

**In-vitro-Untersuchungen zur Bildung individualspezifischer
Schmelzpellikel**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Nadine Apitz
geboren am 23.01.1976 in Querfurt

Inhaltsverzeichnis

Seite

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1	Zusammenfassung	4
2	Einleitung	6
2.1	Humanspeichel	7
2.1.1	Definition des Speichels	7
2.1.2	Bildung und Zusammensetzung des Speichels	7
2.1.3	Sekretion des Speichels	9
2.1.4	Funktionen des Speichels	10
2.2	Speichelproteine und ihre Funktionen	10
2.3	Schmelzpellikel	17
2.3.1	Bildung und Zusammensetzung der Pellikel	17
2.3.2	Funktion der Schmelzpellikel	19
2.3.3	Struktur und Reifung der Pellikel	21
2.3.4	Bisherige Untersuchungstechniken der Pellikel	22
3	Zielstellung	24
4	Material und Methode	25
4.1	Probandengut	25
4.2	Speichelgewinnung	25
4.2.1	Gewinnung von unstimuliertem Mischspeichel	26
4.2.2	Gewinnung von stimuliertem Mischspeichel	26
4.2.3	Gewinnung von Parotisspeichel	26
4.3	Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure-Assay	27
4.4	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	29
4.4.1	Prinzip	29
4.4.2	Probenaufbereitung für die HPLC-Anlage	31
4.4.3	Analyse der Chromatogramme	31
4.4.3.1	Qualitative Identifikation der Speichelproteine	31
4.4.3.2	Quantitative Speichelanalyse	34
4.5	Massenspektrometrie	34
4.6	Varianzanalyse	36
4.7	Methode der In-vitro-Pellikelbildung	38
4.7.1	Speichelgewinnung für die Pellikelbildung	38
4.7.2	Prinzip der In-vitro-Pellikelbildung	38
4.7.3	Pellikelbildung mit einmaliger Speichelzugabe	38
4.7.4	Pellikelbildung mit mehrmaliger Speichelzugabe	38
4.7.5	Ablösung der Pellikel vom Hydroxylapatit	39
4.8	Statistische Auswertung	40
5	Ergebnisse	41
5.1	Quantitative Gesamtproteinbestimmung	41
5.1.1	Tageszeitliches Proteinprofil des unstimulierten und stimulierten Mischspeichels sowie des Parotisspeichels mit dem BCA-Assay	41
5.1.2	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes mit der HPLC-Methode	42
5.2	Stabilitätsuntersuchungen	42

5.3	Proteinspektrum des Speichels	43
5.3.1	Proteinspektrum des stimulierten Mischspeichels eines Individuums	43
5.3.2	Proteinspektrum der Stichprobe	45
5.3.3	Ergebnisse der Untersuchung der intra- und interindividuellen Varianz	46
5.4	Ergebnisse der In-vitro-Pellikelbildung	47
5.4.1	Proteinzusammensetzung der In-vitro-Pellikel	47
5.4.2	Anreicherungsfaktoren der Proteine in der Pellikel	48
5.4.3	Bindungsstärke der Proteine in der experimentellen Pellikel	49
5.5	Korrelation zwischen Ausgangsspeichel und In-vitro-Pellikel	50
5.6	Aufspaltung der prolinreichen Proteine in ihre Polymorphismen	52
6	Diskussion	55
7	Schlussfolgerung	66
8	Literaturverzeichnis	67
9	Anhang	81
10	Anlagen	93

Danksagung

Lebenslauf

Ehrenwörtliche Erklärung

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
API	Approximalraum-Plaque-Index
BSA	Bovine Serum Albumin (deutsch: Rinderserumalbumin)
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
CaF ₂	Calciumfluorid
DMF-T	zahnbezogener Karies-Index
DMF-S	zahnflächenbezogener Karies-Index
Ed.	englische „Edition“
engl.	englisch(e)
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
RP-HPLC	Reversed Phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kD	Kilodalton
LB	Lactobazillen
n	Anzahl
MG	Muzin Glukoprotein
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
nm	Nanometer
PBI	Papillenblutungsindex
PRP	prolinreiche Proteine
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SM	Streptococcus mutans
sIgA	sekretorisches Immunglobulin A
TFA	Trifluoressigsäure
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehung pro Minute
VK	Variationskoeffizient
\bar{x}	Mittelwert

1 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden In-vitro-Studie war es, den Einfluss der individuellen Speichelzusammensetzung auf die Pellikel qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Dabei wurde zunächst der Untersuchung individueller Variationen der Speichelproteine nachgegangen und ein geeignetes Modell zur In-vitro-Pellikelbildung mit synthetischem Hydroxylapatit erstellt. Die Frage nach der Selektivität bzw. der Individualität der Pellikel sollte anschließend mit diesem Vorgehen bearbeitet werden.

In die Untersuchung zur individuellen Speichelqualität gingen Proben unstimulierten und stimulierten Mischspeichels sowie Parotisspeichels von 11 Probanden ein. Der Gesamtproteingehalt, die Proteinzusammensetzung des Speichels und die an synthetischem Hydroxylapatit gebildete Pellikel wurde mit einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an einer hydrophoben C8-(Zorbax)-Säule und mit einem Wasser/Acetonitrilgradienten analysiert. Um den Einfluss der Dauer der Speichelexposition auf die Pellikelzusammensetzung zu beurteilen, wurden 2 Versuchsregime mit einmaliger oder viermaliger Speichelerneuerung in einer Stunde mit den Proben von 11 Probanden untersucht. Die Speichelproteine ließen sich in 9 Peaks, die von A bis I bezeichnet wurden, reproduzierbar trennen; ihre Identifikation konnte mit Referenzproteinen bzw. über massenspektrometrische Bewertung der Hauptbestandteile vorgenommen werden. Die quantitative Bewertung erfolgte mit einem BSA-Standard.

Stimulierter Mischspeichel wies den höchsten Proteingehalt (2674 µg/ml) gegenüber dem unstimulierten Mischsekret (1830 µg/ml) auf und wurde deshalb zum Studium der In-vitro-Pellikelbildung ausgewählt. Intraindividuell bestand eine geringere Variabilität im Proteinspektrum als interindividuell. Die als Histatine (Peak A) und PRP (Peak D) bezeichneten Fraktionen nahmen den größten Anteil der Speichelproteine ein, deren Mengen mit 1190 bzw. 456 µg/ml berechnet wurden. 10 mg Hydroxylapatit (Fluka, Fast Flow) adsorbierten in vitro in einer Stunde 330-340 µg Protein aus einem Milliliter Speichel. Wenn in dieser Zeit Speichel mehrfach angeboten wurde, beinhaltete die artifizielle Pellikel 440 – 450 µg Protein und wies auf die Reifung der Pellikel hin, wie sie auch in vivo beschrieben ist. Am Apatit wurden von den 9 Fraktionen nur fünf (B, C, D, E und I) gebunden. Eine besondere Anreicherung erfolgte für die Fraktion E (Statherin).

Die Korrelationsanalyse zwischen Ausgangsspeichel und artifizieller Pellikel zeigte, dass die Fraktionen C, D, E und I selektiv in der Pellikel gebunden wurden. Qualitative Unterschiede im Proteinmuster des Speichels deuteten sich in massenspektrometrisch separierbaren polymorphen Molekülspezies der PRP an, die ihren Niederschlag auch in der Pellikel fanden.

Die vorliegende Studie ließ quantitative und qualitative individuelle Unterschiede im Speichel- und Pellikelproteinmuster erkennen, so dass die differente Speichelzusammensetzung einen Einfluss auf die protektiven Eigenschaften der Pellikel haben könnte, und somit der Pellikeleinfluss und seine präventive Steuerung weiterhin eine Zielrichtung kariologischer Forschung darstellen sollte.

2 Einleitung

Im Rahmen der Untersuchungen zum Kariesrückgang (caries decline) wurde immer wieder die Polarisierung des Kariesbefalls mit einer Risikogruppe sichtbar. Vielfältige Studien untersuchten ursächliche Faktoren, vor allem soziale, bakterielle und nichtbakterielle Parameter. Bei Untersuchungen des kariösen Prozesses als gestörtes De- und Remineralisationsgleichgewicht wird dem Einfluss der Schmelzpellikel auf diese Vorgänge größere Aufmerksamkeit geschenkt, da die Schmelzpellikel auch eine Erosionsbarriere darstellt (NEKRASHEVYCH und STÖBER, 2003).

Auf den Oberflächen der Mundhöhle bildet sich aufgrund der Adsorption von Speichelproteinen ein Biofilm - die Schmelzpellikel. Zu den in der Pellikel vorkommenden Speichelproteinen zählen die sauren prolinreichen Proteine, Statherin, Histatine, Cystatine, Muzine und α -Amylase. Neben verschiedenen Aufgaben beeinflusst die Pellikel als semipermeable Membran die De- und Remineralisationsprozesse an der Schmelzoberfläche und fördert auch die Anheftung von Streptokokken und Aktinomyzeten an die Zahnoberfläche. Dabei spielen die prolinreichen Proteine, die Histatine (MURAKAMI et al., 1991) und α -Amylase (BERGMANN und GÜLZOW, 1995; SCANNAPIECO et al., 1995) eine besondere Rolle.

Die Schutzfunktion der Pellikel gegenüber der Demineralisation hat im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Erosion der Zahnhartsubstanz an Bedeutung gewonnen, da letzteres Krankheitsbild aktuell vermehrt angetroffen wird.

Zu Untersuchungen der Pellikel gab es in der Vergangenheit nur die Möglichkeit, die minimalen Mengen einer Aminosäurenanalyse zu unterziehen, während die moderne Proteinchemie die individuelle Identifikation kleinster Mengen mit massenspektroskopischen und immunologischen Methoden erlaubt. In diesem Zusammenhang sollte in der vorliegenden Arbeit mit einer HPLC unter Kopplung von massenspektroskopischer Detektion und in vitro Bedingungen die Pellikelbildung an Apatitpulver untersucht werden.

Interindividuelle Unterschiede in der Pellikelzusammensetzung mit Einfluss auf die De- und Remineralisationsprozesse oder die Adhärenzförderung von Mikroorganismen könnten von kariogener Relevanz sein, so dass die Kariesaktivität des Individuums durch seine Pellikeleigenschaften beeinflusst wird, wozu das bearbeitete In-vitro-Modell einen Beitrag leisten sollte.

2.1 Humanspeichel

2.1.1 Definition des Speichels

Definition des Speichels. Die Bezeichnung Speichel steht für das Gemisch der Sekrete der drei großen paarigen Speicheldrüsen, der kleineren Schleimhautdrüsen und der gingivalen Sulkusflüssigkeit, das die Zähne und die Mundschleimhaut kontinuierlich benetzt (WHELTON, 1996). Die reinen Drüsensekrete nehmen in der Mundhöhle Bakterien, Epithelzellen der Schleimhäute sowie zelluläre und nichtzelluläre Bestandteile der Sulkusflüssigkeit auf und bilden den sogenannten Mischspeichel (KÖNIG, 1987). Einige Autoren verwenden den Begriff Mundflüssigkeit. Die Ohrspeicheldrüse (Glandula parotis), die Unterkieferdrüse (Glandula submandibularis) und die Unterzungendrüse (Glandula sublingualis) sind die drei großen paarigen Speicheldrüsen, neben denen kleinere Drüsen in der Schleimhaut von Lippe, Wange, Gaumen und Zunge existieren. Das reine Drüsensekret trägt die Bezeichnung der entsprechenden Drüse.

2.1.2 Bildung und Zusammensetzung des Speichels

Die *Bildung des Speichels* übernehmen die o.g. Speicheldrüsen, in deren Azinuszellen zunächst der „primäre Speichel“ gebildet wird, der ein Ultrafiltrat des Blutplasmas darstellt. Im weiteren Prozess erfolgt in den Streifenstücken der Ausführungsgänge die Rückresorption vor allem von Natrium und Chlorid. Die Speichelproteinsynthese und deren Glykosylierung findet vorwiegend in den Azinuszellen statt. Daneben werden einige Proteine in den Ausführungsgängen synthetisiert (SMITH, 1996). Die Zusammensetzung des in der jeweiligen Drüse sezernierten Speichels ist unterschiedlich. Im Mischspeichel sind aufgrund proteolytischer Prozesse eine Vielzahl von Proteinbruchstücken vorhanden. Der rein seröse Parotisspeichel besteht zu einem großen Anteil aus prolinreichen Proteinen (PRP) bzw. glykosylierten prolinreichen Proteinen. Die Glandula sublingualis ist hingegen für die Synthese der Muzine verantwortlich (BEELEY, 1991). Das seromuköse Sekret der Glandula submandibularis ist vorwiegend serös. Die Zunge weist verschiedene Drüsenarten auf. Im Bereich des Zungengrundes sezernieren die kleineren Drüsen einen rein mukösen Speichel. Die in der Nähe der Papillae vallatae und foliatae gelegenen sogenannten Spüldrüsen sezernieren ein rein seröses Sekret, das die Geschmacksknospen umspült und neuen Geschmacksstoffen den Zugang

ermöglicht. Die unter der Zungenspitze lokalisierte Glandula lingualis anterior bildet ein gemischtes Sekret (WALDEYER und MAYET, 1993).

Inhaltsstoffe des Speichels. Der Speichels besteht bis zu 94 % aus Wasser und einem geringeren Anteil Trockensubstanz (6 %). Dieser kleine Anteil besteht zu einem Drittel aus anorganischem und zu zwei Dritteln aus organischem Material (BUDDECKE, 1981). Die anorganischen Stoffe sind in Tabelle 1 aufgezählt.

Tab. 1: Die anorganischen Inhaltsstoffe des menschlichen Speichels und ihre Konzentration (WHELTON, 1996)

Anorganische Stoffe	Konzentration in mM
Ca^{2+}	1-2
Mg^{2+}	0,2-0,5
Na^+	6-26
K^+	14-32
NH_4^+	1-7
H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}	2-23
Cl^-	17-29
HCO_3^-	2-30
F^-	0,0005-0,005
SN^-	0,1-2,0

Die Quelle des Wassers und der Ionen ist das Blutplasma. Nur das Bicarbonat wird in den Speicheldrüsen mit Hilfe der Carboanhydrase aus Kohlendioxid synthetisiert (SMITH, 1996). Der Speichel ist eine hypotone Flüssigkeit mit anderen Elektrolytkonzentrationen als das Blutplasma (COLE und EASTOE, 1988).

Die organischen Inhaltsstoffe des Speichels sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Die Zusammensetzung des Speichels ist von der Beteiligung der einzelnen Speicheldrüsen abhängig und durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zu diesen Faktoren zählen neben der Plasmazusammensetzung die Fließrate, die Art und Dauer der Stimulation, der biologische Rhythmus, Hormone, Schwangerschaft, zahlreiche Medikamente mit salivationshemmenden Nebenwirkungen und unterschiedliche Krankheiten (DAWES, 1996).

Tab. 2: Die organischen Inhaltsstoffe des menschlichen Speichels (JENKINS, 1978; WHELTON, 1996; KLIMM, 1997)

Organische Inhaltsstoffe	
Biologisch aktive Proteine und Aminoverbindungen	α -Amylase, Maltase, Hexokinase; Aldolase, Dehydrogenasen, Kallikrein, Carboanhydrase, Speichelperoxidase, Lipase, Glukosidasen, Proteasen, Peptidasen
Glykoproteine	Muzine, Parotisagglutinin, sIgA, Lactoferrin
Weitere Speichelproteine	PRP, Statherin, Cystatine, Histatine, Sialin, Histamin, Harnstoff
Fette	Lipide, Lipoide
Säuren	Laktat, Zitrat, Harnsäure
Hormone	Östrogene, Progesteron
Vitamine	C, B ₁ , B ₂ , B ₁₂
Abwehrfaktoren	<i>unspezifisch:</i> Lysozym, Lactoferrin, Speichelperoxidase, neutrophile Granulozyten <i>spezifisch:</i> Immunglobuline: sIgA, IgG
Blutgruppensubstanzen	
Gase	CO ₂ , O ₂ , NO ₂ , NH ₃

2.1.3 Sekretion des Speichels

Die Sekretion der einzelnen Drüsen verteilt sich folgendermaßen. Die Glandula parotis liefert 20 % des Gesamtvolumens bei unstimulierter Speichelsekretion, während die Glandula submandibularis den größten Anteil mit 65 % sezerniert. Jeweils 7 – 8 % tragen die Glandula sublingualis und die kleinen Schleimhautdrüsen bei (EDGAR und O'MULLANE, 1990).

Die Angaben für den Speichelfluss innerhalb von 24 Stunden variieren von 500-600 ml (DAWES, 1987) bis hin zu circa 1-1,5 l (ERICSON und MÄKINEN, 1986). Die Bestimmung dieser Fließrate ist aufgrund methodischer Schwierigkeiten und interindividueller Unterschiede erschwert. Der unstimulierte Speichelfluss unterliegt einem circadianen Rhythmus, wobei der höchste Wert am späten Nachmittag und der niedrigste während des Schlafes ermittelt wurde (DAWES, 1972). Die Speichelproduktion in der Nacht ist gegenüber dem Tag deutlich verringert (KÖNIG, 1992; DAWES, 1996). Nach BUDDECKE (1981) beträgt die Sekretionsrate des Ruhespeichels 0,25-0,35 ml/min und die des Reizspeichels 1,0-2,0 ml/min. Neuere Studien weisen auf geschlechtsspezifisch

unterschiedliche Speichelfließraten hin. Für Frauen liegt die Untergrenze des „normalen“ unstimulierten Speichelflusses bei 0,05 ml/min und für Männer bei 0,1 ml/min (SREEBNY, 2000).

Im Vergleich zu anderen Drüsen unterliegt die Speichelsekretion ausschließlich der Kontrolle des vegetativen Nervensystems ohne den Einfluss von Hormonen. Während parasympathische Nerven durch die Ausschüttung von Acetylcholin die Flüssigkeitssekretion erhöhen, stimulieren sympathische Nerven über die Freigabe von Noradrenalin die Proteinsekretion (SMITH, 1996).

2.1.4 Funktionen des Speichels

Eine extreme Verringerung der Speichelsekretion bis hin zum Versiegen des Speichelflusses hat die Mundtrockenheit (Xerostomie) zur Folge, die fatale Auswirkungen auf die Gesundheit der Mundhöhle hat (IMFELD, 1984). Ursächlich für die Xerostomie können zum Beispiel die Nichtanlage oder Fehlbildung von Speicheldrüsen, das Sjögren-Syndrom, Diabetes mellitus, das Parkinson-Syndrom, Sarkoidose, Angst, Depression und Stress sowie die Bestrahlung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich sein (NEWBRUN, 1989; SREENBY, 1996). Die Beeinträchtigung der Mundgesundheit und des Allgemeinbefindens von Xerostomiepatienten verdeutlicht die zahlreichen Aufgaben des Speichels.

Die Funktionen des Speichels sind nicht nur auf die Mundfunktionen wie das Sprechen und die Durchfeuchtung sowie das Gleitfähigmachen der Nahrung, die Geschmacksempfindung, das Schlucken und Einleiten des Verdauungsvorganges begrenzt. Der Speichel beeinflusst das Kariesgeschehen durch seine remineralisierende Wirkung und hält mit seinen Puffersystemen den nahezu neutralen pH-Wert im Ökosystem Mundhöhle aufrecht. Außerdem übt der Speichel Kontrollfunktionen gegenüber oralen Mikroorganismen aus. Besonderes Interesse gilt den Schutzfunktionen des Speichels für die Zahnhartgewebe und Schleimhäute und der Pellikelbildung.

2.2 Speichelproteine und ihre Funktionen

Aufgrund der Tatsache, dass einem Speichelprotein nicht nur eine spezielle Aufgabe zugeordnet werden kann, sondern die Funktionen aller Speichelproteine überlappend sind, verwendete LEVINE (1993) die Beschreibung „Multi- und Amphifunktionalität“. Die Aufgabenbereiche sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: „Multi- und Amphifunktionalität“ der Speichelproteine (RUDNEY, 2000)

	Bakterielle Agglutination	Bakterielle Adhärenz	Antimikrobi- elle Aktivität	Pellikelbildung
α -Amylase		+	+	+
Saure PRP		+		+
Basische PRP			+	
Statherin		+		+
Muzine (MG1, MG2)	+	+		+
Parotisagglutinin	+	+		+
Cystatine			+	+
Histatine			+	+
Peroxidase		+	+	+
Lysozym	+	+	+	+
Lactoferrin	+	+	+	+
sIgA	+	+	+	+

Durch die methodisch immer detailliertere Charakterisierung der Speichelproteine sind verschiedene Proteinfamilien, welche aufgrund genetischer und posttranslationaler Prozesse zahlreiche Mitglieder besitzen, bekannt (LEVINE, 1993). Dies ergibt eine Vielzahl Speichelproteine, deren Vertreter im Folgenden näher beschrieben werden.

Von den menschlichen Speicheldrüsen sezernieren vor allem die Glandulae parotis und submandibularis hohe Konzentrationen an **prolinreichen Proteinen (PRP)**. Nahezu 70 % der gesamten Proteinsekretion entfallen auf die PRP (BENNICK, 1987; MINAGUCHI und BENNICK, 1989). Diese Proteine können unterteilt werden in saure und basische PRP (BENNICK, 1987; MINAGUCHI und BENNICK, 1989) und glykosyliert oder phosphoryliert sein (LEVINE et al., 1987, ROBINSON et al., 1989; STUBBS et al., 1998). Im Falle der *sauren PRP* sind zehn Proteine (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, Db-s, Db-f, PIF-s, PIF-f, Pa-Monomer und Pa-Dimer) bekannt (HAY et al., 1988), von denen die vier erstgenannten von OPPENHEIM et al. (1971) beschrieben und benannt wurden. Für die sauren PRP sind eine Fülle von Prolin, Glutaminsäure, Glutamin und Glycin charakteristisch (HAY et al., 1988).

Von einem Individuum wurden neun *basische PRP* (IB-1 – IB-9) isoliert (KAUFFMANN und KELLER, 1979). Andere Autoren beschrieben ebenfalls neun basische PRP und deren Primärstrukturen (ISEMURA et al., 1980). Den gemeinsamen Ursprung der PRP zeigen die cDNA-Nukleotidsequenzen der PRP (CARLSON, 1993). Alle PRP weisen vier Domänen auf: eine sekretorische Signalpeptidsequenz, ein stark negativ geladenes Aminoende, eine „Repeat“-Region und eine carboxylterminale Region. Die Vielfalt der PRP ist durch differentielles mRNA „splicing“ und posttranslationale Modifikationen bedingt.

Die Funktion der sauren PRP besteht darin, sich mit einer hohen Affinität an Hydroxylapatit zu binden (HAY 1967, 1973; BENNICK et al., 1979), Calciumionen zu fixieren (BENNICK et al. 1981) und das Kristallwachstum von Calciumphosphatsalzen in übersättigten Lösungen zu inhibieren (GRØN und HAY, 1976; HAY et al. 1979). Die PRP treten in physiologischen Konzentrationen als Inhibitoren der sekundären Präzipitation von Calciumphosphaten in übersättigten Lösungen in Erscheinung (HAY und MORENO, 1979, 1989). Somit wird nach der Adsorption am Hydroxylapatit die Bildung von Calciumphosphatkristallen auf der Zahnoberfläche verhindert. Nach AOBA et al. (1984) hat das aminoterminal Ende der PRP mit seinen zwei Phosphoserinmolekülen diese Funktion inne. Die PRP sind an der Pellikelbildung beteiligt (KOUSVELARI et al., 1980; BENNICK et al., 1983) und können auch als Rezeptoren für orale Bakterien dienen (SCANNAPIECO, 1995).

Prolinreiche Glykoproteine sind potentielle Rezeptoren für orale Mikroorganismen (LEVINE et al., 1987; GILLECE-CASTRO et al., 1991). Wenn sich z.B. die sauren PRP am Hydroxylapatit adsorbiert haben, sind zahlreiche orale Bakterien in der Lage zu adhären, besonders *Actinomyces viscosus* (GIBBONS und HAY, 1988a; LEUNG et al., 1990). Insbesondere das PRP-1 wird aufgrund seiner Aminosäuresequenzen (Pro-Gln) von den Adhäsinen der Aktinomyceten erkannt und fördert die Adhärenz. Die Haftung beruht wahrscheinlich auf der Interaktion zwischen Typ 1 Fimbrien und dem Carboxylende. Durch die Bedingung des vorherigen Bindens von PRP am Hydroxylapatit vor Anheftung des *Actinomyces viscosus* ist eine Clearancebeschleunigung durch hohe Konzentrationen an PRP in der flüssigen Phase des Speichels nicht möglich. Ähnliche Phänomene wurden beim Binden von *Streptococcus mutans* und *Streptococcus gordonii* beobachtet (GIBBONS und HAY, 1988b, 1989; GIBBONS et al. ,1991). *Streptococcus mutans* bindet an die größeren PRP (PRP-1, PRP-2, PIF-s) stärker als an kleinere Varianten. Während die größeren PRP die Bakterienanheftung zu unterstützen scheinen, re-

duzieren die kleineren PRP das initiale Anheften. Beide PRP-Typen konkurrieren um dieselbe Hydroxylapatit-Bindungsstelle an der Schmelzoberfläche. Die kleineren PRP z.B. das PRP-3, eine vom PRP-1 abgeleitete Variante, besitzen keine Bindungsstellen für Bakterien und haben somit keine Rezeptorfunktion (BRATT et al., 1998). Das Verhältnis von PRP-1 zu PRP-3 beeinflusst die Besiedelung der Pellikel durch *A. naeslundii*, wie CARLEN et al. (1998) zeigten.

Statherin wird in den Azinuszellen der Glandulae parotis und submandibularis gebildet und besitzt ein Molekulargewicht von 5,38 kD. Die Peptide der Familie der Statherine besitzen 43 Aminosäuren, vor allem Tyrosin-Reste und Phosphoserin in der Primärstruktur (SCHLESINGER und HAY, 1977). Von JENSEN et al. (1991) wurden drei Strukturvarianten (SV1, SV2 und SV3) gefunden, für deren Kodierung ein einziges Gen zuständig ist (SABATINI et al., 1990). Alle Vertreter sind an Ser-2 und Ser-3 phosphoryliert.

Statherin und seine Varianten besitzen unterschiedliche Funktionen. Sie binden mit hoher Selektivität am Hydroxylapatit (HAY, 1973; MORENO et al., 1978; JENSEN et al., 1991), was zu der Annahme führte, dass es sich um einen potentiellen Precursor für die Pellikel handelt. Es verhindert das Kristallwachstum von Calciumphosphatsalzen, und als einziges Protein unterbindet es das spontane Ausfällen von Calciumphosphatsalzen aus übersättigtem Speichel (HAY et al., 1979). Überraschenderweise zeigt das separate aminoterminal Peptid aus 6 Aminosäureresten die vierfache Inhibition des Kristallwachstums verglichen mit dem intakten Statherin, aber nur eine minimale Unterdrückung der spontanen Ausfällung (HAY et al., 1979; SCHLESINGER et al., 1987). Nicht nur die PRP sondern auch die Statherine sind befähigt, nach Adsorption am Hydroxylapatit *Actinomyces viscosus* zu binden (GIBBONS und HAY, 1988a).

Die **Histatine** sind eine Gruppe von zwölf niedermolekularen histidinreichen Polypeptiden, die von den Glandulae parotis und submandibularis sezerniert werden (OPPENHEIM et al., 1986, 1988; TROXLER et al., 1990). Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 3 und 4 kDa (OPPENHEIM et al., 1988). Das wahrscheinlich bekannteste, das Histatin-5, beeinflusst den Mineralisationsprozess (RICHARDSON et al., 1993) und hat eine antifungizide und antibakterielle Wirkung (HELMERHORST, 1997). Die vorherrschenden Formen sind Histatin-1, Histatin-3 und Histatin-5 bestehend aus 38, 32 und 24 Aminosäureresten. Durch proteolytische Spaltung entstehen weitere kleinere

Histatine. Histatin-5, welches durch Proteolyse aus Histatin-3 gebildet wird, beeinflusst den Mineralisationsprozess (RICHARDSON et al., 1993) und hat eine antifungizide sowie antimikrobielle Wirkung (z.B. HELMERHORST et al., 1997). Histatin-1 und Histatin-3 sind Produkte zweier unterschiedlicher m-RNAs. Von allen Histatinen ist nur Histatin-1 phosphoryliert (OPPENHEIM et al., 1988). Histatin-1, Histatin-3 und Histatin-5 binden an Hydroxylapatit und sind damit Precursor für die Pellikel (MAYHALL, 1970). LAMKIN et al. (1991b) reinigten aus der Pellikel Histatin-3 und Histatin-5 mit anschließender Sequenzbestimmung. Histatin-1 inhibiert wie die PRP das Kristallwachstum, nicht jedoch die spontane Ausfällung (OPPENHEIM et al., 1986). Alle drei sind befähigt, *Candida albicans* in seiner Hefe- und Mycel-Form abzutöten (XU et al., 1991). Weniger gut untersucht sind die antibakteriellen Aktivitäten. MAC KAY et al. (1984) zeigten die Fähigkeit einer histidinreichen Fraktion, *Streptococcus mutans* zu töten. Histatin-1, Histatin-3 und Histatin-5 weisen unterschiedliche Aktivitäten auf (XU et al., 1991). Ebenso verschieden sind die bakteriostatischen Aktivitäten innerhalb der Histatine. Histatin-5 bindet an *Porphyromonas gingivalis* (MURAKAMI et al., 1990a) und inhibiert die von Bakterien induzierte Hämagglutination und somit die Kolonisation (MURAKAMI et al., 1990b). Hinsichtlich der metabolischen Aktivität der Bakterien an der Zahnoberfläche und ihrer Säureproduktion mit dem resultierenden pH-Abfall agieren die histidinreichen Reste der Histatine als pufferndes Agens (MANDEL, 1987).

Cystatine wurden aus der Submandibularsekretion isoliert. Die Speichelcystatine SA, SA-I und SA-III sind 121 Aminosäurereste lang, zu 90% homolog und enthalten zwei Disulfidbrücken (ISEMURA et al., 1987; AL-HASHIMI et al., 1988; LAMKIN et al., 1991a). Zwei andere Cystatine, S und SN, entstehen wahrscheinlich aus Cystatin SA-I und SA-III durch postsynthetische Abspaltung von 8 Aminosäureresten an der aminoterminalen Seite des Moleküls (ISEMURA et al., 1984, 1986). Einige Speichelcystatine sind phosphoryliert und binden ebenfalls an Hydroxylapatit. SHOMERS et al. (1982) zeigten, dass das Cystatin CCP1 eine reduzierte aber nicht vollständig eliminierte Bindungsaffinität nach Dephosphorylierung besaß. Cystatine binden ein Drittel weniger an Hydroxylapatit als Statherine (JOHNSSON et al., 1991) und inhibieren das Kristallwachstum mit nur einem Zehntel der Aktivität von Statherin (SHOMERS et al., 1982). Wie auch Cystatine aus Serum oder Liquor sind Speichelcystatine in der Lage, Cysteineproteasen nichtkompetitiv zu hemmen.

Die **Amylase** tritt im Speichel zum einen als nichtglykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kD, zum anderen glykosyliert mit einem Molekulargewicht von 62 kD auf. Von beiden Formen gibt es mehrere Isoenzyme mit unterschiedlichen Ladungen (MAYO und CARLSON, 1974). Die α -Amylase spaltet α -1 \rightarrow 4-glykosidische Bindungen der Stärke, Amylose und Amylopektin und gehört zu den Hydrolasen. Stärke wird zunächst in Oligosaccharide von 6 bis 7 Einheiten und später in Disaccharide wie Maltose und Isomaltose bis zu Glukose gespalten (KÖNIG, 1987). In erster Linie hat Amylase eine digestive Funktion. Ein Drittel der Proteine des Parotissekretes macht die α -Amylase aus. Der Amylase-Anteil an den Parotisproteinen steigt durch Stimulation weiter an. Auch in der Pellikel wurde Amylase gefunden (ØRSTAVIK und KRAUSS, 1973, 1974; AL-HASHIMI und LEVINE, 1989, BRADWAY et al., 1992). Selbst nach der Adsorption weist Amylase noch enzymatische Aktivität auf (ØRSTAVIK und KRAUSS, 1974; RØLLA et al., 1983).

Speichelamylase bindet selektiv und mit hoher Affinität orale Streptokokkenspezies, wie Streptokokkus gordonii (SCANNAPIECO et al., 1989, 1990). SCANNAPIECO et al. (1995) zeigten, dass Amylase und auch PRP in der Pellikel als Rezeptoren für amylase-bindende Streptokokken, wie z.B. S. gordonii, fungieren.

Die **Muzine** werden ebenfalls von den Speicheldrüsen sezerniert. Nach TABAK (1995) besitzen die Muzine eine bedeutende Rolle beim Schutz der Mundhöhlenepithelien und bei der nicht-immunologischen Abwehr. Biochemisch betrachtet, setzen sich die Muzine zu 15 - 20 % aus Proteinen und bis zu 80 % aus Kohlenhydraten mit der Grundstruktur eines O-glykosidisch gebundenen Glykans zusammen (STROUS und DEKKER, 1992; GENDLER und SPICER, 1995). Die am häufigsten vorkommenden Aminosäuren sind Serin und Threonin. Das Molekulargewicht der Monomere ist größer als 2 Millionen Dalton, bei Multimeren zehnfach größer. Anhand Größenausschlusschromatographie wurden in der submandibular-sublingual Sekretion zwei Muzine separiert und als Muzin Glykoprotein 1 (MG 1) und Muzin Glykoprotein 2 (MG 2) benannt (LEVINE et al., 1985; LOOMIS et al., 1987; RAMASUBBU et al. 1991). Für MG 1 wurden in weiteren Studien funktionelle Aufgaben nachgewiesen. So beeinflusst MG 1 die rheologischen und viskoelastischen Eigenschaften des Speichels mit Erleichterung des Sprechens, des Kauens und des Schluckens. IONTCHEVA et al. (1997) zeigten, dass MG 1 mit Amylase, PRP, Statherin und Histatin Komplexe bildet. Dieses Muzin bindet an Hydroxylapatit, wobei sich die beiden Muzine in ihren Interaktionen mit Hydroxylapatit

unterscheiden (TABAK et al., 1985). Vermutlich sind sie Bestandteil der Schmelzpellikel (AL-HASHIMI und LEVINE, 1989). MG 1 ist ein wichtiger Faktor des oralen Abwehrsystems aufgrund seiner Fähigkeit, eine Vielzahl von Speichel-Bakterien zu binden -wie *Porphyromonas gingivalis* (AMANO et al., 1994)- und ihre Clearance zu erleichtern.

Ein fucosereiches Glykoprotein, das ***Parotisagglutinin***, wurde von ERICSON und RUNDGREN (1983) beschrieben. Auch in der Pellikel wurde das Parotisagglutinin als Adhäsionssubstrat für *Streptococcus mutans* nachgewiesen (GIBBONS und HAY, 1989). Der aus Untereinheiten von 440 kD bestehende makromolekulare Komplex hat ein Molekulargewicht von 5000 kD mit hohen Anteilen an Aspartat, Serin sowie Threonin und wenig Prolin. Obwohl seine Konzentration im Parotisspeichel sehr gering ist, erfolgt aufgrund der hohen biologischen Aktivität eine starke Agglutination (ERICSON und RUNDGREN, 1983).

Speichelperoxidase wird größtenteils in den Azinuszellen der großen Speicheldrüsen und in geringerem Maße von oralen Granulozyten (Myeloperoxidase) synthetisiert (MANDEL et al., 1983). Mit einem Molekulargewicht von 75-80 kD kommt es frei oder an Makromoleküle gebunden vor (TENOVUO, 1981). Die Speichelperoxidase wirkt antimikrobiell durch die Bildung von Hypothiocyanat aus Thiocyanat und dem bakteriellen Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Kallikrein beeinflusst durch die Auslösung einer Kontraktion der myoepithelialen Zellen der Speicheldrüsen die Sekretion (JENKINS, 1978). Vermutlich bewirkt es die Bildung von PRP-3 durch posttranslationale Spaltung von PRP-1 (WONG et al., 1983).

Lactoferrin ist ein Glykoprotein von 75-78 kD, das zum einen in den Azinus- und Epithelzellen der großen und kleinen Speicheldrüsen (COHEN und LEVINE, 1989), zum anderen von den PMNs der Sulkusflüssigkeit gebildet wird (FRIEDMAN et. al., 1983).

Fibronektine sind Glykoproteine, deren Monomere ein Molekulargewicht von 210-260 kD und die Dimere eines von 450 kD aufweisen (AKIYAMA und YAMADA, 1987). Die im Gesamtspeichel nur gering vorhandenen Fibronektine werden von den oralen gramnegativen Bakterien abgebaut (WIKSTRÖM und LINDE, 1986). Neben der Fähigkeit Streptokokken zu agglutinieren, ist es in der Lage, an Hydroxylapatit zu binden und die bakterielle Adhärenz zu fördern (BABU et al., 1983; BABU und DABBOUS, 1986).

Albumin bzw. „Speichelalbumin“ wurde in der Pellikel nachgewiesen (COHEN und LEVINE, 1989).

Lysozym, ein basisches Protein mit einer Molekularmasse von 14 kD, ist zur Lyse der Bakterienzellwände befähigt (LAIBLE und GERMAINE, 1985) und wird sowohl in der Pellikel als auch in der Plaque angetroffen (COLE et al., 1981). Es fördert nach seiner Adsorption am Hydroxylapatit die Adhäsion bestimmter Streptokokken (GERMAINE und TELLEFSON, 1986).

2.3 Schmelzpellikel

Auf einer gereinigten Zahnoberfläche bildet sich bei Speichelkontakt ein dünner, azellulärer Proteinfilm, bekannt als "aquired enamel pellicle" – erworbene Schmelzpellikel - (DAWES et al., 1963; MECKEL, 1965). Die Bezeichnung ist von dem Wort *pellicula* (lat: *kleines Fell*) abgeleitet. Häufig wurde auch die Bezeichnung „Zahnoberhäutchen“ (BÖSSMANN und HOPPE, 1974) oder „Schmelzoberhäutchen“ (TILL und THIELMANN, 1989) verwendet. Dieser Biofilm formiert sich posteruptiv durch die Adsorption von Glykoproteinen des Speichels an der Zahnoberfläche (MAYHALL, 1975). Neben dem Begriff erworbene Pellikel existiert die Bezeichnung „primäre Pellikel“. Dieser Begriff steht für das initiale Zahnoberhäutchen, das nach dem Zahndurchbruch aus rudimentären Ameloblasten besteht, durch die Kaufunktion schnell verloren geht und durch das erworbene Schmelzoberhäutchen ersetzt wird (DAWES et al., 1963). Nach NEWBRUN (1989) wurden die Pellikelkomponenten auch als *lösliche* und *unlösliche* definiert. Die *lösliche* Pellikel lässt sich durch eine kurzzeitige Anwendung von Säure vom Zahnschmelz ablösen. Das Entfernen des *unlöslichen* Anteils, der auf der Zahnoberfläche in Form einer Membran fixiert ist, gelingt nur mit intensiver Reinigung. Die unlösliche Pellikel setzt sich aus Glykoproteinen und bakteriellen Zellwänden zusammen (ARMSTRONG, 1968). Löslicher und unlöslicher Anteil bilden die Gesamtpellikel (engl. *total pellicle*) (NEWBRUN, 1989).

Die Pellikel stellt die essentiell erforderliche Basis für die bakterielle Besiedlung und somit die Entwicklung der Plaque dar.

2.3.1 Bildung und Zusammensetzung der Pellikel

Für die *Bildung der Pellikel* ist das Mundhöhlenmilieu Ausgangspunkt. Die Zahnoberflächen sind umgeben von Speichel, was zur Folge hat, dass die Calciumionen des

Hydroxylapatits das Bestreben haben, in Lösung zu gehen. Es entsteht eine negativ geladene Schmelzoberfläche aufgrund der Überzahl an Phosphatresten. Unter physiologischen Bedingungen wird die Schmelzoberfläche durch eine Schicht Calcium-Gegenionen aus dem Speichel elektrisch neutral. Diese Schicht auf der Zahnoberfläche wird „hydration layer“ oder „Stern layer“ genannt, die zu 90 % aus Calciumionen und zu 10 % aus Phosphationen besteht (ARENDS und JONGEBLOED, 1977). Wie BERNARDI und KAWASAKI (1968) zeigten, lagern sich Speichelproteine an die positiven Calciumionen an. Dies beruht auf elektrostatischen Bindungen zwischen Calciumionen und den Phosphatgruppen des Zahnschmelzes einerseits und entgegengeladenen Gruppen der Makromoleküle aus dem Speichel andererseits. Zum Beispiel binden die sauren Proteine spezifisch mit ihren Carboxylgruppen an den Calcium-Bindungsstellen des Zahnschmelzes bzw. der Hydratationsschicht (BENNICK et al., 1979; MORENO et al., 1979; MORENO et al., 1982; BENNICK, 1987). Außer den elektrostatischen Interaktionen sind neben Konformationsänderungen der Proteine und der Desorption von Wasser auch Wasserstoffbrücken, Dispersionskräfte und hydrophobe Wechselwirkungen für die Adsorptionsprozesse von Bedeutung (MORENO et al., 1979, 1984). In wenigen Sekunden beginnt bei Speichelkontakt die Pellikelbildung auf Festkörperoberflächen (BAIER, 1977; GLANTZ, 1980; BAIER et al., 1984). Die Pellikelbildung findet nicht nur auf dem Zahnschmelz, sondern neben dem Wurzelzement und den Mundschleimhäuten auch auf restaurativen Materialien, Prothesenkunststoffen und anderen Festkörperoberflächen statt (SØNJU und GLANTZ, 1975; SØNJU und SKJØRLAND, 1976; FISHER et al., 1987; HANNIG, 1997).

Biochemische Zusammensetzung. Sowohl In-vitro- als auch In-vivo-Studien konnten Speichelproteine als Hauptbestandteil der Pellikel bestätigen (HANNESSON EGGEN, 1983; Mayhall, 1970; SØNJU und RØLLA, 1973). Aufgrund der großen Affinität von PRP zum Hydroxylapatit wurde postuliert, dass PRP in der Pellikel präsent sind. KOUSVELARI et al. (1980) demonstrierten die Antikörperreaktion gegen saure PRP mit Pellikelkomponenten an der Zahnoberfläche.

Zwei Klassen von Calciumbindungsstellen wurden identifiziert, deren Bindungsaffinität das physiologische Spektrum überspannen (BENNICK et al., 1981). Die Adsorption von PRP induziert eine Konformationsänderung. Die Hydroxylapatit-Bindungsaktivität beruht auf den initialen 30 Aminosäureresten (BENNICK et al., 1979; MORENO et al., 1982; AOBA et al., 1984). Das aminoterminal 30-Reste-Peptid inhibiert nicht nur das

Kristallwachstum, sondern ist auffallend aktiver als das komplette Protein (HAY et al., 1979). Noch kleinere Peptide dieser Art weisen allerdings geringere Aktivität auf (HAY et al., 1987). Die aminoterminal Region von sauren PRP stellt die Calcium- und Hydroxylbindungsdomäne dar und ist verantwortlich für die Inhibition des Kristallwachstums durch die PRP. Dem carboxylterminalen Ende fallen unterschiedliche Rollen zu. Weitere potentielle Substrate für die Pellikelbildung sind Plasmaproteine, Immunglobuline, Blutgruppensubstanzen und Enzyme. In der In-vivo-Pellikel waren Ig-A, Ig-G, Ig-M, Albumin, Lactoferrin, Transferrin, Cärolplasmin, Fibrinogen, α -Amylase, Lysozym, Glykosyltransferase und Lactoperoxidase mittels Methoden der Immunfluoreszenz nachweisbar (ØRSTAVIK und KRAUSS, 1973, 1974; KRAUSS et al., 1973; ; KRAUSS und MESTECKI, 1976; RØLLA et al., 1983; LEVINE et al., 1985; AL-HASHIMI und LEVINE, 1989).

Mehrere Studien beschäftigten sich mit der Aminosäurezusammensetzung der Pellikel. So wurden in der in vivo gebildeten 2-Stunden-Pellikel große Anteile saurer Aminosäuren wie Glutaminsäure und Asparaginsäure sowie hohe Anteile von Alanin, Glycin, Serin, und Prolin ermittelt (ARMSTRONG, 1966, 1967; LEACH, 1967; LEACH et al., 1967; ARMSTRONG und HAYWARD, 1968; HOPPE, 1970; MAYHALL, 1970, 1975, 1977; SØNJU und RØLLA, 1973; ÖSTE et al., 1981; EGGEN und RØLLA, 1982a, 1983; KUBOKI et al., 1987; AL-HASHIMI und LEVINE, 1989; RYKKE et al., 1989).

SLOMIANY et al. (1986, 1990) wiesen Lipide in der natürlichen und experimentellen Pellikel nach. Dabei handelte es sich um neutrale Lipide, vor allem freie Fettsäuren, Triglyceride, Cholesterin und Cholesterinester sowie verschiedene Phospho- und Glykolipide. Der Lipidgehalt der Pellikel betrug mehr als 20 % des Trockengewichtes. Signifikante Unterschiede im Lipidgehalt und der –zusammensetzung korrelierten mit der individuellen Kariesaktivität. Allerdings gibt es keine weiteren Arbeiten, die diese Beeinflussung der Pellikelzusammensetzung beschreiben. Bei Untersuchungen von hydrolysiertem Pellikelmateriale auf Kohlenhydratanteile wurden Glukose, Galaktose, Fucose, Mannose, Galaktosamin, Glukosamin, N-Acetylneuraminsäure und andere Sialinsäuren nachgewiesen (HAY, 1967; MAYHALL und BUTTLER, 1976).

Hinweise auf Unterschiede der Pellikelzusammensetzung bzw. der Struktur und Dicke zwischen den Gebissregionen wurden von CARLÈN et al. (1998) und HANNIG (1999) gefunden.

2.3.2 Funktion der Schmelzpellikel

Die aus Speichelproteinen auf der Zahnoberfläche gebildete Pellikel hat verschiedene Funktionen. Sie stellt einen **Gleitfilm** dar, der beim Kauakt die Abrasion und Attrition der antagonistischen und unmittelbar benachbarten Zähne verringert. Vor allem die PRP und die Muzine tragen zum lubrikativen Effekt bei (HATTON et al., 1985). Außerdem bewirkt sie eine geringere und zeitlich verzögerte **erosive Destruktion der Schmelzoberfläche durch saure Noxen** (MECKEL, 1965; SLOMIANY et al., 1986; NIEUW AMERONGEN et al., 1987; MEURMAN und FRANK, 1991; HANNIG, 1998). In der Funktion als **semipermeable Membran**, die die Diffusion saurer Noxen und den Ionenfluss von Calcium und Phosphat behindert, **verringert sie die Löslichkeit des Zahnschmelzes** (SCHÜLE, 1961, 1962, 1963; FEATHERSTONE et al., 1993). Andererseits **verzögert sich dadurch auch der reparative Mineralisationsprozess** (ZAHRADNIK et al., 1976, 1977, 1978; MORENO und ZAHRADNIK, 1979). BÖßMANN und HOPPE (1974) zeigten einen verzögerten Eintritt der Karies unter Vorhandensein des Zahnoberhäutchens.

Weiterhin inhibiert die Pellikel die **Präzipitation von Calciumsalzen** aus dem an Calcium- und Phosphationen übersättigten Speichel. Die sauren PRP, Statherin und in geringerem Maße auch Cystatin in adsorbiertem Zustand, verhindern eine nachteilige kontinuierliche Mineralablagerung an der Zahnoberfläche (HAY und MORENO, 1979; MORENO et al., 1979; AOBA et al., 1984; SCHLESINGER und HAY, 1986; MADAPALLIMATTAN und BENNICK, 1989).

Die Zusammensetzung der Pellikel beeinflusst außerdem die Anheftung von Mikroorganismen. Nach Adsorption bestimmter Speichelproteine, wie der sauren prolinreichen Proteine, der Histatine (MURAKAMI et al., 1991) und α -Amylase (SCANNAPIECO et al., 1995; BERGMANN und GÜLZOW, 1995), können pathogene Streptokokken und Aktinomycceten adhärieren. Das aminoterminal Ende der sauren PRP bindet an Hydroxylapatit (BENNICK et al., 1979, BENNICK, 1987), während das Carboxylende als Rezeptor für die **bakterielle Adhärenz** fungiert. Erst nach der Adsorption werden die in Lösung maskierten Bindungsstellen der sauren PRP durch Konformationsänderung frei (GIBBONS und HAY, 1988a, 1988b).

Weiterhin stellt die Pellikel funktionell betrachtet ein **Reservoir für kariesprotektive Ionen**, z.B. Fluoridionen dar. Nach Fluoridapplikation ist die Pellikel an der langanhalt-

tenden Retention der CaF_2 -Deckschicht auf der Schmelzoberfläche komplex beteiligt (GROBLER et al., 1981). Die Aufnahme von Fluorid in die oberflächliche Schmelzschicht ist aufgrund der Semipermeabilität der Pellikel nicht beeinträchtigt (TINANOFF et al., 1975; ARENDS et al., 1981).

2.3.3 Struktur und Reifung der Pellikel

Mikromorphologisch betrachtet ist die Pellikel eine strukturlose, homogene, amorphe Membran (LEACH, 1967; LENZ, 1967; ARMSTRONG und HAYWARD, 1968). Elektronenmikroskopisch erscheinen die Pellikelstrukturen feingranulär bis granulär mit unterschiedlicher Elektronendichte, aber auch globulär und heterogen (LIE, 1975, 1977, 1978; BERTHOLD, 1979; NYVAD und FEJERSKOV, 1984, 1987; HANNIG und BÖSSMANN, 1989).

Abhängig von der Untersuchungsmethodik, der Lokalisation und der Pellikelbildungszeit liegen sehr unterschiedliche Daten zur Pellikeldicke in einem Bereich von wenigen Nanometern bis hin zu mehreren Mikrometern vor.

In günstigen Reinigungszonen wurden Pellikeldicken von 0,03 – 0,08 μm (LEACH und SAXTON, 1966; LENZ, 1967) und approximal bis zu 2,0 μm (FRANK und BRENDDEL, 1966) gemessen. Nach zwei Stunden wurde auf den Bukkalflächen der Zähne eine Pellikeldicke von 100 nm gemessen, die nach 48 Stunden ca. 500 nm betrug (SØNJU et al., 1974; LIE, 1975, 1977; BERTHOLD, 1979). LIE (1979) zeigte, dass die initiale Pellikel dünn und inkomplett wirkt. Während der ersten Stunde der Pellikelbildung steigt der Anteil der sauren prolinreichen Proteine auf 40 %, gealterte Pellikel weist nur noch 0,1 % dieser Proteine auf (BENNICK et al., 1983). Nach mehrtägiger Reifung erscheint die Pellikel kompakt und elektronendicht (LENZ, 1967; LIE, 1979), was auf die Veränderungen in der Proteinzusammensetzung und -konformation innerhalb der Pellikel schließen lässt (MAYHALL, 1970, 1975, 1977; HAY und MORENO, 1979; BENNICK et al. 1983; EMBERY et al., 1986). Aufgrund der spezifischen Bindung der oralen Streptokokken mit entsprechenden Speichelproteinen (GIBBONS et al., 1985) resultieren aus Änderungen in der Pellikelzusammensetzung während der Reifung Verschiebungen in der bakteriellen Besiedlung. Zum Beispiel haftet *S. mutans* an gereiften Pellikeln, wenn die hochmolekularen Proteine mit den spezifischen Rezeptoren vorhanden sind (GIBBONS et al., 1986). Entgegen der Zunahmen von *S. mutans* mit Reifung der Plaque nimmt die Adhärenz von *S. sanguis* ab (PRATT-TERPSTRA et al., 1987). Vermutlich

geht dies mit der Abnahme niedermolekularer Proteine und der zeitlichen Verminderung der PRP einher (BENNICK et al., 1983; LOOMIS et al., 1987).

Untersuchungen zum *zeitlichen Verlauf der Pellikelbildung* zeigten, dass eine erfassbare Pellikelschicht eine Minute nach Exposition der Schmelzproben in der Mundhöhle vorlag (HANNIG, 1999). Nach SKØRLAND et al. (1995) wurde die initiale Pellikeldicke nach 2 bis 3 min erreicht. Auf diesem Niveau verharrte die Pellikel ca. 30 min, verdreifachte sich anschließend und blieb für das untersuchte Zeitintervall von 10 Stunden konstant. Anhand von röntgenphotoelektronenspektroskopischen Studien (KUBOKI et al., 1987) wurde ein Anstieg bis zur 30. Minute und ein Plateau der Adsorption nach 90 min ermittelt. Bei Beobachtungen über 30, 60, 90 und 120 min wurde eine Stagnation der Menge an Aminosäuren nach 90 min analysiert (SØNJU und RØLLA, 1973). ÖSTE et al. (1981) schlossen auf eine endgültige Dicke der Pellikel nach 1 bis 2 Stunden. Weitere Studien benennen für das Eintreten eines Gleichgewichtes zwischen Adsorption und Desorption eine Zeit von 2 Stunden. Der Nachweis von Bakterien auf in der Mundhöhle getragenen Schmelzsplinten gelang erst nach 4 Stunden (LIE, 1975).

2.3.4 Bisherige Untersuchungstechniken der Pellikel

Die geringen Mengen an Pellikel, die gewonnen werden können, limitierten die Untersuchungen der Pellikelproteine zunächst auf die *Analyse der Aminosäuren*. Solche Studien wurden zahlreich vorgenommen (ARMSTRONG, 1966, 1967; LEACH, 1967; LEACH et al., 1967; ARMSTRONG und HAYWARD, 1968; HOPPE, 1970; MAYHALL, 1970, 1975, 1977; SØNJU und RØLLA, 1973; ÖSTE et al., 1981; EGGEN und RØLLA, 1982, 1983; KUBOKI et al., 1987; AL-HASHIMI und LEVINE, 1989; RYKKE et al., 1989). Neben der Aminosäurenanalyse wendeten SKØRLAND et al. (1995) die Auger-Elektronenspektroskopie an. Weitere Untersuchungen widmeten sich den *strukturellen und morphologischen Aspekten* der Pellikel unter Anwendung elektronenmikroskopischer (LEACH und SAXTON, 1966; LENZ, 1967) gekoppelt mit phasenkontrastmikroskopischen Verfahren (ARMSTRONG und HAYWARD, 1968). Weiterhin erfolgten Beobachtungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (BUSSCHER et al., 1989; HANNIG und BÖSSMANN, 1989; HANNIG, 1993) und Rasterelektronenmikroskopie (EWERS et al., 1977; MEURMAN und FRANK, 1991). Mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie untersuchte KUBOKI et al. (1987) am Schmelz adsorbierte Speichelbestandteile. LEACH und APPLETON (1981) nahmen Untersuchungen zur

Ultrastruktur von Pellikel- und Plaquekomponenten mit Hilfe der energiedispersen Röntgenmikroanalyse vor.

Chemische Analysen von Makromolekülen in der 2-Stunden-Pellikel wurden mittels Gel-Filtration und Ionenaustauschchromatographie von EGGEN und RØLLA (1982) durchgeführt. Anhand radioaktiver Markierung untersuchten FISHER et al. (1987) die Pellikelkomponenten. KOUSVELARI et al. (1980) gelang der immunochemische Nachweis der PRP im Speichel und in der Pellikel. Ebenfalls mit immunochemischen Methoden nahmen RUAN et al. (1986) quantitative Bestimmungen von in vitro adsorbierten Speichelproteinen an Schmelz und Zement vor. Weitere analytische Bestimmungen erfolgten chromatographisch (BERNARDI et al., 1972), teilweise auch mit Hydroxylapatitsäulen (MORENO et al., 1984) und auch mittels Flüssigkeitsgaschromatographie (ÖSTE et al., 1981).

JENSEN et al. (1992) analysierten die aus verschiedenen Speicheldrüsensekreten experimentell erzeugten Pellikelarten mittels Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie kombiniert mit Gelfiltration. LAMKIN et al. (1996) wendeten ebenfalls die Gelfiltration zur Pellikelanalyse an. Anhand SDS-Page und Immunblotting untersuchten CARLÉN et al. (1998) in vivo und in vitro gebildete Pellikel. Aktuellste Studien bedienten sich der Massenspektrometrie (YAO et al., 2001).

3 Zielstellung

Große Bedeutung für die Integrität der Zahnhartsubstanz und somit auch für den kariösen Prozess kommt der Schmelzpellikel zu, einem aus Speichelproteinen auf der Zahnoberfläche gebildeten Proteinfilm. Dieser Proteinfilm kann einerseits die destruktive Säurewirkung auf den Zahnschmelz hemmen, verzögert aber andererseits auch den reparativen Remineralisationsprozess. Aus dem spezifischen Speichel jedes Individuums resultiert möglicherweise eine Pellikel mit individualspezifischen Eigenschaften. Neben zahlreichen Untersuchungen der Pellikel zur Aminosäurezusammensetzung, der Struktur, Funktion und Morphologie, richten die chemischen Analysen ihr Augenmerk meist auf bestimmte einzelne Pellikelkomponenten.

In der vorgelegten Arbeit sollte hauptsächlich der Frage nach dem Proteinspektrum der In-vitro-Pellikel nachgegangen werden. Da der physikochemische Prozess der Adsorption durch die selektive Bindung von Proteinen eine uniforme Pellikel entstehen lässt, könnte hypothetisch aus Differenzen in der Speichelproteinzusammensetzung eine einheitliche oder individuell variable Pellikelzusammensetzung resultieren.

Dazu sollte unter In-vitro-Bedingungen mit Hydroxylapatitpulver eine große „Pseudo-Schmelzoberfläche“ geschaffen werden, an der es gelingt, quantitative Studien der Proteinbindung vorzunehmen. An einer definierten Apatitmenge sollte die Pellikelbildung während einer Stunde studiert und die selektive Wechselwirkung einzelner Bestandteile mit dem Apatit untersucht werden.

Die Zusammensetzung des unstimulierten und stimulierten Speichels und die Kinetik der Pellikelbildung sollte mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie bestimmt werden. Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund:

1. Untersuchung der individuellen Variationen der Proteinzusammensetzung des Speichels
2. Schaffung eines In-vitro-Modells zur Pellikelbildung und Analyse der Pellikelzusammensetzung
3. Qualitative und quantitative Korrelation zwischen Speichel- und Pellikelzusammensetzung

4 Material und Methode

4.1 Probandengut

Die Probanden waren 11 gesunde Personen im Alter von 34 ± 10 Jahren. Darunter befanden sich 8 Frauen und 3 Männer. Sie wiesen eine gute Mundhygiene mit einem Approximalraum-Plaque-Index zwischen 25 % bzw. 39 % auf (API; Lange et al. ,1986). Der Zustand des Parodonts nach dem Papillenblutungsindex (PBI; Saxer und Mühlemann, 1975) war in den meisten Fällen als klinisch gesund einzustufen. Bei 4 Probanden mit einem PBI bei 20 % lag eine schwache Entzündung vor. Die DMF-T- bzw. DMF-S-Indices nach KLEIN et al. (1938) waren relativ hoch. Alle Probanden waren saniert. Die mit Dentocult SM und Dentocult LB ermittelten Keimzahlklassen für *S. mutans* bzw. Lactobazillen waren individuell unterschiedlich (Tab. 4).

Tab. 4: Probandendaten in Hinsicht auf Alter, Geschlecht, Zahngesundheit, Hygienestatus und mikrobiologische Daten

Nr.	Alter	Geschlecht	DMF-T	DMF-S	API	PBI	SM*	LB*
1	24	w	6	12	24	0	2	3
2	37	w	10	21	21	11	3	0
3	37	w	11	29	38	7	1	1
4	37	w	11	27	23	12	0	0
5	24	w	3	5	21	11	0	2
6	24	m	9	29	32	8	1	2
7	44	w	17	52	38	19	3	1
8	24	w	14	26	21	0	2	2
9	28	m	12	32	14	7	1	1
10	33	w	17	69	5	8	0	0
11	34	m	13	36	11	4	3	1

*SM- und LB-Werte mit dem chairside Test Dentocult® bestimmt

4.2 Speichelgewinnung

Von jedem dieser 11 Probanden wurde unstimulierter und stimulierter Mischspeichel sowie Parotisspeichel gewonnen.

4.2.1 Gewinnung von unstimuliertem Mischspeichel

Jeder Proband sammelte den Speichel in einem auf Eis gelagerten Plastikgefäß mit einer Volumenkapazität von 8 ml (Firma Brand, Wertheim/Main) und einem Trichter. Der Proband wurde aufgefordert, den gesamten Speichel ohne Stimulation im Mundraum zu sammeln und etwa ein- bis zweimal pro Minute in das Röhrchen zu spucken. Diese Methode wird *spitting method* genannt (NAVAZESH und CHRISTENSEN, 1982). Nach 4 min wurde das Plastikgefäß 10 min bei 4000 U/min und 4 °C zentrifugiert (Biofuge 22 R, Heraeus Sepatech GmbH, Osteroda). Der Überstand wurde in ein neues Plastikgefäß überführt, anschließend in eine Einwegspritze aufgezogen und durch einen „Minisart RC 25“ mit einer Porengröße von 0,20 µm (Sartorius AG, Göttingen) filtriert. Das Filtrat wurde in Volumina a 150 µl (mindestens 3 Proben) bis zur analytischen Aufarbeitung bei –20°C gelagert. Von jedem Probanden wurde zu vier Tageszeiten (8, 10, 12, 14 Uhr) Speichel gewonnen. Außer diesem Tagesprofil erfolgten je Proband 5 weitere Speichelnahmen im zweiwöchigen Abstand, um die Übereinstimmung der Speichelproben zu untersuchen.

4.2.2 Gewinnung von stimuliertem Mischspeichel

Als Stimulus kauten die Probanden 2 min lang eine Paraffinkapsel und gaben etwa aller 30 s den Speichel in ein eisgekühltes Gefäß ab. Die Gewinnungszeiten und die Aufbereitung dieses stimulierten Speichels bis zur Lagerung erfolgte analog der Prozedur des unstimulierten Mischspeichels.

4.2.3 Gewinnung von Parotisspeichel

Um reinen Speichel der Glandula parotidis zu erhalten, bevor eine Vermischung mit den Sekreten der anderen Speicheldrüsen in der Mundhöhle stattfindet, wurde der Parotisspeichel an der Papilla parotidea in Höhe des zweiten oberen Molaren aufgefangen. Dazu dienten Lashley-Kappen, die dankenswerterweise von Dr. N. Takai (Osaka, Dental University, Japan) zur Verfügung gestellt wurden. Die aus Polyethylen bestehenden Kappen weisen einen inneren und einen äußeren Ring auf. Zu jedem Kompartiment führt ein dünner Plastikschauch. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks mit einer Einwegspritze wurde die Kappe direkt über der Papille fixiert. Als Stimulus lutschte der Proband ein Zitronensäurebonbon mit 1,0 %iger Zitronensäure (Sula GmbH & Co. KG, Metelen). Auf diesen Reiz hin konnte der Parotisspeichel über den inneren Hohlraum

der Lashley-Kappe und den daran angeschlossenen Schlauch in das bereits beschriebene gekühlte Röhrchen fließen. Die Sammelzeit betrug 2 min. Im Unterschied zur Aufbereitung des Mischspeichels entfiel die Zentrifugation und Filtration. 3 Proben mit je 150 µl wurden bei –20°C aufbewahrt.

Durch Differenzwägung der Plastikgefäße vor und nach der Speichelnahme konnten die Fließraten bei jeder Speichelnahme bestimmt werden (Tab. 5).

Tab. 5: Mittlere Fließraten der 11 Probanden für den unstimulierten und stimulierten Mischspeichel sowie den stimulierten Parotisspeichel

	Fließraten in ml/min		
	Mischspeichel		Parotisspeichel
	<i>unstimuliert</i>	<i>stimuliert</i>	<i>stimuliert</i>
	n = 55	n = 55	n = 10
1	0,90	3,10	1,09
2	0,66	2,35	0,82
3	0,36	0,83	0,41
4	0,38	2,36	0,31
5	0,87	2,45	1,16
6	0,68	1,63	-
7	0,58	1,81	0,78
8	0,83	3,30	0,54
9	0,66	2,01	0,64
10	0,73	2,44	0,82
11	0,77	2,03	0,33
\bar{x}	0,67	2,21	0,69

4.3 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure-Assay

Zur quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes des Speichels wurde der von SMITH et al. (1985) veröffentlichte Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) angewendet. Es handelt sich um eine kolorimetrische Methode, bei der die Biuret-Reaktion mit der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} abläuft und durch einen Farbkomplex verstärkt wird (Abb. 1).

Aufgrund dieser Farbreaktion war die quantitative Bestimmung von Proteinen am Spektralphotometer möglich. Der Farbkomplex hat ein Adsorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm; die Farbintensität gehorcht dem Lambert-Beerschen-Gesetz und steht in direkter quantitativer Korrelation zur vorgelegten Proteinmenge.

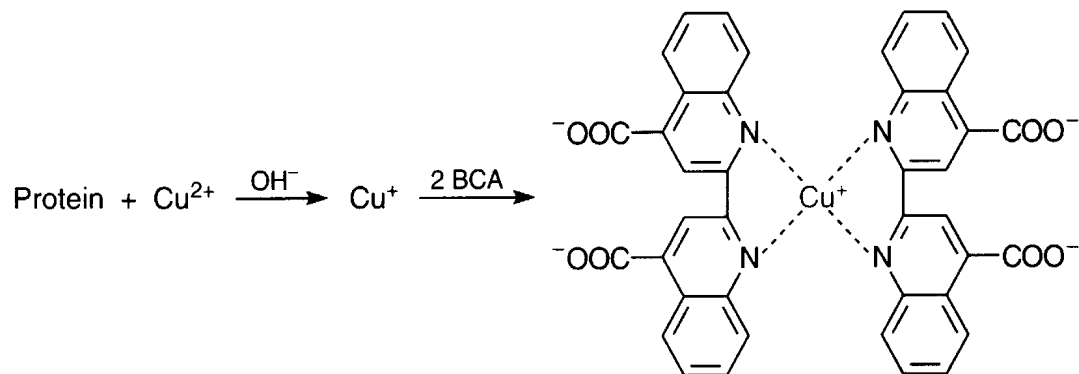


Abb. 1: Der Bicinchoninsäure-Assay mit der selektiven Bicinchoninsäure-Komplexierung von Cu^{2+} .

Als Standard für den Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (SIGMA®, Steinheim) diente Rinder-Serum-Albumin (BSA) mit einer Konzentration von 1 mg/ml. Mit verschiedenen Verdünnungen von BSA mit 0,85%igem NaCl wurde mit dem Spektralphotometer (Spectronic® Genesys 5) eine Eichkurve (Abb. 2) mit folgenden Lösungen erstellt:

100 µl Proteinlösung (Verdünnungen des Protein-Standards BSA mit 0,85% NaCl von 0,2 – 1,0 mg/ml)
 +
 2000 µl BCA-Proteinbestimmungslösung (1 Teil Cu(II)SO_4 , 50 Teile BCA-Lösung).

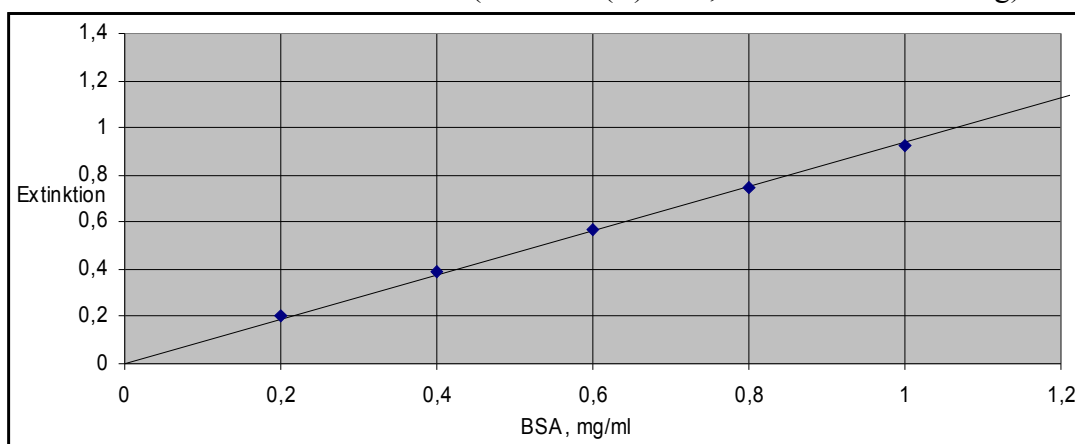


Abb. 2: Eichkurve der Verdünnungen des BSA-Standards mit der entsprechenden Extinktion

Zur Proteinbestimmung wurden 50 µl Speichel mit 50 µl NaCl verdünnt und mit 2 ml Proteinbestimmungslösung gemischt. Diese bestand aus 1 Teil 4%igem Cu(II)SO₄ und 50 Teilen Bicinchoninsäurelösung. Das Gemisch wurde bei 37°C für 30 min inkubiert und 20 min auf Zimmertemperatur (21°C) abgekühlt. Bei einer Wellenlänge von 562 nm erfolgte im Spektralphotometer eine Doppelbestimmung des Proteingehaltes bei 1 cm Schichtdicke. Die Extinktion der Proteinbestimmungslösung (2 ml BCA-Lösung + 100 µl NaCl) stellte den Leerwert dar. Von der gemittelten Extinktion wurde jeweils der Leerwert subtrahiert. Die gemessene Extinktion wurde nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz zur Berechnung der Proteinkonzentration folgendermaßen benutzt.

$$c = \frac{(Extinktion - Leerwert)}{m} \cdot Verdünnungsfaktor$$

m (Anstieg der Eichkurve) = 1,029727273

$$Verdünnungsfaktor = \frac{Gesamtvolumen}{Speichelvolumen} = \frac{50 \mu l \text{ Speichel} + 50 \mu l \text{ NaCl}}{50 \mu l \text{ Speichel}} = 2$$

Unter Berücksichtigung der 1:2 Verdünnung wurde die Proteinkonzentration berechnet.

4.4 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

4.4.1 Prinzip

Bei der HPLC (*engl.: High Performance Liquid Chromatography*) handelt es sich um eine Methode zur Analyse löslicher fester und flüssiger Substanzgemische. Mit ihrer Hilfe können sehr komplexe Gemische qualitativ und quantitativ getrennt werden. Die Trennung der Komponenten ist aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften, wie Molekülgröße oder Polarität möglich. Im benutzten System wird die HPLC mit chemisch gebundener apolarer Umkehrphase verwendet (RPLC: Reversed Phase Liquid Chromatography), die von einem polaren Lösungsmittel durchströmt wird. Dabei erfolgt eine Rückhaltung solvatisierter Stoffe wie beispielsweise Aminosäuren, Peptide und Proteine an der apolaren stationären Phase (ACED und MÖCKEL, 1991).

Die chromatographische Trennung der Speichelproteine erfolgte mit der LC 1100 (Hewlett Packard, Waldbronn). Die mobile Phase (das Eluens) durchströmt angetrieben von einer Hochdruckförderpumpe mit konstanter Flussrate von 0,6 ml/min die mit Füllmaterial gepackte Trennsäule (Abb. 3). Als Füllmaterial wurde ein oktyl-alkyliertes Silikagel

verwendet (C8-Zorbax, Porendurchmesser 300 Å, Hewlett Packard). Die Säule wurde auf 35°C temperiert. Das Elutionsmittel war ein Wasser/Acetonitril-Gemisch unter Zusatz von 0,05% Trifluoressigsäure (TFA) als Ionenpaar-Reagenz. Über einen gekühlten Probengeber (4°C) werden jeweils 50 µl des Speichels automatisch in die Anlage injiziert. Zu einem Zeitpunkt $t = 0$ wird die Speichelprobe unmittelbar am Säulenanfang in die mobile Phase gegeben und von dieser durch die Säule transportiert. Die mobile Phase, d.h. das Wasser/Acetonitril-Gemisch war im zeitlichen Verlauf der chromatographischen Trennung wie folgt zusammengesetzt: Der Gemisch-Gradient startete mit 5% Acetonitril (ACN) unter seiner linearen Zunahme auf 40% bis zur 15. Minute und nochmaligem Anstieg auf 95% bis zur 20. Minute. Die Zusammensetzung wurde bis zur 30. Minute beibehalten. Das Elutionsmittel wurde somit in zunehmendem Maße apolarer. Durch die zuvor vorgenommene Optimierung des Gradienten konnten die prolinreichen Proteine weitestgehend von den anderen Proteinen getrennt werden (KEHRER, 1999).

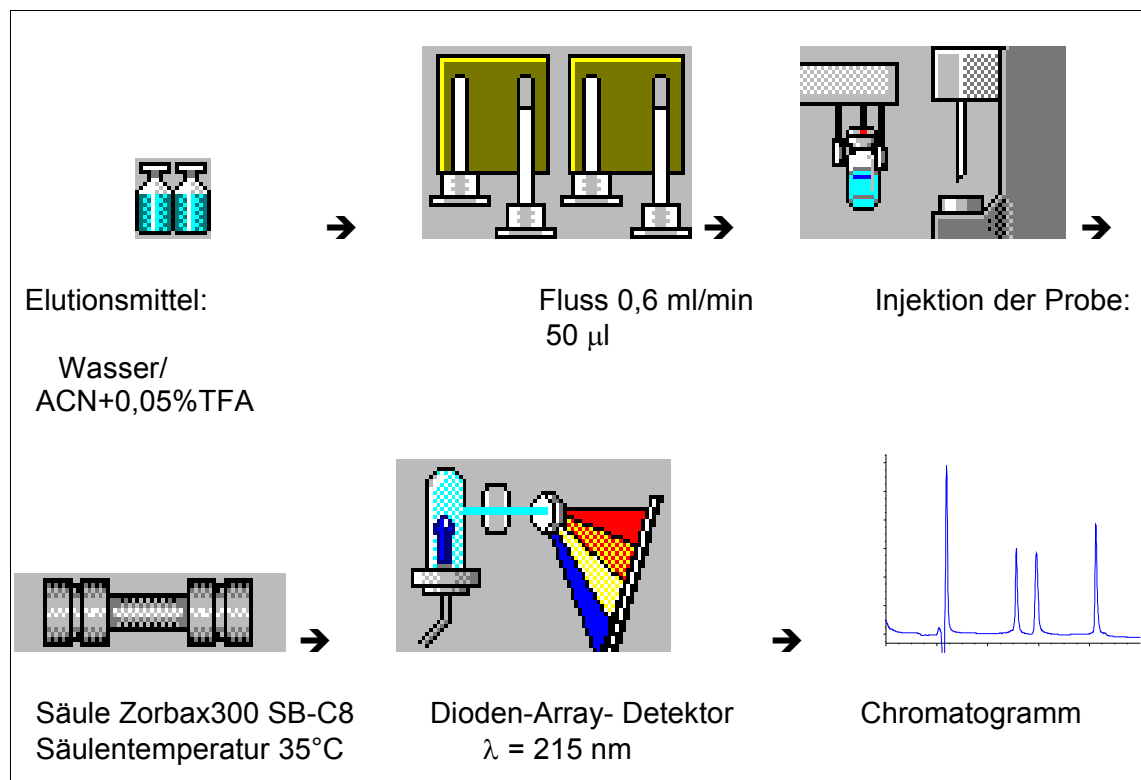


Abb. 3: Schematische Darstellung der HPLC-Methode

Während der Trennung wechseln die verschiedenen Speichelproteinmoleküle viele Male von der mobilen in die stationäre Phase, wobei die Verweildauer an der stationären Phase für die Speichelproteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität verschie-

den groß ist. Hierdurch verlassen die einzelnen Komponenten zeitlich voneinander getrennt nacheinander die Säule. Aufgrund der abnehmenden Polarität des Elutionsmittels werden letztendlich alle Komponenten von der Säule eluiert. Die getrennten Proteine werden nach Verlassen der Säule von einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 215 nm erfasst. Bei diese Wellenlänge werden die Peptidbindungen im Protein zu Schwingungen angeregt, wodurch UV-Strahlung absorbiert wird. Die UV-Absorption bildet das Messsignal, durch das das Chromatogramm sichtbar gemacht wird. Den unterschiedlichen Retentionszeiten der Speichelproteine entsprechend setzt sich das Chromatogramm aus einzelnen Peaks und Peakgruppen zusammen.

4.4.2 Probenaufbereitung für die HPLC-Anlage

Zur Injektion von 50 µl Speichel wurden Portionen a 100 µl in Glaseinsätze der Probengefäße pipettiert und für die Analyse in den Probengeber bei 4°C gestellt. Um lange Standzeiten wegen der Thermolabilität der Proteine zu vermeiden, wurden jeweils nur 6 Proben gleichzeitig im Autosampler bereitgestellt.

Zur Analyse bot sich folgendes Zeitregime für die kontinuierliche Analyse der Speichelproben an:

1. – 6. Probe	0 min	6 x 40 min	
7. – 13. Probe	240. Min	6 x 40 min	
14. – 20. Probe	480. Min	6 x 40 min	usw.

Die sechste Probe lagerte maximal 3,5 Stunden bis zur Injektion im Probengeber bei 4°C. Die Thermolabilität der Speichelproteine wurde bei 4°C sowie 37°C bis zu 8 Stunden kontrolliert.

4.4.3 Analyse der Chromatogramme

4.4.3.1 Qualitative Identifikation der Speichelproteine

Die Identifizierung der Speichelproteine erfolgte aufgrund ihrer präzisen, reproduzierbaren Retentionszeiten sowie durch Ko-Elution von gereinigten Referenzproteinen. Die relativen Standardabweichungen der Retentionszeiten lagen unter 0,01% nach KEHRER et al. (1999). In der Abbildung 4 ist ein Chromatogramm mit folgenden Proteinen dargestellt: Histatin-5, PRP-1, PRP-3, Statherin und α -Amylase.

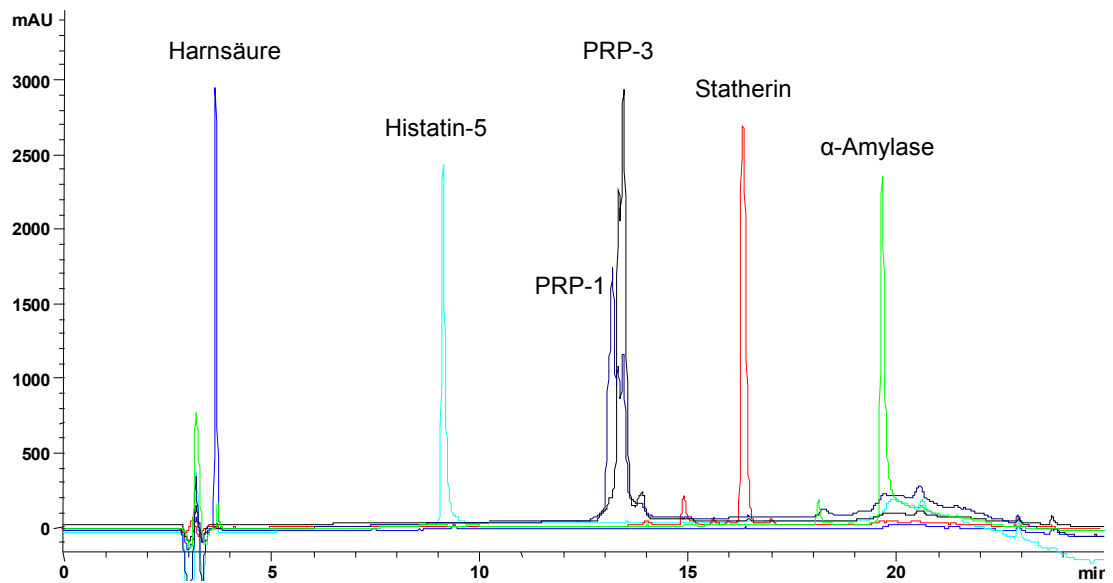


Abb. 4: Chromatogramm verfügbarer gereinigter Speichelreferenzproteine*

*Die gereinigten Proteine PRP-1, PRP-3 und Statherin wurden uns dankenswerterweise von Prof. N. Strömberg (Umea University, Dept. Cariology, Schweden) und das gereinigte Histatin-5 von Prof. F.G. Oppenheim (Boston University, Goldman School of Dental Medicine, Periodontology and Oral Biology, Massachusetts) zur Verfügung gestellt.

Da die chromatographische Trennung der Proteine nur unvollständig erfolgte, wurden die chromatographischen Profile nach KEHRER (1999) in 9 Proteingruppen, die von A bis I bezeichnet wurden, unterteilt (Abb. 5). Entsprechend der Referenzproteine und weiterhin massenspektrometrisch gewonnener Ergebnisse wurden die Gruppen wie folgt bezeichnet:

- A: Histatine und basische prolinreiche Proteine,
- B: 7,3 kD; 7,6 kD; 9,3 kD; 9,6 kD,
- C: unbekannt,
- D: saure PRP,
- E: Statherin,
- F: 5,8 kD,
- G: Cystatin (14,3 kD),
- H: Cystatin (14,2 kD),
- I: α-Amylase.

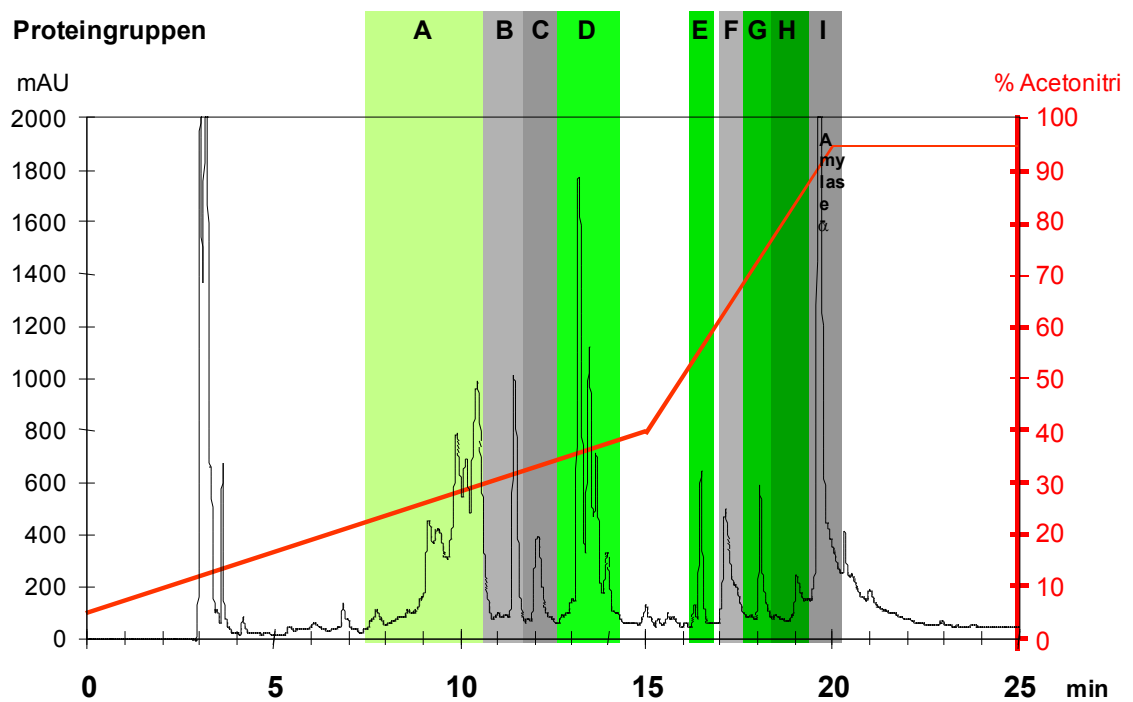


Abb. 5: Standardisiertes Proteinprofil von Mischspeichel, erhalten mit der HPLC unter Verwendung eines Wasser/Acetonitril-Gradienten

Mehrmalige Wiederholungen ($n = 5$) der Analyse eines Referenzspeichels ergaben folgende Reproduzierbarkeiten für die einzelnen Peakgruppen (Tab. 6):

Tab. 6: Variationskoeffizienten (VK) der Peakflächen eines Referenzspeichels ($n = 5$)

Proteinfraktionen	Variationskoeffizienten der Peakflächen (%)
A	1
B	2
C	8
D	3
E	10
F	1
G	4
H	3
I	4

Die relativen Standardabweichungen der Peakflächen lagen im allgemein akzeptierten Grenzbereich von 5 - 8 % (MEYER, 1990).

4.4.3.2 Quantitative Speichelanalyse

Zur quantitativen Auswertung wurden die Flächen der einzelnen Peaks bzw. Peakgruppen integriert. Um die Flächeneinheiten in eine Proteinmenge umzurechnen, wurde ein BSA-Standard (Firma Sigma) mit bekannter Proteinkonzentration von 1 mg/ml verwendet. Von diesem BSA-Standard wurden 0,5 ml mit 0,5 ml NaCl verdünnt und 50 µl in die HPLC-Anlage injiziert. Die Fläche des BSA-Peaks im resultierenden Chromatogramm wurde mit dem entsprechenden Computerprogramm integriert und als Bezugsbasis für die Speichelproteine verwendet.

4.5 Massenspektrometrie

Die weitere Auftrennung des Spektrums der Speichelproteine, insbesondere innerhalb der Hauptfraktion der PRP, erfolgte durch Kopplung eines Massenspektrometers (Hewlett Packard) an die HPLC. Nach der chromatographischen Trennung schließt sich die weitere Identifikation von Komponenten auf der Basis der Molekularmassenbestimmung an. Diese Kopplung wird als HPLC-MS bezeichnet (SHEEHAN, 2000). Bei dem angewandten Verfahren handelt es sich um Elektrospray mit Ionisierung (API-ES). Das Massenspektrometer erzeugt aus einer Substanzprobe einen Strahl gasförmiger Ionen mit deren anschließender Trennung nach Ladung und Masse. Es liefert Massenspektren, die Rückschlüsse auf die Zusammensetzung von Gemischen und bei Einzelsubstanzen auf deren Struktur ermöglichen (BUDZIKIEWICZ, 1998).

Der schematische Aufbau in der Abbildung 6 zeigt, dass die Proben nach chromatographischer Trennung in der HPLC über eine nadelartige Zerstäuberkapillare in das Massenspektrometer eingesprüht werden.

In dem sogenannten Elektrospray werden sehr kleine Tröpfchen gebildet, die in ein starkes elektrisches Feld geleitet werden. Das Aerosolgemisch aus Lösungsmittel und gelöster Probe wird eingedampft, so dass die Moleküle der versprühten Probe in der gasförmigen Phase verbleiben. Die Trocknung erfolgt unter Atmosphärendruck mit Stickstoff bei 350°C. Nach Entfernung der Lösungsmittelmatrix kommt es aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zur Coulomb-Explosion und Freisetzung von Ionen.

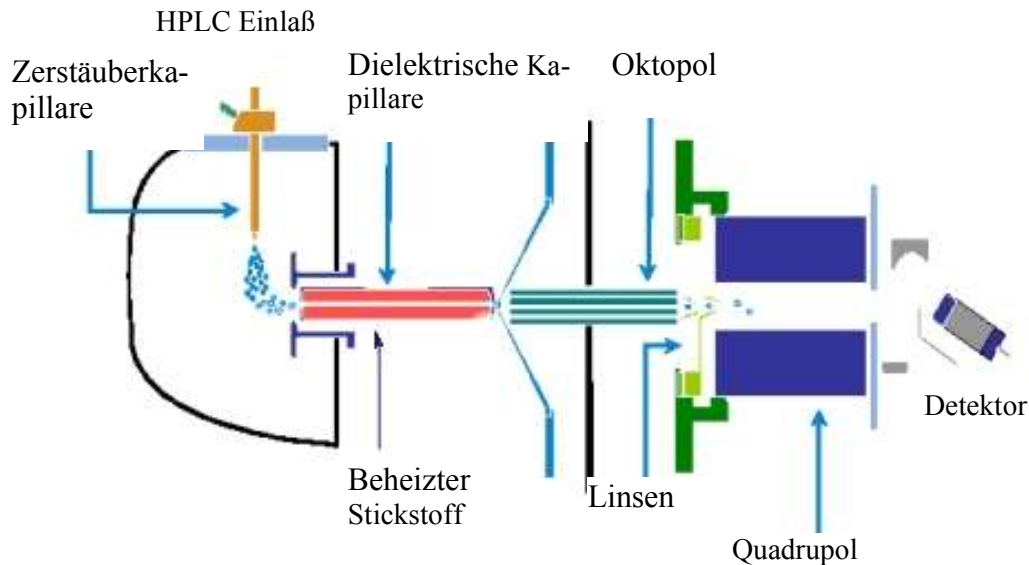


Abb. 6: Schematische Darstellung des Massenspektrometers

Der Ionisation der Moleküle folgt das Einleiten in den Analysator (das Quadrupol-Feld), wo die Ablenkung der gebildeten Ionen aus ihrer Flugbahn durch das Anlegen von starken elektrischen Feldern bewirkt wird. Das Quadrupol-Feld dient als Massenfilter und besteht aus vier im Quadrat angeordneten Metallstäben, zwischen denen sich durch Anlegen einer Wechselspannung abwechselnd positive und negative Felder aufbauen. Die Ablenkung der Ionen von der Mittelachse hängt von der Spannung, der Frequenz und der Masse der Ionen ab. So erfolgt die Trennung der Ionen anhand ihrer unterschiedlichen Masse-Ladungsverhältnisse. Im Analysator liegt ein Hochvakuum von $1 \cdot 10^{-5}$ Torr vor. Der Detektor erfasst die massenspektrometrischen Signale (Abb. 7) von mehrfach geladenen Ionen.

Die Masse-Ladungsverhältnisse (m/z) der Massenspektren ermöglichen unter Benutzung eines Deconvolutionsprogrammes die Berechnung von Molekularmassen. Das Deconvolutionsprogramm berechnete in diesem Beispiel aus den Masse-Ladungsverhältnissen die Molekularmasse von 15515 kD.

Der Vergleich der erhaltenen Molekularmassen mit solchen aus Proteindatenbanken (BARKER et al., 2000) gibt Hinweise auf die mögliche Identität des Proteins. So handelt es sich im Peak 1 in der Abbildung 7 um Vertreter der sauren prolinreichen Proteine: PRP-1/PRP-2. Die theoretische Molekularmasse beträgt in diesem Fall 15500 kD.

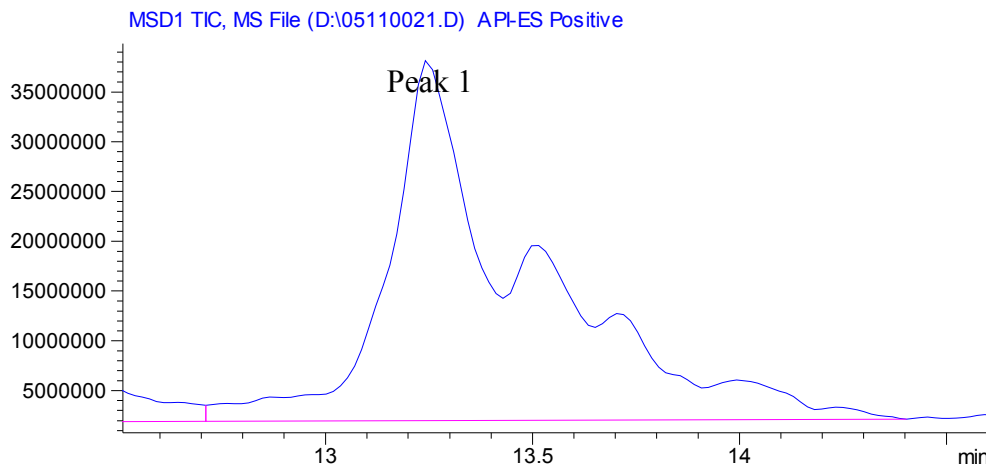


Abb. 7: Massenspektrometrisches Signal (Totalionenstrom) einer Speichelprobe; Ausschnitt der PRP

In vorangegangenen qualitativen Untersuchungen der Speichelproteine mit der HPLC wurde gereinigtes PRP-1 als Speichelreferenzprotein benutzt (Abb. 4). In den Chromatogrammen der Speichelproben wurde PRP-1 anhand der reproduzierbaren identischen Retentionszeiten identifiziert. So ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich hierbei um dieses Protein handelt sehr groß, denn es besteht Übereinstimmung in zwei Identifikationsmitteln, zum einen in der Retentionszeit und zum anderen in der Molekularmasse. Die weitere Anwendung der massenspektrometrischen Kopplung an die HPLC diente der Aufspaltung der Gruppe der PRP in ihre polymorphen Formen.

4.6 Varianzanalyse (Reliabilitätsuntersuchung)

Für die Beurteilung der intra- und interindividuellen biologischen Variation der Proteinmengen von unstimuliertem und stimuliertem Mischspeichel über einen Zeitraum von 12 Wochen wurden 5 Wiederholungsuntersuchungen und die Reliabilitätsanalyse nach FLEISS (1986) verwendet.

Mit dieser Analyse, die zur Untersuchung der Übereinstimmung mehrerer Messzeitpunkte geeignet ist, wurde die intraindividuelle Varianz im Vergleich zur interindividuellen Variation untersucht. Als Daten gingen die Proteinmengen je Proteinfraction der 5 Wiederholungsmessungen von allen Probanden von unstimuliertem und stimuliertem Mischspeichel ein. Die Berechnung des Reliabilitätskoeffizienten R berücksichtigte die Varianz zwischen den Probanden (engl.: between-subjects variability, BMS) und innerhalb des Probanden (engl.: within-subject variability, WMS).

R besitzt folgende Eigenschaften: Der Reliabilitätskoeffizient nimmt Werte von 0 bis 1 an. Ergeben sich für R große Werte, so ist der Unterschied zwischen den Probanden groß im Verhältnis zu einem kleineren Unterschied innerhalb des Probanden.

Verallgemeinert dargestellt, war die Versuchsanordnung folgendermaßen:

Es wurde von mehreren Probanden (n=11) zu 5 Zeitpunkten (k=5) anhand der Proteinmengen von unstimuliertem und stimuliertem Mischspeichel die individuelle Varianz (s_n^2) und die Gesamtvarianz (s^2) bestimmt.

Subjekte	1. Messung	2. Messung	k. Messung		Mittelwert	Varianz
1	x_{11}	x_{12}	x_{1k}	k_1	\bar{x}_1	s_1^2
:	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:
n	x_{n1}	x_{n2}	x_{nk}	k_n	\bar{x}_n	s_n^2
				k	\bar{x}	s^2

n Anzahl der Subjekte (n=11)

x_{ij} i Subjekt (i = 1, 2,11)

j Messzeitpunkt (j= 1, 2, 5)

k_i Anzahl der Messwiederholungen des i-ten Subjekts

$$k = \sum_{i=1}^n k_i \quad \text{Gesamtzahl der Messungen (k = 55)}$$

$$\bar{x}_i = \frac{1}{k_i} \sum_{j=1}^{k_i} x_{ij} \quad \text{Mittelwert des i-ten Subjekts}$$

$$s_i^2 = \frac{1}{k_i - 1} \sum_{j=1}^{k_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \quad \text{Varianz des i-ten Subjekts}$$

$$\bar{x} = \frac{1}{k} \sum_i \sum_j x_{ij} = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^n k_i \bar{x}_i \quad \text{Gesamtmittelwert}$$

$$s^2 = \frac{1}{k-1} \sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x})^2 \quad \text{Gesamtvarianz}$$

$$BMS = \sum k_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$$

$$WMS = \sum (k_i - 1) s_i^2$$

$k_0 = 5$ Anzahl der Wiederholungen

Der Reliabilitätskoeffizient lässt sich nach FLEISS (1986) folgendermaßen berechnen:

$$R = \frac{BMS - WMS}{BMS + (k_0 - 1) \cdot WMS}$$

4.7 Methode der In-vitro-Pellikelbildung

4.7.1 Speichelgewinnung für die Pellikelbildung

Von 10 Probanden wurde stimulierter Mischspeichel (14 Uhr) 10 min lang gesammelt, zentrifugiert und filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf).

4.7.2 Prinzip der In-vitro-Pellikelbildung

Für die Untersuchungen der In-vitro-Pellikelbildung diente synthetisches Hydroxylapatit (Fluka, Fast Flow Grade) mit einer spezifischen Oberfläche von $60\text{-}80\text{ m}^2/\text{g}$ als Modell für den Zahnschmelz. Der stimulierte Mischspeichel wurde mit synthetischem Hydroxylapatit in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 37°C unter ständigem Mischen suspendiert. Auf diese Weise sollte die Bildung der Pellikel in der Mundhöhle in vitro simuliert werden. Nach einer vorgegebenen Zeit wurde die Suspension zentrifugiert, der an Proteinen verarmte Speichelüberstand (150 μl) für die Analyse entnommen. Die experimentell erzeugte Pellikel wurde durch Auflösung des Hydroxylapatits gewonnen.

4.7.3 Pellikelbildung mit einmaliger Speichelzugabe

In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden jeweils ca. 10 mg Hydroxylapatit eingewogen und mit 1 ml Speichel versetzt. Zusätzlich wurde ein Kontrollspeichel ohne Hydroxylapatit mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde der Überstand durch Zentrifugieren (4000 U/min, 2 min) vom Hydroxylapatit getrennt. Das proteinbeladene Hydroxylapatit wurde mit je 1 ml Aqua dest (Merck) dreimal für jeweils 2 min im Thermomixer gewaschen und anschließend abzentrifugiert. Diese drei wässrigen Überstände wurden als H₂O-Probe 1, 2 und 3 analysiert. Das Ablösen der Pellikel erfolgte mit 1 ml 2%iger TFA. Diese Pellikel wurde als „P60“ bezeichnet (Abb. 8).

4.7.4 Pellikelbildung mit mehrmaliger Speichelzugabe

10 mg Hydroxylapatit wurden viertelstündlich mit 1 ml Speichel versetzt und im Thermomixer bei 37°C suspendiert. Dazu existierte wiederum ein paralleler Kontrollspeichel. Der Viertelstundenrhythmus sollte den Speichelfluss simulieren. Der Adsorptionsprozedur schloss sich der dreimalige Waschprozess mit je 1 ml Aqua dest an. Die Auflösung erfolgte ebenfalls mit ca. 1 ml 2%iger TFA. Alle Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt und als Pellikel „P-4x15“ bezeichnet. Die Analyse aller Proben erfolgte mit der HPLC (Abb. 8).

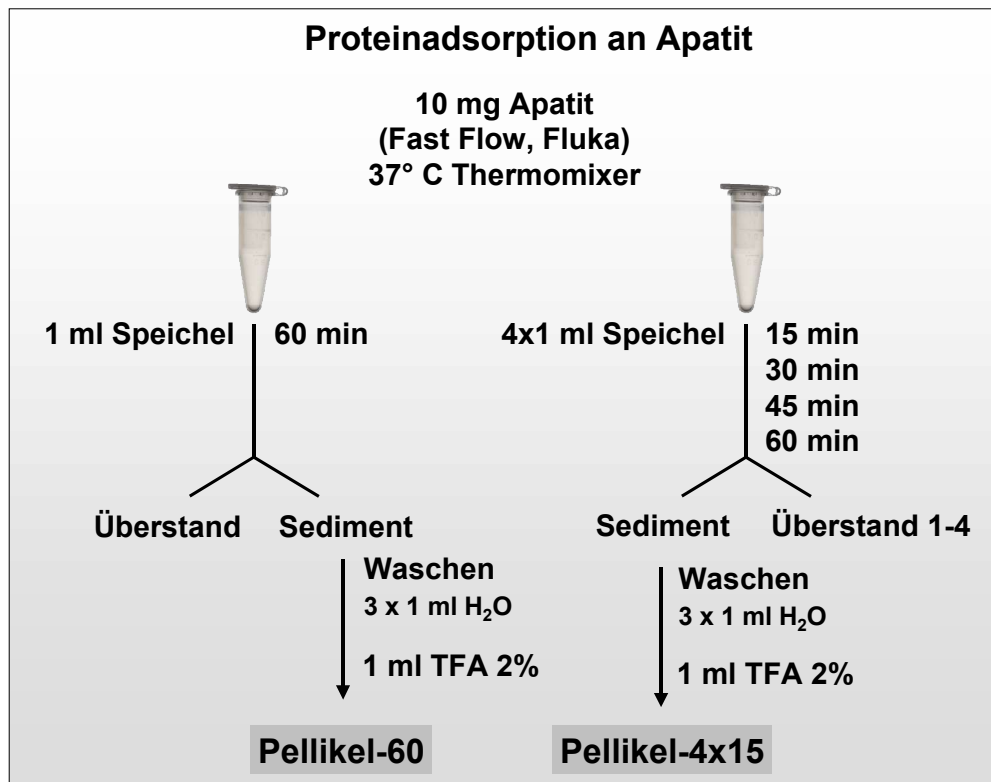


Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Pellikelbildung in vitro

4.7.5 Ablösung der Pellikel vom Hydroxylapatit

Um die experimentelle Pellikel von der Oberfläche abzulösen, wurde Trifluoressigsäure (TFA) getestet. Dabei erfolgte die Variation der Konzentrationen von TFA (Tab. 7).

Tab. 7: Variation der Säurekonzentrationen und der Hydroxylapatitmengen zur Auflösung des Apatits (+ ja; - nein)

Säure (1 ml)	Konzentration	Hydroxylapatit, mg	Auflösung
TFA	0,05 %	10	-
	1 %	10	-
	2 %	10	+
	5 %	10	+

Allein die Auflösung mit 2%iger bzw. 5%iger TFA verlief vollständig, wenn 1 ml zu 10 mg Hydroxylapatit zugegeben wurden. Die niedrigeren Konzentrationen führten nicht zu einer befriedigenden Auflösung des Apatitsediments.

4.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 9.0) für Windows. Für alle Messwerte wurden Mittelwerte, Medianwert und Standardabweichung ermittelt. Zur Untersuchung der Unterschiede zwischen den Speichelarten in Bezug auf Proteinmengen und Fließraten wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Beim Vergleich mehrerer unabhängiger Variablen wurde der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Zur Prüfung linearer Zusammenhänge wurde die bivariate Korrelation nach Pearson und Spearman verwendet. Die Untersuchung der intra- und interindividuellen Varianz erfolgte anhand der Reliabilitätsanalyse nach FLEISS (Kapitel 4.6). Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf $p < 0,05$ festgelegt.

5. Ergebnisse

5.1 Quantitative Gesamtproteinbestimmung

5.1.1 Tageszeitliche Proteinprofile des unstimulierten und stimulierten Mischspeichels sowie des Parotisspeichels mit dem BCA-Assay

Der mit dem Bicinchoninsäure-Assay ermittelte durchschnittliche Gesamtproteingehalt von 11 Probanden zeigte einen Anstieg im unstimulierten Mischspeichel von 0,64 auf 0,94 mg/ml im Tagesverlauf. Der Proteingehalt gegen 12:00 und 14:00 Uhr höher als gegen 8:00 Uhr ($p \leq 0,02$) (Tab. 8).

Tab. 8: Proteinmengen und Fließraten der drei Speichelarten im Tagesverlauf

	Mischspeichel				Parotisspeichel	
	unstimuliert (n = 11)		stimuliert (n = 10)		stimuliert (n = 10)	
	Protein	Fließrate	Protein	Fließrate	Protein	Fließrate
	mg/ml	ml/min	mg/ml	ml/min	mg/ml	ml/min
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
8 Uhr	0,64 ± 0,23	0,70 ± 0,27	1,04 ± 0,44	2,20 ± 0,69		
10 Uhr	0,79 ± 0,27	0,82 ± 0,34	0,99 ± 0,32	2,36 ± 0,78		
12 Uhr	0,89 ± 0,29	0,76 ± 0,34	1,06 ± 0,32	2,26 ± 0,64		
14 Uhr	0,94 ± 0,38	0,72 ± 0,26	1,05 ± 0,47	2,18 ± 0,69	1,34 ± 0,58	0,69 ± 0,30
\bar{x}	0,81 ± 0,31	0,75 ± 0,29	1,04 ± 0,38	2,25 ± 0,68		

Die Fließraten des unstimulierten und stimulierten Mischspeichels weisen keine tageszeitlichen Unterschiede auf ($p = 0,905$). Die durchschnittliche Fließrate des unstimulierten Mischspeichels betrug $0,75 \pm 0,29$ ml/min bzw. $2,25$ ml/min bei stimuliertem Speichel.

Es bestand keine Korrelation zwischen dem Proteingehalt und der Fließrate des Ruhespeichels ($r = -0,108$ nach Pearson). Der stimulierte Mischspeichel wies eine negative

Korrelation ($r = -0.6$ nach Pearson) zwischen Proteingehalt und Fließrate auf. Es bestand keine Abhängigkeit der Fließrate und des Proteingehalts von der Tageszeit.

Der stimulierte Mischspeichel ($n = 10$) hatte keine tageszeitlichen Schwankungen in der untersuchten Spanne von 8 bis 14 Uhr ($p = 0,714$), aber einen höheren Proteingehalt von 1,04 mg/ml als der unstimulierte Mischspeichel mit 0,81 mg/ml.

Tagesprofile des *Parotisspeichels* wurden nicht bestimmt. Der durchschnittliche Proteingehalt betrug 1,34 mg/ml, die durchschnittliche Fließrate des Parotisspeichels lag bei 0,69 ml/min und variierte zwischen 0,31 - 1,16 ml/min.

5.1.2 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes mit der HPLC-Methode

Der Vergleich der Proteinkonzentration, die auf Basis der HPLC-Analyse mit einem BSA-Standard berechnet wurde, ergab für alle Speichelarten höhere Proteinwerte als mittels der BCA-Methode (Tab. 9). Mit beiden Bestimmungsmethoden bestand ein signifikanter Unterschied im Proteingehalt von unstimuliertem und stimuliertem Mischspeichel, während der höhere Gehalt des Parotisspeichels gegenüber dem stimulierten Mischspeichel nicht signifikant war.

Tab. 9: Proteingehalt der drei Speichelarten mittels zweier Bestimmungsmethoden (BCA; HPLC) in mg/ml

	Speichel		
	unstimuliert	stimuliert	Parotis
BCA	0,8	1,04	1,34
HPLC	1,83	2,67	3,65

5.2 Stabilitätsuntersuchungen

Um das methodische Vorgehen bei der Inkubation des HA-Pulvers mit Speichel (37°C) und die Vorlage der Proben in der HPLC-Apparatur (4°C) hinsichtlich der Thermostabilität der Proteine zu überprüfen, wurde die Stabilität bei 37°C über 1 Stunde und bei 4°C über 4 Stunden anhand des HPLC-Spektrums eines Speichels überprüft. Weitgehend stabil war das thermolabile PRP-1 nach 2 Stunden bei 4°C (Tab. 10). Vierstündige Aufbewahrung im Probengeber führte zu einem Verlust von ca. 3% PRP-1. Bei separater Betrachtung eines Referenzspeichels während der Pellikelbildung musste nach 60-minütiger Inkubation im Thermomixer bei 37°C ein gewisser Verlust für die

Proteinfraktionen E und F hingenommen werden (E fiel von 23,5 auf 16,6 µg Protein/ml; F von 67,5 auf 57,2 µg Protein/ml). Auffällig stabil war α-Amylase.

Tab. 10: Stabilität der Speichelproteine A bis I unter Temperatureinfluss von 4°C und 37°C in einem Zeitintervall von 8 h (Peakhöhe in mm, Stabilität in %)

		4°C				37°C			
	Peakhöhe in mm	1 h %	2 h %	4 h* %	8 h %	1 h* %	2 h %	4 h %	8 h %
A	90	101	101	100	100	98	95	83	65
B	52	102	100	96	94	100	93	80	63
C	39	103	110	105	108	118	113	105	92
D	98	100	100	97	94	97	91	76	56
E	52	37	62	54	96	89	59	83	87
F	47	98	96	94	85	92	76	59	39
G	91	96	96	95	95	100	98	96	95
H	61	102	107	107	108	113	114	114	116
I	105	100	100	100	100	100	100	100	100

*Die Werte für die Bedingungen im Probengeber der HPLC-Apparatur bei 4°C über 4 h und im Thermomixer bei 37°C über 1 h sind hervorgehoben.

5.3 Proteinspektrum des Speichels

5.3.1 Proteinspektrum des stimulierten Mischspeichels eines Individuums

Von 11 Probanden wurden jeweils 5 Speichelanalysen des unstimulierten und stimulierten Mischspeichels untersucht, um die intra- und interindividuelle Variation zu bewerten. ($\bar{x} \pm SD$; VK). Die Zusammenfassung aller Werte für den stimulierten Mischspeichel zeigt die Tabelle 11.

In der Analyse ergaben sich keine qualitativen, jedoch individuelle quantitative Unterschiede (Tab. 11). Die Probanden 1 bzw. 7 wiesen den maximalen bzw. minimalen Gesamtprotein- und PRP-gehalt auf und spiegelten die individuelle Variation wider. Während Proband 7 mit Werten von 1,5 bis 2,3 mg/ml Gesamtprotein relativ stabil war, wiesen andere Probanden (8 und 6) relativ große intraindividuelle Schwankungen auf. Ungeachtet dessen war der relative Anteil der einzelnen Fraktionen stabil (Abb. 9).

Tab. 11: Mittelwerte der Proteinmengen in µg/ml des **stimulierten Mischspeichels** je Proband (n = 5)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe
	$\bar{x} \pm \text{SD}$ VK [%]	$\bar{x} \pm \text{SD}$ VK [%]	$\bar{x} \pm \text{SD}$ VK [%]	$\bar{x} \pm \text{SD}$ VK [%]	$\bar{x} \pm \text{SD}$ VK [%]	$\bar{x} \pm \text{SD}$ VK [%]	$\bar{x} \pm \text{SD}$ VK [%]	$\bar{x} \pm \text{SD}$ VK [%]	$\bar{x} \pm \text{SD}$ VK [%]	$\bar{x} \pm \text{SD}$ VK [%]
1	1652,59 ± 352,59 21	255,65 ± 68,58 27	290,78 ± 70,96 24	706,33 ± 130,76 19	40,26 ± 19,18 48	63,50 ± 12,30 19	49,74 ± 13,80 28	66,32 ± 14,27 22	471,52 ± 70,02 15	3596,70 ± 694,80 19
2	1107,94 ± 158,20 14	188,02 ± 5,22 3	57,82 ± 7,00 12	435,22 ± 58,18 13	47,80 ± 20,64 43	105,23 ± 11,46 11	52,41 ± 25,26 48	63,55 ± 5,48 9	323,50 ± 44,97 14	2381,50 ± 234,56 10
3	1402,28 ± 368,92 26	167,66 ± 38,97 23	278,41 ± 120,78 43	444,53 ± 136,03 31	18,72 ± 3,42 18	83,86 ± 28,05 33	97,01 ± 29,82 31	210,78 ± 74,88 36	117,60 ± 60,15 51	2820,84 ± 741,52 26
4	1247,08 ± 112,66 9	212,08 ± 60,28 28	153,85 ± 21,25 14	408,85 ± 28,15 7	25,58 ± 10,52 41	73,46 ± 11,87 16	56,52 ± 6,36 11	81,39 ± 23,49 29	209,68 ± 8,07 4	2468,50 ± 119,63 5
5	1292,06 ± 386,54 30	188,71 ± 65,20 35	91,98 ± 29,00 32	345,70 ± 87,47 25	26,16 ± 10,50 40	88,16 ± 21,48 24	44,69 ± 12,96 29	58,39 ± 12,43 21	542,29 ± 144,34 27	2678,15 ± 725,99 27
6	1317,85 ± 393,80 30	132,82 ± 26,45 20	43,55 ± 21,89 50	338,70 ± 152,55 45	70,72 ± 40,65 57	109,29 ± 32,16 29	112,77 ± 42,45 38	122,69 ± 18,90 15	769,21 ± 243,75 32	3017,58 ± 880,94 29
7	661,74 ± 112,41 17	60,63 ± 15,42 25	38,90 ± 12,63 32	312,28 ± 49,55 16	29,63 ± 13,29 45	45,03 ± 5,92 13	40,79 ± 5,92 12	83,73 ± 16,21 19	625,81 ± 100,10 16	1898,53 ± 266,85 14
8	629,32 ± 217,34 35	95,37 ± 37,54 39	16,01 ± 11,99 75	315,92 ± 147,87 47	21,05 ± 9,51 45	56,52 ± 21,10 37	34,43 ± 9,90 29	41,06 ± 7,19 18	611,49 ± 769,03 126	1821,17 ± 813,11 45
9	1261,82 ± 339,49 27	111,05 ± 22,44 20	232,09 ± 42,83 18	627,34 ± 153,98 25	36,04 ± 10,39 29	81,80 ± 23,96 29	51,46 ± 10,82 21	117,31 ± 38,42 33	536,09 ± 102,03 19	3055,00 ± 652,60 21
10	1456,88 ± 441,07 30	285,54 ± 72,54 25	0	635,37 ± 173,48 27	60,14 ± 26,44 44	154,08 ± 35,69 23	36,44 ± 2,80 8	77,91 ± 6,61 8	464,83 ± 89,82 19	3170,76 ± 821,14 26
11	1062,80 ± 343,29 32	117,06 ± 28,69 25	47,31 ± 14,28 30	450,76 ± 117,56 26	17,01 ± 4,65 27	108,37 ± 24,26 22	59,28 ± 11,18 19	76,36 ± 11,18 19	564,38 ± 78,64 14	2503,33 ± 608,15 24
\bar{x}	1190,21 ± 313,34 26	164,92 ± 69,24 42	113,70 ± 107,29 94	456,45 ± 139,00 30	35,74 ± 17,53 49	88,12 ± 30,39 34	57,78 ± 24,82 43	90,86 ± 46,36 51	476,04 ± 191,14 40	2673,82 ± 535,58 20

Die Resultate der einzelnen Messungen für den unstimulierten Mischspeichel befinden sich im Anhang (Tab. 20).

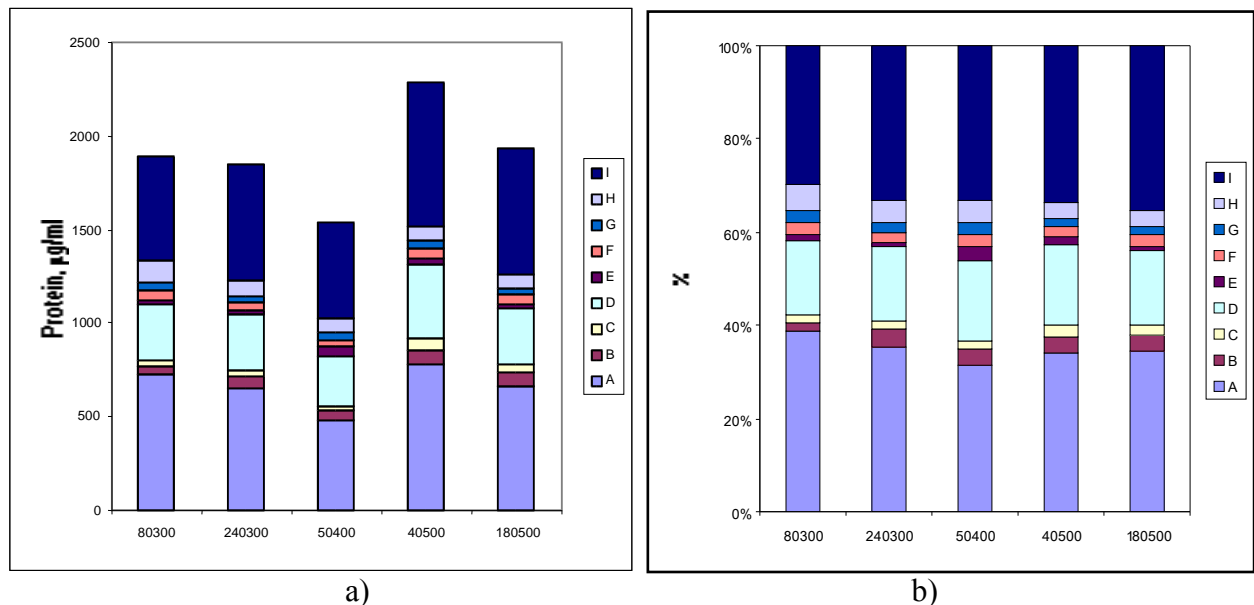


Abb. 9: Absolut- (a) und Prozentwerte (b) der Proteinmengen für 5 Wiederholungen des stimulierten Mischspeichels von Proband 7 vom 08.03.2000 bis 18.05.2000

5.3.2 Proteinspektrum der Stichprobe

Der Proteingehalt des stimulierten Mischspeichels als Mittelwert der 55 Einzel-HPLC-Analysen betrug durchschnittlich 2674 µg/ml. Den größten Anteil daran hatten die Histatine (Gruppe A) gefolgt von der α -Amylase (I) und den PRP (D) (Tab. 12).

Der durchschnittliche Gesamtproteingehalt des unstimulierten Mischspeichels betrug 1830 µg/ml und der von Parotisspeichel 3653 µg/ml. Unstimulierter und stimulierter Mischspeichel unterschieden sich bezüglich der Absolutwerte der Proteinmengen signifikant in den Gruppen A und D ($p=0,003$). Im Parotisspeichel fehlte Cystatin mit 14,2 kD (Fraktion H). Die stimulierten Speichelarten unterscheiden sich außer in H auch in Gruppe G ($p<0,001$). Weiterhin gibt es Unterschiede zwischen unstimuliertem Mischspeichel und Parotisspeichel bezüglich der Gruppen A, B, C, D und G ($p\leq 0,02$). Die Einzelwerte der Messungen je Proband befinden sich im Anhang (Tab. 22).

Der Vergleich der prozentualen Proteinanteile der einzelnen Fraktionen des unstimulierten und des stimulierten Mischspeichels zeigte einen Unterschied innerhalb der Gruppen A und F ($p = 0,045$) sowie G und H ($p\leq 0,002$).

Bei den PRP stieg die absolute Proteinmenge durch Stimulation an, die prozentualen Anteile bezüglich der Gesamtproteinmenge im unstimulierten und stimulierten Misch-

speichel unterschieden sich jedoch nicht. Die prozentualen Anteile von unstimuliertem und stimuliertem Mischspeichel für die Gruppen B, C, E und I wiesen ebenfalls keine Unterschiede auf.

Tab. 12: Proteinzusammensetzung des unstimulierten und stimulierten Mischspeichels (jeweils n = 55) sowie des stimulierten Parotisspeichels (n = 10)

Proteinfraktion	stimulierter		unstimulierter		stimulierter	
	Mischspeichel µg/ml	VK (%)	Mischspeichel µg/ml	VK (%)	Parotisspeichel µg/ml	VK (%)
A Histatine, basische PRP	1190 ± 313	26	702 ± 241	34	1785	54
B 7.3; 7.6; 9.3; 9.6 kD	165 ± 69	42	123 ± 49	40	289	60
C Unbekannt	114 ± 107	94	66 ± 49	73	276	86
D Saure PRP	456 ± 139	30	297 ± 87	30	667	50
E Statherin	36 ± 18	49	25 ± 11	47	54	76
F 5.8 kD	88 ± 30	34	80 ± 32	40	68	70
G Cystatin 14.3 kD	58 ± 25	43	67 ± 29	43	23	73
H Cystatin 14.2 kD	91 ± 46	51	116 ± 29	43	0	0
I α-Amylase	476 ± 191	40	354 ± 187	53	490	52
	Σ 2674 ± 536	20	Σ 1830 ± 542	30	Σ 3653	50

5.3.3 Ergebnisse der Untersuchung der intra- und interindividuellen Varianz

Die Ermittlung der Varianz nach FLEISS (1986) zwischen den Probanden und innerhalb der 5 Wiederholungen je Proband ergab eine deutlich kleinere *intra-individuelle Varianz* (WMS; *within measured subjects*) im Vergleich zur *interindividuellen Varianz* (BMS; *between measured subjects*) bei stimuliertem Mischspeichel (Tab. 13). Die Werte lagen für die *Reliabilitätskoeffizienten R* zwischen R = 0,205 und R = 0,836. Je größere Werte der Reliabilitätskoeffizient einnimmt (FLEISS, 1986), umso geringer ist die Variabilität eines Probanden über die 5 Wiederholungen im Vergleich zur Variabilität zwischen den Probanden. Dies bezieht sich auf den Gesamtproteingehalt und die einzelnen Fraktionen.

Tab. 13: Intra- und interindividuelle Varianz und Reliabilität bei *stimuliertem* Mischspeichel

Proteinfraktion	Varianz		Reliabilitäts- koeffizient
	BMS	WMS	
Gesamtprotein	1,5214	0,3831	0,373
A	0,5355	0,0935	0,486
B	0,026	0,0022	0,684
C	0,0609	0,0023	0,836
D	0,0989	0,0139	0,550
E	0,001	0,0002	0,444
F	0,0049	0,0005	0,638
G	0,0016	0,0002	0,583
H	0,0113	0,0009	0,698
I	0,1505	0,0658	0,205

5.4 Ergebnisse der In-vitro-Pellikelbildung

5.4.1 Proteinzusammensetzung der In-vitro-Pellikel

Nach 60 min waren an 10 mg Hydroxylapatit bei einmaliger Speichelsexposition 335 µg, bei viermaliger 446 µg adsorbiert (Tab. 14).

Tab. 14: Proteingehalt von Speichel, Pellikel P-60 und Pellikel P-4x15 in µg Protein/ml bzw. µg Protein/10 mg Hydroxylapatit

Proteinfraktion	Speichel R0 µg Protein/ml n = 10	P-60 µg Protein/10 mg Hydroxylapatit n = 10	P-4x15 n = 9
A	1175,5		
B	147,2	4,9	3,6
C	100,3	27,9	57,9
D	449,5	255,0	287,6
E	23,5	18,5	71,5
F	67,5		
G	55,0		
H	77,0		
I	446,0	28,2	25,8
Summe	2541,5	334,5	446,4

Die Fraktionen A, F, G, H waren nicht nachweisbar. Zwischen den individuellen Pellikelarten (Speichelproben von 10 Probanden) bestanden quantitative Unterschiede, aber es waren immer die Fraktionen B, C, D, E, I am Apatit adsorbiert.

Wenn die Pellikel P-60 und P-4x15 verglichen wurden, bestand der größte Unterschied an adsorbierten Proteinen für die Fraktion E mit 19 μg gegenüber 72 μg , wenn eine vierfache Speichelexposition erfolgte. Die Fraktion C nahm von 28 μg auf 58 μg und die Fraktion D von 255 auf 288 μg zu, während für die Fraktion B etwa die gleichen Zahlenwerte von 5 bzw. 4 μg und für Amylase (I) 28 bzw. 26 μg Protein pro Hydroxylapatit-Pellet nachgewiesen wurden (Tab. 14).

5.4.2 Anreicherungsfaktoren der Proteine in der Pellikel

Das unterschiedliche Adsorptionsverhalten der Proteine am Hydroxylapatit wurde beim Vergleich der prozentualen Anteile der Fraktionen an der Pellikel zur relativen Größe der Fraktionen im Ausgangsspeichel deutlich (Abb. 10).

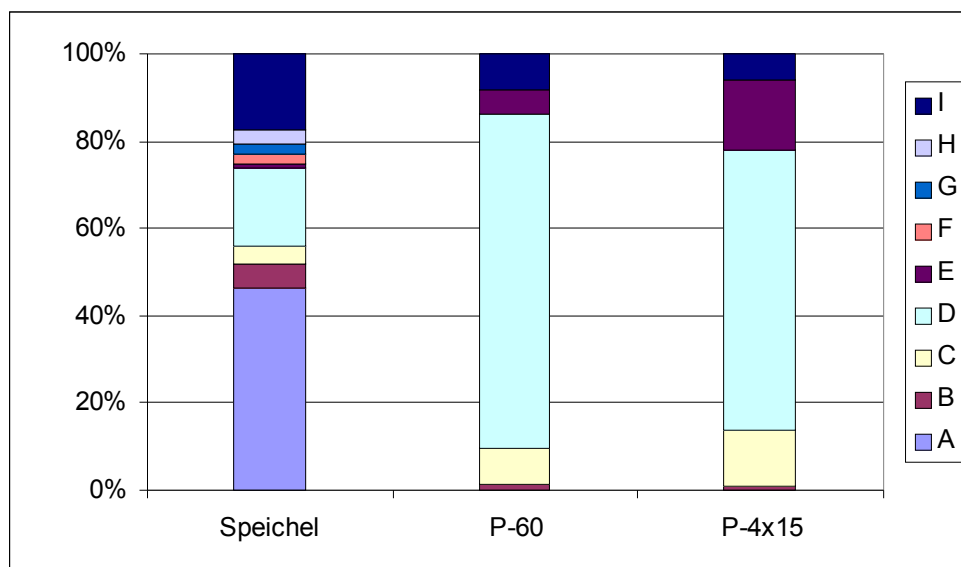


Abb. 10: Vergleich der prozentualen Zusammensetzung der Pellikel unter einmaliger (P-60) und unter mehrmaliger Speichelgabe (P-4x15)

Dafür wurde die Summe aller Fraktionen A bis I des Speichels als 100 % Bezugsbasis gewählt und die Pellikel-Anteile ermittelt. Den größten prozentualen Anteil im Ausgangsspeichel bildete die Gruppe A mit 46 %, die in der experimentellen Pellikel nicht gefunden wurde. Die Gruppe D (PRP) stellte im Ausgangsspeichel 17 % und in der Pellikel 75 % (P-60) bzw. 58 % (P-4x15) dar. Bei der Gruppe E fiel auf, dass der Sta-

therin-Anteil mit nur 0,9 % im Speichel, aber in der Pellikel P-60 auf 5 % bzw. bei P-4x15 auf 15 % anstieg. Bei einem Anteil von 19 % der Gruppe I im Ausgangsspeichel betrug die prozentuale Beteiligung an der Pellikel nur noch 9 % (P-60) bzw. 6 % (P-4x15). Bei Fraktion C war ein Anstieg von 8 % (P-60) auf 13 % (P-4x15) gegenüber 3 % im Ausgangsspeichel zu verzeichnen.

Bei der Betrachtung des prozentualen Anteils eines Proteins in der Pellikel zu dem relativen Anteil im Speichel ergibt sich ein Quotient (Q), der die Anreicherung während der selektiven Bindung beschreibt. Für die Fraktionen C, D und E wurde eine Zunahme festgestellt, die außer für die PRP gleichzeitig regimeabhängig unterschiedlich ausfiel. Die Fraktionen B und I waren prozentual geringer an der Pellikelbildung beteiligt (Abb. 11).

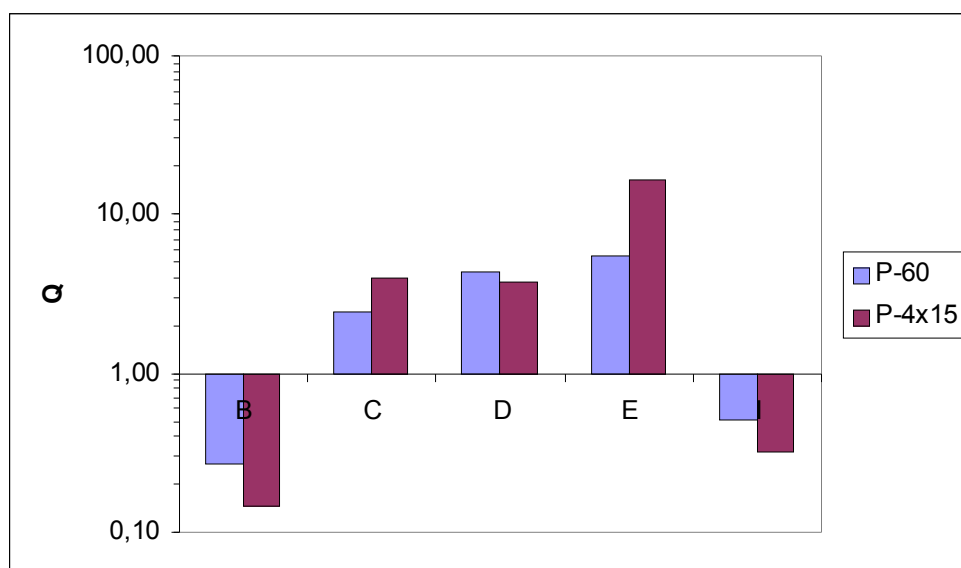


Abb. 11: Vergleich der prozentualen Anteile der einzelnen Proteinfractionen A bis I an der experimentellen Pellikel P-60 und P-4x15 im Vergleich zu den prozentualen Anteilen im Ausgangsspeichel R0 mittels des Quotienten

5.4.3 Bindungsstärke der Proteine in der experimentellen Pellikel

Um auszuschließen, dass nicht adsorbierte Proteine aus dem Speichelüberstand vermeintlich als Pellikel analysiert werden, wurde die Pellikel mit Aqua dest. dreimal gewaschen.

Die Analyse der Spülflüssigkeit nach der 1. Waschung ergab geringe Mengen der Proteine der Gruppen A, B, C und I (Abb. 12). Nach der 3. Waschung konnte nur noch Amylase in der Spülflüssigkeit nachgewiesen werden.

In der Pellikel konnten danach immer noch die Proteine der Gruppen B, C, D, E und I gefunden werden.

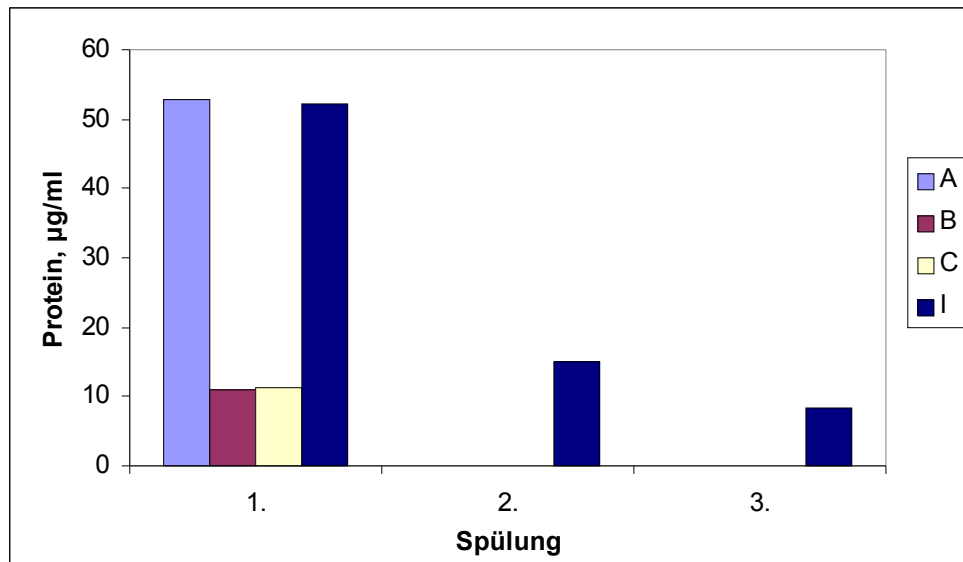


Abb. 12: Darstellung des Ergebnisses des Spülprozesses nach 3 Spülungen.

5.5 Korrelation zwischen Ausgangsspeichel und In-vitro-Pellikel

Um festzustellen, in welchem Zusammenhang die experimentelle Pellikel mit dem angebotenen Speichel stand, wurde die Korrelation zwischen den Proteinen im Speichel und in der Pellikel untersucht. Die In-vitro-Pellikelbildung mit dem Speichel von jeweils 10 Probanden lieferten 10 separate Messungen.

Bei dem Vergleich der absoluten Proteinmengen von Ausgangsspeichel und Pellikel zeigte sich nach Pearson bzw. Spearman eine Korrelation für folgende Proteine:

Tab. 15: Vergleich der Korrelationskoeffizienten von Speichel R0 mit der Pellikel P-60 und P-4x15

	R0 mit P-60	R0 mit P-4x15
B	0,070	-0,224
C	0,789	0,674
D	0,782 (Spearman)	0,550 (Spearman)
E	0,701	0,869
I	0,836	0,893

Unabhängig davon wurde sowohl innerhalb des Speichels als auch innerhalb der Pellikel eine positive Korrelation zwischen Gruppe D (PRP) und E (Statherin) festgestellt, d.h. waren im Speichel viel PRP vorhanden, so ging dies mit einer großen Menge an Statherin in der Pellikel einher. Das traf ebenfalls für diese Proteine in der Pellikel P-60 und P-4x15 zu ($r = 0,615$ und $r = 0,717$ nach Pearson).

Mit steigendem absoluten Proteinangebot des Ausgangsspeichels erhöhten sich die adsorbierten Proteinmengen der Proteine der Gruppen C, E und I. Die Werte der Proteine der Gruppe B von Speichel und Pellikel korrelierten nicht miteinander. Die Wertepaare für die Gruppe D (PRP) beschrieben einen exponentiellen Verlauf (Abb. 13).

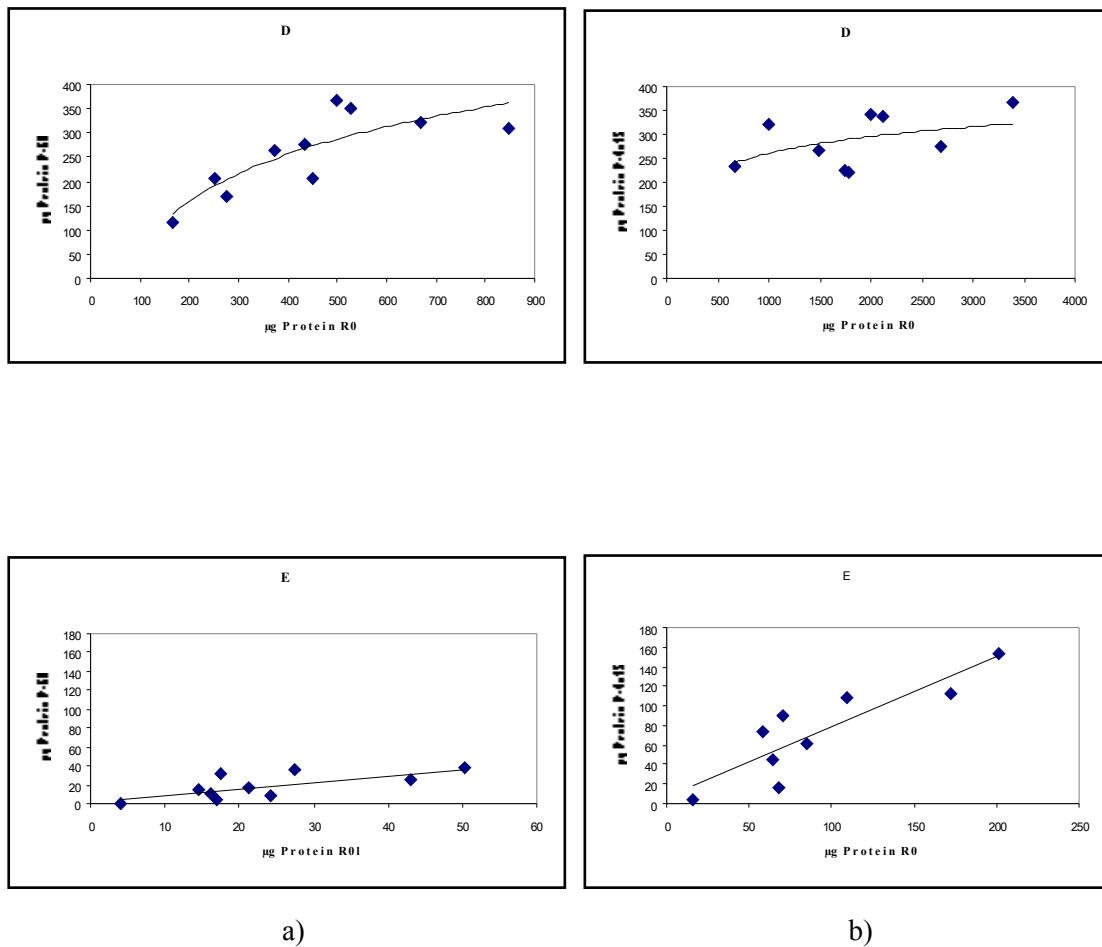


Abb. 13: Korrelation der Fraktionen D (PRP) bzw. E (Statherin) im Ausgangsspeichel R0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) und in der Pellikel P-60 (a) und P-4x15 (b) ($\mu\text{g}/10 \text{ mg HA}$)

Bei Betrachtung des Statherins (E) imponierte der Vergleich des Anstieges der beiden Geraden (Abb. 13). Die Trendlinie dieser x,y-Paare von Speichel und Pellikel beschrieben den Verlauf einer Geraden, die nahezu den Nullpunkt schneidet, und somit ergab sich scheinbar eine lineare Abhängigkeit. Der Anstieg der Geraden (m) ver-

vierfachte sich unter den Versuchsbedingungen der mehrmaligen Speichelzufuhr (P-4x15) von $m = 0,7$ auf $m = 2,8$.

Die Amylaseadsorption aus dem Speichel ergab sowohl bei einmaligem als auch bei viermaligem Substratangebot eine lineare Abhängigkeit. Es zeigte sich in beiden Fällen eine Gerade mit geringem Anstieg von $m = 0,03$ (Abb. 14).

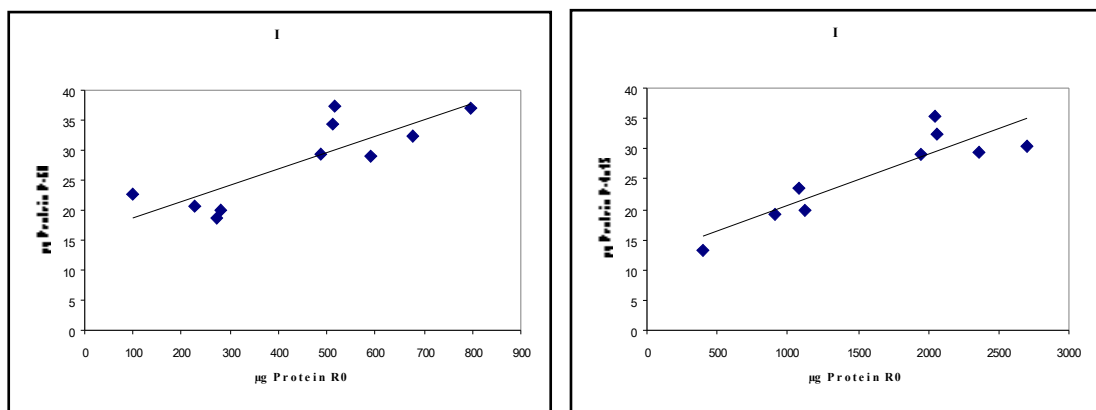


Abb. 14: Darstellung der absoluten Proteinmengen der Amylase in Speichel und Pellikel

5.6 Aufspaltung der prolinreichen Proteine in ihre Polymorphismen

Die Hauptfraktion der In-vitro-Pellikel bildeten die sauren prolinreichen Proteine der Gruppe D mit bis zu 75 %. Im Speichel beträgt ihr Anteil 17 %. Von HAY et al. (1988) wurden zehn Proteine in der Gruppe der sauren PRP (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, Db-s, Db-f, PIF-s, PIF-f, Pa-I und Pa-II) identifiziert.

Tab. 16: Theoretische und mittlere ermittelte Molekularmassen der sauren prolinreichen Proteine

PRP- Polymorphis- men	Molekular- masse theoretisch	ermittelt
PRP-1	15500,43	15515,34 *
PRP-2	15501,41	
PRP-3	11147,64	11163,38 *
PRP-4	11148,62	
Db-s	17618,64	17633,54 *
Db-f	13265,95	13282,11
PIF-s	17618,74	
PIF-f	11147,64	
Pa-I	15447,38	15434,39
Pa-II	30892,75	30920,78

*Die Trennung von Proteinen mit gleichen Molekularmassen ist mit Hilfe der HPLC möglich, wenn die Retentionszeit unterschiedlich ist. Sind die Retentionszeiten gleich, ist die Trennung anhand der unterschiedlichen Molekularmasse mittels Massenspektrometrie möglich. Im Falle von PRP-1 und PRP-2; Db-s und PIF-s; PRP-3, PRP-4 und

PIF-f war aufgrund der gleichen bzw. sehr ähnlichen Molekularmasse keine Trennung möglich (mit * gekennzeichnet).

Mit Hilfe der an die HPLC gekoppelten Massenspektrometrie wurden die Polymorphismen der PRP sowohl im Speichel der 10 Probanden als auch in der In-vitro-Pellikel untersucht. Die Suche im Speichel erfolgte innerhalb der 5 Wiederholungen von unstimuliertem und stimuliertem Mischspeichel. Der Vergleich der ermittelten Molekularmassen mit den Informationen aus Proteindatenbanken (BARKER et al., 2000) ermöglichte die Identifikation von PRP-1/2, PRP-3/4, Db-s, Db-f, Parotis-Monomer (Pa-I) und Parotis-Dimer (Pa-II) (Tab. 16).

Entsprechend der in Abb. 16 dargestellten Analyse wurden die polymorphen PRP separiert und identifiziert.

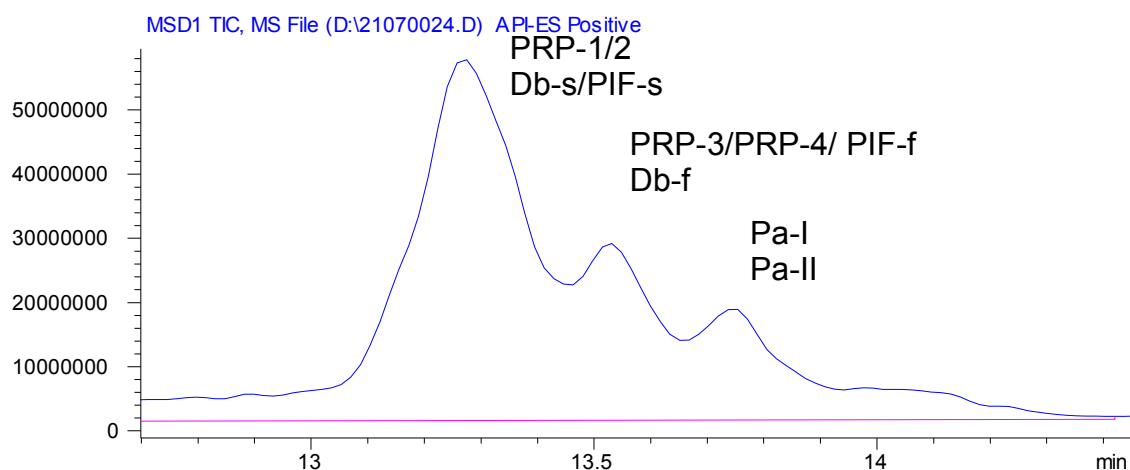


Abb. 16: Chromatogramm-Ausschnitt der PRP von stimuliertem Mischspeichel

Von den vorhandenen 6 Polymorphismen der PRP (PRP-1/PRP-2, PRP-3/PRP-4/PIF-f, Db-s/PIF-s, Db-f, Pa-I und Pa-II) wurde in vorliegender Arbeit eine Auflistung aller möglichen Kombinationen erstellt und mit Identifikations-Nummern von 1 bis 63 belegt (Gesamtkombinationen in Anhangstab. 23). Die nachgewiesenen Kombinationen der Polymorphismen wurden in Tab. 17 für den Speichel von 10 Probanden zusammengefasst.

Tab. 17: Vorhandene Kombinationen der PRP-Polymorphismen der 10 Probanden im Speichel

<i>ID-Nr.</i>	Kombination	<i>Proband</i>
24	PRP-1/2 + PRP-3/4/PIF-f + Pa-I	5
42	PRP-1/2 + PRP-3/4/PIF-f + Db-s/PIF-s + Db-f	2, 4
47	PRP-1/2 + PRP-3/4/PIF-f + Pa-I + Pa-II	1, 7, 9, 10, 11
63	PRP-1/2 + PRP-3/4/PIF-f + Db-s/PIF-s + Db-f + Pa-I + Pa-II	3, 8

Die individuell unterschiedlichen Polymorphismen der PRP im Speichel wurden den in der Pellikel gefundenen Polymorphismen gegenübergestellt (Tab. 18).

Tab. 18: Vergleich des Vorkommens der Polymorphismen nach Identifikations-Nummern (ID-Nr.) in Speichel und Pellikel je Proband

Proband Nr.	Speichel ID-Nr.	Pellikel P-60 ID-Nr.	Pellikel P-4x15 ID-Nr.
9	47	47	47
4	42	42	22 (kein Db-f, Pa-I, Pa-II)
1	47	25 (kein Pa-I)	47
10	47	58 (kein Pa-I)	47
2	42	23 (kein Db-s)	23 (kein Db-s)
5	24	7 (nur PRP1/2 u. PRP3/4)	7 (nur PRP1/2 u. PRP3/4)
11	47	7 (nur PRP1/2 u. PRP3/4)	7 (nur PRP1/2 u. PRP3/4)
8	63	58 (kein Pa-I)	58 (kein Pa-I)
3	63	7 (nur PRP1/2 u. PRP3/4)	22 (kein Db-f, Pa-I, Pa-II)
7	47	7 (nur PRP1/2 u. PRP3/4)	-

Für Proband 9 wurden die gleichen Vertreter im Speichel, in der Pellikel P-60 sowie P-4x15 nachgewiesen, während bei 7 anderen Kombinationen nur in jeweils 2 Parametern Übereinstimmung gefunden wurde. Übereinstimmung zwischen Speichel und P-60 lag bei 2 Probanden (4 und 9) und zwischen Speichel und P-4x15 bei 3 Probanden (1, 9, 10) vor.

6 Diskussion

Im Zusammenhang mit der Kariesrisikoproblematik widmeten sich Studien vorwiegend Parametern des Speichels, wie zum Beispiel der Elektrolytzusammensetzung, mikrobiologischer Keimbestimmung, Immunglobulinen oder antibakteriellen Enzymen. Zunehmend gewinnen jedoch auch die Speichelproteine und die Pellikel als mögliche modulierende Komponenten im Entstehungsprozess der Karies an Bedeutung. Eine Vielzahl von Untersuchungen setzten sich vor allem mit dem protektiven Einfluss der Pellikel auf die Erosion auseinander und bestätigten dies mehrfach (HANNIG, 2002; NEKRASHEVYCH und STÖBER, 2003). Da der Speichel das Substrat für die Ausbildung der Schmelzpellikel darstellt, ist der Einfluss auf die Pellikelbildung und deren Eigenschaften von Interesse (JENSEN et al., 1992). Trotz der Vielzahl von Speichelbestandteilen adsorbieren nur bestimmte einzelne Komponenten am Zahnschmelz. Ungeklärt ist, ob Hydroxylapatit aufgrund seiner Polarität und der selektiv adsorbierenden Speichelproteine eine einheitliche Pellikel entstehen lässt oder das individuelle Angebot an Speichelproteinen über die Zusammensetzung und die Eigenschaften der Pellikel entscheidet. Da jedes Individuum seinen spezifischen Speichel bildet, weist vielleicht auch die gereifte Pellikel individualspezifische Eigenschaften auf (HANNIG, 1994).

Zur Gesamtbestimmung des Proteingehaltes wurde die BCA-Methode (SMITH et al., 1985) gewählt. Diese kolorimetrische Methode, ebenso wie die nach LOWRY (1951), reagiert vorrangig auf aromatische Aminosäuren wie z.B. Tyrosin. Da Speichelproteine relativ wenig Tyrosin enthalten, kommt es zu einer Unterbestimmung. Das tyrosinreiche Statherin (SCHLESINGER und HAY, 1977) macht nur ca. 1 % der Speichelproteine des stimulierten Mischspeichels auch in dieser Studie aus. Die HPLC hingegen bedient sich zur Bestimmung der Proteine dem Adsorptionsmaximum der Peptidbindung bei 215 nm. Demnach beruht der Nachweis auf der Anzahl der Bindungen und ist nicht von bestimmten Aminosäuren abhängig. Der durchschnittliche Gesamtproteingehalt mit der BCA-Methode lag mit Werten von 0,81 mg/ml für den unstimulierten Mischspeichel und 1,04 mg/ml für den stimulierten weit unter den HPLC-Werten von 1,83 mg/ml (unstimuliert) oder 2,47 mg/ml (stimuliert). Unterschiede in der Gesamtproteinmenge zwischen den verschiedenen Proteinbestimmungsmethoden beruhen auf dem Prinzip des jeweiligen Verfahrens. Eine Studie zur Speichelanalyse von VEERMAN et al. (1996) bestimmte mit der BCA-Methode für reine stimulierte Drüsensekrete (sublingual, submandibular, parotis, palatinal) Proteinkonzentrationen zwischen 1,3 und 2,1 mg/ml.

JENKINS (1978) gibt für den Gesamtproteingehalt von Mischspeichel 220 mg/100 ml (Ruhespeichel) bzw. 280 mg/100 ml (Reizspeichel) an. DODDS et al. (1997) bestimmten mit der HPLC für den Parotisspeichel durchschnittlich 2,72 mg/ml, einen niedrigeren Wert als 3,65 mg/ml in der vorliegenden Arbeit. Signifikant zeigte die zitierte Studie eine Geschlechtsspezifität mit einem Unterschied des Proteingehaltes von 3,0 mg/ml bei weiblichen Probanden gegenüber 2,36 mg/ml bei männlichen ($p < 0,05$). In der vorliegenden Arbeit konnte der Unterschied nicht bestätigt werden.

Elementar für die Speichel- und Pellikeluntersuchung ist eine geeignete Analytik. Vorarbeiten von KEHRER (1999) zur Analytik der Speichelproteine mittels HPLC bereiten die Grundlagen der Auftrennung in Proteingruppen. Im Rahmen der Erfurter Kariesrisikostudie trennte KEHRER (1999) mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie die Speichelbestandteile in Peakgruppen und einzelne Peaks. Die Methode war über eine große Anzahl von Analysen (150) stabil. KEHRER et al. (1999) untersuchte bereits die Variation eines „Eichspeichels“, dessen Standardabweichungen im allgemein akzeptierten Grenzbereich von 5-8% lagen (Kapitel 4.4.3.1, Tab. 6) (MEYER, 1990). Es gelang die Separation der Speichelproteine in 9 Fraktionen und deren teilweise Identifikation anhand von gereinigten Referenzproteinen und den entsprechenden Retentionszeiten unter Kopplung eines Massenspektrometers sowie deren Quantifizierung. KEHRER bezeichnete die Proteinfractionen mit A bis I: **A**: Histatine und basische prolinreiche Proteine, **B**: 7,3 kD; 7,6 kD; 9,3 kD; 9,6 kD, **C**: unbekannt, **D**: saure PRP, **E**: Statherin, **F**: 5,8 kD, **G**: Cystatin (14,3 kD), **H**: Cystatin (14,2 kD), **I**: α -Amylase. Das in der vorliegenden Arbeit gewählte methodische Vorgehen entsprach der Analyse nach KEHRER (1999). Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde ebenfalls zur Identifizierung von Pellikelproteinen von LENDENMANN et al. (2000) und LAMKIN et al. (2001) eingesetzt. Harnsäure (noch vor Peak A), Statherin und α -Amylase liegen als einzelne Peaks vor, die Histatine und die sauren PRP hingegen sind nur als Peakgruppen auswertbar. Anhand des gereinigten Histatin-5 wurde für die Peakgruppe A die Vermutung ausgesprochen, dass es sich um Histatine und basische PRP handelt, wobei die Fraktion A wahrscheinlich noch andere Proteine bzw. Peptide beinhaltet, deren Identifikation noch nicht gelang.

Die Peakgruppe D, identifiziert als saure PRP, zeigte im Chromatogramm der adsorbierten Pellikel weniger Peaks als im Ausgangsspeichel, da nicht alle Proteine gleich stark an der Pellikelbildung beteiligt waren (Abb. 18).

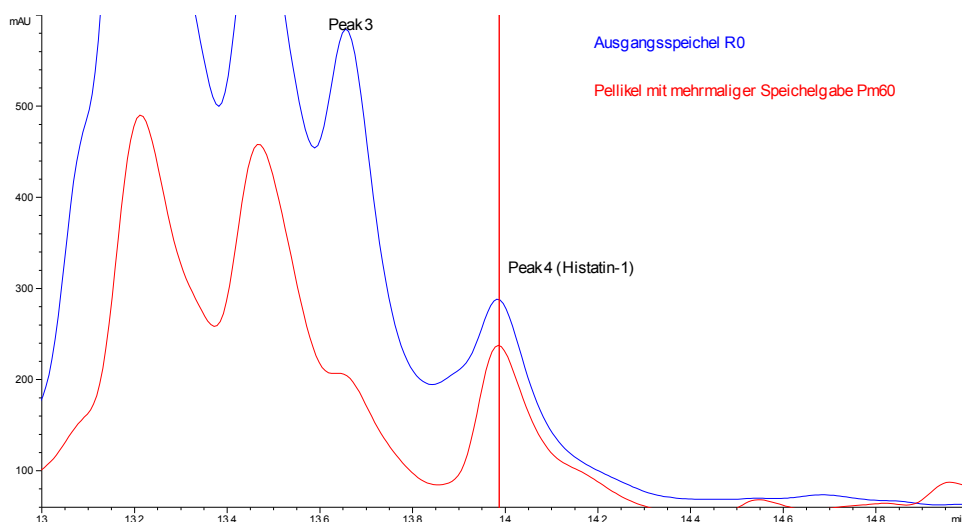


Abb. 18: Darstellung des Chromatogrammausschnitts im Bereich der PRP von Ausgangsspeichel (R0) und Pellikel nach mehrmaliger Speichelgabe (P-4x15).

Die gefundene durchschnittliche Molekularmasse eines Peaks 4 in Abbildung 18 von 4927,92 kD stimmt mit der auf der Basis seiner Aminosäuresequenz (TROXLER et al., 1990) berechneten Molekularmasse von 4927,19 kD für Histatin-1 sehr gut überein.

Um der Labilität der Speichelproteine vorzubeugen, wurde der Speichel durch Sammeln auf Eis, Zentrifugation und Filtration als eine klare, weitgehend bakterienfreie Flüssigkeit erhalten und bei -20°C eingefroren. Damit wurde u.a. dem von MANDEL (1980) beschriebenen Einfluss von Bakterien auf das Analysenresultat vorgebeugt, wo die Anwesenheit von lebenden Bakterien in der Speichelprobe mit spontaner Abgabe von CO_2 eine Änderung der Zusammensetzung verursachte. Nach RUHL (1999) führte starke und schwache Zentrifugation zur Halbierung der Gesamtproteinkonzentration, jedoch unverändertem elektrophoretischen Muster. Die Lagerung der Speichelproben bei -20°C ist eine allgemein akzeptierte Methode zur Speichelkonservierung (SÖDERLING, 1989; VIRELLA und GOUDSWAARD, 1978). Nach RUHL et al. (1999) tritt nach Kühl- oder Gefrierlagerung mit und ohne Zentrifugation keine Veränderung auf.

Die Filtration mit einer Porengröße von $0,2\text{ }\mu\text{m}$ zur möglichst vollständigen Abtrennung der Bakterien verursachte wahrscheinlich das Zurückhalten von Muzinen (Molekulargewicht bis zu 40 Millionen (OFFNER und TROXLER, 2000)), die in der Analyse aber als Stoffgruppe nicht berücksichtigt wurden und die „biologische Vollwertigkeit“ der In-vitro-Pellikel limitierten. Laut AL-HASHIMI und LEVINE (1989) sind die Muzine mit großer Wahrscheinlichkeit Pellikelbestandteil und haben einen wichtigen protektiven

Effekt (NIEUW AMERONGEN et al., 1987, 1995). Sie sind nachweislich in der Lage, an HA zu binden (TABAK et al., 1985).

Die Ergebnisse der Speicheluntersuchung von 11 Probanden mit der HPLC ergaben keine qualitativen, jedoch individuelle quantitative Unterschiede mit einer Spannweite der Gesamtproteinwerte zwischen 1821 und 3597 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 12) für den stimulierten Mischspeichel (Mittelwerte aus 5 Wiederholungen). Auch für die sauren PRP unterschieden sich die individuellen Werte in einem Bereich von 312 bis 706 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 11).

Signifikante Unterschiede zwischen den Absolutwerten von unstimuliertem und stimuliertem Mischspeichel waren nur in den Fraktionen A und D zu finden ($p = 0,003$), wobei wahrscheinlich der Unterschied in Bezug auf die Gruppe D in der vermehrten Sekretion der sauren PRP aus den Glandulae parotis und submandibularis unter Stimulation begründet liegt. Laut HAY und MORENO (1989) beträgt der Anteil der sauren PRP in Bezug auf alle Speichelproteine 25-30 %. Die PRP nehmen an der Parotis- und Submandibulärsekretion nahezu 70 % ein (HAY et al., 1988).

Aufgrund des höheren Proteingehalts und der mengenmäßig effektiveren Probengewinnung des stimulierten Mischspeichels wurde dieser als Ausgangssubstrat der Pellikelbildung verwendet. Da sich der prozentuale Anteil der potentiell am Zahnschmelz adsorbierenden und an der Pellikelbildung beteiligten Proteine C, D, E und I durch Stimulation nicht verändert, kann stimulierter anstelle des unstimulierten Mischspeichel für die Untersuchungen der Pellikelbildung an Hydroxylapatit verwendet werden. Auch wenn andere Autoren mit reinen Drüsensekreten arbeiteten (JENSEN et al., 1992), entspricht dieses Vorgehen einer besseren Annäherung an die realen Bedingungen in der Mundhöhle. Für die orale Gesundheit ist allerdings die Zusammensetzung des unstimulierten Speichels bedeutsamer, da dieser Speichel die überwiegende Zeit in der Mundhöhle vorherrscht. Die Analyse von Gesamtspeichel ist relevanter als die der Sekrete einzelner Drüsen (NAVAZESH und CHRISTENSEN, 1982).

Die Schwankungen der Proteinwerte über 5 Wiederholungsmessungen waren individuell unterschiedlich stark. Während ein Proband (Nr. 7) mit einem Variationskoeffizienten von 14 relativ stabil war, schwankten andere Probanden (Nr. 8) mit Variationskoeffizienten bis zu 45 relativ stark. Trotz der intraindividuellen Schwankungen

der Absolutwerte blieben die relativen Anteile der einzelnen Fraktionen annähernd stabil.

Die Analyse der intra- und interindividuellen Varianz nach FLEISS (1979) ergab eine höhere Varianz zwischen den Probanden als die Schwankung des Individuums innerhalb von 5 Wiederholungsmessungen. Die Reliabilitätskoeffizienten R lagen zwischen $R = 0,205$ und $0,836$.

Für die Bildung von In-vitro-Pellikel diente als Modell für den Zahnschmelz synthetisches Hydroxylapatit, das aufgrund seiner großen spezifischen Oberfläche ($60\text{--}80\text{ m}^2/\text{g}$) genügend Protein anlagern kann. Bei in vivo gebildeter Pellikel können zum einen Ablöseprobleme auftreten und zum anderen ist die abgelöste Proteinmenge für die analytische Bestimmung meist zu gering. Synthetisches HA-Pulver wurde ebenfalls in Studien von JENSEN et al. (1992) und LAMKIN et al. (2001) verwendet.

Die Vorgehensweise der Pellikelbildung war ähnlich der Methodik von JENSEN et al. (1992), wobei die Hydroxylapatitmenge doppelt so hoch und die Pellikelbildungszeit halbiert wurde. 10 mg HA-Pulver wurden mit 1 ml Speichel suspensiert, mit Aqua dest. gewaschen und nach Solubilisierung mittels saurer Lösung (3%iger TFA) zur Analyse benutzt. Vorteilhaft war die einfache Auflösung des synthetischen HA-Pulvers gegenüber der erschwerten in vivo Pellikelgewinnung vom natürlichen Schmelz. Andere Studien verwendeten schwache HCl zum Ablösen der Pellikel (RØLLA et al., 1983) oder EDTA (HANNESSON EGGEN, 1994).

Neben der 60-minütigen Suspendierung erfolgte außerdem ein Austausch durch frischen Speichel, wodurch der Speichelfluss simuliert werden sollte. Mit einem viermaligen Speichelaustausch innerhalb von 60 min war das praktikierbare Maximum erreicht. LAMKIN et al. (1996) geben für den Bildungsprozess eine Zeitspanne von 30 bis 60 min an. Laut HANNIG (2002) erweist sich auch kurzfristig ausgebildete Pellikel als relativ gut protektiv. Verschiedene Autoren vermuten ein Gleichgewicht der Pellikelbildung von Adsorption und Desorption in vivo zwischen 90 bis 120 min (SKØRLAND et al., 1995; KUBOKI et al., 1987) SØNJU und RØLLA (1973) erreichen ein Plateau für die Pellikelbildung bei 60 bis 90 min. Die ersten Bakterien binden während dieser Zeit an die neue Pellikel, so dass das spätere mikrobielle Wachstum wahrscheinlich von der 60-min-Pellikel beeinflusst wird. NIEUW AMERONGEN et al. (1987) untersuchten in vitro die Hemmung der Demineralisation durch die Pellikel in Perioden von 1 min bis zu einigen Tagen. Mit Zunahme des Pellikelalters stieg der Schutz des Schmelzes. Jedoch

wies bereits eine 9-Minuten-Pellikel einen signifikanten Schutz auf und erreichte ein Maximum vor 60 min.

Die Thermolabilität der Proteine fand Berücksichtigung und erwies sich bei der Inkubation bei 4°C - die im Probengeber der HPLC-Apparatur gewährleistet werden - über 4 Stunden als relativ konstant (Tab. 10). Die bei 37°C ausgeführte Pellikelbildung über 60 min bewirkt bei einem Vergleich ohne diese Inkubationszeit keinen besonderen Verlust an Proteinen (Tab. 10). Die Untersuchungen der Thermostabilität der Speichelproteine in der vorliegenden Arbeit zeigten für Statherin hohe Variationen, für Amylase hingegen sehr stabile Werte. In diesem Modell wurde versucht, möglichst native Proteine zu identifizieren, während bei in vivo Untersuchungen häufig Bruchstücke nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit war die Identifikation von Proteinfragmenten mit der HPLC-Technik sowie der hochsensitiven Massenspektrometrie nicht die primäre Aufgabe. Die Rolle dieser Bruchstücke bei der Pellikelbildung ist noch nicht vollständig geklärt. In der Untersuchung von LAMKIN et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass der Anteil der proteolytisch modifizierten Proteine nur 5 % betrug. In Zusammenhang mit den Ergebnissen von PERINPANAYAGAM et al. (1995) kann vermutet werden, dass die erhaltenen Fragmente aufgrund ihrer geringeren Größe effektiver im wässrigen Milieu und in die Pellikel diffundieren können. Da die Bruchstücke teilweise bioaktive Peptide sind, sollte ihr Beitrag an der Pellikelfunktion nicht unterschätzt werden. Sicherlich wird nach Adsorption an der Schmelzoberfläche ein Teil der Moleküle stabilisiert, aber mit Zerfall ist zu rechnen. JURIAANSE et al. (1980) zeigten, dass Phosphoproteine fester an der Schmelzoberfläche (in vitro, Rinderzähne) binden als nicht phosphorylierte Proteine. Während der experimentellen Reifung der Pellikel verdrängten die phosphorylierten Proteine die nicht phosphorylierten.

Aus dem Angebot der analytisch nachweisbaren 9 Fraktionen wurden in der Pellikel nur 5 wiedergefunden, von denen 3 auf eine selektive Adsorption hinweisen und für die eine statistisch signifikante Korrelation zwischen angebotenem und gebundenem Protein existierte. Für Amylase war diese Beziehung ebenfalls statistisch signifikant nachweisbar, es fand jedoch keine Anreicherung statt. Fraktion B adsorbierte ebenfalls ohne quantitative Beziehung zum Proteinangebot im Speichel.

Die Proteine zeigten ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten. Die PRP und Statherin wiesen eine sehr starke Affinität zu Hydroxylapatit auf, wie von HAY (1973) gezeigt

wurde. Amylase sowie die Proteine der Gruppen B und C adsorbierten schwach, während die Proteine der Fraktionen A, F, G und H keine Adsorptionsneigung zeigten. Von den angebotenen 2700 µg/ml Protein im Speichel adsorbierten an 10 mg Hydroxylapatit ca. 300 µg nach einmaliger und ca. 400 µg nach mehrmaliger Speichelzufuhr. Die Proteine waren fest adsorbiert, da selbst nach mehrfacher Eluierung nur wenig Protein vom Apatit abgelöst wurde. Nach dem Spülprozess blieben diese Proteine adsorbiert. KOUSVELARI et al. (1980) und BENNICK (1983) wiesen die Beteiligung der PRP an der Pellikelbildung nach. HAY (1967, 1969, 1973) zeigte die selektive Adsorption von Proteinen bei einem niedrigen Hydroxylapatit-Speichel-Verhältnis. Mit diesen klassischen Untersuchungen mittels Chromatographie und Elektrophorese beobachtete er die hohe Selektivität von Statherin, Histatin-1 und PRP für Hydroxylapatit. PRUITT et al. (1969) zeigten in einer Untersuchung mit stimuliertem Gesamtspeichel, der über eine Säule mit Schmelzpulver geleitet wurde, dass Amylase am Schmelz adsorbierte, aber mit Wasser ausgewaschen werden konnte. Detaillierte Mengenangaben für einzelne adsorbierte Proteine liefert eine Studie von JURIAANSE und BOOIJ (1979), in der eine Lösung mit 100 µg/ml Protein mit 10 mg HA für 60 min bei Zimmertemperatur versetzt wird. Sie ermittelten für Protein I (15950 kD) 60 µg, Protein II (12870 kD) 80 µg und Protein III (13970 kD) 81 µg. Eine weitere in vitro Studie adsorbierte an Schmelzpulver pro mm² 217 ng PRP, 72 ng Cystatin S, 12,6 ng Lysozym, 5,3 ng Albumin und 1,1 ng Lactoferrin (RUAN et al., 1986). LAMKIN et al. (2001) analysierten in der in vitro gebildeten Mischspeichel-Pellikel saure PRP, Cystatine, Statherine und Histatine. Während die PRP nur etwa 25 % der Pellikel ausmachten, entsprach der Statherin-Anteil mit etwa einem Viertel der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Menge. LAMKIN beschrieb weiterhin einen kleinen Anteil Cystatine und 36 % Histatine. In der hier erzeugten Pellikel aus stimuliertem Mischspeichel konnte kein Cystatin nachgewiesen werden. JENSEN et al. (1992) zeigten Komponenten der Pellikel aus Mischspeichel, die experimentell ebenfalls mit synthetischem Hydroxylapatit (5 mg HA + 1 ml Speichel) gewonnen wurden. Die Pellikel bestand vorwiegend aus Amylase gefolgt von sauren PRP, Cystatinen und proteolytischen Peptiden. In der aus reinem Parotisspeichel resultierenden Pellikel fanden sie Amylase, glykosylierte PRP, Statherin sowie Histatin-3 und Histatin-5. In der Pellikel aus reinem Submandibularspeichel fanden die gleichen Autoren zu den eben genannten Bestandteilen noch Cystatin, hingegen fehlte ein Nachweis von glykosylierten PRP. Die

Ergebnisse von JENSEN et al. (1992) bestätigten die selektive Adsorption von sowohl sauren als auch neutralen Phosphoproteinen sowie basischen Histatinen aus reinen Drüsensekreten, verweisen jedoch auf die dramatische Änderung der Adsorptionsmuster von Speichelspeichel bedingt durch die Proteolyse der Proteine.

MAYHALL (1970) erbrachte den Nachweis der Bindung von Histatin-1, Histatin-3 und Histatin-5 an Hydroxylapatit und LAMKIN et al. (1991b) gelang die Reinigung von Histatin-3 und Histatin-5 aus der Pellikel mit Sequenzbestimmung. In der vorliegenden Arbeit gibt es Hinweise auf die Beteiligung von Histatin-1, jedoch gelang kein Nachweis von Histatin-3 bzw. Histatin-5. Auch der Nachweis von Amylase in der Pellikel wurde in unterschiedlichen Studien erbracht (ØRSTAVIK und KRAUSS, 1973, 1974; AL-HASHIMI und LEVINE, 1989). Laut ØRSTAVIK und KRAUSS (1974) sowie RØLLA et al. (1983) weist Amylase selbst nach der Adsorption noch enzymatische Aktivität auf.

Die eingeführten Anreicherungsfaktoren (Kapitel 5.4.2) spiegeln die Affinität der Speichelproteine zu Hydroxylapatit wider. Besonders deutlich wird dies bei Betrachtung der Statherinadsorption, wobei der Statherinanteil im Speichel mit nur 0,9 % in der Pellikel P-60 auf 5 % bzw. P-4x15 auf 15 % anstieg. Statherin bindet aufgrund hoher Affinität zu Calcium mit hoher Selektivität am Hydroxylapatit (HAY, 1973; MORENO et al., 1978; JENSEN et al., 1991). Trotz verstärkter Speichelsexposition nahmen die Anteile der Fraktionen B und I ab, was die Selektivität bzw. die Affinität der Fraktionen C, D und E verdeutlicht.

Die Korrelationsanalyse zwischen angebotenen Speichelproteinen und der resultierenden Pellikelzusammensetzung mit verschiedenen Speichelproben bestätigte einen Zusammenhang. Die absoluten Proteinmengen der Proteine C, D, E und I korrelierten in Speichel und Pellikel sowohl bei einmaligem (P-60) als auch mehrmaligem Speichelangebot (P-4x15) ($R = 0,550 - 0,893$). Für die Proteinfraction B bestand kein Zusammenhang ($R = 0,070 - -0,224$). Besonders auffällig verhielt sich Statherin (E), dessen Wertepaare nahezu eine Gerade bildeten und deren Anstieg sich unter den Versuchsbedingungen der mehrmaligen Speichelzufuhr (P-4x15) vervierfachte und somit die starke Affinität des Statherins zum Hydroxylapatit deutlich machte. Für Amylase zeigte sich ein linearer Zusammenhang.

Um individuelle Unterschiede aufzuspüren, wurde die adsorbierende Hauptfraktion - die prolinreichen Proteine (PRP) - auf ihre Polymorphismen mittels Massenspektrometrie untersucht. Nicht alle Probanden wiesen das gesamte Polymorphismenspektrum auf, d.h. alle zehn Proteine der Gruppe der sauren PRP (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, Db-s, Db-f, PIF-s, PIF-f, Pa-Monomer und Pa-Dimer), welche von HAY et al. (1988) identifiziert wurden. Aus diesem Grund erfolgte die Zusammenstellung von Kombinationen der Polymorphismen (Anhangstab. 23). Bei nur einem Probanden wurde sowohl im Speichel als auch in der Pellikel beider Versuchsregime die gleiche Kombination wiedergefunden; bei 3 Probanden immerhin in der Pellikel eines Versuchsregimes. Diese Ergebnisse können jedoch sehr weit methodisch beeinflusst sein.

Die Polymorphismen der PRP in der Pellikel spielen in Hinblick auf ihre Interaktionen mit Speichelbakterien eine Rolle. So bindet *Streptococcus mutans* an die größeren PRP (PRP-1, PRP-2, PIF-s) stärker als an kleinere Varianten, welche das initiale Anheften reduzieren. Es konkurrieren jedoch beide PRP-Typen um dieselbe Hydroxylapatit-Bindungsstelle an der Schmelzoberfläche. Nach BRATT et al. (1998) besitzen die kleineren PRP, z.B. das PRP-3, keine Bindungsstellen für Bakterien und somit keine Rezeptorfunktion. CARLÉN et al. (1998b) zeigten, dass das Verhältnis von PRP-1 zu PRP-3 die Besiedelung der Pellikel durch *A. naeslundii* beeinflusst. Neben den PRP sind auch die Statherine nach ihrer Adsorption am Hydroxylapatit befähigt, *Actinomyces viscosus* zu binden (GIBBONS und HAY, 1988a). Untersuchungen von KRAUS und MESTECKY (1976) zeigen den Einfluss der Pellikelkomposition auf die Bakterienadhäsion. Hier spiegelt sich die Komplexität des Pellikelbildungsprozesses und der Beeinflussung der bakteriellen Besiedelung wider. Dabei spielen nicht nur absolute Proteinmengen sondern neben der prozentualen Zusammensetzung auch die Wechselwirkungen zwischen den beeinflussenden Faktoren eine Rolle.

Wenn die Zusammensetzung der Pellikel individuell durch die Speichelzusammensetzung beeinflusst wird, dann stellt diese auch eine modulierende Größe für die De- und Remineralisationsprozesse dar. Wenn unterschiedliche Pellikel individuell bedingt sind, wäre durchaus vorstellbar, dass die De- und Remineralisation mehr oder weniger moduliert wird. Eventuell resultiert daraus eine unterschiedliche Reaktionsbereitschaft an der Schmelzoberfläche. Die Charakteristika der präadsorbierten Biopolymer-schicht auf Festkörpern beeinflussen die zelluläre und bakterielle Adhärenz (NORDE, 1984).

LAMKIN et al. (1996) untersuchten die Art und Weise der Adsorption von Proteinen aus Mischspeichel. Anhand dieser Resultate werden zwei Adsorptionsmechanismen vermutet, zum einen die direkte Adsorption von Proteinen am HA und zum anderen die indirekte, wobei Proteine mit den bereits adsorbierten Proteinen interagieren. Die Zusammensetzung der Pellikel ändert sich während des Dickenwachstums, in den nachfolgenden Schichten sind unterschiedliche Proteine angereichert (EDGAR und O'MULLANE, 1990). Die Interaktionen zwischen den Pellikelproteinen wurden für PRP-1 und Statherin in vitro über orale Transglutaminase (YAO et al., 2000) beschrieben. Diese Untersuchungen erlauben die Vorstellung, dass die „Basisschicht“ auf der Schmelzoberfläche zwar zunächst „uniform“/selektiv bedingt ist, jedoch die weitere Zusammensetzung individuell von Proteinangebot und der Interaktionen zwischen den Proteinen abhängt.

Quantitative Unterschiede von Speichelproteinen bei Kindern zeigten HENNING et al. (2001), wobei eine Gruppe von Kindern doppelt so viel Protein im Speichel aufwies als die andere. Unterschiede in der biochemischen Zusammensetzung der Pellikel von kariessaktiven und –inaktiven Personen deuten auf individualspezifische Differenzen in der Pellikelzusammensetzung hin (SLOMIANY et al., 1986). Eine Korrelation zwischen der Proteinkomposition von Parotisspeichel und der Kariesaktivität lag in der Studie von DODDS et al. (1997) nicht vor.

Interindividuelle Unterschiede der Pellikelzusammensetzung waren in Bezug auf die Verteilung von Enzymen, Blutgruppensubstanzen und Immunglobulinen zu finden (AL-HASHIMI und LEVINE, 1989; KRAUSS und MESTECKY, 1976; LEVINE et al., 1985; ØRSTAVIK und KRAUSS, 1973, 1974; RØLLA et al., 1983). RYKKE et al. (1990b) fanden keine probandenabhängigen Unterschiede in der generellen Aminosäurezusammensetzung und den proteinabhängigen physikochemischen Eigenschaften der Pellikel. Die Studie zeigte weder intra- noch interindividuelle Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der 2h-Pellikel der Bukkalflächen der Zähne. CARLÉN et al. (1998) gewannen Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Pellikelzusammensetzung und der vorwiegenden Herkunft des Speichels in jener Gebissregion. Auch Gingivitis und Parodontitis beeinflussen die Pellikelzusammensetzung aufgrund steigenden Flusses der Crevikularflüssigkeit (RÜDIGER et al., 2002).

Neueste Studien von YAO et al. (2002) analysieren in der In-vivo-Pellikel nicht nur klassische Speichelproteine, sondern auch nicht ursprünglich dem Speichel ent-

stammende Proteinkomponenten. Diese Untersuchung schlussfolgert eine selektive Pellikel-Protein-Ablagerung ohne Reflektion der Speichel-Protein-Zusammensetzung. RYKKE et al. (1990) fanden bei der Suche nach intra- und interindividuelle Unterschieden der AS-Sequenz konstante Werte mit nur geringen Variationen in den AS-Profilen. Diese Ergebnisse sprechen für einen selektiven Adsorptionsprozess. Allerdings stammte die Pellikel von nur 3 Probanden.

Ob Unterschiede in der Zusammensetzung der In-vivo-Pellikel durch andere Vorgänge überlagert werden, die durch das In-vitro-Vorgehen bzw. durch Proteolyse oder thermische Bedingungen beeinflusst sind, bleibt noch zu beantworten.

Die Pellikel bildet die Grundlage für die bakterielle Besiedelung. Somit ist ein Einfluss individueller Unterschiede der Pellikel auf die Plaquebildung vorstellbar. RYKKE et al. untersuchten Effekte auf die Pellikelformation durch Silikonöl (RYKKE und RØLLA, 1990), Na-Lauryl Sulfate (1990a), Pyrophosphat (1988), CaF_2 überzogenen Schmelz (1989), woraus eine verringerte bzw. verlangsamte Pellikelbildung resultierte. Die Proteine adsorbierten an Na-Lauryl Sulfat behandeltem Schmelz fester.

Die Suche nach präventiven Ansätzen, außer der Plaquereduktion durch antimikrobielle Agenzien, wäre in Zukunft auch im Sinne einer Modulation der Pellikelbildung denkbar.

Die vorliegende Studie erlaubt die Aussage, dass individuelle quantitative Unterschiede sowohl in der Speichelzusammensetzung als auch in der Pellikelzusammensetzung in vivo wahrscheinlich sind, qualitative Variationen konnten durch Bezug auf die genetischen Polymorphismen der PRP festgestellt werden. Die HPLC ermöglichte die Trennung des Proteinspektrums in 9 Fraktionen und unter Kopplung eines Massenspektrometers eine nähere Analyse der Polymorphismen der sauren prolinreichen Proteine. Zur Identifikation der Proteine ist die Methode der HPLC nahezu ausgeschöpft. Andere Methoden, wie z.B. die Elektrophorese oder der Einsatz von Antikörpern könnten weitere Erkenntnisse bringen und sollten Probandengruppen betrachten, bei denen hohe Unterschiede im Gesamtproteingehalt des Speichels bestehen, wie von der Gruppe HENNING et al. (2003) kürzlich beschrieben.

7 Schlussfolgerung

Zur Wahl des Substrates für die Pellikelbildung in vitro wurden unstimulierter und stimulierter Mischspeichel sowie stimulierter Parotisspeichel herangezogen und deren Gesamtproteingehalt verglichen. Die stimulierten Speichelarten wiesen den höchsten Proteingehalt auf. Der stimulierte Mischspeichel wurde dem reinen Drüsensekret der Parotis als hauptsächlich in der Mundhöhle vorherrschender vorgezogen. Prozentual betrachtet unterschieden sich unstimulierter und stimulierter Mischspeichel jedoch kaum (Kapitel 5.1). Für die In-vitro-Pellikelbildung erwies sich stimulierter Mischspeichel als geeignet. Der Vergleich zu Pellikel aus reinen Drüsensekreten bleibt zu untersuchen. Die Stabilität der Proteine unter den Versuchsbedingungen war proteinspezifisch unterschiedlich. Einige Proteine vor allem Amylase erwiesen sich als sehr stabil, Statherin hingegen muß als besonders thermolabil eingestuft werden (Kapitel 5.2). Dies wurde bei den Versuchsbedingungen berücksichtigt, könnte jedoch die Ergebnisse beeinflussen.

Mit Hilfe der RP-HPLC unter Verwendung von gereinigten Referenzproteinen gelang die Auftrennung des Spektrums der Speichelproteine in 9 Fraktionen (Kapitel 5.3), wobei manche Proteine als einzelne Peaks andere nur als Peakgruppen separiert werden konnten. Ebenfalls wurde anhand von Rinderserumalbumin quantifiziert. Neben der HPLC-Technik sollten zur weiteren detaillierten Analyse auch elektrophoretische und immunologische Nachweismethoden Anwendung finden.

Nur bestimmte Proteine des Speichelspektrums adsorbierten an Hydroxylapatit in vitro. Trotz der amphoteren Eigenschaften des Zahnschmelzes können sich nur selektiv Proteingruppen am Hydroxylapatit anlagern. Demzufolge weist die Schmelzpellikel ein spezifisches Proteinspektrum auf. Die Hauptkomponenten der artifiziell erzeugten Pellikel sind die sauren prolinreichen Proteine und Statherin, gefolgt von Fraktion C, Amylase und Fraktion B. Besonders fiel die Anreicherung von Statherin mit zunehmendem Speichelangebot auf, was sicherlich auf seine hohe Affinität zurückzuführen ist (Kapitel 5.4).

Eine quantitative Abhängigkeit der Adsorption vom Proteinangebot konnte festgestellt werden. Die individuellen Unterschiede im Speichel fanden auch in der Pellikelquantität ihren Niederschlag. Qualitative individuelle Unterschiede lagen auf der Ebene der genetischen Polymorphismen der PRP vor sowohl im Speichel als auch daraus resultierend in der Pellikel vor. Ob die Unterschiede Einfluss auf die De- und Remineralisationsprozesse an der Schmelzoberfläche haben, bedarf es weiterer Untersuchungen.

8 Literaturverzeichnis

1. Aced G und Möckel HJ: Liquidchromatographie: apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC. Weinheim; New York; Basel; Cambridge: VCH, (1991) S. 55.
2. Akiyama SK and Yamada KM (1987) Biosynthesis and acquisition of biological activity of fibronectin receptor. *J Biol Chem* 262 (36):17536-17542.
3. Al-Hashimi I and Levine MJ (1989) Characterization of in vivo Salivary-Derived Enamel Pellicle. *Arch Oral Biol* 34:289-295.
4. Al-Hashimi I and Dickinson PD, Levine MJ (1988) Purification, molecular cloning and sequencing of salivary cystatin SA-I. *J Biol Chem* 263:9381-9387.
5. Amano A, Sojar HT, Lee JY, Sharma MJ, Levine MJ and Genco RJ (1994) Salivary receptors for recombinant fimbriin of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 62:3372-3380.
6. Aoba T, Moreno EC and Hay DI (1984) Initiation of apatite crystal growth by the amino-terminal segment of human salivary acidic proteins. *Calcif Tiss Int* 36:651-658.
7. Arends J and Jongebloed WL (1977) The enamel substrate – characteristics of the enamel surface. *Swed Dent J* 1:215-224.
8. Arends J, Schuthof J and Jongebloed WL: The outer enamel surface after various topical fluoride treatments. In: Rølla G, Sønju T, Embery G (eds.): *Tooth surface interactions and preventive dentistry*. 1. Aufl., IRL Press Ltd, London (1981) S. 169-180.
9. Armstrong WG (1966) Amino-acid composition of acquired pellicle of human tooth enamel. *Nature* 210 19.
10. Armstrong WG (1968) Origin and nature of the acquired pellicle. *Proc R Soc Med* 61: 923-930.
11. Armstrong WG (1967) The composition of organic films formed on human teeth. *Caries Res* 1:89-103.
12. Armstrong WG and Hayward AF (1968) Acquired organic integuments of human enamel: a comparison of analytical studies with optical, phase-contrast and electron microscope examinations. *Caries Res* 2:294-305.
13. Babu JP and Dabbous MK (1986) Interaction of salivary fibronectin with oral streptococci. *J Dent Res* 65(8):1094-1100.
14. Babu JP, Simpson WA, Courtney HS and Beachey EH (1983) Interaction of human plasma fibronectin with cariogenic and non-cariogenic oral streptococci. *Infect Immun* 41(1):162-168.
15. Baier RE (1977) On the Formation of biological films. *Swed Dent J* 1:261-271.
16. Baier RE, Meyer AE, Natiella JR and Carter JM (1984) Surface properties determine bioadhesive outcomes: Methodes and results. *J Biomed Mater Res* 18:337-355.
17. Barker WC, Garavelli JS, Huang H, Mc Garvey PB, Orcut BC, Srinivasarao GY, Xiao C, Yeh JSL, Ledley RS, Janda JF, Pfeiffer F, Mewes HW, Tsugita A and Wu C (2000) The Protein Information Resource (PIR). *Nucleic Acids Research* 28(1):41-44.

18. Beeley JA (1991) Clinical applications of electrophoresis of human salivary proteins. *J Chromatography* 569:261-280.
19. Bennick A (1987) Structural and genetic aspects of proline-rich proteins. *J Dent Res* 66:457-461.
20. Bennick A, Cannon M and Madapallimattam G (1979) The Nature of the Hydroxyapatite-Binding Site in Salivary Proline-Rich Proteins. *Biochem J* 183:115-126.
21. Bennick A, Chau G, Goodlin R, Abrams S, Tustian D and Madapallimattam G (1983) The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Arch Oral Biol* 28:19-28.
22. Bennick A, McLaughlin AC, Grey AA and Madapallimattam G (1981) The location and nature of calcium-binding sites in salivary acidic proline rich phosphoproteins. *J Biol Chem* 256:4741-4746.
23. Bergmann JE and Gülzow H-J (1995) Detection of binding of denatured salivary α -amylase to *Streptococcus sanguis*. *Arch Oral Biol* 40:973-974.
24. Bernardi G, Giro MG and Gailard C (1972) Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns: some new developments. *Biochem Biophys Acta* 409-420.
25. Bernardi G and Kawasaki T (1968) Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns. *Biochem Biophys Acta* 160:301-310.
26. Berthold P (1979) Formation of salivary coatings and dental plaque on two different supporting materials. An electron microscopic study. *J Periodontol* 50:397.
27. Bößmann K und Hoppe WF (1974) Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Funktion des Zahnoberhäutchens. *Dtsch Zahnärztl Z* 29:1030-1035.
28. Bradway DJ, Bergey EJ, Scannapieco FA, Ramasubbu N, Zaeacki S and Levine MJ (1992) Formation in salivary-mucosal pellicle: the role of transglutaminase. *Biochem J* 284:557-564.
29. Bratt P, Li T, Johansson I, Ryberg M, Järholm M and Strömberg N (1998) Specific Binding to and Proteolytic Cleavage of Salivary Acidic Proline-Rich Proteins by Commensal Streptococci and Actinomyces. *Caries Res* 32:299.
30. Buddecke E: *Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin*. Verlag de Gruyter, Berlin, New York (1981).
31. Busscher HJ, Uyen MHWJC, Stokroos J and Jongebloed WL (1989) A transmission electron microscopy study of the adsorption patterns of early developing artificial pellicles. *Arch Oral Biol* 34:803-810.
32. Budzikiewicz H: *Massenspektrometrie: Eine Einführung*. 4. Aufl., Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto, Wiley-VCH, 1998.
33. Carlén A, Bratt P, Stenudd C, Olsson J and Strömberg N (1998) Agglutinin and Acidic Proline-rich Protein Receptor Patterns May Modulate Bacterial Adherence and Colonization on Tooth Surfaces. *J Dent Res* 77:81-90.

34. Carlson DM (1993) Salivary Proline-rich Proteins: Biochemistry, Molecular Biology, and Regulation of Expression. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:495-502.
35. Cohen RE and Levine MJ: Salivary glycoproteins. In: Tenovuo JO (ed.), *Human saliva: Clinical Chemistry and Microbiology*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, Vol. 1, pp. 101-130.
36. Cole AS and Eastoe JE: The oral environment. In: *Biochemistry and oral biology*, 2nd ed. Bristol: Wright, (1988) S. 475-489.
37. Cole MF, Hsu ST, Baum BJ, Bowen WH, Sierra LI, Aquirre M and Gillespie G (1981) Specific and non-specific immune factors in dental plaque fluid and saliva from young and old populations. *Infect Immun* 31(3):998-1002.
38. Carlén A, Börjesson AC, Nikdel K and Olsson J (1998) Composition of Pellicle Formed in vivo on Tooth Surfaces in Different Parts of the Dentition, and in vitro on Hydroxyapatite. *Caries Res* 32:447-455.
39. Dawes C (1972) Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol (Lond)* 220:529-545.
40. Dawes C: Clearance of Substances from Oral Cavity-Implications for Oral Health. In: Edgar WM, O'Mullane DM (Eds): *Saliva and oral health*. Second Ed, Thanet Press-LTD., Margate (1996) S. 67-79.
41. Dawes C (1987) Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *J Dent Res* 66:(Spec. Iss) 648-653.
42. Dawes C, Jenkins GN and Tonge CH (1963) The nomenclature of the integuments of the enamel surface of teeth. *Br Dent J* 115:65-68.
43. Dodds MWJ, Johnson DA, Mobley CC and Hattaway KM (1997) Parotid saliva protein profiles in caries-free and caries-active adults. *Oral Surg Oral Med Oral Patholog* 83:244-251.
44. Edgar WM and O'Mullane: *Saliva and dental health*. First Ed. Latimer Trend and Company Ltd., Plymouth (1990).
45. Edgerton M, Scannapieco FA, Reddy MS and Levine MJ (1993) Human submandibular/sub-lingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. *Infect Immun* 61:2644-2652.
46. Eggen KH and Rølla G (1982a) Gel filtration and ion exchange chromatographie and chemical analysis of macromolecules present in acquired enamel pellicle (2-hour pellicle). *Scand J Dent Res* 90:182-188.
47. Eggen KH and Rølla G (1983) Further studies on the composition of the acquired enamel pellicle. *Scand J Dent Res* 91:439-446.
48. Embery G, Hogg SD, Heaney TG, Stanbury JB and Green DRJ (1986) Studies on the organic polyanionic constituents of human acquired dental pellicle. *Arch Oral Biol* 31:623-625.

49. Ericson T and Mäkinen KK: Saliva-formation, composition and possible role. In: Thylstrup A, Fejerskov O (Eds.): Textbook of cariology. Copenhagen: Munksgaard, (1986) S. 28-45.
50. Ericson T and Rundegren J (1983) Characterization of a Salivary Agglutinin Reacting with a Serotype C Strain of *Streptococcus mutans*. *Eur J Biochem* 133:255-261.
51. Ewers GJ, Taylor RL and Schoenfeld CM (1977) Scanning electron microscopy of human dental pellicle and initial plaque formation in vivo. *Aust Dent J* 22:462-467.
52. Featherstone JDB, Behrman JM and Bell JE (1993) Effect of whole saliva components on enamel demineralization in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:357-362.
53. Fleiss JL: Reliability of Measurement. In: Fleiss JL (ed): The design and analysis of clinical experiments. John Wiley & Sons, Inc. United States of America (1986) S. 1-32.
54. Fisher SJ, Prakobphol A, Kajisa L and Murray PA (1987) External radiolabelling of components of pellicle on human enamel and cementum. *Arch Oral Biol* 32:509-517.
55. Frank RM, Brendel A (1966) Ultrastructure of the approximal dental Plaque and the underlying normal and carious enamel. *Arch Oral Biol* 11:883-912.
56. Friedman SA, Mandel ID and Herrera MS (1983) Lysozyme and lactoferrin quantitation in the crevicular fluid. *J Periodontol* 54 (6):347-350.
57. Gendler SJ and Spicer AP (1995) Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* 57:607-634.
58. Germaine GR and Tellefson LM (1986) Potential role of lysozyme in bacterial activity of in vitro-acquired salivary pellicle against *Streptococcus faecium* 9790. *Infect Immun* 54(3):846-854.
59. Gibbons RJ and Hay DI: Adsorbed Salivary Proline-Rich Proteins as Bacterial Receptors on Apatitic Surfaces. In: Switalski LM, Hook M, Beachey E (eds.): Molecular Mechanisms of Microbial Adhesion. New York: Springer-Verlag (1988b) S. 143-169.
60. Gibbons RJ and Hay DI (1988a) Human Salivary Acidic Proline-Rich Proteins and Statherin Promote the Attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to Apatitic Surfaces. *Infect Immun* 56:439-445.
61. Gibbons RJ and Hay DI (1989) Adsorbed Salivary Acidic-Proline-Rich Proteins contribute to the Adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to Apatitic Surfaces. *J Dent Res* 68:1303-1307.
62. Gibbons RJ, Hay DI, Cisar JO and Clark WB (1991) Adsorbed Salivary Proline-Rich Protein 1 and Statherin: Receptors for Type 1 Fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on Apatitic Surfaces. *Infect Immun* 59:2948-2954.
63. Gibbons RJ, Cohen L and Hay DI (1986) Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. *Infect Immun* 52:555-561.
64. Gibbons RJ and Etherden I (1985) Albumin as a blocking agent in studies of streptococcal adsorption to experimental salivary pellicles. *Infect Immun* 50:592-594.

65. Gillece-Castro BL, Prakobphol A, Burlingame AL, Leffler H and Fisher SJ (1991) Structure and bacterial receptor activity of human salivary proline-rich glycoprotein. *J Biol Chem* 226:17358-17368.
66. Glantz PO: Adhesion to the surfaces of the teeth. In: Leach SA: Dental plaque and surface interactions in the oral cavity. IRL Press Ltd., London (1980) S. 49-64.
67. Grobler SR, Ogaard B and Rølla G: Uptake and retention of fluoride in sound dental enamel in vivo after a single application of neutral 2% sodium fluoride. In: Rølla G, Sønju T and Embery G (eds.): Tooth surface interactions and preventive dentistry. IRL Press Ltd, London, (1981) S. 17-25.
68. Grøn P and Hay DI (1976) Inhibition of Calcium Phosphate Precipitation by Human Salivary Secretions. *Arch Oral Biol* 21:201-205.
69. Hannesson Eggen K (1983) Adsorption of proteins onto dental enamel in vivo and hydroxyapatite in vitro. Thesis University Oslo.
70. Hannig M (1994) Bildung, Funktion und Bedeutung der Pellikel. I. Biochemische, bakteriologische und strukturelle Aspekte. *Oralprophylaxe* 16:39-46.
71. Hannig M (1998) Die protektive Wirkung der Pellikel bei der Schmelzerosion durch verschiedene Säuren. *ZWR* 7/8 421-426.
72. Hannig M (2002) The protective nature of salivary pellicle. *Int Dent J* Vol. 52/no.5 (Suppl 2):418-423.
73. Hannig M (1997) Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci* 105:422-433.
74. Hannig M (1999) Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Invest* 3:88-95.
75. Hannig M (1993) Ultrastructural studies of salivary pellicle formation on ceramics, glass ceramics, and dental enamel in vivo. *Caries Res* 27:227-228.
76. Hannig M and Balz M (1999) Influence of in vivo Formed Salivary Pellicle. *Caries Res* 33:372-379.
77. Hannig M und Bößmann K (1989) Pellicula dentis.-Ultrastrukturelle Vielfalt als Ausdruck komplexer Bildung und Reifung. Teil I und II. *Quintessenz* 40:1329-1327 bzw. 1485-1489.
78. Hatton MN, Loomis RE, Levine MJ and Tabak LA (1985) Masticatory Lubrication. The Role of Carbohydrate in the Lubricating Property of a Salivary Glycoprotein-Albumin Complex. *Biochem J* 230:817-820.
79. Hay DI (1969) Some observations on human saliva proteins and their role in the formation of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res* 48:806-810.
80. Hay DI (1967) The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. *Arch Oral Biol* 11:937-946.
81. Hay DI (1973) The Interaction of Human Parotid Salivary Proteins with Hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 18:1517-1529.

82. Hay DI and Moreno EC (1979) Differential Adsorption and Chemical Affinities of Proteins for Apatite Surfaces. *J Dent Res* 58:930-940.
83. Hay DI and Moreno EC: Statherin and Acidic Proline-rich Proteins. In: Tenovou JO (ed.): *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology*. Boca Raton: CRC Press (1989) S 131-150.
84. Hay DI, Moreno EC and Schlesinger DH (1979) Phosphoprotein Inhibitors of Calcium Phosphate Precipitation from Human Salivary Secretions. *Inorg Persp Biol Med* 2:271-285.
85. Hay DI, Carlson ER, Schluckebier SK, Moreno EC and Schlesinger DH (1987) Inhibition of Calcium Phosphate Precipitation from Human Salivary Acidic Proline-Rich Proteins: Structure-Activity Relationships. *Arch Oral Biol* 18:126-132.
86. Hay DI, Bennick A, Schlesinger DH, Minaguchi K, Madapallimattam G and Schluckebier SK (1988) The Primary Structures of Six Human Salivary Acidic Proline-Rich Proteins (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, PIF-s, PIF-f). *Biochem J* 255:15-21.
87. Helmerhorst EJ, Van't Hof W, Veerman EC, Simoons-Smit I, Nieuw Amerongen AV (1997) Synthetic histatin analogues with broad-spectrum antimicrobial activity. *Biochem J* 326:39-45.
88. Henning T, Heinrich-Weltzien R, Röhrig B and Stöber L (2003) Changes in salivary protein composition in children during adolescence. *Caries Res* 37:269-270.
89. Hoppe WF (1970) Experimentelle Untersuchungen über die Struktur, den anorganischen Gehalt, den Bildungsmechanismus und die Funktion des Zahnoberhautchens. *Med Habil Kiel*
90. Imfeld T (1984) Oligosialie und Xerostomie I: Grundlagen, Epidemiologie, Ätiologie und Pathologie. *Acta Parodontol* 13:81-110.
91. Ioncheteva I, Oppenheim FG and Troxler RF (1997) Human Salivary Mucin MG1 Selectively Forms Heterotypic Complexes with Amylase, Proline-rich Proteins, Statherin, and Histatins. *J Dent Res* 76:734-743.
92. Isemura S, Saitoh E and Sanada K (1987) Characterization and Amino Acid Sequence of a New Acidic Cysteine Proteinase Inhibitor (Cystatin SA) Structurally Closely to Cystatin S, from Human Whole Saliva. *J Biochem* 102:693-704.
93. Isemura S, Saitoh E and Sanada K (1986) Characterization of a New Cysteine Proteinase Inhibitor of Human Saliva, Cystatin SN, Which is Immunologically Related to Cystatin S. *S FEBS Lett.* 198:145-149.
94. Isemura S, Saitoh E and Sanada K (1980) The amino-acid sequence of a salivary proline-rich peptide, P-C, and its relation to a salivary proline-rich phosphoprotein, protein C. *J Biochem* 87:1071-1077.
95. Isemura S, Saitoh E, Ito S, Isemura M and Sanada K (1984) Cystatin S: A Cysteine Proteinase Inhibitor of Human Saliva. *J Biochem* 96:1311-1314.
96. Jenkins GN: *The physiology and biochemistry of the mouth*. 4th Ed. Alden Press, Oxford (1978) S. 284-360.

97. Jensen JL, Lamkin MS, Troxler RF and Oppenheim FG (1992) Adsorption of Human Salivary Proteins to Hydroxyapatite: A Comparison between Whole Saliva and Glandular Salivary Secretions. *J Dent Res* 71:1569-1576.
98. Jensen JL, Lamkin MS, Troxler RF and Oppenheim FG (1991) Multiple Forms of Statherin In Human Salivary Secretions. *Arch Oral Biol* 36:529-534.
99. Johnsson M, Richrdson CF, Bergey EJ, Levine MJ and Nancollas GH (1991) The Effects of Human Salivary Cystatins and Statherin on Hydroxyapatite Crystallization. *Arch Oral Biol* 36:631-636.
100. Juriaanse AC: Phosphoproteins and function of the pellicle. In: Leach SA (ed.): *Dental Plaque and Surface Interactions in the Oral Cavity*. London: IRL Press (1980) S. 313-318.
101. Juriaanse AC and Booij M (1979) Isolation and partial characterisation of the three acidic proteins from human submandibular saliva. *Arch Oral Biol* 24: 621.
102. Kauffman DL and Keller PJ (1979) The basic proline-rich proteins in human parotid saliva from a single subject. *Arch Oral Biol* 24:249-256.
103. Kehrer U, Fischer T, Kneist S and Stöber L (1999) Reversed phase liquid chromatography of human salivary proteins. *Caries Res* 33:309-310.
104. Klein H, Palmer CE and Knutson JW (1938) Studies in dental caries. I. Dental status and dental needs of elementary school children. *Public Health Rep* 53:751.
105. Klimm W: *Kariologie*. Carl Hanser Verlag München Wien: (1997) S. 84.
106. König KG: *Karies und Parodontopathien*. ThiemeVerlag Stuttgart (1987).
107. König KG und Goepel C (1992) Die Bedeutung des Speichels für die Mund- und Zahngesundheit. *Zahnärztl Mitt* 82:42-53.
108. Kousvelari EE, Baratz RS, Burke B and Oppenheim FG (1980) Immunochemical Identification and Determination of Proline-rich Proteins in Salivary Secretions, Enamel Pellicle, and Glandular Tissue Specimens. *J Dent Res* 59 (8):1430-1438.
109. Kraus FW and Mestecky J (1976) Salivary proteins and the development of dental plaque. *J Dent Res* 55:149-152.
110. Kraus FW, Øratavik D, Hurst DC and Cook CH (1973) The aquired pellicle: Variability and subject-dependence of specific proteins. *J Oral Path* 2:165-173.
111. Kuboki Y, Teraoka K and Okada S (1987) X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel. *J Dent Res* 66:1016-1019.
112. Laible NJ and Germaine GR (1985) Bacterial activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis* : inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect Immun* 48(3):720-728.
113. Lamkin MS, Arancillo AA and Oppenheim FG (1996) Temporal and Compositional Characteristics of Salivary Protein Adsorption to Hydroxyapatite. *J Dent Res* 75:803-808.

114. Lamkin MS, Setayesh MR, Troxler RF and Oppenheim FG(1991b) Amino Acid Sequence of Peptides Isolated from Acquired Enamel Pellicle. IADR Prog & Abst 70 No 1861.
115. Lamkin MS, Migliari D, Yao Y, Troxler RF and Oppenheim FG (2001) New in vitro Model for the Aquired Enamel Pellicle: Pellicles Formed from Whole Saliva Show Inter-subject Consistency in Protein Composition and Proteolytic Fragmentation Patterns. J Dent Res 80:385-388.
116. Lamkin MS, Jensen JL, Setayesh RM, Troxler RF and Oppenheim FG (1991a) Salivary Cystatin SA-III, a Potential Precursor of the Acquired Enamel Pellicle, Is Phosphorylated at Both ist Amino- and Carboxyl-Terminal Regions. Arch Biochem Biophys 288:664-670.
117. Lange DE: Parodontologie in der täglichen Praxis. 3. Aufl. Quintessenz, Berlin (1986).
118. Leach SA (1967) The aquired integuments of the teeth. A biochemical review. Br Dent J 122:537-544.
119. Leach SA and Appleton J: Ultrastructural investigations by energy dispersive x-ray microanalysis of some of the elements involved in the formation of dental plaque and pellicle. In: Rølla G, Sønju R and Embery G (eds.): Tooth surface interactions and preventive dentistry. 1. Aufl., IRL Press, Ltd, London (1981) S. 65-79.
120. Leach SA and Saxton CA (1966) An electron microscopic study of the acquired pellicle and plaque formed on the enamel of human incisors. Arch Oral Biol 11:1081-1094.
121. Leach SA, Critshley P, Kolendo AB and Saxton CA (1967) Salivary glycoproteins as components of the enamel integuments. Caries Res 1:104-111.
122. Lendenmann U, Grogan J and Oppenheim FG (2000) Saliva and Dental Pellicle-A Review. Adv Dent Res 14:22-28.
123. Lenz H (1967) Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Schmelzoberhäutchen (SOH): 2. Das Schmelzoberhäutchen von durchgebrochenen Zähnen. Dtsch Zahnärztl Z 22:1466-1482.
124. Leung K-P, Nesbitt WE, Fischlschweiger W, Hay DI and Clark WB (1990) Binding of Colloidal Gold-Labeled Salivary Proline-Rich Proteins to Actinomyces viscosus Type 1 Fimbriae. Infect Immun 58:1986-1990.
125. Levine MJ (1993) Development of Artificial Saliva. Crit Rev Oral Biol Med 4:279-286.
126. Levine MJ, Tabak LA, Reddy M and Mandel ID: Nature of salivary pellicles in microbial adherence: Role of salivary mucins. In: Mergenhagen SE, Rosan B (eds.): Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion. Washington: American Society for Microbiology (1985) S. 125-130.
127. Levine MJ, Reddy M, Tabak LA, Loomis RE, Bergey EJ, Jones PC, Cohen RE, Stinson MW and Al-Hashimi I (1987a) Structural aspects of salivary glycoproteins. J Dent Res 66:436-441.
128. Lie T (1979) Morphological studies on dental claque formation. Acta Odontol Scand 37:73-85.

129. Lie T (1975) Pellicle formation on hydroxyapatite splints attached to the human dentition: Morphological confirmation of the concept of adsorption. *Arch Oral Biol* 20:739-742.
130. Lie T (1977b) Scanning and transmission electron microscope study of pellicle morphogenesis. *Scand J Dent Res* 85:217-231.
131. Lie T (1978) Ultrastructural study of early dental plaque formation. *J Periodontol Res* 13:391-409.
132. Loomis RE, Prakobphol A, Levine MJ, Reddy MS and Jones PC (1987) Biochemical and biophysical comparison of two mucins from human submandibular-sublingual saliva. *Arch Biochem Biophys* 258:452-464.
133. Lowry OH, Roseborough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
134. MacKay BJ, Denepitiya L, Iacono VJ, Krost SB and Pollock JJ (1984) Growth-Inhibitory and Bactericidal Effects of Human Parotid Salivary Histidine-Rich Polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 44:695-701.
135. Madapallimattam G and Bennick A (1989) Biologically active phosphopeptides in human whole saliva. *J Dent Res* 68:984, Abstr. No. 939.
136. Mandel ID (1987) The Functions of Saliva. *J Dent Res* 66:(Spec) 623-627.
137. Mandel ID (1980) Sialochemistry in diseases and clinical situations affecting salivary glands. *Crit Rev Clin Lab Sci* 12:321-366.
138. Mandel ID, Behrmann J, Levy R and Weinstein D (1983) The salivary lactoperoxidase system in caries-resistant and -susceptible adults. *J Dent Res* 62:(8)922-925.
139. Mayhall CW (1977) Amino acid composition of experimental salivary pellicles. *J Periodont* 48:78-91.
140. Mayhall CW (1970) Concerning the composition and source of the acquired enamel pellicle of human teeth. *Arch Oral Biol* 15:1327-1341.
141. Mayhall CW (1975) Studies on the composition of the enamel pellicle. *Alabama J Med Sci* 12:252-271.
142. Mayhall CW and Butler WT (1976) The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. *J Oral Path* 5:358-370.
143. Mayo JW and Carlson DM (1974) Isolation and Properties of Four α -Amylase Isoenzymes from Human Submandibular Saliva. *Arch Biochem Biophys* 163:498-506.
144. Meckel AH (1965) The formation and properties of organic films on teeth. *Arch Oral Biol* 10:585-597.
145. Meurman JH and Frank RM (1991) Scanning electronic microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 25:1-6.
146. Meyer JG: *Labormedizin*. Deutscher Ärzte-Verl, Köln 1990.

147. Minaguchi K and Bennick A (1989) Genetics of Human Salivary Proteins. *J Dent Res* 68:2-15.
148. Moreno EC and Zahradnik RT (1979) Demineralization and remineralization of dental enamel. *J Dent Res* 58:896-902.
149. Moreno EC, Kresak M and Hay DI (1978) Adsorption of Two Human Parotid Salivary Macromolecules on Hydroxy-, Fluorhydroxy- and Fluorapatites. *Arch Oral Biol* 23:525-533.
150. Moreno EC, Kresak M and Hay DI (1984) Adsorption of Molecules of Biological Interest onto Hydroxyapatite. *Calcif Tiss Int* 36:48-59.
151. Moreno EC, Kresak M and Hay DI (1982) Adsorption Thermodynamics of Acidic Proline-Rich Human Salivary Proteins onto Calcium Apatites. *J Biol Chem* 257:2981-2989.
152. Moreno EC, Varughese K and Hay DI (1979) Effect of Human Salivary proteins on The Precipitation Kinetics of Calcium Phosphates. *Calcif Tiss Int* 28:7-16.
153. Murakami Y, Takeshita T, Shizukuishi S, Tsunemitsu A and Aimoto S (1990a) Inhibitory Effects of Synthetic Histidine-Rich Peptides on Hemagglutination by *Bacteroides gingivalis* 381. *Arch Oral Biol* 35:775-777.
154. Murakami Y, Amano A, Takagaki S, Shizukuishi S, Tsunemitsu A and Aimoto S (1990b) Purification and Characterization from Human Parotid Secretion of a Peptide Which Inhibits Hemagglutination of *Bacteroides gingivalis* 381. *FEMS Microbiol. Lett* 72:275-280.
155. Murakami Y, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Nakashima K, Kato Y and Aimoto S (1991) Binding of a Histidine-Rich Peptide to *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 82:253-256.
156. Navazesh M and Christensen CM (1982) A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res* 61:1158-1162.
157. Nekrashevych Y and Stöber L (2003) Protective Influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries Res* 187:1-7.
158. Newbrun E: Cariology. Chicago: Quintessence Publ, (1989). S. 177-189.
159. Nieuw Amerongen AV, Bolscher JGM and Veerman ECI (1995) Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity. *Glycobiology* vol. 5 no.8 pp. 733-740.
160. Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH and Driessen AA (1987) Role of mucins from human whole saliva in protection of tooth enamel against demineralisation in vitro. *Caries Res* 21:297-309.
161. Norde W: Adsorption of biopolymers and its relevance for particle adhesion: a physico-chemical approach. In: Ten Cate JM, Leach SA, Arends J: Bacterial adhesion and preventive dentistry. 1. Aufl., IRL Press Ltd., Oxford (1984) S. 1-17.
162. Nyvad B and Fejerskov O: Experimentally induced changes in ultrastructure of pellicle and microbial colonization on enamel in vivo. In: Ten Cate JM, Leach SA, Arends J:

- Bacterial adhesion and preventive dentistry. 1. Aufl., IRL Press, Oxford (1984) S.143-151.
163. Nyvad B and Fejerskov O (1987) Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human dental enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95:297-307.
 164. Offner GD and Troxler RF (2000) Heterogeneity of High-molecular-weight Human Salivary Mucins. *Adv Dent Res* 14:69-75.
 165. Oppenheim FG, Hay DI and Franzblau C (1971) Proline-Rich Proteins from Human Parotid Saliva. I. Isolation and Partial Characterization. *Biochemistry* 10:4233-4238.
 166. Oppenheim FG, Yang JC, Diamond RD, Hyslop D, Offner GD and Troxler RF (1986) The primary Structure and Functional Characterization of the Neutral Histidine-Rich Polypeptide from Human Parotid Secretion. *J Biol Chem* 261:1177-1182.
 167. Oppenheim FG, Xu T, McMillan FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD and Troxler RF (1988) Histatins a Novel Family of Histidine-Rich Proteins in Human Parotid Secretions. *J Biol Chem* 263:7472-7477.
 168. Örstavik D and Kraus FW (1974) The acquired pellicle: enzymes and antibody activities. *Scand J Dent Res* 82:2-205.
 169. Örstavik D and Kraus FW (1973) The acquired pellicle: Immunofluorescent demonstration of specific proteins. *J Oral Pathol* 2:68-76.
 170. Öste R, Rönström A, Birkeland D, Edwardson S and Stenberg G (1981) Gas-liquid chromatography analysis of amino acid in pellicle formed on tooth surface and plastic films in vivo. *Arch Oral Biol* 26:635-641.
 171. Perinpanayagam HER, VanWuyckhuysse BC, Ji ZS and Tabak LA (1995) Characterization of Low-molecular-weight Peptides in Human Parotid Saliva. *J Dent Res* 74:345-350.
 172. Pratt-Terpstra JH, Weerkamp AH and Busscher HJ (1987) Adhesion of oral streptococci from a flowing suspension to uncoated and albumin-coated surfaces. *J Gen Microbiol* 133:3199-3206.
 173. Pruitt KM, Caldwell RC, Jamieson AD and Taylor RE (1969) The interaction of salivary proteins with tooth surface. *J Dent Res* 48:818-823.
 174. Ramasubbu N, Reddy MS, Bergey EJ, Haraszthy GG, Soni S-D and Levine MJ (1991) Large-Scale Purification and Characterization of Major Phosphoproteins and Mucins of Human Submandibular-Sublingual Saliva. *Biochem J* 280:341-352.
 175. Richardson CF, Johnsson M, Raj PA, Levine MJ and Nancollas GH (1993) The Influence of Histatin-5 Fragments on the Mineralization of Hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 38:997-1002.
 176. Robinson R, Kauffman DL, Wayne MMY, Blum M, Bennick A and Keller PJ (1989) Primary Structure and Possible Origin of Non-Glycosylated Basic Proline-Rich Protein of Human Submandibular/Sublingual Saliva. *Biochem J* 263:497-503.

177. Rølla G, Ciardi JE and Bowen WH (1983) Identifikation of IgA, IgG, lysozyme, albumin, -amylase and glycosyltransferase in the protein layer adsorb to hydroxyapatite from whole saliva. *Scand J Dent Res* 91:1986-2190.
178. Ruan MS, DiPaola C and Mandel ID (1986) Quantitative immuno-chemistry of salivary proteins adsorbed in vitro to enamel and cementum from caries.resistent and caries-susceptible human adults. *Arch Oral Biol* 31:597-601.
179. Rüdiger SG, Carlén A, Meurman JH, Kari K and Olsson J (2002) Dental biofilms at healthy and inflamed gingival margins. *J Clin Periodontol* 29:524-530.
180. Rudney JD (2000) Saliva and Dental Claque. *Adv Dent Res* 14:29-39.
181. Ruhl S (1999) Proteine und Glycoproteine im Speichel: Interaktionen mit der oralen mikrobiellen Flora und mögliche klinische Bedeutung. Habilitationsschrift Universität Regensburg.
182. Rykke M and Rølla G (1990) Effect of silicone oil on protein adsorption to hydroxyapatite in vitro and on pellicle formation in vivo. *Scand J Dent Res* 98:401-411.
183. Rykke M, Rølla G and Sønju T (1988) Effect of pyrophosphate on protein adsorption to hydroxyapatite in vitro and on pellicle formation in vivo. *Scand J Dent Res* 96:517-522.
184. Rykke M, Rølla G and Sønju T (1990) Effect of sodium lauryl sulfate on protein adsorption to hydroxyapatite in vitro and on pellicle formation in vivo. *Scand J Dent Res* 98:135-143.
185. Rykke M, Sønju T, Skørland K and Rølla G (1989) Protein adsorption to hydroxyapatite and to calcium fluoride in vitro and amino acid analysis of pellicle formed on normal enamel and calcium-fluoride-covered enamel in vivo. *Acta Odontol Scand* 47:245-251.
186. Rykke M, Sønju T and Rølla G (1990b) Interindividuell and longitudinal studies of amino acid composition of pellicle collected in vivo. *Scand J Dent Res* 98:129-134.
187. Sabatini LM, He YZ and Azen EA (1990) Structure and Sequence Determination of the Gene Encoding Human Salivary Statherin. *Gene* 89:245-251.
188. Saxer UP und Mühlemann R (1975) Motivation und Aufklärung. *Schweiz Mschr Zahnheilk* 85:905.
189. Scannapieco FA, Bergey EJ, Reddy MS and Levine MJ (1989) Characterization of the Salivary α -Amylase Binding to *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun* 57:2853-2863.
190. Scannapieco FA, Bhandary K, Ramasubbu N and Levine MJ (1990) Structural Relationship Between the Enzymatic and Streptococcal Binding Sites of Human Salivary α -Amylase. *Biochem Biophys Res Commun* 173:1109-1115.
191. Scannapieco FA, Torres GI and Levine MJ (1995) Salivary Amylase Promotes Adhesion of Oral Streptococci to Hydroxyapatite. *J Dent Res* 74:1360-1366.
192. Schlesinger DH and Hay DI (1986) Complete Covalent Structure of a proline-rich phosphoprotein, PRP-2, an inhibitor of calcium phosphate crystal growth from human parotid saliva. *Int J Pept Protein Res* 27:373-379.

193. Schlesinger DH and Hay DI (1977) Complete Covalent Structure of Statherin, a Tyrosin-Rich Acidic Peptide Which Inhibits Calcium Phosphate Precipitation from Human Parotid Saliva. *J Biol Chem* 252:1689-1695.
194. Schlesinger DH, Buku A, Wyssbrod HR and Hay DI (1987) Chemical Synthesis of Phosphoseryl-Phosphoserine, a Partial Analogue of Human Salivary Statherin, a Protein Inhibitor of Calcium Phosphate Precipitation in Human Saliva. *Int J Peptide Protein Res* 30:257-262.
195. Schüle H (1961) Chemische Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften des Schmelzoberhäutchens. *Arch Oral Biol* 4:40-49.
196. Schüle H: Das Schmelzoberhäutchen. Untersuchungen über die morphologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften. 1. Aufl., Thieme, Stuttgart (1962)
197. Schüle H (1963) The enamel cuticle in incipient caries. Morphological and biochemical investigations. *Int Dent J* 13:465-470.
198. Sheehan D: Physical biochemistry: Principles and applications. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2000, S. 134.
199. Shomers JP, Tabak LA, Levine MJ and Hay DI (1982) Properties of cysteine-Containing Phosphoproteins from Human Submandibular-Sublingual Saliva. *J Dent Res* 61:397-399.
200. Skørland K, Rykke M and Sønju T (1995) Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand* 53:358-362.
201. Slomiany BL, Murty VLN, Zdebska E, Slomiany A, Gwozdziński K and Mandel ID (1986) Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. *Arch Oral Biol* 31:187-191.
202. Slomiany BL, Murty VLN, Mandel ID, Sengputa S and Slomiany A (1990) Effects of lipids on the lactic retardation capacity of tooth enamel and cementum pellicles formed in vitro from saliva of caries-resistant and caries-susceptible human adults. *Arch Oral Biol* 35:175-180.
203. Smith PM: Mechanisms of Secretion by Salivary Glands. In: Edgar WM, O'Mullane DM (eds.): *Saliva and Oral Health*. 2. Aufl., Thanet Press Limited, London (1996) S. 9-25.
204. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem*. 79:76-85.
205. Söderling E Practical aspects of salivary analyses. In: Tenovuo JO (eds.): *Human saliva: clinical chemistry and microbiology*. Band 1. Florida CRC Press, Boca Raton, (1989) S. 1-24.
206. Sønju T and Glantz, P-O (1975) Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics. *Arch Oral Biol* 20:687-691.

207. Sønju T and Rølla G (1973) Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Res* 7:30-38.
208. Sønju T and Skørland K (1976) Pellicle composition and initial bacterial colonization on composite and amalgam in vivo. *Microbiol 1 (Spec Suppl)* 133-141.
209. Sønju T, Christensen TB, Kornstad L and Rølla G (1974) Electron Microscopy, carbohydrate analyses and biological activities of the proteins adsorbed in two hours to tooth surfaces in vivo. *Caries Res* 8:113-122.
210. Strous GJ and Dekker J (1992) Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27:57-92.
211. Stubbs M, Chan J, Kwan A, So J, Barchynsky U, Rassouli-Rahsti M, Robinson R and Bennick A (1998) Encoding of human basic and glycosylated proline-rich proteins by the PRB gene complex and proteolytic processing of their precursor proteins. *Arch Oral Biol* 43:753-770.
212. Sreebny LM (2000) Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J* 50:140-161.
213. Sreebny LM: Xerostomia: diagnosis, management and clinical complications. In: Edgar WM, O'Mullane DM (eds.): *Saliva and oral health*. 2. Aufl. London British Dental Association (1996) S. 43-66.
214. Tabak LA, Levine MJ, Jain JK, Brian AR, Cohen RE, Monte LD, Zawacki SJ, Nancollas GH, Slomiany A and Slomiany BL (1985) Adsorption of Human Salivary Mucins to Hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 30:423-427.
215. Tabak LA (1995) In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Rev Physiol* 57:547-564.
216. Tenovuo J (1981) Different molecular forms of human salivary lactoperoxidase. *Arch Oral Biol* 26:1051-1055.
217. Till U und Thielmann K: *Pathobiochemie*. Berlin: Verl Volk und Gesundheit (1989) S. 176-183.
218. Tinanoff N, Wei SHY and Parkins FM (1975) Effect of acquired pellicle on fluoride uptake in tooth enamel in vitro. *Caries Res* 9:224-230.
219. Troxler RF, Offner GD, Xu T, vanderSpek JC and Oppenheim FG (1990) Structural Relationship Between Human Salivary Histatins. *J Dent Res* 69:2-6.
220. Veerman ECI, Van den Keybus PAM, Vissink A and Nieuw Amerongen AV (1996) Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Eur J Oral Sci* 104:346-352.
221. Virella G, Goudswaard J (1978) Measurement of salivary lysozyme. *J Dent Res* 57:326-328.
222. Waldeyer A und Mayet A: *Anatomie des Menschen, Band 2* Berlin: Walter de Gruyter (1993) S. 194.

223. Whelton H: Introduction: The anatomy and physiology of salivary glands. In: Edgar WM, O'Mullane DM (eds.): *Saliva and oral health*, 2. Auflage, London: British dental association, (1996) S. 1-8.
224. Wikstrom M and Linde A (1986) Ability of oral bacteria to degrade fibronectin. *Infect Immun* 51 (2):707-11.
225. Wong RSC, Madapallimattam G and Bennick A (1983) The Role of Glandular Kallikrein in the Formation of a Salivary Proline-rich Protein A by Cleavage of a Single Bond in Salivary Protein C. *Biochem J* 211:35-44.
226. Xu T, Levitz SM, Diamond RD and Oppenheim FG (1991) Anticandidal Activity of Major Human Salivary Histatins. *Infect Immun* 59:2549-2554.
227. Yao Y, Lamkin MS and Oppenheim FG (2000) Pellicle Precursor Protein Crosslinking: Characterization of an Adduct between Acidic Proline-Rich Protein (PRP-1) and Statherin Generated by Transglutaminase. *J Dent Res* 79(4):930-938.
228. Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, Costello CE and Oppenheim FG (2001) Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol* 46: 293-303.
229. Zahradnik RT, Moreno EC and Burke EJ (1976) Effect of Salivary Pellicle on Enamel Subsurface Demineralization in vitro. *J Dent Res* 55:664-670.
230. Zahradnik RT, Propas D and Moreno EC (1978) Effect of Salivary Pellicle Formation time by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 57:1036-1042.
231. Zahradnik RT, Propas D and Moreno EC (1978) Effect of salivary pellicle formation on in vitro attachment and demineralization by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 57:1036-1042.
232. Zahradnik RT, Propas D and Moreno EC (1977) In vitro enamel demineralization by *Streptococcus mutans* in the presence of salivary pellicle. *J Dent Res* 56:1107-1110.

9 Anhang

Mittelwerte der Proteinmengen des unstimulierten Mischspeichels je Proband (Tab. 20)

Absolutwerte der Proteinmengen des stimulierten Parotisspeichels je Proband (Tab. 21)

Einzelwerte der Proteinmengen des unstimulierten und stimulierten Mischspeichels der Proteinfraktionen A bis I (Tab. 22)

Varianzanalyse (Tab. 23 und Abb. 17)

Proteinmengen der Proteinfraktionen A bis I der Pellikel P-60 bzw. P-4x15 (Tab. 24/25)

Kombinationen der PRP-Polymorphismen (Tab. 25)

Einfluss von TFA auf die Speichelproteine (Abb. 18)

Tab.: 20 → Mittelwerte der Proteinmengen in µg/ml des unstimulierten Speichels je Proband (n=5)

□	A□	B□	C□	D□	E□	F□	G□	H□	I□	Summe□
	$\bar{x} \pm SD$ ·VK [%]□	$\bar{x} \pm SD$ ·VK [%]□	$\bar{x} \pm SD$ ·VK [%]□	$\bar{x} \pm SD$ ·VK [%]□	$\bar{x} \pm SD$ ·VK [%]□	$\bar{x} \pm SD$ ·VK [%]□	$\bar{x} \pm SD$ ·VK [%]□	$\bar{x} \pm SD$ ·VK [%]□	$\bar{x} \pm SD$ ·VK [%]□	$\bar{x} \pm SD$ ·VK [%]□
1□	754,82 ± 264,51 35□	149,62 ± 76,36 51□	124,89 ± 75,88 61□	406,58 ± 103,65 25□	37,40 ± 8,28 22□	65,94 ± 18,09 27□	50,48 ± 23,59 47□	98,57 ± 21,93 22□	355,54 ± 60,58 17□	2043,85 ± 531,61 26□
2□	557,28 ± 100,10 18□	126,81 ± 26,75 21□	37,30 ± 10,48 28□	301,52 ± 36,11 12□	37,96 ± 8,82 23□	103,94 ± 25,44 24□	70,99 ± 9,42 13□	70,54 ± 18,67 26□	243,82 ± 33,32 14□	1550,16 ± 217,32 14□
3□	657,70 ± 86,88 13□	96,16 ± 15,67 16□	118,76 ± 30,71 26□	226,00 ± 46,97 21□	14,25 ± 3,60 25□	59,55 ± 8,13 14□	75,93 ± 33,92 45□	206,46 ± 15,11 7□	103,32 ± 23,39 23□	1558,13 ± 187,18 12□
4□	518,88 ± 185,55 36□	72,98 ± 33,74 46□	49,88 ± 33,04 66□	163,70 ± 90,22 55□	11,10 ± 8,02 72□	28,21 ± 21,41 76□	48,76 ± 13,14 27□	90,30 ± 17,27 19□	156,54 ± 63,03 40□	1140,34 ± 423,37 37□
5□	1163,88 ± 407,83 35□	203,78 ± 58,97 29□	101,12 ± 36,43 36□	272,68 ± 51,22 19□	16,77 ± 10,52 63□	99,08 ± 24,85 25□	69,12 ± 16,36 24□	72,84 ± 22,64 31□	497,31 ± 90,43 18□	2496,58 ± 645,16 26□
6□	1072,57 ± 193,35 18□	173,55 ± 49,96 29□	48,39 ± 19,97 41□	284,86 ± 104,01 37□	45,47 ± 13,66 30□	132,56 ± 44,85 34□	148,34 ± 34,91 24□	221,97 ± 69,01 31□	794,35 ± 123,54 16□	2922,07 ± 529,15 18□
7□	333,81 ± 64,66 19□	32,91 ± 11,40 35□	13,54 ± 2,06 15□	161,03 ± 17,61 11□	14,88 ± 2,28 16□	37,93 ± 6,59 17□	46,48 ± 7,77 17□	105,50 ± 28,06 27□	437,38 ± 46,27 11□	1182,76 ± 145,81 12□
8□	515,45 ± 167,11 32□	124,70 ± 41,62 33□	23,16 ± 6,88 30□	313,20 ± 66,25 21□	19,72 ± 7,08 36□	72,75 ± 8,36 11□	60,22 ± 12,09 20□	55,35 ± 7,93 14□	245,54 ± 45,39 18□	1430,10 ± 332,36 23□
9□	718,73 ± 259,06 36□	95,27 ± 38,97 41□	144,31 ± 39,17 28□	381,80 ± 81,85 21□	18,31 ± 4,01 22□	67,80 ± 16,57 24□	59,25 ± 15,35 26□	156,98 ± 63,48 40□	331,14 ± 115,96 35□	1973,59 ± 528,83 27□
10□	742,41 ± 260,28 35□	170,76 ± 64,54 38□	0□	343,87 ± 118,94 35□	25,98 ± 13,20 51□	108,72 ± 31,96 29□	46,42 ± 11,66 25□	115,44 ± 14,58 13□	322,12 ± 64,92 20□	1861,03 ± 533,09 29□
11□	688,84 ± 151,18 22□	109,08 ± 45,01 41□	75,52 ± 69,27 96□	412,04 ± 109,30 27□	35,21 ± 22,12 63□	103,02 ± 36,48 35□	64,60 ± 7,87 12□	83,74 ± 12,60 15□	406,44 ± 78,75 19□	1975,49 ± 420,00 21□
— x□	702,22 ± 241,32 34□	123,24 ± 49,39 40□	66,72 ± 48,98 73□	297,02 ± 87,72 30□	25,12 ± 11,88 47□	79,96 ± 32,13 40□	67,33 ± 28,77 43□	116,15 ± 28,77 43□	353,95 ± 187,46 53□	1830,37 ± 541,49 30□

Tab.: 21 Absolutwerte der Proteinmengen in µg/ml des **stimulierten Parotisspeichels** je Proband (n = 10)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe
1	2564,06	387,16	427,94	1103,64	30,08	45,18	32,22	0,00	623,98	5214,26
2	2782,48	525,20	287,08	913,98	80,08	95,00	27,84	0,00	550,22	5261,88
3	1841,12	250,74	659,12	580,54	17,44	40,52	18,54	0,00	91,80	3499,82
4	3286,16	559,12	649,34	1021,58	76,46	154,42	50,52	0,00	491,70	6289,30
5	1564,02	306,30	169,98	506,38	50,28	74,20	22,12	0,00	649,86	3343,14
7	1832,10	183,08	211,30	832,40	95,46	41,52	27,50	0,00	930,88	4154,24
8	436,46	96,62	27,28	216,30	3,34	18,42	9,82	0,00	272,36	1080,60
9	375,74	31,28	77,06	146,24	8,52	0,00	0,00	0,00	229,20	868,04
10	1070,96	201,10	0,00	457,86	49,98	94,94	0,00	0,00	352,92	2227,76
11	2093,90	347,80	251,94	893,88	130,36	116,72	46,10	0,00	708,82	4589,52
\bar{x}	1784,70	288,84	276,10	667,28	54,20	68,09	23,47	0	490,17	3652,86

Tab. 22: Einzelwerte der Proteinmengen in µg/ml für unstimulierten und stimulierten Mischspeichel der Proteinfraktionen A-I															
Proband	Datum	Analyse	Fließrate		A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
1	140200	1	0,77	UNSTMS	670,58	125,24	102,78	375,74	36,74	52,88	56,64	85,12	352,3	1858,02	
1	290200	2	0,95	UNSTMS	568,1	109,78	104,62	313,8	27,48	48,3	50,66	113,62	303,92	1640,28	
1	140300	3	0,97	UNSTMS	675,22	141,82	131,52	382,76	31,7	63,48	56,44	81,9	289,76	1854,6	
1	310300	4	0,97	UNSTMS	1221,76	281,78	246,32	585,12	47,84	70,9	12,1	82,4	429,96	2978,18	
1	120400	5	0,83	UNSTMS	638,46	89,5	39,22	375,48	43,22	94,16	76,54	129,82	401,78	1888,18	
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe		
				MW	754,82	149,62	124,89	406,58	37,40	65,94	50,48	98,57	355,54	2043,85	
				SD	264,51	76,36	75,88	103,65	8,28	18,09	23,59	21,93	60,58	531,61	
2	140200	1	0,62	UNSTMS	463,56	96,6	37,18	258,8	29,56	69,9	54,24	48,28	188,72	1246,84	
2	20300	2	0,83	UNSTMS	605,76	125,1	45,24	308,68	47,08	97,12	76,14	65,92	278,78	1649,82	
2	140300	3	0,68	UNSTMS	571,06	140,18	34,86	269,36	27,92	94,16	73,78	62,16	247,52	1521	
2	310300	4	0,6	UNSTMS	454,14	107,84	21,28	332,8	45,16	130,88	76,3	78,52	247,86	1494,78	
2	120400	5	0,56	UNSTMS	691,88	164,34	47,96	337,94	40,1	127,66	74,48	97,8	256,2	1838,36	
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe		
				MW	557,28	126,812	37,304	301,516	37,964	103,944	70,988	70,536	243,816	1550,16	
				SD	100,10	26,75	10,48	36,11	8,82	25,44	9,42	18,67	33,32	217,32	
3	140200	1	0,34	UNSTMS	573,52	73,38	85,46	209,22	12,7	53,48	92,6	209,34	93,4	1403,1	
3	290200	2	0,34	UNSTMS	782,36	109,08	133,2	304,24	19,68	64,06	92,88	201,82	133,34	1840,66	
3	140300	3	0,3	UNSTMS	659,26	109,6	131,36	182,68	10,16	59,46	90,06	196,74	108	1547,32	
3	300300	4	0,51	UNSTMS	578,88	86,98	88,14	203,12	13,06	50,24	15,32	231,2	111,68	1378,62	
3	130400	5	0,29	UNSTMS	694,5	101,76	155,62	230,74	15,64	70,52	88,78	193,18	70,2	1620,94	
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe		
				MW	657,70	96,16	118,76	226,00	14,25	59,55	75,93	206,46	103,32	1558,13	
				SD	86,88	15,67	30,71	46,97	3,60	8,13	33,92	15,11	23,39	187,18	
4	140200	1	0,46	UNSTMS	758,9	125,12	101,48	314,24	22,46	53,22	64,46	86,46	230,3	1756,64	
4	290200	2	0,37	UNSTMS	462,94	81,06	62,38	152,92	12,76	34,22	59,72	99,64	203,96	1169,6	
4	140300	3	0,33	UNSTMS	400,58	42,18	19,28	71,52	0	0	36,1	94,7	99,98	764,34	
4	300300	4	0,39	UNSTMS	660,38	72,16	38,06	148,62	9,62	40,46	47,48	107,98	162,38	1287,14	
4	130400	5	0,37	UNSTMS	311,6	44,36	28,18	131,18	10,68	13,16	36,02	62,74	86,06	723,98	
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe		
				MW	518,88	72,98	49,88	163,70	11,10	28,21	48,76	90,30	156,54	1140,34	
				SD	185,55	33,74	33,04	90,22	8,02	21,41	13,14	17,27	63,03	423,37	
5	150200	1	1,14	UNSTMS	1190,58	270,6	111,6	302,38	9,74	89,28	47,36	56,98	524,1	2602,62	
5	10300	2	0,88	UNSTMS	1189,6	203,48	126,54	238,74	34,52	89,76	74,18	79,42	565,96	2602,2	
5	300300	3	0,75	UNSTMS	738,9	144,84	55,44	204,1	14,54	93,86	85,36	74,98	369,56	1781,58	
5	120400	4	0,7	UNSTMS	1805,08	254,5	140,78	332,58	8,22	142,58	81,76	105,78	585,72	3457	
5	40500	5	0,87	UNSTMS	895,24	145,48	71,26	285,62	16,82	79,9	56,94	47,04	441,22	2039,52	
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe		
				MW	1163,88	203,78	101,12	272,68	16,77	99,08	69,12	72,84	497,31	2496,58	
				SD	407,83	58,97	36,43	51,22	10,52	24,85	16,36	22,64	90,43	645,16	

Tab. 22: Einzelwerte der Proteinmengen in µg/ml für unstimulierten und stimulierten Mischspeichel der Proteinfractionen A-I

6	150200	1	0,85	UNSTMS	1246,1	201,8	61,3	291,56	48,24	117,94	123,06	143,16	740,98	2974,14
6	290200	2	0,74	UNSTMS	1229,74	195,38	69,88	293,2	52,42	132,04	207,84	239,74	940,38	3360,62
6	150300	3	0,59	UNSTMS	1081,62	211,24	53,38	429,2	62,26	198,2	149,56	328,4	913,14	3427
6	300300	4	0,69	UNSTMS	1038,58	171,12	37,84	274,54	37,56	140,86	136,34	208,38	674,42	2719,64
6	190400	5	0,54	UNSTMS	766,82	88,22	19,56	135,8	26,88	73,78	124,9	190,18	702,82	2128,96
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
				Mw	1072,57	173,55	48,39	284,86	45,47	132,56	148,34	221,97	794,35	2922,07
				SD	193,35	49,96	19,97	104,01	13,66	44,85	34,91	69,01	123,54	529,15
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
7	150200	1	0,6	UNSTMS	289,52	29,46	12,8	162,24	16,14	34,04	45,04	96,38	366,18	1051,8
7	20300	2	0,63	UNSTMS	278,94	25,1	12,48	159,56	16,88	34,62	41,9	80,3	449,06	1098,84
7	140300	3	0,69	UNSTMS	292,68	25	14,98	153,72	13,64	35,86	40,96	83,02	447,46	1107,32
7	310300	4	0,37	UNSTMS	393,4	32,48	11,16	140,78	12,84	35,48	44,46	146,44	430,2	1247,24
7	120400	5	0,61	UNSTMS	414,5	52,52	16,3	188,84	11,42	49,66	60,04	121,34	493,98	1408,6
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
				Mw	333,81	32,91	13,54	161,03	14,18	37,93	46,48	105,50	437,38	1182,76
				SD	64,66	11,40	2,06	17,61	2,28	6,59	7,77	28,06	46,27	145,81
8	180200	1	0,84	UNSTMS	784,28	194,44	31,94	424	31,56	87,06	68,2	69,06	313,3	2003,84
8	20300	2	1,22	UNSTMS	377,2	90,88	27,86	285,52	20,88	68,02	70,48	49,24	221,12	1211,2
8	150300	3	0,28	UNSTMS	375,24	97,68	14,24	271,34	15,46	73,08	68,34	54,84	222,38	1192,6
8	300300	4	0,69	UNSTMS	537,78	128,96	20,52	261,66	16,52	66,54	45,9	51,08	269,48	1398,44
8	130400	5	1,11	UNSTMS	502,76	111,56	21,22	323,46	14,2	69,04	48,2	52,54	201,44	1344,42
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
				Mw	515,45	124,70	23,16	313,20	19,72	72,75	60,22	55,35	245,54	1430,10
				SD	167,11	41,62	6,88	66,25	7,08	8,36	12,09	7,93	45,39	332,36
9	180200	1	0,63	UNSTMS	543,32	72,54	130,36	342,5	20,12	61,5	47,54	201,78	235,58	1655,24
9	20300	2	0,5	UNSTMS	755,76	103,8	152,4	305,22	13,62	52,46	62,74	105,1	441,58	1992,68
9	150300	3	0,81	UNSTMS	568,82	79	118,64	373,4	18,16	69,48	57,68	231,92	246,28	1763,38
9	310300	4	0,64	UNSTMS	1156,36	159,26	209,52	520,08	15,66	95,4	83,42	164,92	472,92	2877,54
9	130400	5	0,74	UNSTMS	569,38	61,74	110,62	367,78	23,98	60,18	44,86	81,2	259,36	1579,1
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
				Mw	718,73	95,27	144,31	381,80	18,31	67,80	59,25	156,98	331,14	1973,59
				SD	259,06	38,97	39,71	81,85	4,01	16,57	15,35	63,48	115,96	528,83
10	210200	1	0,86	UNSTMS	625,88	131,02	0	435,76	24,9	113,72	37,92	123,28	299,46	1791,94
10	30300	2	0,67	UNSTMS	911,58	199,12	0	349,72	47,4	128,7	50,98	116,76	378,64	2197,3
10	150300	3	0,63	UNSTMS	337,14	77,14	0	139,82	11,94	52,7	30,64	93,88	219,52	962,78
10	310300	4	0,78	UNSTMS	884,28	224,16	0	417,24	19,68	128,78	54,3	110,56	345,12	2096,24
10	130400	5	0,7	UNSTMS	953,18	222,36	0	376,82	26	119,72	58,24	132,72	367,86	2256,9
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
				Mw	742,41	170,76	0,00	343,87	25,98	108,72	46,42	115,44	322,12	1861,03
				SD	260,28	64,54	0,00	118,94	13,20	31,96	11,66	14,58	64,92	533,09

Tab. 22: Einzelwerte der Proteinmengen in µg/ml für unstimulierten und stimulierten Mischspeichel der Proteinfractionen A-I

11	210200	1	0,65	UNSTMS	782,44	129,22	58,14	522,3	44,56	153,78	71,92	75,14	448,9	2286,4	
11	60300	2	0,92	UNSTMS	726,56	91,98	60,26	454,76	34,86	121,02	74,04	104,94	487,94	2156,36	
11	160300	3	0,85	UNSTMS	620,18	106,38	33,16	360,8	15,62	103,02	60,04	85,12	448,24	1832,56	
11	300300	4	0,72	UNSTMS	850,58	169,74	192,44	475,18	67,24	63,28	56,3	79,28	344,5	2298,54	
11	120400	5	0,72	UNSTMS	464,42	48,1	18,62	247,14	13,76	74	60,7	74,24	302,62	1303,6	
					A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
					Mw	688,84	109,08	72,52	412,04	35,21	103,02	64,60	83,74	406,44	1975,49
					SD	151,18	45,01	69,27	109,30	22,12	36,48	7,87	12,60	78,75	420,00
1	80300	1	3,95	STMS	1817,78	201,44	310,44	794,8	73,5	77,6	70,92	49,12	482,36	3877,96	
1	230300	2	2,91	STMS	1185,06	176,72	204,94	562,18	32,02	45,24	38,1	56,94	381,58	2682,78	
1	50400	3	2,5	STMS	1992,44	338,16	392,3	862,66	33,48	71,5	56,44	77,28	536,16	4360,42	
1	40500	4	3,02	STMS	1373,84	253,08	246,14	584,32	24,56	62,48	42,36	64,44	419,08	3070,3	
1	220500	5	3,06	STMS	1893,84	308,86	300,08	727,7	37,72	60,7	40,86	83,84	538,42	3992,02	
					A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
					Mw	1652,59	255,65	290,78	706,33	40,26	63,50	49,74	66,32	471,52	3596,70
					SD	352,59	68,58	70,96	130,76	19,18	12,30	13,80	14,27	70,02	694,80
2	80300	1	1,12	STMS	1043,94	181,3	55,3	464,38	57,92	123,08	8,44	68,8	370,08	2373,24	
2	230300	2	2,35	STMS	1027,1	188,42	62,2	461,6	78,3	109,72	73,34	67,8	323,56	2392,04	
2	60400	3	2,54	STMS	1082,8	194,3	48,22	358,64	34,66	94,3	61,04	65,82	291,9	2231,68	
2	190400	4	3,13	STMS	1385,8	184,58	66,6	500,1	41,82	100,46	58,64	57,66	365,02	2760,68	
2	40500	5	2,6	STMS	1000,06	191,52	56,78	391,4	26,28	98,58	60,6	57,66	266,96	2149,84	
					A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
					Mw	1107,94	188,02	57,82	435,22	47,80	105,23	52,41	63,55	323,50	2381,50
					SD	158,20	5,22	7,00	58,18	20,64	11,46	25,26	5,48	44,97	234,56
3	80300	1	0,74	STMS	1591,84	208,48	264,76	494,08	19,82	108,54	73,92	158,1	218,66	3138,2	
3	240300	2	1,06	STMS	1308,42	153,02	212,58	354,46	17,56	63,22	98	194,68	117,74	2519,68	
3	60400	3	0,96	STMS	1812,4	191,42	357,3	626,5	24,1	93,78	139,94	213,06	94,76	3553,26	
3	190400	4	0,78	STMS	830,36	108,18	124,42	272,98	16,72	45,92	64,64	151,34	60,16	1674,72	
3	90500	5	0,72	STMS	1468,36	177,22	432,98	474,62	15,38	107,82	108,54	336,7	96,7	3218,32	
					A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
					Mw	1402,28	167,66	278,41	444,53	18,72	83,86	97,01	210,78	117,60	2820,84
					SD	368,92	38,97	120,78	136,03	3,42	28,05	29,82	74,88	60,15	741,52
4	80300	1	2,59	STMS	1355,48	215,2	140,44	456,48	20,3	88,76	62,52	72,12	214,26	2625,56	
4	230300	2	2,58	STMS	1330,34	149,62	133,98	385,94	21,94	71,3	62,82	78,4	198,16	2432,5	
4	50400	3	2,91	STMS	1202,92	306,96	141,12	393,22	36,9	78,96	55,74	69,72	217,44	2502,98	
4	190400	4	1,66	STMS	1075,2	172,06	174,46	397,6	36,02	56,36	47,66	122,42	214,08	2295,86	
4	40500	5	2,04	STMS	1271,46	216,58	179,24	411	12,76	71,94	53,88	64,28	204,46	2485,6	
					A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
					Mw	1247,08	212,08	153,85	408,85	25,58	73,46	56,52	81,39	209,68	2468,50
					SD	112,66	60,28	21,25	28,15	10,52	11,87	6,36	23,49	8,07	119,63

Tab. 22: Einzelwerte der Proteinmengen in µg/ml für unstimulierten und stimulierten Mischspeichel der Proteinfractionen A-I

5	3003	1	3,07	STMS	977,1	141,52	56,78	279,9	17,54	80,16	45,22	60,98	342,86	2002,06
5	50400	2	2,14	STMS	1621,08	184,04	98,42	364,52	12,42	77,4	39,94	59,28	617,76	3074,86
5	190400	3	2,65	STMS	1053,4	156,86	88,4	297,86	36	85,1	40,18	48,62	502,84	2309,26
5	40500	4	2,6	STMS	1011,9	159,02	80,32	295,3	31,26	72,46	31,88	45,8	516,86	2244,8
5	190500	5	1,77	STMS	1796,8	302,1	135,96	490,94	33,6	125,7	66,24	77,28	731,14	3759,76
					A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe
				MW	1292,06	188,71	91,98	345,70	26,16	88,16	44,69	58,39	542,29	2678,15
				SD	386,54	65,20	29,00	87,47	10,50	21,48	12,96	12,43	144,34	725,99
6	80300	1	1,93	STMS	1081,28	105,28	22,1	164,56	27,16	67,82	90,1	146,62	574,72	2279,64
6	240300	2	1,64	STMS	1864,88	134,18	69,3	505	96,66	138,08	173,48	114,32	1124,42	4220,32
6	60400	3	1,56	STMS	1338,46	168,22	53,74	419,44	112,94	131	109,3	127,3	663,18	3123,58
6	190400	4	1,4	STMS	986,78	123,6	29,06	265,78	46,12	100,24	78,2	102,5	714,5	2446,78
					A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe
				MW	1317,85	132,82	43,55	338,70	70,72	109,29	112,77	122,69	769,21	3017,58
				SD	393,80	26,45	21,89	152,55	40,65	32,16	42,45	18,90	243,75	880,94
7	80300	1	2,15	STMS	730,72	38,94	33,26	294,48	26,9	47,7	49,3	110,48	559,62	1891,4
7	240300	2	1,97	STMS	652,22	67,8	32,44	296,2	16,62	42,24	36,52	86,26	615,42	1845,72
7	50400	3	1,45	STMS	482,42	50,68	27,04	266,66	48,28	36,7	40,82	72,54	509,44	1534,58
7	40500	4	1,75	STMS	778,06	76,78	59,16	396,78	37,62	52,44	39,56	79,12	763,72	2283,24
7	180500	5	1,73	STMS	665,28	68,94	42,6	307,26	18,74	46,06	37,74	70,24	680,86	1937,72
					A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe
				MW	661,74	60,63	38,90	312,28	29,63	45,03	40,79	83,73	625,81	1898,53
				SD	112,41	15,42	12,63	49,55	13,29	5,92	5,04	16,21	100,10	266,85
8	100300	1	3,14	STMS	571,54	82,74	0	207,76	10,8	42,74	29,2	40,76	1980,1	2965,64
8	230300	2	3,19	STMS	697,08	100,72	25,16	327,6	34,72	60,68	28,68	48,7	279,1	1602,44
8	60400	3	2,82	STMS	370,2	43,88	10,18	187,48	23,82	30,44	24,62	30,76	170,44	891,82
8	120500	4	3,88	STMS	957,4	147,9	30,12	558,46	22,58	85,68	47,92	46,88	386,06	2283
8	300500	5	3,45	STMS	550,38	101,62	14,58	298,3	13,32	63,08	41,74	38,2	241,74	1362,96
					A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe
				MW	629,32	95,37	16,01	315,92	21,05	56,52	34,43	41,06	611,49	1821,17
				SD	217,34	37,54	11,99	147,87	9,51	21,10	9,90	7,19	769,03	813,11
9	100300	1	1,76	STMS	1773,58	124,84	278,08	862,36	40,04	111,46	60,36	117,92	713,2	4081,84
9	230300	2	1,55	STMS	1286,32	113,6	222,22	643,9	41,28	100,34	64,96	132,84	458,82	3064,28
9	50400	3	2,52	STMS	1050,18	96,16	194,86	557,48	48,32	65,64	41,78	76,54	520,66	2651,62
9	220500	4	2,44	STMS	874,74	82,08	189,4	441,78	26,96	53,58	41,1	172,62	478,1	2360,36
9	50600	5	1,79	STMS	1324,28	138,56	275,88	631,2	23,6	77,96	49,12	86,64	509,68	3116,92
					A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe
				MW	1261,82	111,05	232,09	627,34	36,04	81,80	51,46	117,31	536,09	3055,00
				SD	339,49	22,44	42,83	153,98	10,39	23,96	10,82	38,42	102,03	652,60

Tab. 22: Einzelwerte der Proteinmengen in µg/ml für unstimulierten und stimulierten Mischspeichel der Proteinfractionen A-I

10	100300	1	2,4	STMS	745,46	168,76	0	359,96	42,9	99,9	34,88	70,56	310,26	1832,68	
10	240300	2	2,03	STMS	1675,76	303,48	0	656,02	48,54	164,92	39,76	76,8	494,52	3459,8	
10	60400	3	2,33	STMS	1312,08	266,58	0	617,1	54,14	139,1	35,9	88,3	467,4	2980,6	
10	190400	4	2,84	STMS	1781,22	338,56	0	828,9	106,9	190,88	38,74	79,16	523,74	3888,1	
10	40500	5	2,6	STMS	1769,88	348,14	0	714,86	48,24	175,62	32,92	74,74	528,22	3692,62	
					A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
					MW	1456,88	285,10	0,00	635,37	60,14	154,08	36,44	77,91	464,83	3170,76
					SD	441,07	72,54	0,00	173,48	26,44	35,69	2,80	6,61	89,82	821,14
11	140300	1	3,47	STMS	763,2	84,4	30,9	316,98	8,88	85,74	46,48	91,36	512,2	1940,14	
11	300300	2	1,7	STMS	1464	147,68	58,64	576,58	19,94	136,2	70,64	90,84	663,82	3228,34	
11	60400	3	2,1	STMS	1396,9	127,78	62,68	547,22	17,48	125,68	65,88	76,06	635,04	3054,72	
11	190400	4	2,21	STMS	760,88	88,9	34,12	341,96	19,84	81,08	48,04	59,22	514,96	1949	
11	40500	5	2,4	STMS	929,02	136,56	50,2	471,08	18,9	113,14	65,38	64,3	495,88	2344,46	
					A	B	C	D	E	F	G	H	I	Summe	
					MW	1062,80	117,06	47,31	450,76	17,01	108,37	59,28	76,36	564,38	2503,33
					SD	343,29	28,69	14,28	117,56	4,65	24,26	11,18	14,78	78,64	608,15

Varianzanalyse

Tab. 23: Intra- und interindividuelle Varianz und Reliabilität bei *unstimuliertem* Mischspeichel

Unstimulierter Mischspeichel				
Proteinfraktion	BMS	WMS	R	Rang
Gesamtprotein	1,446	0,2953	0,438	
A	0,2912	0,0469	0,510	3
B	0,0122	0,0021	0,490	2
C	0,012	0,0015	0,583	5
D	0,0385	0,0067	0,487	1
E	0,0007	0,0001	0,545	4
F	0,0052	0,0006	0,605	6
G	0,0041	0,0004	0,649	7
H	0,0154	0,0011	0,722	8
I	0,1757	0,0055	0,861	9

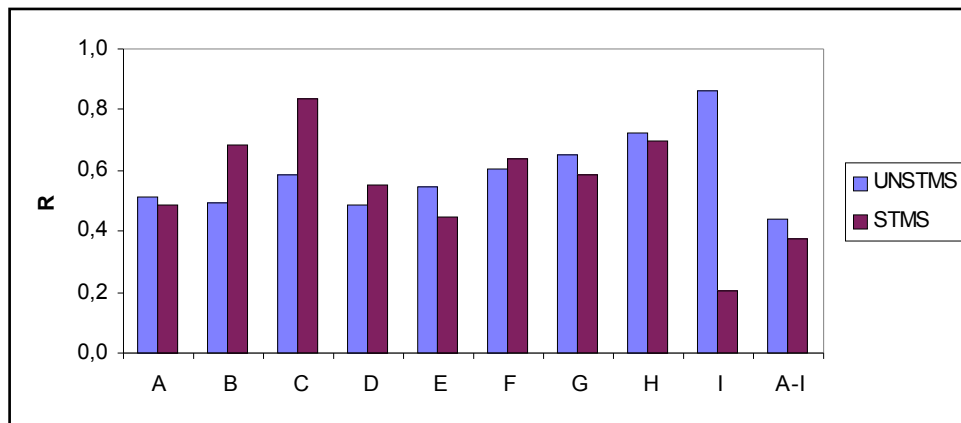


Abb. 17: Vergleich der Reliabilitätskoeffizienten R der Proteinfraktionen A bis I von unstimuliertem (UNSTMS) und stimuliertem (STMS) Mischspeichel

Tab. 24: Proteinmengen der Proteinfractionen A- I der Pellikel P-60 in µg/10 mg
HA je Proband

Proband	B	C	D	E	I	Summe
1	7,3	54,9	285,0	31,3	34,3	415,3
2	3,8	17,8	264,8	36,8	20,0	343,3
3	0	67,9	204,9	3,3	22,8	299,0
4	4,5	49,4	274,5	10,4	20,7	359,5
5	4,0	6,7	117,3	0,8	37,4	166,2
7	9,2	14,9	168,1	8,0	37,1	237,2
8	2,5	7,0	207,7	14,5	18,8	250,4
9	4,8	44,9	309,9	25,0	32,4	425,5
10	6,4	0	350,4	38,1	29,3	429,9
11	7,0	15,6	368,1	16,9	29,0	436,5
MW	4,9	27,9	255,0	18,5	28,2	334,5
SD	2,6	24,0	79,9	13,6	7,2	94,9
VK	53	86	31	74	25	28

Tab. 25: Proteinmengen der Proteinfractionen A- I der Pellikel P-4x15 in
µg/10 mg HA je Proband

Proband	B	C	D	E	I	Summe
1	5,0	74,0	274,2	68,7	35,4	457,5
2	3,7	34,7	268,5	109,2	19,9	436,0
3	0	149,6	219,7	20,0	13,2	402,5
4	3,2	58,4	224,6	44,5	19,0	349,7
5	6,8	31,1	175,0	18,0	32,6	263,4
8	1,6	22,9	322,7	56,5	23,5	427,2
9	3,6	102,6	366,8	111,7	30,4	615,1
10	4,0	0	338,2	153,6	29,1	524,8
11	4,9	47,8	398,7	61,0	29,4	541,7
MW	3,6	57,9	287,6	71,5	25,8	446,4
SD	2,0	45,6	74,3	45,2	7,3	105,5
VK	54	79	26	63	28	24

Tab. 25:

Tab. 25: Kombinations der PRP-Polymorphismen

Kombinationen der Polymorphismen		Maximaler Hinzugewinn					Minimaler Hinzugewinn					Parallungsgewinn	
Zus.		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
Zus.	1 PRP-1 PRP-2												
	2 PRP-1/PRP-4/PIF-6												
	3 Dk-w/PIF-u												
	4 Dk-f												
	5 P-a-I												
	6 P-a-II												
	7 PRP-1 PRP-2 - PRP-3 PRP-4/PIF-6	5				5						5	
	8 PRP-1/PRP-2 - Dk-w/PIF-u												
	9 PRP-1/PRP-2 - Dk-f												
	10 PRP-1/PRP-2 - P-a-I												
	11 PRP-1/PRP-2 - P-a-II												
	12 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u												
	13 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-f												
	14 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - P-a-I												
	15 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - P-a-II												
	16 Dk-w/PIF-u - Dk-f												
	17 Dk-w/PIF-u - P-a-I												
	18 Dk-w/PIF-u - P-a-II												
	19 Dk-f - P-a-I												
	20 Dk-f - P-a-II												
	21 P-a-I - P-a-II												
Zus.	22 PRP-1 PRP-2 - PRP-3 PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u		4, 5	5	5			5					
	23 PRP-1/PRP-2 - PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-f												
	24 PRP-1 PRP-2 - PRP-3 PRP-4/PIF-6 - P-a-I	18	5	5, 18	5	5, 11	5	5	5	5	5	5	
	25 PRP-1/PRP-2 - PRP-3/PRP-4/PIF-6 - P-a-II												
	26 PRP-1/PRP-2 - Dk-w/PIF-u - Dk-f				4	4							
	27 PRP-1/PRP-2 - Dk-w/PIF-u - P-a-I												
	28 PRP-1/PRP-2 - Dk-w/PIF-u - P-a-II												
	29 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - Dk-f												
	30 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - P-a-I												
	31 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - P-a-II												
	32 PRP-1/PRP-2 - Dk-f - P-a-I												
	33 PRP-1/PRP-2 - Dk-f - P-a-II												
	34 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-f - P-a-I												
	35 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-f - P-a-II												
	36 PRP-1/PRP-2 - P-a-I - P-a-II												
	37 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - P-a-I - P-a-II												
	38 Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-I												
	39 Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-II												
40 Dk-w/PIF-u - P-a-I - P-a-II													
41 Dk-f - P-a-I - P-a-II													
Zus.	42 PRP-1 PRP-2 - PRP-3 PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - Dk-f	2, 4	2	2, 3	2	2, 4	2	2, 4	2, 4	2, 4	2, 4	2, 4	
	43 PRP-1/PRP-2 - PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - P-a-I												
	44 PRP-1/PRP-2 - PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - P-a-II												
	45 PRP-1/PRP-2 - PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-f - P-a-I												
	46 PRP-1/PRP-2 - PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-f - P-a-II												
	47 PRP-1 PRP-2 - PRP-3 PRP-4/PIF-6 - P-a-I - P-a-II	1, 2, 3, 11	1, 3, 10, 11	1, 2, 3, 11	1, 3, 10, 11	1, 2, 3, 10	1, 3, 10, 11	1, 3, 10, 11	1, 3, 10, 11	1, 3, 10, 11	1, 3, 10, 11	1, 3, 10, 11	
	48 PRP-1/PRP-2 - Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-I												
	49 PRP-1/PRP-2 - Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-II												
	50 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-I												
	51 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-II												
	52 PRP-1/PRP-2 - Dk-w/PIF-u - P-a-I - P-a-II												
	53 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-f - P-a-I - P-a-II												
	54 PRP-1/PRP-2 - Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-II												
	55 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - P-a-I - P-a-II												
56 Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-I - P-a-II													
Zus.	57 PRP-1 PRP-2 - PRP-3 PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-I	5					4	5	5	5			
	58 PRP-1 PRP-2 - PRP-3 PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-II								5				
	59 PRP-1 PRP-2 - PRP-3 PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - P-a-I - P-a-II	3				3						5	
	60 PRP-1/PRP-2 - PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-f - P-a-I - P-a-II												
Zus.	61 PRP-1/PRP-2 - Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-I - P-a-II												
	62 PRP-3/PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-I - P-a-II												
Zus.	63 PRP-1 PRP-2 - PRP-3 PRP-4/PIF-6 - Dk-w/PIF-u - Dk-f - P-a-I - P-a-II	5	3, 5	3, 5	5	3, 5	3, 5	3, 5	3	3, 5	3, 5	3	

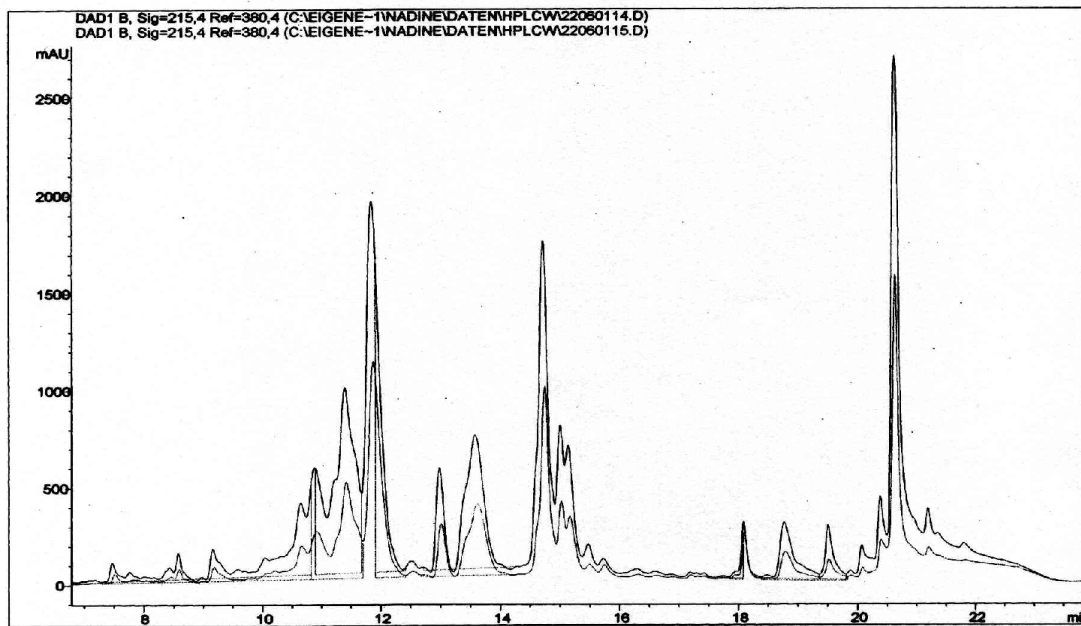


Abb. 18: Einfluß von TFA auf die Speichelproteine:

Chromatogramm 1 (Datei: 22060114): 1 ml stimulierter Mischspeichel

Chromatogramm 2 (Datei: 22060115): 1 ml stimulierter Mischspeichel + 1 ml TFA

Chromatogramm 2 zeigt aufgrund der Verdünnung nur halb so große Peaks

10 Anlagen

Danksagung

Lebenslauf

Ehrenwörtliche Erklärung

Danksagung

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Lutz Stößer (amt. Direktor der Poliklinik für Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena) für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die großzügige fachliche Betreuung meiner Forschung.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Uwe Kehrer bedanke ich mich vielmals für die Einarbeitung in die Analytik dieser Untersuchungen und die stets konstruktive Zusammenarbeit.

Frau Ulrike Eichstädt und Frau Ilona Albert (Poliklinik für Präventive Zahnheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena) waren mir bei den analytischen Untersuchungen behilflich. An sie geht mein nächstes Dankeschön.

Für die freundliche Mithilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Bernd Röhrig (Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation).

Zu großem Dank bin ich der Graduiertenförderung der Friedrich-Schiller-Universität Jena verpflichtet, die mich finanziell während meiner Studie mit einem Graduiertenstipendium unterstützte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Apitz
Vorname:	Nadine
Geburtsdatum:	23.01.1976
Geburtsort:	Querfurt

Schulausbildung

1982 - 1990	Polytechnische Oberschule Wohlmirstedt
1990 - 1994	Staatliches Gymnasium Klosterschule Roßleben
	Abitur

Studium

09/1994 - 01/2000	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
	Staatsexamen
02/2000 - 08/2001	Promotionsstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
	Graduiertenstipendium

Berufliche Tätigkeit

seit 09/2001	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis G. Baumgardt in Erfurt
--------------	---

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Prof. Dr. Dr. Lutz Stößer, Dr. Uwe Kehrer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, 31.07.2003

Nadine Apitz