Ergebnisse, dass eine Kombination von RIPA-Puffer und die gleichzeitige Behandlung durch ein Ultraschallgerät die gesamte Pellikel vom Prüfkörper ablöste. Zusätzlich wurde festgestellt, dass 0,6 M Salzsäure in Bezug auf die Pellikelablösung sehr effektiv war. Die dabei verwendeten Bestandteile haben nachweislich keinen Einfluss auf die Ergebnisse der nano LC-ESI-MS/MS, da sie durch andere Reagenzien ausgewaschen werden (Lu und Zhu, 2005). Durch dieses chemische Elutionsprotokoll ist die *in-vivo* Ablösung der Pellikel nicht möglich, weshalb Prüfkörper verwendet werden müssen. Dennoch ist das bisher identifizierte Pellikelproteom deutlich größer (Trautmann et al., 2019) als das mit der von Siqueira et al. (2007) angewandten Technik identifizierte.

Für die Analyse mittels nano Tandem-Massenspektrometrie existieren zwei Methoden: die „top-down“- und die „bottom-up“-Methode. Bei der „top-down“-Methode werden ganze Proteine untersucht, mittels einer ESI oder MALDI analysiert und die Peptide über eine Gasfraktionierung generiert (Khurshid et al., 2016). Somit kann das Protein direkt identifiziert werden und nicht fälschlicherweise ein sehr ähnliches derselben Proteinklasse (Bronstrup, 2004). Ein großes Problem dieser Methode stellt u.a. die Protein-Löslichkeit dar. Speziell Membranproteine sind per Definition nicht wasserlöslich und können ohne den Zusatz von Tensiden nicht analysiert werden. Die Analyse im weiteren Verlauf ist ebenfalls schwierig. Bei der ESI kann ein Protein bis zu 60 und mehr Ladungen erhalten (Tholey und Becker, 2017), was die darauffolgende *m/z* Identifikation erheblich erschwert. Gerade bei Proteinen mit einem Molekulargewicht > 30 kDa sind noch weitere Verbesserungen dieser Methodik nötig. Abschließend ist die bioinformatische Auswertung der Ergebnisse sehr zeitaufwendig

und die Identifikation der Proteine noch nicht auf dem Stand der anderen, bisher weiterverbreiteten Methode.

Bei der hier verwendeten „bottom-up“-Methode werden die Proteine chemisch oder enzymatisch gespalten, modifiziert und die Peptide anschließend über eine LC und MS/MS analysiert (Bronstrup, 2004; Khurshid et al., 2016). Dieses Verfahren ist aufgrund der Vielzahl von Schritten vor der Analyse sehr aufwendig und hat ebenfalls potentielle Schwachstellen, nämlich wenn Peptide mehreren Proteinen zugeordnet und somit nicht eindeutig identifiziert werden können, oder zu wenige Peptide gefunden werden, um ein Protein sicher zu identifizieren. Dadurch werden eher Proteingruppen als einzelne Proteine identifiziert. Dennoch ist dies gerade bei sehr komplexen Proteomen die Methode der Wahl (Tholey und Becker, 2017). Ein notwendiger Schritt vor der nano LC-ESI-MS/MS im „bottom-up“-Verfahren ist die vorherige Auftrennung der Proteine. Dies geschieht über ein SDS-Gel (Wu et al., 2005). Dabei muss diese Auftrennung nicht vollständig durchgeführt werden. Eine Konzentration der Banden führt in diesem Fall zu einer maximalen Ausbeute und die folgende in-Gel Digestion ist aufgrund der geringeren Anzahl an Banden weniger aufwendig (Ferro et al., 2003; Marmagne et al., 2004).

Um eventuelle Verunreinigungen ausschließen zu können, wurde in jeder Versuchsreihe eine Kontrollprobe im SDS-Gel mitgeführt und analysiert (siehe Abbildung 2).

Zur Auswertung der quantitativen Daten der nano LC-ESI-MS/MS-Analyse gibt es mehrere Möglichkeiten: 1) ganze Proteome über eine relative Quantifizierung zu vergleichen, 2) die relative Häufigkeit einer großen Menge an Proteinen zu vergleichen, oder 3) die absolute Quantifizierung einzelner Proteine innerhalb einer Probe zu untersuchen. Für diese Möglichkeiten stehen wiederum zwei Optionen zu Verfügung: entweder eine markierungsbasierte („label-based“) oder eine markierungsfreie („label-free“) Analyse. Die markierungsbasierte Analyse ist für die Anzahl der Proteine, die diese Untersuchung in der initialen Pellikel aufweist, nicht praktikabel. Es können immer nur einige wenige Proteine direkt miteinander verglichen werden, die Verfahren sind sehr zeitintensiv oder benötigen aufwendig generierte Peptide und sind damit sehr kostenintensiv. Damit ist eine markierungsbasierte quantitative Analyse eines so komplexen Proteoms nicht möglich.

Bei den markierungsfreien Methoden werden keine markierten Reagenzien benötigt, was diese Methoden kostengünstiger und weniger aufwendig macht. Zudem können ganze Proteome analysiert und die Quantität der einzelnen Proteine kann miteinander verglichen werden, jedoch handelt es sich meist um eine relative Quantifizierung. Es existieren zwei Herangehens-

weisen: einerseits die Bestimmung der Anzahl der identifizierten Spektren der Peptide eines Proteins, andererseits die Messung der Signalintensität der Peptide eines Proteins. Je nach Herangehensweise und Algorithmus handelt es sich bei diesen Methoden um eine relative oder absolute Quantifizierung, mit unterschiedlichen Stärken und Schwächen. Beim exponentiell modifizierten Protein-Häufigkeits-Index (emPAI) geben Ishihama et al. (2005) an, dass diese Methode eine zuverlässige absolute Quantifizierung von komplexem Proteomen gewährleistet. Jedoch entwickelt sich die lineare Beziehung der Parameter bei Zunahme der Proteinkonzentration in eine Asymptote, was somit dieser Aussage widerspricht (Gerber et al., 2003; Silva et al., 2006). Bei dieser Methode besteht eine Korrelation der insgesamt identifizierten Peptiden und der identifizierten Peptide pro Protein (Ishihama et al., 2005) und es werden die Spektren der Peptide gemessen.

Bei der Messung der Signalintensität der Peptide existiert die TOP3 Methode. Hierbei wird die Quantität über die Mittelwerte der Peakflächen der drei am stärksten ionisierten Peptide eines Proteins ermittelt. Diese Peptide werden separat für jeden Versuchsdurchlauf bestimmt, sodass auch unterschiedliche Peptide eines Proteins in den unterschiedlichen Versuchen verwendet werden können. Somit können Proteine mit wenigen und vielen Peptiden miteinander verglichen werden, auch ohne Referenzproteine. Eine potentielle Fehlerquelle all dieser genannten Methoden sind Proteine mit einem Molekulargewicht  $< 25$  kDa. Diese werden aufgrund ihrer geringen Anzahl an Peptiden tendenziell falsch analysiert. Bei der TOP3-Methode liegt dies an der Messung über die nano LC-ESI-MS/MS: Es können große Unterschiede in der Signalintensität der Peptide bestehen, die bei einem Protein mit vielen Peptiden besser ausgeglichen werden können. Diese Varianz kann bei Proteinen mit wenigen Peptiden dazu führen, dass diese über- oder unterrepräsentiert werden (Silva et al., 2006). Trotz dieses Nachteils ist diese Form der Analyse derjenigen, die die Anzahl der identifizierten Spektren bestimmt, überlegen und liefert genauere Ergebnisse, auch gegenüber der emPAI Analyse (Ahrne et al., 2013; Grossmann et al., 2010). Für eine absolute Quantifizierung innerhalb der TOP3 können Referenzproteine mit bekannter Quantität hinzugegeben werden, um die korrespondierende absolute Quantität der zu analysierenden Proteine zu bestimmen (Silva et al., 2006). Dieses Vorgehen ist allerdings nur möglich, wenn nur die Quantität einiger weniger von wenigen Proteine bestimmt werden soll und somit für die vorliegenden Untersuchungen des Proteoms nicht anwendbar.

Eine weitere Möglichkeit stellt die intensitätsbasierte absolute Quantifizierung (iBAQ) dar. Bei dieser Analyse wird die Summe der Spitzenintensitäten aller Peptide eines Proteins gebil-

det und durch die Anzahl der theoretisch observierten Peptide dividiert (Schwanhauser et al., 2011). Damit ist eine absolute Quantifizierung der Proteine möglich. Hierbei kann aber keine direkte Proportionalität der Parameter angenommen werden und für akkurate Ergebnisse benötigt diese Methode Referenzproteine. Ohne diese kann das Programm nicht kalibriert werden und somit sind keine absoluten Quantitäten messbar (Ahrne et al., 2013), was bei dieser Vielzahl an Proteinen im Pellikelproteom nicht praktikabel ist. Demnach wird bei dem Fehlen von Referenzproteinen für ein komplexes Proteom die TOP3-Methode empfohlen, welche in den Analysen der vorliegenden Untersuchungen verwendet wurde. Dennoch haben all diese Methoden eine gewisse Schwäche bei der Verwendung des „bottom-up“-Verfahrens, da die Quantität von den identifizierten Peptiden abhängig ist. Da diese aber teilweise für eine gesamte Proteingruppe stehen können und nicht immer ein einzelnes Protein sicher identifiziert wird, ist die Analyse der Quantität immer abhängig von der Identifizierung der einzelnen Proteine über die nano LC-ESI-MS/MS (Fornelli et al., 2017).

Die Pellikel ist prinzipiell rasterelektronenmikroskopisch darstellbar (Meurman und Frank, 1991). Aufgrund der Aufnahmetechnik ist lediglich eine flächenhafte Beurteilung der Pellikel möglich. Jedoch kann aufgrund der Bearbeitung der Proben mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe nicht ausgeschlossen werden, dass Schrumpfungartefakte sichtbar werden. Da die Pellikel in den vorliegenden Studien vor allem über die TEM-Untersuchungen analysiert wurde, stand in den REM-Aufnahmen die Beurteilung der Dentinoberfläche und -tubuli vor und nach der Säureeinwirkung im Fokus.

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie wurde in der Zahnmedizin die Ultrastruktur der Pellikel bereits mit vielfältigen Fragestellungen dargestellt und analysiert (Bauer, 2012; Hannig et al., 2007a; Hannig und Balz, 1999; Liu und Hannig, 2020). Unter Zuhilfenahme von Diamantmessern lassen sich mittlerweile Ultradünnschnitte anfertigen. Da die Pellikel intraoral je nach Bildungsort eine unterschiedliche Dicke aufweist, aber ein Vergleich der Pellikel mit den anderen Probanden bestehen bleiben sollte, wurden die Prüfkörper ebenfalls bukkal in der Unterkieferumschlagfalte exponiert und nicht extra auf Trageschienen angebracht (Hannig, 1999). Anders als bei der Pellikelbildung auf Schmelz wird das Dentin bei den TEM-Untersuchungen nicht retrograd entkalkt. Zudem war die Dokumentation der Demineralisation und der Ausprägung der demineralisierten Anteile des Dentins für die Begründung des Pellikelschutzes in den vorliegenden Untersuchungen relevant.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden Untersuchungen beziehen sich auf die Analyse der Pellikel von zwei Probanden und ergaben eine Gesamtanzahl von 578 unterschiedlichen identifizierten Proteinen. Folgende Voreinstellungen in der Software Scaffold 4 waren die Grundlage: Es wurde ein Identifikationsschwellenwert der Peptide und Proteine von  $> 95\%$  bzw.  $> 90\%$  gewählt und die Identifizierung eines Proteins wurde durch mindestens zwei unabhängige Peptide gewährleistet, wodurch es mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit korrekt identifiziert wurde. Eine direkte Kontrollprobe hat in jedem Versuchsdurchlauf die mögliche Verunreinigung auf ein Minimum reduziert. Wie bereits durch andere Arbeitsgruppen gezeigt, unterscheidet sich auch hier das individuelle Pellikelproteom der beiden Probanden (Delius et al., 2017; Trautmann et al., 2019; Trautmann et al., 2020)

Zusätzlich ist ein Anstieg der identifizierten Pellikelproteine nach der Zitronensäure-Ätzung mit 5% bei Proband 1 zu finden. Ähnliches wurde auch in den Untersuchungen von Delecrode et al. (2015a) dargelegt. Dies kann verschiedene Ursachen haben, welche in der Publikation von Delecrode et al. (2015a) nicht ausreichend diskutiert wurden. Die Analyse der TEM- und REM-Bilder lässt hier folgende Schlussfolgerung zu: Die Inkubation mit hochprozentiger Zitronensäure löst die vorher durch die Pellikel ausgefüllten Dentintubuli verstärkt auf. Zudem werden auch die Wände der Dentintubuli erodiert und dadurch das darin enthaltene Pellikelmaterial durch die Zitronensäure gelöst. Somit könnten Prüfkörper, welche vermehrt Dentintubuli aufweisen, zu dieser Abweichung beigetragen haben. Das Dentin wird ebenfalls stärker angegriffen, was gerade in der Tiefe der Tubuli deutlich sichtbar ist, und kann so auch bovine Dentinproteine frei legen. Bei der Analyse mittels der nano LC-ESI-MS/MS wird zwar ein Humanfilter angewendet, jedoch könnten diese bovinen Proteine aufgrund von Homologien zu menschlichen Proteinen fälschlicherweise ebenfalls analysiert werden. Die Analyse boviner Proteine eines rein bovinen Prüfkörpers ohne 3 min-Pellikel ergab trotz Anwenden eines Humanfilters eine Gesamtanzahl von 63 identifizierten Proteinen, welche in den Tabellen 3 Tabelle 3 und 6 aufgelistet sind. Da diese Proteine Teil der humanen Pellikel sind und in allen weiteren Pellikeluntersuchungen identifiziert wurden, wurden sie für die weiteren Untersuchungen in der Auflistung belassen.

Es müsste dementsprechend ein dentingleiches Material gefunden werden, welches für alle Versuchsproben in denselben Zustand gebracht werden kann und bei dem während der Analyse mittels nano LC-ESI-MS/MS keine Proteine, welche Bestandteil der humanen Pellikel sind, identifiziert werden. Von diesem dürfte sich aber durch die starken Säureätzungen kein

eigenes Material des Prüfkörpers selbst lösen, welches die folgenden Analysen der Massenspektrometrie verändern könnte. Selbst humanes Dentin wird diesen Anforderungen nicht gerecht, weshalb bis heute noch keine praktikable Lösung für dieses Problem der Erosionsstudien am Dentin gefunden wurde (Shellis et al., 2011).

Diese möglichen Schlussfolgerungen zum Pellikelproteinanstieg innerhalb der aufsteigenden Säurekonzentrations-Reihe sind auch auf die Quantifizierung mittels TOP3-Methode übertragbar. Vor allem in den Proben nach Ätzung mit 5%iger Zitronensäure fällt der häufig sehr starke Anstieg in der Quantität der Proteine auf, wobei theoretisch anzunehmen wäre, dass die Quantität der Pellikelproteine nach Ätzung mit höheren Säurekonzentrationen abnehmen sollte. Dennoch wird hier die Annahme widerlegt, dass durch die Ätzung vor allem Proteine aus dem Dentin freigesetzt werden. Von den 13 abundantesten Proteinen sind lediglich *Lysozyme C*, *Serum albumin* und *Hemoglobin subunit alpha* ebenfalls in den Proteinuntersuchungen der bovinen Dentinprobe ohne Pellikel aufzufinden. Jedoch weist gerade *Lysozyme C* bei beiden Probanden in der Probe der 5%igen Zitronensäure-Ätzung keinen Anstieg in der Quantität auf. Somit ist ein Anstieg der Quantität nur aufgrund des Herauslösen von Proteinen aus dem bovinen Dentin ausgeschlossen. Diese drei Proteine sind in gleichem Maße in allen Proben aller Probanden mit und ohne Zitronensäure-Ätzung zu finden. Falls sich somit Proteine aus dem bovinen Dentin lösen und durch Homologien als humane identifiziert werden, findet das eher in geringen Mengen statt. Dadurch könnte sich die Anzahl an Proteinen in gewissen Maßen erhöhen, jedoch hat dies keine entscheidende Auswirkung auf die Quantität, was die mögliche Erklärung in den Fokus rücken lässt, dass die Heterogenität des Substrates Dentin, und damit die beispielsweise unterschiedliche Anzahl der Dentintubuli der Prüfkörper eine Ursache sein könnte. Eine Bestimmung der Quantität der Pellikelproteine kann nicht vor und nach der Säureätzung stattfinden, da die Analysen durch die Massenspektrometrie ein Ablösen der Pellikel erfordern und somit der direkte Vergleich derselben Proben nicht möglich ist. Prinzipiell scheint der erosive Angriff an der pellikelbedeckten Dentinoberfläche von Proband 2 größer zu sein, da die prozentuale Abnahme der Pellikelproteine durch die Ätzung größer ist als bei dem Probanden 1. Somit bietet seine Pellikel vermutlich den geringeren Schutz vor dem Herauslösen weiterer Pellikelproteine. Solche individuellen Unterschiede in den protektiven Effekten der Pellikel, welche nicht auf einzelne Pellikelproteine zurückzuführen sind, stellten auch Bruvo et al. (2009) in ihren Untersuchungen auf bovinen Schmelzprüfkörpern fest.

Bei den vorliegenden Untersuchungen zeigt sich, anders als in denen von Delius et al. (2017), dass das individuelle Pellikelproteom des Probanden 1 an unterschiedlichen Untersuchungstagen nicht identisch ist. Trotz der zum Ausschluss von zirkadiane Schwankungen (Dawes und Ong, 1973) immer zur gleichen Zeit durchgeführten Versuche, wurde nur eine 44,49%ige Übereinstimmung des Proteoms des Probanden 1 an den beiden Versuchstagen festgestellt. Jedoch wurden bei den Untersuchungen von Delius et al. (2017) Keramikprüfkörper verwendet, wodurch die Ergebnisse aufgrund des unterschiedlichen Materials nicht vollständig miteinander vergleichbar sind, und aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungen in den vorliegenden Ergebnissen auf Dentin kann keine statistisch signifikante Aussage getroffen werden.

Obwohl die Anzahl der Proteine der 3 min-Pellikel innerhalb der verschiedenen Versuchsdurchläufe an einem Probanden nur geringfügig voneinander abweicht, ist es auffällig, dass die probandenspezifische Schnittmenge des Pellikelproteoms lediglich bei 44,49% (Proband 1.2) bzw. 38,44% (Proband 2) liegt. Diese Tatsache kann abermals an der Heterogenität der Dentinoberflächen liegen und an der schwer zu standardisierbaren Möglichkeit der Bearbeitung und Glättung dieser Flächen. Hierfür wären weitere Untersuchungen, wie diejenigen von Trautmann et al. (2020), mit dem jeweiligen Speichel der Probanden notwendig, um herauszufinden, welche Speichelproteine eines Probanden Teil seiner Pellikel werden und wie die Adsorption dieser Pellikelproteine auf die Dentinoberfläche im Detail geschieht.

Grundsätzlich stellt sich die Frage: Warum ist trotz dieser kleinen Schnittmenge des Pellikelproteoms der 3 min-Pellikel innerhalb eines Probanden dennoch eine so hohe Übereinstimmung in den Verteilungsmustern der Molekulargewichte und der molekularen Funktion zu finden? Die Vermutung liegt nahe, dass durch die Zitronensäureätzung vor allem die Proteine gelöst werden, die in der Pellikel in geringer Quantität zu detektieren sind. Es scheint also ein zufälliger Prozess zu sein, bei denen die hoch abundanten Proteine aufgrund ihrer höheren Quantität mit höherer Wahrscheinlichkeit in der Pellikel verbleiben. Somit wären die Proteine der Schnittmenge auch diejenigen, die mit besonders hoher Quantität detektiert werden. Tatsächlich sind die 13 abundantesten Proteine der Probanden 1 und 2, bis auf *Cystatin-S* und *Basic salivary PRP*, in allen Versuchsdurchläufen zu finden.

Die TEM-Ergebnisse visualisieren diese Vorgänge auf dem Dentin. Der globuläre Anteil der Pellikel wird durch die Zitronensäureätzung sichtbar diminuiert, dennoch verbleibt ein residueller Anteil der basalen elektronendichten Pellikelschicht. Dieser ist aber nicht mehr durchgängig zu detektieren. Dies sind vor allem diejenigen Proteine, die mit einer erhöhten Quanti-

tät in der Pellikel zu finden sind, da diese, wie bereits dargestellt, in allen Versuchsdurchläufen der Untersuchungen anzutreffen sind. Deshalb ist davon auszugehen, dass nicht, wie bisher angenommen, einige wenige Proteine die Protektivität der Pellikel definieren (Delecrode et al., 2015a), sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit das gesamte Pellikelproteom die Protektivität der Pellikelschicht ergibt.

Viele Studien belegen die Protektivität der Pellikel gegenüber Säuren. Jedoch variieren die Angaben darüber, wie effektiv dieser Schutz ist. Trotz der Pellikelbildung auf Zahnmaterialien findet eine gewisse Erosion der darunterliegenden Zahnhartsubstanz statt. Die Stärke der Erosion ist auf Dentin größer ausgeprägt als auf Schmelz (Wetton et al., 2006; Wiegand et al., 2008). Die Pellikel schützt die Zahnhartsubstanz daher nicht vollständig, kann aber, indem sie den direkten Kontakt der Säure mit der Zahnhartsubstanz verhindert, den Mineralverlust signifikant mindern (Hannig und Hannig, 2014). Dieser Schutz ist bereits ab einer Pellikelbildungszeit von 3 min auf Schmelz (Hannig et al., 2004) und ab einer Pellikelbildungszeit von 2 min auf Dentin möglich (Wetton et al., 2006). Die Erosion löst unterdessen die Pellikel nicht auf. Sie reduziert ihre Dicke und damit die äußere, globuläre Schicht, jedoch verbleibt die elektronendichte Schicht bzw. bei Verwendung starker Säuren eine residuale Pellikel (Bauer, 2012; Hannig et al., 2007a; Hannig und Balz, 1999; Hannig et al., 2003). Die bisher umfassendste ultrastrukturelle Untersuchung der Pellikel an Dentin und ihrer Säureprotektivität wurde von Bauer (2012) durchgeführt. Sie fand bei Untersuchungen der 3 min-Pellikel auf dem Dentin keine basale elektronendichte Schicht, sondern lediglich eine lockere granuläre Schicht. Erst ab einer 30 min-Pellikel war eine kontinuierliche Pellikel mit einer elektronendichten Schicht sichtbar. Dies deckt sich nicht mit den Untersuchungen der vorliegenden Studie. Hier konnte bereits bei der 3 min-Pellikel eine elektronendichte Pellikelschicht identifiziert werden, welche im Bereich der Dentintubuli besonders gut sichtbar war.

Andere Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen decken sich wiederum mit den Ergebnissen von Bauer (2012). Bei ihren Untersuchungen unterschieden sich die äußeren Anteile der Pellikel zwischen den Probanden. So hatten einige eher eine globuläre, andere eher eine granuläre oder eine Mischung der beiden Pellikelformen. Der Einfluss der Zitronensäure war ebenfalls erst ab einer Konzentration von 1% auf den TEM-Bildern sichtbar. Geringere Säurekonzentrationen hatten teilweise keinen sichtbaren Einfluss, an anderen Stellen erschien die Pellikel stark angegriffen. Jedoch war keine Demineralisation der Dentinoberfläche erkennbar. Dies konnte auch in den hier durchgeführten Untersuchungen festgestellt werden. Es waren erst ab einer Zitronensäureätzung von 1% auf den 3 min-Pellikelproben der Probanden

sichtbare Erosionen zu erkennen. Diese nahmen ebenfalls mit der Zunahme der Zitronensäurestärke zu. Die äußere Pellikelschicht war auch in diesen Untersuchungen bei den beiden Probanden unterschiedlich. Proband 2 neigte zu einer eher stärker ausgeprägten äußeren Pellikelschicht, was sich aber nicht in einer erhöhten Protektivität gegenüber Säuren zeigte. Die Dentintubuli der Proben der Probanden 1 und 2 waren in den REM-Bildern gleich stark angegriffen. In den TEM-Bildern der 3 min-Pellikel des Probanden 2 sieht man hingegen eine deutlich stärker ausgeprägte Erosion gegenüber der 5%igen Zitronensäure als in den TEM-Bildern der 3 min-Pellikel von Proband 1 bei derselben Zitronensäurekonzentration. Bruvo et al. (2009) und Wetton et al. (2007) stellten ebenfalls fest, dass die Pellikel unterschiedlicher Probanden einen unterschiedlichen Schutz gegenüber Erosionen bietet. Somit scheint eher die Zusammensetzung der Pellikel als ihre Dicke zu bestimmten Zeitpunkten die Protektivität der Pellikel auszumachen. Jedoch ist der Einfluss der Lipide und anderer Pellikelbestandteile auf die Protektivität nicht zu vernachlässigen (Hannig und Hannig, 2007; Hannig und Joiner, 2006; Kensche et al., 2013), welche allerdings in den hier vorgelegten Untersuchungen nicht thematisiert wurden.

In den Kreisdiagrammen über die Verteilung der molekularen Funktionen (Abbildung 9, Abbildung 10) entfallen ca. drei Viertel des Anteils auf die „Bindung“, die „Katalytischen Aktivität“ und die „Enzym-regulierende Aktivität“. Das zeigt, dass während der initialen Phase der Pellikelbildung auf Dentin sowohl die Proteinbindung an das Substrat Dentin als auch die Bindung weiterer Proteine an die Pellikelschicht wichtige Faktoren sind. Es konnte bereits in vergleichenden Studien zwischen dem Pellikelproteom und dem Speichelproteom festgestellt werden, dass die Pellikel signifikant mehr Enzyme enthält als das Speichelproteom (Schweigel et al., 2016).

Während der Bildung der initialen Pellikel sind katalytische und enzymregulierende Effekte notwendig, um den stetigen Umbau der Pellikel in dieser sensiblen Phase zu gewährleisten. Dies konnte in den Untersuchungen von Trautmann et al. (2020) bei der 3 min-Pellikelbildung auf Schmelz ebenfalls gezeigt werden. Dort entfielen drei Viertel der molekularen Funktionen der Schmelzpellikel auf die „Bindung“ und „Katalytische Aktivität“. Auch bei kariesaktiven und kariesfreien Probanden zeigte die Pellikel hohe Anteile an Proteinen, die als molekulare Funktion die „Proteinbindung“ und „enzymatische Aktivität“ aufweisen (Trautmann et al., 2019). Die Untersuchungen von Delecrode et al. (2015b) zeigten zu 54% als molekulare Funktion die Protein-Protein-Interaktion in der 2 h gebildeten Schmelzpellikel. Auch Lee et al. (2013) zeigten, dass die molekularen Funktionen der Pellikel

sich größtenteils auf die Protein-Protein-Interaktion und die Calcium/Phosphat-Ionen-Bindung verteilen. Dies deckt sich mit Untersuchungen der 10 min- bzw. 2 h-Dentinpellikel von Delecrode et al. (2015a). Dort war der Großteil der molekularen Funktionen (68%) unbekannt. Jedoch zeigte sich, dass eine hohe Protein-Protein-Interaktion der Pellikel bestand (39%) und 8% der Interaktionen der Proteine auf eine Bindung mit Calcium- und Phosphationen zurückzuführen waren.

Die Molekulargewichte der Pellikelproteome in dieser Studie reichen von 7-629 kDa, wobei auch ein einziges Mal Titin mit 3816 kDa identifiziert wurde. Der Großteil der Proteine hat ein Molekulargewicht < 200 kDa, 87-94% der 3 min-Pellikelproteine mit und ohne Zitronensäureätzung hatten ein Molekulargewicht < 100 kDa. Trautmann et al. (2020) konnten zeigen, dass die Pellikelproteine im Vergleich zu den Speichelproteinen ein signifikant kleineres Molekulargewicht hatten. Dieses geringe Molekulargewicht ist am ehesten auf die während der initialen Phase der Pellikelformation nötige, größere Mobilität der Proteine zurückzuführen (Trautmann et al., 2020). In der 2 h-Pellikel auf Schmelz wurden vorwiegend Proteine mit Molekulargewichten bis 250 kDa identifiziert (Siqueira et al., 2007). In vergleichenden Untersuchungen von Schweigel et al. (2016) wurde gezeigt, dass das Pellikelproteom zur Hälfte ein Molekulargewicht < 30 kDa besitzt. Molekulargewichte > 100 kDa waren eher Bestandteil des Speichelproteoms. Diese Analysen beziehen sich auf Untersuchungen, die im Durchschnitt lediglich 85 Pellikelproteine im Pellikelproteom identifizierten. Im Gegensatz dazu adsorbierten in den vorliegenden Untersuchungen jedoch bereits in der 3 min-Pellikel Proteine an die Dentinoberfläche, die ein höheres Molekulargewicht besitzen (200 – 629 kDa). Somit befinden sich in der 3 min-Dentinpellikel nicht nur niedermolekulare Präkursor-Proteine aufgrund von ionischen Anziehungskräften, van der Waals Kräften, oder hydrophoben Interaktion, sondern ebenfalls höhermolekulare Proteine, die durch Protein-Protein-Interaktionen an die initiale 3 min-Pellikel binden (Gibbins et al., 2014; Hannig und Joiner, 2006).

### 5.3 Einordnen in den bisherigen Stand der Wissenschaft

Die bisher durchgeführten Erosions-Studien konzentrierten sich auf die Pellikel des Schmelzes und deren protektive Eigenschaften. Wenige Studien befassten sich mit den protektiven Eigenschaften der Pellikel auf Dentin und versuchten, diese auf unterschiedliche Weise zu messen (Bauer, 2012; Delecrode et al., 2015a; Hall et al., 1999; Hannig et al., 2007a; Hara et al., 2006; Wetton et al., 2006; Wiegand et al., 2008; Wiegand et al., 2019). Diese Studien befassen sich größtenteils mit der indirekten Messung des protektiven Potentials der Pellikel auf dem Zahnsubstrat Dentin.

Lediglich Delecrode et al. (2015a) befassten sich mit der Pellikelproteom-Analyse auf dem Dentin und dessen direkter, säureinduzierter Veränderung. Dabei unterscheiden sich jedoch sowohl die Methoden als auch die Ergebnisse wesentlich von den hier vorliegenden Resultaten. Die Arbeitsgruppe um Delecrode et al. (2015a) untersuchte das Proteom der Pellikel auf dem Wurzelentin frisch extrahierter Weisheitszähne. Dazu wurde ein Pellikelpool aus dem Proteom der Pellikel von neun Probanden und Replikaten von mehreren Versuchstagen erstellt. Dieser Proteompool enthielt insgesamt 223 verschiedene Proteine und wurde durch die folgenden 20 s *ex-vivo* Ätzungen mit verschiedenen Säuren drastisch reduziert, wobei Zitronensäure den größten Einfluss hatte. Dies könnte am Unterschied im pH-Wert der Zitronensäure (pH 1) gegenüber der eingesetzten Milchsäure (pH 4,8) liegen. Die nach der Ätzung remanenten Pellikelschichten wurden mit Hilfe einiger in 3%iger Zitronensäure getränkter Teststreifen aus Filterpapier von den Prüfkörpern abgelöst (Siqueira et al., 2007) und anschließend bei einem 85 min Gradienten über eine nano LC-ESI-MS/MS analysiert. Die Kontrollproben-Pools ohne Ätzung der 10 min- und 2 h-Pellikel enthielten 56 bzw. 41 Proteine. Dieses Ergebnis ist überraschend, da man davon ausgehen würde, dass die orale Exposition über einen Zeitraum von 2 h eine größere Vielfalt an Proteinen aufzeigen würde als die vorliegende Untersuchung, in der nach einer *in-situ* Expositionszeit von lediglich 3 min insgesamt 578 Pellikelproteine identifiziert wurden. In der Untersuchung von Delecrode et al. (2015a) wurden bei der Säureätzung der 10 min-Pellikel mit Milchsäure auch mehr Proteine identifiziert als in der Untersuchung der 10 min-Pellikel ohne folgende Säureätzung. Möglicherweise sind diese 56 bzw. 41 Proteine so abundant, dass sie innerhalb der nano LC-ESI-MS/MS alle weiteren Proteine überlagern und die Analyse dieser Proteine erschweren. Auf jeden Fall ist aber die Methodik zur Gewinnung der Proteine mittels der Teststreifen eine besondere Schwachstelle in der Studie von Delecrode et al. (2015a). Wie bereits erwähnt, wurde

mit Einführen dieser Methode nie untersucht, ob das gesamte Proteom von der Prüfkörperoberfläche abgewonnen wird. Es wurde lediglich getestet, ob die durch das SDS-Gel aufgenommenen Proteine der Teststreifen sowie die direkt in das SDS-Gel applizierten Proteine dieselben sind. Somit kann nicht sichergestellt sein, dass in der Untersuchung von Delecrode et al. (2015a) das gesamte Pellikelproteom eines Probanden identifiziert wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnisse übersteigen die von Delecrode et al. (2015a) identifizierten Proteinzahlen um ein Vielfaches. An einem Probanden wurden in der 3 min-Pellikel ohne Säureätzung bis zu 351 verschiedene Pellikelproteine identifiziert und insgesamt wurden 578 unterschiedliche Pellikelproteine detektiert – in nur vier Versuchsdurchläufen an zwei verschiedenen Probanden. Ebenfalls neuartig ist, dass ein individuelles Profil des Pellikelproteoms eines jeden Probanden erstellt wurde. Dies liegt größtenteils an der neuartigen Methode zur Gewinnung der Pellikelproteine vom Prüfkörper – der chemischen Elution mittels RIPA-Puffer und Triton X-100. Dadurch kann die gesamte Pellikel vom Prüfkörper für die nachfolgende nano LC-ESI-MS/MS gewonnen werden (Kratz et al., 2015). Die lange Dauer der nano LC-ESI-MS/MS mit einem drei Stunden-Gradienten und die Identifizierung individueller Pellikelproteome von der Dentinoberfläche wurde bisher von keiner weiteren Arbeitsgruppe durchgeführt. Durch diesen sehr langen Gradienten kann eine sehr hohe Identifikationsrate der Peptide, respektive der Proteine, sichergestellt werden. Andere Pellikel-Studien mit einem annähernd so langen Gradienten an 24 Probanden auf Keramikprüfkörper haben die Identifikation von 1188 verschiedenen Pellikelproteinen ermöglicht (Trautmann et al., 2019).

Ein weiterer Unterschied der Ergebnisse liegt im Einfluss der Zitronensäure auf die Pellikel. Delecrode et al. (2015a) identifizierten nach dem Säureangriff mit Zitronensäure lediglich neun bzw. vier Proteine aus der residualen 10 min- bzw. 2 h-Pellikel, was 6,34% bzw. 4,12% der ursprünglich identifizierten Proteine entspricht. Innerhalb der aufsteigenden Zitronensäurekonzentration der vorliegenden Untersuchungen betrug die Überschneidung der noch identifizierten Pellikelproteine in der verbliebenen Restpellikel nie weniger als 63%. In den vorliegenden Untersuchungen hat die Zitronensäure damit bei Weitem keinen so großen Einfluss auf das Pellikelproteom, wie durch die Untersuchungen von Delecrode et al. (2015a) bisher postuliert. Die Überschneidung aller identifizierten Pellikelproteine und damit potenziell protektiven Pellikelproteine nach der Behandlung mit deionisiertem Wasser, Zitronensäure und Milchsäure in den Untersuchungen von Delecrode et al. (2015a) ergab nur eine Anzahl von drei bzw. einem Protein, was 2,11% bzw. 1,03% der identifizierten Proteine entspricht. Dies

steht den in diesen Untersuchungen detektierten 107 Pellikelproteinen (18,38%), die in allen Versuchsreihen identifiziert wurden, entgegen.

Ausgehend von dem bisherigen Wissensstand arbeitet keine andere Arbeitsgruppe mit einem ähnlich effizienten chemischen Elutionsprotokoll und unter den vorliegenden nano LC-ESI-MS/MS-Bedingungen. Dadurch wurde diese Vielzahl an Proteinen in einem Pellikelproteom an Dentin bisher noch nicht identifiziert. Analysen der Pellikelproteine von 24 Probanden auf Keramikprüfkörpern lieferten eine Gesamtanzahl von 1188 Pellikelproteinen, wobei bis zu 546 Pellikelproteinen an einem einzigen Probanden detektiert wurden (Trautmann et al., 2019), welche die in den vorliegenden Untersuchungen von bis zu 351 identifizierten Pellikelproteinen an einem einzigen Probanden noch ein wenig übersteigen. Jedoch wurden die Untersuchungen von Trautmann et al. (2019) auf Keramikprüfkörpern und mit einer höheren Probandenanzahl durchgeführt. Dies gilt es bei weiteren Untersuchungen der Pellikel an Dentin weiter zu überprüfen.

## 5.4 Schlussfolgerungen

Mit Hilfe des neuartigen chemischen Elutionsprotokoll und der damit verbundenen neuen Methodik konnte eine unerwartet hohe Proteinviefalt des initialen Pellikelproteoms auf Dentin identifiziert werden. Damit ist dieses weitaus komplexer zusammengesetzt als bisher angenommen und die bisherige Annahme, dass auf dem Substrat Dentin weniger Proteine adsorbieren können als auf dem Substrat Schmelz, wurde widerlegt. Zum ersten Mal konnte ein individuelles Pellikelproteom auf Dentin für die einzelnen Probanden erstellt und miteinander verglichen werden. Des Weiteren konnten die molekularen Funktionen der Pellikelproteine dargestellt werden und es konnte gezeigt werden, dass sich diese trotz der Ätzung mit Zitronensäure und der darauffolgenden Änderung des Pellikelproteoms nicht verändern. Dass die molekularen Funktionen „Bindung“, „Katalytischen Aktivität“ und „Enzym-regulierende Aktivität“ den größten Anteil besitzen, spiegelt sich auch in den Molekulargewichten der Pellikelproteine wider. Bereits in der initialen Phase der 3 min-Pellikelbildung wurden Pellikelproteine mit einem Molekulargewicht > 200 kDa identifiziert.

Grundlegend lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass nicht einzelne oder einige wenige Proteine für die Protektivität der Pellikel verantwortlich sind, sondern die Gesamtheit des komplexen Pellikelproteoms. Dies unterstützt das bisherige Modell, dass die Pellikel nicht als Barriere, sondern als Diffusion begrenzendes, semiperme-

ables Netzwerk agiert, welches selbst nach einem hoch konzentrierten Säureangriff zu einem großen Teil mit seiner elektronendichten, basalen Schicht bestehen bleibt. Diese Protektivität scheint aber in dieser initialen Phase nicht mit der Pellikelgröße zu korrelieren, sondern kann eher auf ihre probandenindividuelle Zusammensetzung zurückgeführt werden. Die Interaktion der Pellikel mit dem Dentin und interne Interaktionen müssen noch weiter untersucht werden. Darüber hinaus können mit einer höheren Probandenanzahl die Schnittmenge der in der Pellikel identifizierten Proteine und die der residualen Pellikelproteine nach Zitronensäureätzung weiter eingegrenzt werden, und mit Probanden verglichen werden, deren Dentition größere Erosionsschäden aufweisen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ahrne E, Molzahn L, Glatter T, Schmidt A (2013) Critical assessment of proteome-wide label-free absolute abundance estimation strategies. *Proteomics* 13:2567-2578
2. Bauer C (2012) Ultrastrukturelle Analyse von Bioadhäsions- und Erosionsprozessen am Dentin.
3. Berg IC, Rutland MW, Arnebrant T (2003) Lubricating properties of the initial salivary pellicle--an AFM study. *Biofouling* 19:365-369
4. Breschi L, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Ellis TH, Stangel I (2002) High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric acid. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 18:26-35
5. Bronstrup M (2004) Absolute quantification strategies in proteomics based on mass spectrometry. *Expert review of proteomics* 1:503-512
6. Bruvo M, Moe D, Kirkeby S, Vorum H, Bardow A (2009) Individual variations in protective effects of experimentally formed salivary pellicles. *Caries research* 43:163-170
7. Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT (2012) Saliva and dental erosion. *Journal of applied oral science : revista FOB* 20:493-502
8. Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC (2007) Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod* 33:422-426
9. Dawes C, Ong BY (1973) Circadian rhythms in the concentrations of protein and the main electrolytes in human unstimulated parotid saliva. *Archives of oral biology* 18:1233-1242
10. Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Leite AL, Xiao Y, et al. (2015a) Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle. *Journal of dentistry* 43:583-588
11. Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Moffa EB, Mussi MC, et al. (2015b) Identification of acid-resistant proteins in acquired enamel pellicle. *Journal of dentistry* 43:1470-1475

12. Delius J, Trautmann S, Medard G, Kuster B, Hannig M, Hofmann T (2017) Label-free quantitative proteome analysis of the surface-bound salivary pellicle. *Colloids Surf B Biointerfaces* 152:68-76
13. Eccles JD (1979) Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *The Journal of prosthetic dentistry* 42:649-653
14. Ferro M, Salvi D, Brugiére S, Miras S, Kowalski S, Louwagie M, et al. (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2:325-345
15. Fornelli L, Durbin KR, Fellers RT, Early BP, Greer JB, LeDuc RD, et al. (2017) Advancing Top-down Analysis of the Human Proteome Using a Benchtop Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Journal of proteome research* 16:609-618
16. Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J (2007) Effects of toothbrushing on eroded dentine. *European journal of oral sciences* 115:390-396
17. Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP (2003) Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6940-6945
18. Gibbins HL, Yakubov GE, Proctor GB, Wilson S, Carpenter GH (2014) What interactions drive the salivary mucosal pellicle formation? *Colloids Surf B Biointerfaces* 120:184-192
19. Grossmann J, Roschitzki B, Panse C, Fortes C, Barkow-Oesterreicher S, Rutishauser D, et al. (2010) Implementation and evaluation of relative and absolute quantification in shotgun proteomics with label-free methods. *Journal of proteomics* 73:1740-1746
20. Hall AF, Buchanan CA, Millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH (1999) The effect of saliva on enamel and dentine erosion. *Journal of dentistry* 27:333-339
21. Hannig C, Becker K, Hausler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M (2007a) Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion - an ex vivo pilot study. *Archives of oral biology* 52:444-449
22. Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A (2007b) Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Archives of oral biology* 52:1048-1056

23. Hannig M (1999) Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig* 3:88-95
24. Hannig M, Balz M (1999) Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries research* 33:372-379
25. Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y (2004) Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Archives of oral biology* 49:903-910
26. Hannig M, Hannig C (2007) Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe* 29
27. Hannig M, Hannig C (2014) The pellicle and erosion. *Monogr Oral Sci* 25:206-214
28. Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M (2003) Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study. *Clin Oral Investig* 7:158-161
29. Hannig M, Joiner A (2006) The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 19:29-64
30. Hannig M, Khanafer AK, Hoth-Hannig W, Al-Marrawi F, Acil Y (2005) Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle. *Clin Oral Investig* 9:30-37
31. Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, González-Cabezas C, Zero DT (2005) Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries research* 39:134-138
32. Hara AT, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT (2006) Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *Journal of dental research* 85:612-616
33. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. (2005) Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 4:1265-1272
34. Kensche A, Reich M, Kümmerer K, Hannig M, Hannig C (2013) Lipids in preventive dentistry. *Clin Oral Investig* 17:669-685

35. Khurshid Z, Zohaib S, Najeeb S, Zafar MS, Rehman R, Rehman IU (2016) Advances of Proteomic Sciences in Dentistry. *International journal of molecular sciences* 17
36. Kinney JH, Balooch M, Haupt DL, Jr., Marshall SJ, Marshall GW, Jr. (1995) Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *Journal of dental research* 74:1179-1184
37. Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, Ten Cate JM (1994) The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *Journal of dental research* 73:1523-1529
38. Kratz F, Grass S, Umanskaya N, Scheibe C, Muller-Renno C, Davoudi N, et al. (2015) Cleaning of biomaterial surfaces: protein removal by different solvents. *Colloids Surf B Biointerfaces* 128:28-35
39. Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, et al. (2013) Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during in vivo formation. *PloS one* 8:e67919
40. Liu Y, Hannig M (2020) Vinegar inhibits the formation of oral biofilm in situ. *BMC oral health* 20:167
41. Lu X, Zhu H (2005) Tube-gel digestion: a novel proteomic approach for high throughput analysis of membrane proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4:1948-1958
42. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C (2011) Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries research* 45 Suppl 1:2-12
43. Marmagne A, Rouet MA, Ferro M, Rolland N, Alcon C, Joyard J, et al. (2004) Identification of new intrinsic proteins in Arabidopsis plasma membrane proteome. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3:675-691
44. Meurman JH, Frank RM (1991) Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries research* 25:1-6
45. Morge S, Adamczak E, Linden LA (1989) Variation in human salivary pellicle formation on biomaterials during the day. *Archives of oral biology* 34:669-674

46. Pelá VT, Cassiano LPS, Ventura T, Souza ESCM, Gironda CC, Rios D, et al. (2018) Proteomic analysis of the acquired enamel pellicle formed on human and bovine tooth: a study using the Bauru in situ pellicle model (BISPM). *Journal of applied oral science : revista FOB* 27:e20180113
47. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W (2000) Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Archives of oral biology* 45:355-361
48. Schwanhausser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473:337-342
49. Schweigel H, Wicht M, Schwendicke F (2016) Salivary and pellicle proteome: A datamining analysis. *Scientific reports* 6:38882
50. Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A (2011) Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries research* 45 Suppl 1:69-77
51. Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ (2006) Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5:144-156
52. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG (2007) Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *Journal of proteome research* 6:2152-2160
53. Skjørland KK, Rykke M, Sønju T (1995) Rate of pellicle formation in vivo. *Acta odontologica Scandinavica* 53:358-362
54. Teruel Jde D, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJ (2015) Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Archives of oral biology* 60:768-775
55. Tholey A, Becker A (2017) Top-down proteomics for the analysis of proteolytic events - Methods, applications and perspectives. *Biochim Biophys Acta*
56. Trautmann S, Barghash A, Fecher-Trost C, Schalkowsky P, Hannig C, Kirsch J, et al. (2019) Proteomic Analysis of the Initial Oral Pellicle in Caries-Active and Caries-Free Individuals. *Proteomics Clinical applications* 13:e1800143

57. Trautmann S, Künzel N, Fecher-Trost C, Barghash A, Schalkowsky P, Dudek J, et al. (2020) Deep Proteomic Insights into the Individual Short-Term Pellicle Formation on Enamel-An In Situ Pilot Study. *Proteomics Clinical applications* 14:e1900090
58. Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T (2008) Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *Journal of oral rehabilitation* 35:390-394
59. Wegehaupt FJ, Widmer R, Attin T (2010) Is bovine dentine an appropriate substitute in abrasion studies? *Clin Oral Investig* 14:201-205
60. Wetton S, Hughes J, Newcombe RG, Addy M (2007) The effect of saliva derived from different individuals on the erosion of enamel and dentine. A study in vitro. *Caries research* 41:423-426
61. Wetton S, Hughes J, West N, Addy M (2006) Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: a study in vitro. *Caries research* 40:213-217
62. Wiegand A, Bliggenstorfer S, Magalhaes AC, Sener B, Attin T (2008) Impact of the in situ formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion induced by different acids. *Acta odontologica Scandinavica* 66:225-230
63. Wiegand A, Rosemann A, Hoch M, Barke S, Dakna M, Kanzow P (2019) Erosion-Protective Capacity of the Salivary Pellicle of Female and Male Subjects Is Not Different. *Caries research* 53:636-642
64. Wu S, Tang XT, Siems WF, Bruce JE (2005) A hybrid LC-Gel-MS method for proteomics research and its application to protease functional pathway mapping. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 822:98-111
65. Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG (2003) Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *The Journal of biological chemistry* 278:5300-5308

## 7 Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Hannig, der mir dieses besondere Thema anvertraut hat, mich bei meinen wissenschaftlichen Arbeiten unterstützt hat und sich sehr viel Zeit für die Korrektur meiner Arbeit und den sich daraus ergebenden Fragen genommen hat. Ich danke Ihnen für das Vertrauen, dass Sie mir damit entgegen gebracht haben und für die lehrreiche Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten. Weiterhin möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. Simone Trautmann danken, die mich die Methodik lehrte und mir die Freude an der experimentellen Arbeit vermittelte. Ich habe die Stunden im Labor sehr genossen und war froh über das offene Ohr bei meinen unzähligen Fragen und Anliegen. Vor allem die unermüdliche Beratung und Korrektur der schriftlichen Dissertation werde ich nicht vergessen. Ein weiterer Dank gebührt Frau Dr. Natalia Umanskaya, Herrn Norbert Pütz und Frau Wiebke Hoth-Hannig, die die Prüfkörper für die raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen weiterbearbeiteten und die Untersuchungen durchführten. Weiterhin danke ich Frau Dr. Claudia Fecher-Trost vom Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie an der Universität des Saarlandes für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen und der Beantwortung meiner detailreichen Fragen. Meiner Familie und meinem Lebensgefährten danke ich für die ausdauernde Unterstützung bis zum nun endlich erreichten Ende dieser Etappe und das Verständnis für manche besondere Situation. Besonders danken möchte ich Frau Petra Avram für das kritische Gegenlesen meiner Dissertation.

## 8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

## 9 Anhang

Tabelle 5: Liste der 107 detektierten Pellikelproteine, die in allen Versuchen mit einer 3 min-Pellikel, mit und ohne anschließender Zitronensäureätzung, identifiziert wurden.

14-3-3 protein epsilon
14-3-3 protein sigma
14-3-3 protein zeta/delta
5'-nucleotidase
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating
78 kDa glucose-regulated protein
Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring
Alpha-2-macroglobulin
Alpha-2-macroglobulin-like protein 1
Alpha-amylase 1
Alpha-enolase
Annexin A1
Annexin A2
Annexin A5
Antithrombin-III
Beta-2-microglobulin
Biglycan
BPI fold-containing family A member 2
BPI fold-containing family B member 1
Calmodulin-like protein 3
Calreticulin
Carbonic anhydrase 6
Ceruloplasmin
Chloride intracellular channel protein 1
Chondroadherin
Cofilin-1
Collagen alpha-1(I) chain
Collagen alpha-2(I) chain
Complement C3
Complement component C9
Cornulin
Cystatin-A
Cystatin-B
Cystatin-C
Cystatin-D
Cystatin-SA
Cystatin-SN
Cytochrome c
Desmoglein-3
Endoplasmic reticulum resident protein 29
Ezrin
F-box only protein 50
Fructose-1,6-bisphosphatase 1
Fructose-bisphosphate aldolase A
Gelsolin
Glutathione S-transferase P
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Heat shock cognate 71 kDa protein
Heat shock protein beta-1
Heat shock protein HSP 90-alpha
Hemoglobin subunit alpha
Histone H4
Ig alpha-1 chain C region
Ig gamma-1 chain C region
Ig kappa chain C region
Ig lambda-2 chain C regions
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
Interleukin-1 receptor antagonist protein
Keratin, type II cytoskeletal 6A
L-lactate dehydrogenase A chain
Lactoperoxidase
Lactotransferrin
Leukocyte elastase inhibitor
Lysozyme C
Malate dehydrogenase, mitochondrial
Moesin
Mucin-7
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
Nucleoside diphosphate kinase B
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
Peroxiredoxin-1
Peroxiredoxin-5, mitochondrial
Peroxiredoxin-6

Phosphatidylethanolamine-binding protein 1
Phosphoglycerate kinase 1
Poly(U)-specific endoribonuclease
Polymeric immunoglobulin receptor
Prolactin-inducible protein
Protein disulfide-isomerase A3
Protein disulfide-isomerase A6
Protein disulfide-isomerase
Protein DJ-1
Protein S100-A11
Protein S100-A4
Protein S100-A8
Protein S100-A9
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E
Pyruvate kinase PKM
Rho GDP-dissociation inhibitor 1

Ribonuclease 4
Serotransferrin
Serpin B13
Serpin B3
Serpin B5
Serum albumin
SPARC-like protein 1
Sulfhydryl oxidase 1
Tetranectin
Thioredoxin
Thrombospondin-1
Triosephosphate isomerase
Ubiquitin-60S ribosomal protein L40
UPF0762 protein C6orf58
Vimentin
Vitamin D-binding protein
Zymogen granule protein 16 homolog B

Tabelle 6: Proteinliste aller detektierten Proteine aller Versuchsproben. Mit einem X wurden die Proteine markiert, wenn Sie in der vorliegenden Probe detektiert wurden. Abkürzungen: Pr = Proband, Dentk = Dentinkontrollprobe ohne Pellikel, 3 min-Pe = 3 min-Pellikel.

Protein Name	Gen Symbol	Dentk	Pr1.1 3 min-Pe	Pr1.2 3 min-Pe	Pr1.2 0.1% Zitr.säure	Pr1.2 1% Zitr.säure	Pr1.2 5% Zitr.säure	Pr2 3 min-Pe	Pr1 0.1% Zitr.säure	Pr2 1% Zitr.säure	Pr2 5% Zitr.säure
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1								X		
14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB		X	X	X	X	X	X			
14-3-3 protein epsilon	YWHAE		X	X	X	X	X	X	X	X	X
14-3-3 protein gamma	YWHAG		X	X	X	X	X	X	X	X	X
14-3-3 protein sigma	SFN		X	X	X	X	X	X	X	X	X
14-3-3 protein theta	YWHAQ					X					
14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ		X	X	X	X	X	X	X	X	X
40S ribosomal protein S15a	RPS15A					X					
40S ribosomal protein S19	RPS19				X						
40S ribosomal protein S21	RPS21		X	X					X		
40S ribosomal protein S28	RPS28		X	X	X	X	X	X	X		
40S ribosomal protein SA	RPSA		X	X							
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	ALDH9A1		X	X							
5'-nucleotidase	NT5E		X	X	X	X	X	X	X	X	X
60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0					X			X	X	
60S ribosomal protein L10a	RPL10A		X	X	X	X	X	X	X	X	
60S ribosomal protein L12	RPL12		X	X	X				X		
60S ribosomal protein L22	RPL22						X				
60S ribosomal protein L30	RPL30				X						
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD		X	X	X	X	X	X	X	X	X
72 kDa type IV collagenase	MMP2						X				X
78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5		X	X	X	X	X	X	X	X	X









Coatmer subunit delta	ARCNI																		
Cocaine esterase	CES2	X	X	X	X												X		
Cofilin-1	CFL1	X	X	X	X												X	X	X
Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	X															X	X	X
Collagen alpha-1(II) chain	COL2A1																		X
Collagen alpha-1(V) chain	COL5A1	X							X	X								X	X
Collagen alpha-1(XI) chain	COL11A1																X		
Collagen alpha-1(XVIII) chain	COL18A1								X	X									
Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2						X										X		X
Collagen alpha-2(V) chain	COL5A2																X		X
Collagen alpha-2(XI) chain	COL11A2							X									X		X
Collagen alpha-3(V) chain	COL5A3																X		
Collagen triple helix repeat-containing protein 1	CTHRC1																X		X
Complement C3	C3						X										X	X	X
Complement C4-A	C4A							X									X		X
Complement C4-B	C4B																X		
Complement component C9	C9						X										X	X	X
Complement factor H	CFH							X											
Complement factor H-related protein 1	CFHR1							X											
Complement factor I	CFI																X		
Connective tissue growth factor	CTGF																		X
Copper transport protein ATOX1	ATOX1								X										
Cornifin-A	SPRR1A																X		
Cornifin-B	SPRR1B																	X	

Cornulin	CRNN		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Coronin-1C	CORO1C										X																		
Creatine kinase B-type	CKB	X																											
C-X-C motif chemokine 14	CXCL14									X													X					X	
C-X-C motif chemokine 5	CXCL5				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cystatin-A	CSTA		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cystatin-B	CSTB		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cystatin-C	CST3		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cystatin-D	CST5		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cystatin-S	CST4		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cystatin-SA	CST2		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cystatin-SN	CST1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cysteine-rich protein 1	CRIP1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cysteine-rich secretory protein 3	CRISP3		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cytochrome c	CYCS		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cytosolic aconitate hydratase	ACO1		X																				X					X	
Cytosol aminopeptidase	LAP3		X																										
Deleted in malignant brain tumors 1 protein	DMBT1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Dermatopontin	DPT																												X
Desmocollin-2	DSC2		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Desmoglein-1	DSG1		X																										
Desmoglein-3	DSG3		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Desmoplakin	DSP	X																											
Destrin	DSTN							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

Dihydropteridine reductase	QDPR											X	X	X	X	X
Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYSL2	X	X									X	X	X	X	
DnaI homolog subfamily C member 3	DNAJC3					X	X								X	X
Dynein light chain 1, cytoplasmic	DYNLL1			X												
Echinoderm microtubule-associated protein-like 2	EML2											X				
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2	ENPP2									X	X			X		X
EF-hand domain-containing protein D2	EFHD2			X				X	X				X	X		
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	EFEMP2												X			X
Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1		X					X	X				X	X	X	X
Elongation factor 1-delta	EEF1D													X		
Elongation factor 1-gamma	EEF1G		X					X					X			
Elongation factor 2	EEF2		X	X				X	X				X	X		
Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29		X					X	X				X	X	X	X
Endoplasmin	HSP90B1							X	X				X	X	X	X
ERO1-like protein alpha	ERO1L		X					X	X				X	X		X
Eukaryotic initiation factor 4A-1	EIF4A1		X					X								
Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	EIF1AX					X										
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	EIF5A		X					X	X				X	X		
Eukaryotic translation initiation factor 6	EIF6					X		X								
Extracellular matrix protein 1	ECM1		X													
Ezrin	EZR		X					X	X				X	X	X	X
F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAPZA1		X					X	X				X	X		

F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB																			
Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F-box only protein 50	NCCRP1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibrinogen beta chain	FGB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibrinogen gamma chain	FGG	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibroblast growth factor receptor 1	FGFR1									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibroleukin	FGL2										X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibromodulin	FMOD									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibronectin	FN1										X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibulin-5	FBLN5														X	X	X	X	X	X
Filaggrin	FLG	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Filaggrin-2	FLG2										X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Filamin-A	FLNA																			X
Flavin reductase (NADPH)	BLVRB														X	X	X	X	X	X
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Galectin-3	LGALS3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Galectin-7	LGALS7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1	GABARAPL1															X				
Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	GABARAPL2								X								X	X	X	X
Gamma-glutamylcyclotransferase	GGCT									X										X



Hepatoma-derived growth factor	HDGF																		
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1					X						X							
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	HNRNPA1L2											X							
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD					X						X					X		X
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRNPDL										X								
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK									X									X
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1					X				X		X							
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC										X							X	
High mobility group protein B1	HMGB1					X				X		X					X		
Histidine-rich glycoprotein	HRG					X				X		X							
Histone H1.2	HIST1H1C					X													
Histone H1.3	HIST1H1D									X									
Histone H1.4	HIST1H1E																		X
Histone H2A type 1-B/E	HIST1H2AB					X				X		X					X		X
Histone H2A.J	H2AFJ																		X
Histone H2B type 1-B	HIST1H2BB									X							X		
Histone H2B type 1-D	HIST1H2BD											X							
Histone H2B type 1-H	HIST1H2BH																X		X
Histone H3.1t	HIST3H3					X													
Histone H4	HIST1H4A					X				X		X					X		X
Hsc70-interacting protein	ST13									X									
Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	HAGH																X		X





Keratin, type II cuticular Hb4	KRT84														X						
Keratin, type II cuticular Hb5	KRT85			X											X						
Keratin, type II cuticular Hb6	KRT86			X											X						
Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1			X																	X
Keratin, type II cytoskeletal 1b	KRT77			X																	
Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	KRT76					X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 3	KRT3					X															
Keratin, type II cytoskeletal 4	KRT4					X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 5	KRT5					X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 6A	KRT6A			X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 6B	KRT6B																				
Keratin, type II cytoskeletal 6C	KRT6C					X															
Keratin, type II cytoskeletal 7	KRT7			X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 73	KRT73			X											X						X
Keratin, type II cytoskeletal 74	KRT74							X													
Keratin, type II cytoskeletal 75	KRT75			X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 78	KRT78			X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Keratin-associated protein 11-1	KRTAP11-1																				X
Keratin-associated protein 13-1	KRTAP13-1																				X
Keratin-associated protein 19-5	KRTAP19-5																				X
Keratin-associated protein 2-1	KRTAP2-1																				X
Keratin-associated protein 3-1	KRTAP3-1																				X
Keratin-associated protein 9-2	KRTAP9-2																				X
Keratinocyte proline-rich protein	KPRP			X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Kininogen-1	KNG1																		
Lactoperoxidase	LPO		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lactotransferrin	LTF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Latent-transforming growth factor beta-binding protein 3	LTBP3				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Leukocyte cell-derived chemotaxin-2	LECT2				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lipocalin-1	LCN1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	ACPI		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lumican	LUM			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ly-6/neurotoxin-like protein 1	LYNX1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ly6/PLAUR domain-containing protein 3	LYPD3			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lymphocyte antigen 6D	LY6D		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lysosomal alpha-mannosidase	MAN2B1									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lysozyme C	LYZ		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Macrophage-capping protein	CAPG		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Malignant T-cell-amplified sequence 1	MCTS1			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA	MAN1A1									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Matrilysin	MMP7				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Matrix Gla protein	MGP		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Matrix metalloproteinase-20	MMP20	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Matrix metalloproteinase-9	MMP9		X																	
Membrane primary amine oxidase	AOC3		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	MANF		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Mesothelin	MSLN														X					X
Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3														X					X
Mimecan	OGN																			X
Moesin	MSN	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Monocyte differentiation antigen CD14	CD14				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Mucin-5B	MUC5B		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Mucin-7	MUC7		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Myelin P2 protein	PMP2											X								
Myeloperoxidase	MPO		X													X	X	X	X	X
Myosin light polypeptide 6	MYL6		X							X										
Myosin regulatory light chain 12A	MYL12A																			X
Myosin-9	MYH9																			X
Myotrophin	MTPN		X		X															X
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	SLC9A3R1		X		X															X
N-acetyl-D-glucosamine kinase	NAGK		X		X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	NACA		X		X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Nestin	NES				X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK										X	X								
Neutrophil defensin 1	DEFA1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
Neutrophil defensin 3	DEFA3																			X
Neutrophil elastase	ELANE	X																		
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	LCN2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Niban-like protein 1	FAM129B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
Non-specific lipid-transfer protein	SCP2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Nucleobindin-2	NUCB2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							X
Nucleolin	NCL							X	X	X	X	X								
Nucleoside diphosphate kinase A	NME1					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Nucleoside diphosphate kinase B	NME2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Nucleotide exchange factor SIL1	SIL1										X	X								
Obg-like ATPase 1	OLA1						X													
Olfactomedin-like protein 1	OLFML1											X								
Olfactomedin-like protein 3	OLFML3										X	X								X
Osteoclast-stimulating factor 1	OSTF1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
Osteomodulin	OMD																			X
Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	PAM										X	X								X
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	FKBP10																			
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKBP1A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	FKBP2											X	X							





Protein S100-A1						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Protein S100-A11						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Protein S100-A13										X									
Protein S100-A14					X									X					
Protein S100-A16														X					
Protein S100-A2					X	X	X	X	X					X					
Protein S100-A4		X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Protein S100-A6					X	X	X	X	X					X					
Protein S100-A7																	X		
Protein S100-A8					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Protein S100-A9					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K											X	X	X	X	X	X	X	X	X
Protein-lysine 6-oxidase														X	X	X	X	X	X
Prothrombin													X	X	X	X	X	X	X
Purine nucleoside phosphorylase							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Puromycin-sensitive aminopeptidase					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Putative elongation factor 1-alpha-like 3										X									
Putative keratin-87 protein							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Pyruvate kinase PKM					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Rab GDP dissociation inhibitor beta					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1																X	X	X	X
Ras suppressor protein 1															X	X	X	X	X



Serpin B12	SERPINB12											X						
Serpin B13	SERPINB13				X	X	X	X	X	X		X	X	X				X
Serpin B3	SERPINB3				X	X	X	X	X	X		X	X	X				X
Serpin B4	SERPINB4				X													
Serpin B5	SERPINB5				X	X	X	X	X	X		X	X	X				X
Serum albumin	ALB			X	X	X	X	X	X	X		X	X	X				X
Serum amyloid A-2 protein	SAA2				X													
Serum amyloid P-component	APCS				X													
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	SH3BGR1				X	X	X	X	X	X		X	X	X				X
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	SH3BGR3				X	X	X	X	X	X		X	X	X				X
Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 3	SCUBE3									X								X
Slit homolog 3 protein	SLIT3								X	X								X
Small nuclear ribonucleoprotein E	SNRPE												X					
Small proline-rich protein 3	SPRR3				X	X	X	X	X	X		X	X	X				X
Sorbin and SH3 domain-containing protein 2	SORBS2												X					
SPARC	SPARC				X	X	X	X	X	X		X	X	X				X
SPARC-like protein 1	SPARCL1				X	X	X	X	X	X		X	X	X				X
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	SPTBN1			X					X	X								
Spliceosome RNA helicase DDX39B	DDX39B				X				X									
Spondin-1	SPON1								X	X				X				X
Stress-induced-phosphoprotein 1	STP1								X	X								
Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	OXCT1															X	X	X
Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1				X	X	X	X	X	X		X	X	X				X

Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1	SULT2B1		X	X	X	X	X												
Superoxide dismutase (Cu-Zn)	SOD1		X	X	X	X	X								X				
Suprabasin	SBSN		X	X	X	X	X								X				
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	VAT1		X	X	X	X													
Synaptonemal complex protein SC65	LEPREL4										X								
Synemin	SYNM							X											X
Tetranectin	CLEC3B	X	X	X	X	X	X							X	X	X			X
Thioredoxin	TXN		X	X	X	X								X	X				X
Thioredoxin domain-containing protein 17	TXNDC17		X	X	X														
Thioredoxin-like protein 1	TXNL1		X	X	X									X	X	X			X
Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	TARS		X																
Thrombospondin-1	THBS1	X	X	X	X									X	X	X			X
Tight junction protein ZO-1	TJP1			X	X									X	X				
Tissue alpha-L-fucosidase	FUCA1														X				X
Titin	TTN												X						
Transaldolase	TALDO1		X	X	X								X	X					
Transcobalamin-1	TCN1		X	X	X								X	X	X				X
Transcription elongation factor SPT6	SUPT6H				X									X					X
Transforming growth factor beta-1	TGFB1	X	X										X	X				X	X
Transforming growth factor beta-2	TGFB2												X	X				X	X
Transforming growth factor beta-3	TGFB3																		X
Transforming protein RhoA	RHOA			X	X								X	X		X			
Transgelin	TAGLN		X	X	X								X	X					
Transgelin-2	TAGLN2		X	X	X								X	X					



Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	UBE2L3		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	UBE2V1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ubiquitin-fold modifier 1	UFMI		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
UMP-CMP kinase	CMPK1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
UPF0762 protein C6orf58	C6orf58		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Uridine phosphorylase 1	UPP1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
UV excision repair protein RAD23 homolog B	RAD23B		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	VPS4B		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vimentin	VIM	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vitamin D-binding protein	GC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vitamin K-dependent protein S	PROS1																					X
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1											X										
Xylosyltransferase 1	XYLT1											X										X
Zinc-alpha-2-glycoprotein	AZGP1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Zymogen granule protein 16 homolog B	ZG16B		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X