C. Hannig[1], M. Hannig[2]

Enzyme in der Pellikel – eine Synopsis

Enzymes in the pellicle – a synopsis

C. Hannig

Die Pellikel ist der initiale Proteinfilm, der sich auf allen oral exponierten Festkörperoberflächen ausbildet. Enzyme sind elementare funktionelle und strukturelle Komponenten der Pellikel. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Aktivität der Pellikelenzyme und ihre Einbindung in die Ultrastruktur zu charakterisieren.
Die Pellikelenzyme wurden bei bis zu sechs Probanden untersucht, die Pellikelbildung erfolgte in situ über 3, 30 und 120 Minuten auf Schmelzproben, die auf individuell gefertigten Schienen mit Silikon befestigt waren. Mit fluorimetrischen und spektralphotometrischen Verfahren wurden die Enzymaktivitäten bestimmt. Außerdem wurden mit dem Goldimmunolabellingverfahren verschiedene Enzyme in elektronenmikroskopischen Präparaten visualisiert und quantifiziert. Lysozym, Amylase, Peroxidase, alkalische Phosphatase, Carboanhydrase I und II, Transglutaminase sowie Glycosyltransferase B, C und D konnten in aktiver Konformation als Bestandteile der *In-situ*-Pellikel nachgewiesen werden.
Alle Komponenten waren bereits in der 3-min-Pellikel detektierbar. Demgegenüber zeigte die Pellikel nur Spuren proteolytischer Aktivität. Somit sind neben protektiven Speichelenzymen (Lysozym, Peroxidase) auch Enzyme in der Pellikel immobilisiert, die den bakteriellen Kohlenhydratmetabolismus begünstigen (Amylase, Glycosyltransferasen), was die komplexe Rolle der Pellikel bei der Entstehung des bakteriellen Biofilms unterstreicht.

Schlüsselwörter: Amylase, Lysozym, Peroxidase, Transglutaminase, Enzyme, Pellikel, Glycosyltransferase

The acquired pellicle is the initial proteinaceous layer formed on all solid substrates exposed to the oral fluids. Enzymes are essential structural and functional components of the pellicle. The aim of this research project was to characterize the activity of pellicle enzymes and their integration into the pellicle's ultrastructure.
Pellicle enzymes were investigated in several *in situ* studies with up to six subjects. Pellicle formation took place *in situ* for 3, 30 and 120 minutes. For this purpose, enamel specimens were fixed on individual splints with silicone impression material. Enzyme activities were measured using fluorimetric and photometric assays. Furthermore, the enzymes were visualized and quantified electron-microscopically using the gold immunolabeling technique. Lysozyme, amylase, peroxidase, alkaline phosphatase, carbonic anhydrases I and II, transglutaminase as well as glucosyltransferases B, C and D are immobilized in the pellicle layer in an active conformation.
All components were already detectable in 3 min pellicles. On the other hand, only traces of proteolytic activity were found in the pellicle. Protective salivary enzymes (lysozyme, peroxidase) as well as enzymes supporting bacterial carbohydrate metabolism (amylase, glucosyltransferases) are present in the pellicle layer, indicating the complex role of the pellicle in bacterial biofilm formation.

Keywords: amylase, lysozyme, peroxidase, transglutaminase, enzyme, pellicle, glucosyltransferase

[1] Abt. für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Universität Freiburg i. B. (Direktor: Prof. Dr. E. Hellwig)
[2] Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes Homburg (Direktor: Prof. Dr. M. Hannig)

[1] Department of operative dentistry and periodontology, University of Freiburg im Breisgau (Head of department: Prof. Dr. E. Hellwig)
[2] Clinic for operative dentistry, periodontology and preventive dentistry, University Clinic of the Saarland, Homburg (Head of department: Prof. Dr. M. Hannig)
Übersetzung: LinguaDent

1 Einleitung

Auf allen oral exponierten Oberflächen bildet sich innerhalb kürzester Zeit ein Proteinfilm aus, die Pellikel [30, 32, 39]. Ihr kommt essentielle Bedeutung zu als Mediator zwischen den Zähnen, den oralen Flüssigkeiten und den Bakterien in der Mundhöhle. Die Rolle der Pellikel ist ambivalent. Einerseits wirkt dieser Proteinfilm als Lubrikant, als antierosiver Schutzfilm und enthält verschiedene antimikrobielle Substanzen, andererseits ist er die Basis der mikrobiellen Adhärenz an die Zahnoberfläche und damit der Ausbildung des oralen Biofilms [30, 32, 39].

Enzyme sind von elementarer Bedeutung für die Struktur und Funktionen der Pellikel [15]. Es gibt eine Vielzahl von Studien zu Enzymen in der Pellikel. Ein Großteil dieser Studien hat die Enzymaktivitäten jedoch lediglich an *in vitro* gebildeter Pellikel untersucht [15]. Die bisher verfügbaren *In-vivo*- oder *In-situ*-Studien beschränkten sich oft nur auf einen Probanden [15, 65]. Prinzipiell können alle in der Mundhöhle vorhandenen Enzyme in die Pellikel integriert werden, aber die Adsorption verläuft selektiv. Amylase, Lysozym, Carboanhydrasen I, II und IV, Glycosyltransferasen B, C und D, sowie Fructosyltransferase wurden bislang in aktiver Form in der *In-vivo*- bzw. *In-situ*-Pellikel nachgewiesen [15, 40, 49, 65]. Andere Enzyme wurden bis dato lediglich in experimenteller Pellikel oder auf künstlichen Oberflächen bestimmt und untersucht (z. B. Peroxidasen, Elastase, Neuraminidasen, Phosphatasen, Proteasen, Transglutaminasen) [15, 60].

Amylase und Lysozym sind Bestandteile der mizellartigen, globulären Strukturen, die maßgeblich an der Pellikelbildung beteiligt sind und haben somit auch strukturelle Bedeutung [33]. Peroxidasen und Lysozym exponieren antibakterielle Eigenschaften [15, 49, 50]. Viele Enzyme bzw. deren Produkte erleichtern über spezifische, rezeptorvermittelte Interaktionen die bakterielle Besiedlung der Zahnoberfläche (Amylase, Glycosyltransferasen bzw. Glucane, Peroxidasen, Lysozym) [30, 51, 55–57]. Enzyme unterstützen den bakteriellen Metabolismus durch die Zufuhr von Stärkehydrolysaten (Amylase) [9, 63], und bestimmte bakterielle Enzyme, die an der Bildung der Plaquematrix beteiligt sind, werden als integraler Bestandteil der Pellikel angesehen (Glycosyltransferasen) [65]. Darüber hinaus sollen Enzyme an der pH-Homeostase der Pellikel und des Speichels mitwirken (Carboanhydrasen) [35, 46, 47].

Für die Modulation der Pellikel sind Transaminasen bedeutsam, da sie potentiell die Immobilisation und Vernetzung von Funktionsproteinen beeinflussen, während Proteasen durch Hydrolyse von Peptiden zur Maturation der Pellikel beitragen könnten [3, 4, 15]. Neuere labortechnische Verfahren erlauben die weitergehende Exploration der Enzyme in der Pellikel. Für viele Enzyme stehen heute Assays auf der Basis synthetischer Substrate zur Verfügung, die sensitiver und präziser als konventionelle Testverfahren sind [45, 48]. Ein typisches Beispiel ist der Nachweis der Amylaseaktivität, der früher über die Stärkehydrolyse erfolgte. Eine Schwierigkeit hierbei ist, dass das Substrat mehrfach hydrolysiert werden kann, so dass sich keine lineare Enzymkinetik ergibt. Ein moderner Amylasetest basiert auf der Hydrolyse eines synthetischen Trisaccharides, das mit einem Chromophor verbunden ist [45]. Die Reaktion erfolgt linear. Besonders hilfreich sind darüber hinaus die

1 Introduction

A proteinaceous layer termed pellicle is formed on all orally exposed surfaces within a very short time [30, 32, 39]. It plays an essential role as a mediator between the teeth, oral fluids and bacteria in the oral cavity. The role of the pellicle is ambivalent. On the one hand, it serves as a lubricant and antierosive protective film, containing various antimicrobial substances but on the other hand, it is the base for microbial adhesion to the tooth surface and thus the formation of the oral biofilm [30, 32, 39].

Enzymes are of elementary significance for the structure and function of the pellicle [15]. There have been a number of studies on enzymes in the acquired pellicle. However, the majority of these studies only investigated enzyme activities in pellicles formed *in vitro* [15]. The *in vivo* or *in situ* studies available so far often included only one subject [15, 65]. In principle, all of the enzymes present in the oral cavity can be integrated in the pellicle but the adsorption process is highly selective. So far amylase, lysozyme, carbonic anhydrases I, II and IV, glucosyltransferases B, C and D, along with fructosyltransferase have been detected in the *in vivo* and *in situ* pellicle in an active conformation [15, 40, 49, 65]. Until now, other enzymes have been determined and investigated only in experimental pellicles or on artificial surfaces (e. g. peroxidases, elastase, neuraminidases, phosphatases, proteases, transglutaminases) [15, 50].

Amylase and lysozyme are components of the micelle-like globular structures involved substantially in pellicle formation and thus also have structural significance [33]. Peroxidases and lysozyme express anti-bacterial properties [15, 49, 50]. On the other hand, many enzymes or their products facilitate bacterial colonization of the tooth surface by specific receptor-mediated interactions (amylase, glucosyltransferases or glucans, peroxidase, lysozyme) [30, 51, 55–57]. Enzymes support bacterial metabolism by supplying starch hydrolysates (amylase) [9, 63], and certain bacterial enzymes involved in the formation of the plaque matrix are regarded as integral components of the pellicle (glucosyltransferases) [65]. Furthermore, enzymes are believed to be involved in the pH homeostasis of the pellicle and saliva (carbonic anhydrases) [35, 46, 47].

Transaminases are important for the modulation of the pellicle as they potentially impact the immobilization and cross-linking of functional proteins, whereas proteases might contribute to maturation of the pellicle by hydrolyzing peptides [3, 4, 15].

More recent laboratory methods allow extensive exploration of the enzymes in the pellicle. Today, assays based on synthetic substrates are available for many enzymes; they are more sensitive and more precise than conventional assays [45, 48]. A typical example is the determination of amylase activity, which was formerly performed via hydrolysis of starch. A difficulty with this is that the substrate can be hydrolyzed repeatedly so that linear enzyme kinetics are not obtained. A modern amylase test is based on hydrolysis of a synthetic trisaccharide bound to a chromophor [45]. The reaction is linear. Moreover, highly sensitive fluorimetric test methods are particularly helpful [22, 24, 25]. In contrast to the photometric methods, enamel slabs coated with a pellicle can remain in the microtiter plate during the assay.

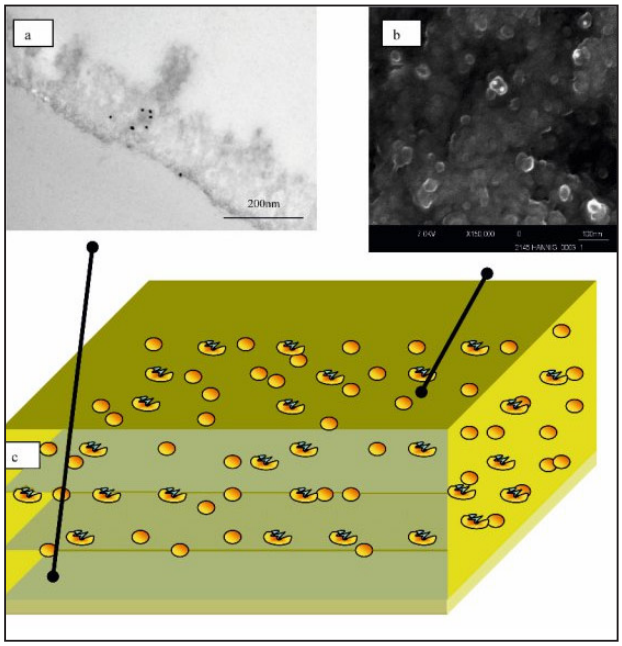

Abbildung 1 Typische Befunde bei der Goldimmunolabelling-Technik:
a: TEM, 120-min-Pellikel, bukkal, mit markierten Peroxidasemolekülen, Original-Vergrößerung: 68 000fach.
b: FEI-SEM, 30 min bukkal, mit markierten Amylasemolekülen, die globuläre, netzartige Oberflächenstruktur ist gut erkennbar. Vergrößerung: 150 000fach.
c: Schichtung der Pellikel, Modellvorstellung. Aufgrund des Dickenwachstums der Pellikel nimmt die Anzahl der detektierten Enzymmoleküle in Pellikelquerschnitten mit der oralen Expositionszeit zu, während die Menge der Enzymmoleküle an der Oberfläche konstant bleibt.
Figure 1 Typical results of gold immunolabeling:
a: TEM, 120 min pellicle, buccal, with labeled peroxidase molecules, original magnification: 68 000x.
b: FEI-SEM, 30 min buccal, with labeled amylase molecules, the globular and reticular structure of the pellicle can be seen clearly. Magnification: 150 000x.
c: Layers of the pellicle, schematically. Due to the increase in thickness of the pellicle, the amount of labeled molecules in cross sections increases with the duration of oral exposure while the number of molecules at the surface remains constant.

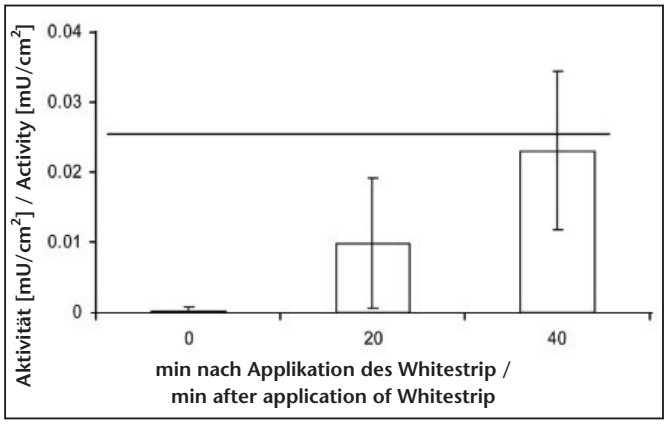

Abbildung 2 Immobilisierte Peroxidaseaktivität der In-situ-Pellikel nach Applikation von Whitestrips [mU/cm^2], n = 12 Proben je Untergruppe, MW ± SD. Die schwarze Linie stellt die durchschnittliche Peroxidaseaktivität einer 30-min-Pellikel dar.
Figure 2 Immobilized peroxidase activity of the *in situ* pellicle after application of Whitestrips [mU/cm^2], n = 12 specimens per subgroup, mean±SD. The black line represents the mean peroxidase activity of 30 min pellicles.

hochempfindlichen fluorimetrischen Testverfahren [22, 24, 25]. Im Gegensatz zu den photometrischen Testverfahren können hier die mit einer Pellikel behafteten Schmelzprüfkörper während der Messung in der Mikrotiterplatte verbleiben.

Außerdem erlaubt die Goldimmunolabellingtechnik die Visualisierung und Quantifizierung von Enzymproteinen in der Pellikel mit Hilfe elektronenmikroskopischer Verfahren wie TEM oder FEI-SEM. Auf diese Weise kann auch die Einbindung der Enzyme in die Ultrastruktur der Pellikel evaluiert werden[7, 8].

Der vorliegende Artikel fasst die Ergebnisse verschiedener *In-situ*-Studien unserer Arbeitsgruppe zu Enzymen in der Pellikel zusammen [7, 8, 13, 16, 17, 20, 21, 23, 25]. Mit modernen Verfahren wurden Aktivität und Lokalisation verschiedener relevanter Enzyme in der Pellikel bei mehreren Probanden exploriert. Die in den Studien untersuchten, klinisch bedeutsamen Enzyme lassen sich dabei drei Gruppen zuordnen: protektive, antibakteriell wirksame Enzyme (Lysozym, Peroxidase), Enzyme mit Einfluss auf die Ultrastruktur der Pellikel (Transglutaminase, Phosphatasen) und Enzyme, welche den bakteriellen Metabolismus begünstigen (Amylase, Glycosyltransferase). Ziel der Untersuchungen war es, die enzymatische Aktivität der *In-situ*-Pellikel und die ultrastrukturelle Integration der Enzyme grundlegend und systematisch zu charakterisieren.

The gold immunolabeling technique allows visualization and quantification of enzyme proteins in the pellicle using electron microscopic methods such as TEM or FEI-SEM. Thereby, the integration of the enzymes in the pellicle's ultrastructure can also be evaluated [7, 8].

The present article summarizes the results of various *in situ* studies on enzymes in the pellicle conducted by our laboratory team [7, 8, 13, 16, 17, 20, 21, 23, 25]. With recent methods, the activity and localization of various relevant enzymes in the pellicle were explored in several subjects. The clinically important enzymes investigated in the study can be classified into three groups: protective enzymes with antibacterial properties (lysozyme, peroxidase), enzymes that influence the ultrastructure of the pellicle (transglutaminase, phosphatases) and enzymes that promote bacterial metabolism (amylase, glucosyltransferase). The aim of the studies was to characterize the enzymatic activity of the *in situ* pellicle and the ultrastructural integration of the enzymes systematically.

2 Material und Methode

2.1 Probenmaterial

Probanden
Für die *In-situ*-Untersuchungen wurden bis zu sechs gesunde, erwachsene Probanden ausgewählt, die freiwillig an den intraoralen Expositionsversuchen teilnahmen. Die Probanden wiesen weder Karies noch gingivale oder parodontale Erkrankungen auf und waren allgemein-anamnestisch unauffällig [7, 13, 16, 17]. Positive Voten der Ethik-Kommissionen der Universität Göttingen (Aktenzeichen 16/6/05) und der Universität des Saarlandes (Kenn-Nr. 52/05) zum Studiendesign lagen vor.

Prüfkörper
Die Untersuchung erfolgte aus Gründen der Standardisierung an Schmelzprüfkörpern, die aus den Labialflächen frisch extrahierter Rinderfrontzähne gewonnen wurden [13, 14, 16, 17]. Runde Probekörper mit jeweils 5 mm Durchmesser wurden für die Aktivitätstests verwendet. Die Oberflächen wurden mit Nassschleifpapier abnehmender Korngröße bis hin zur Körnung „4.000" finiert bzw. poliert. Auf der Rückseite wurde eine Normbohrung gesetzt, welche die Fixation der Proben zum kontaktfreien Einhängen in Mikrotiterplatten erlaubte. Kleinere Proben für elektronenmikroskopische Analysen wurden mit der diamantierten Trennscheibe gewonnen (2 mm²) [7].

Nach der Desinfektion in 70 %igem Ethanol über einen Zeitraum von 30 min sowie einer abschließenden Oberflächenreinigung im Ultraschallbad für 10 min wurden die Prüfkörper vor der intraoralen Exposition zur Ausbildung einer Hydrathülle für 24 Stunden in aqua dest. bei 4°C gelagert [7, 13, 17].

Pellikelbildung in situ
Die Probanden wurden angewiesen, 30 Minuten vor dem Einsetzen der Probekörpertrageschienen eine intensive, individuelle Zahnreinigung unter Zuhilfenahme von Zahnbürste, Zahnseide und Zahnzwischenraumbürstchen vorzunehmen. Der Gebrauch von Zahnpaste war nicht gestattet. Anschließend wurde die Mundhöhle mehrfach mit Wasser gespült. Von diesem Zeitpunkt an sowie während der gesamten intraoralen Verweilzeit der Probekörpertrageschienen herrschte absolute Nahrungskarenz. Ebenso unterblieb die Einnahme von Getränken oder anderen Flüssigkeiten. Zur systematischen Untersuchung der Pellikelenzyme in verschiedenen Bereichen der Mundhöhle wurden von den Probanden über Zeiträume von 3 Minuten, 30 Minuten und 2 Stunden im Oberkiefer Miniplastschienen getragen, an denen in im Bereich der Oberkiefermolaren und -prämolaren palatinal und bukkal Probekörper befestigt waren [13, 14, 16, 17].

Nach der Exposition in der Mundhöhle wurden die Probekörpertrageschienen in destilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurden die einzelnen Testkörper vorsichtig mit einer Pinzette von den Miniplastschienen abgehebelt und enzymologisch bzw. elektronenmikroskopisch analysiert [7, 13, 16, 17].

2.2 Enzymaktivitätsmessung [13, 16, 22–25]

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte photometrisch oder fluorimetrisch. Die Substrate der verschiedenen Testver-

2 Materials and methods

2.1 Subjects and samples

Subjects
Up to six healthy adult volunteers took part in the intraoral exposure experiments. The subjects had neither caries nor gingival or periodontal disease and were in good general health [7, 13, 16, 17]. The study design was approved by the ethics committees of Göttingen University (file number 16/6/05) and the University of the Saarland (ref. no. 52/05).

Substrates
For reasons of standardization, the investigation was conducted with enamel specimens, obtained from the labial surfaces of freshly extracted bovine incisors [13, 14, 16, 17]. Round samples with a diameter of 5 mm were used for investigating the enzyme activities. The surfaces were finished and polished by wet grinding up to grade 4,000. A cavity was prepared on the rear of the slabs that allowed fixation of the samples for contact-free incubation in the microtiter plates. Smaller samples for electron microscopic analysis were obtained with a diamond separating disc (2 mm^2) [7].

After disinfection in 70 % ethanol for 30 minutes and final surface cleaning in an ultrasonic bath for 10 minutes, the samples were stored for 24 h in distilled water at 4°C to form a hydration layer prior to intraoral exposure [7, 13, 17].

Pellicle formation in situ
The subjects were instructed to carry out intensive individual tooth cleaning using a toothbrush, dental floss and interdental brushes 30 minutes before insertion of individual splints with the enamel slabs. Use of toothpaste was not permitted. Afterwards, the oral cavity was rinsed several times with water. From this time on and throughout the period of the in situ experiments, no consumption of food or liquids was permitted. For systematic investigation of the pellicle enzymes in different regions of the mouth, the subjects wore individual upper splints for periods of 3 minutes, 30 minutes and 2 hours. Enamel slabs were fixed palatally and buccally in the region of the upper molars and premolars [13, 14, 16, 17].

After exposure in the oral cavity, they were rinsed in distilled water. The enamel slabs were then removed carefully from the splints with tweezers and analyzed electron microscopically or tested for the different enzyme activities [7, 13, 16, 17].

2.2 Measurement of enzyme activities [13, 16, 22–25]

Enzyme activities were determined photometrically or fluorometrically. The substrates of the different assays are shown in table 1. In all cases, the immobilized activity was calculated per cm^2 of enamel surface.

To determine the activity of lysozyme, peroxidase, amylase and phosphatase, the enamel samples with pellicle were incubated in the wells of the microtiter plates with substrate solution.

In the photometric assays, the enamel slabs had to be removed from the microtiter plates for measurement of the absorption as the slabs would otherwise have been located in the beam (phosphatase, amylase).

Enzym/Enzyme	Substrat/Substrate	Fluoreszenz/Spektralphotometrie Fluorescence/Spectrophotometry
Amylase [13, 45]	Hydrolyse von 2-Chloro-4-Nitrophenyl-4-O-β-D-Galactopyranosylmaltotriosid Hydrolysis of 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O-β-D-galactopyranosyl maltotrioside	Spektralphotometrie Spectrophotometry
Elastase [2, 25]	Hydrolyse von Elastin mit fluorogenem Konjugat Hydrolysis of elastin with fluorogenic conjugate	Fluoreszenz Fluorescence
Glucosyltransferase [38]	Nachweis von freigesetzter Fructose Detection of released fructose	Spektralphotometrie Spectrophotometry
Kollagenase [25] Collagenase [25]	Gelatine, an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt Gelatine, coupled to fluorogenic dye	Fluoreszenz Fluorescence
Lysozym [22, 23, 41] Lysozyme [22, 23, 41]	Hydrolyse von *Micrococcus lysodeicticus* mit fluorogenem Konjugat Hydrolysis of *Micrococcus lysodeicticus* with fluorogenic conjugate	Fluoreszenz Fluorescence
Peroxidase [24, 48]	Hydrolyse von Diacetyldichlorfluorescein Hydrolysis of diacetyl dichlorofluorescin	Fluoreszenz Fluorescence
Alkalische Phosphatase Saure Phosphatase [25, 60] Alkaline phosphatase acidic phosphatase [25, 60]	Hydrolyse von 4-Nitrophenyl-Phosphat Hydrolysis of 4-nitrophenyl phosphate	Spektralphotometrie Spectrophotometry
Protease [11, 25]	Hydrolyse von Casein, Resorufin-markiert Hydrolysis of casein labeled with resorufin	Fluoreszenz Fluorescence
Transglutaminase [3, 4, 25]	Integration von Mono-Dansylcadaverin in α-Casein Integration of mono-dansylcadaverin in α-casein	Fluoreszenz Fluorescence

Tabelle 1 Untersuchte Enzyme und verwendete Substrate bzw. Testverfahren.

Table 1 Investigated enzymes and substrates employed as well as test methods.

fahren sind Tabelle 1 zu entnehmen. In allen Fällen wurde die immobilisierte Aktivität pro cm² Schmelzoberfläche berechnet.

Für die Bestimmung der Aktivität von Lysozym, Peroxidase, Amylase und Phosphatase wurden die Schmelzproben mit Pellikel in den Wells der Mikrotiterplatte mit der Puffer-Substrat-Lösung inkubiert.

Bei den photometrischen Testverfahren mussten für die Messung der Absorption die Probekörper aus den Mikrotiterplatten entfernt werden, da sich die Probekörper sonst im Strahlengang befunden hätten (Phosphatase, Amylase).

Bei den Untersuchungen, die auf fluoreszierenden Produkten beruhen (Lysozym, Peroxidase), konnten die Prüfkörper während der Messung der Enzymaktivität in den Wells der Mikrotiterplatte verbleiben, da sowohl Exzitationsmodul als auch Emissionsdetektor oberhalb der Mikrotiterplatte installiert sind.

In allen Fällen wurde eine Desorption von Enzymaktivität in die umgebende Puffer-Substrat-Lösung beobachtet, so dass bei Amylase, alkalischer Phosphatase, Lysozym und Peroxidase die desorbierte Aktivität mit erfasst wurde.

Weitere Details sind den Originalarbeiten zu entnehmen [13, 16, 17, 22–25].

In the assays based on fluorogenic substrates (lysozyme, peroxidase), the slabs remained in the wells of the microtiter plate during measurement of enzyme activity as both the excitation module and the emission detector are installed above the microtiter plate.

In all cases, desorption of enzyme activity into the surrounding buffer solution was observed. Therefore, both immobilized and desorbed activities were measured separately when testing amylase, alkaline phosphates, lysozyme and peroxidase.

Further details can be found in the respective original articles [13, 16, 17, 22–25].

2.3 Gold immunolabeling and electron microscopy

Amylase, lysozyme, carbonic anhydrase I and II, peroxidase and transglutaminase in the pellicle were visualized and quantified using the gold immunolabeling technique. Ultrathin cross-sections were evaluated by transmission electron microscopy and surface views by scanning electron microscopy. For the immuno-electron microscopic detection of the

2.3 Goldimmunolabelling und elektronenoptische Verfahren

Amylase, Lysozym, Carboanhydrase I und II, Peroxidase und Transglutaminase in der Pellikel wurden mit Hilfe des Goldimmunolabellingverfahrens visualisiert und quantifiziert. Querschnitte wurden transmissionselektronenmikroskopisch und Oberflächenansichten rasterelektronenmikroskopisch evaluiert. Für die immuno-elektronenmikroskopische Detektierung der Pellikelenzyme wurden die Präparate mit primären spezifischen Antikörpern gegen die verschiedenen Enzyme inkubiert, gespült und diese durch Inkubation mit einem sekundären Antikörper (gebunden an 10 nm große kolloidale Goldpartikel) markiert [7].

Weitere methodische Details sind den betreffenden Publikationen zu entnehmen [7, 8, 21].

2.4 Statistik

Ein möglicher Einfluss der oralen Expositionszeit und der Lokalisation der Proben wurde mit ANOVA überprüft. Weitergehende Auswertungen erfolgten mit der Scheffé-Prozedur ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Goldimmunolabelling [7, 8, 21]

Mit Hilfe des Goldimmunolabellingverfahrens konnten folgende Enzyme in der Pellikel nachgewiesen werden: Amylase, Lysozym, Peroxidase, Carboanhydrase I und II sowie Transglutaminase (Tab. 2). Insbesondere gelang die Differenzierung der drei GTF-Isoformen B, C und D in der *In-situ*-Pellikel (Tab. 3) [21]. Dabei war GTF D bei den untersuchten Probanden die signifikant häufigste Isoform. Typische Beispiele für die Visualisierung der markierten Moleküle mit TEM (Querschnitt) und FEI-SEM (Oberfläche) sind Abbildung 1 zu entnehmen.

Alle Enzyme waren randomisiert in der Pellikel verteilt. Bei den jeweiligen Enzymen hatten die Lokalisation und vor allem die Pellikelbildungszeit einen signifikanten Einfluss auf die im Querschnitt mit TEM detektierbaren Enzymmoleküle. In den dünneren palatinalen Pellikeln waren weniger markierte Proteine zu finden als bukkal. Bukkale Pellikel weisen nach 30 Minuten eine Dicke zwischen 20 nm und 160 nm auf (palatinal: 5–30 nm). Nach 120 Minuten zeigt die bukkale Pellikel eine Dicke zwischen 20 nm und 350 nm auf, die palatinale lediglich zwischen 5 nm und 50 nm. Die Dickenzunahme der Pellikel über die Zeit korrelierte ebenfalls mit der Anzahl gelabellter Enzymproteine im Querschnitt. Demgegenüber war die an der Oberfläche exponierte Anzahl, die mit FEI-SEM quantifiziert wurde, nicht signifikant von der Lokalisation oder der oralen Expositionszeit der Probekörper beeinflusst. Die Anzahl der detektierten Moleküle zeigte bei allen untersuchten Enzymen eine hohe intraindividuelle und interindividuelle Variabilität.

3.2 Aktivitätstests

Bei allen Aktivitätstests wurde ebenfalls eine hohe intraindividuelle und interindividuelle Variabilität der Enzymaktivitäten in der Pellikel nachgewiesen (Tab. 4). Für in der Pellikel immo-

pellicle enzymes, the samples were incubated with primary specific antibodies against the different enzymes, rinsed and labeled by incubation with a secondary antibody, bound to a 10 nm colloidal gold particle [7].

Further details of the method can be found in the respective publications [7, 8, 21]

2.4 Statistics

A possible influence of the oral exposure time and localization of the samples on the enzyme activities and on the amount of labeled molecules was examined with ANOVA followed by the Scheffé procedure ($p < 0.05$).

3 Results

3.1 Gold immunolabeling [7, 8, 21]

The following enzymes were detected in the pellicle using the gold immunolabeling technique: amylase, lysozyme, peroxidase, carbonic anhydrase I and II and transglutaminase (Tab. 2). In particular, it was possible to differentiate the three GTF isoforms B, C and D in the *in situ* pellicle (Tab. 3) [21]. GTF D was the significantly most frequent isoform in the investigated subjects. Typical examples of visualization of the labeled molecules with TEM (cross-section) and FEI-SEM (surface) are shown in figure 1.

All enzymes were distributed randomly in the pellicle. For the different enzymes, the location and especially the pellicle formation time had a significant impact on the amount of enzyme molecules detectable with TEM in the cross-sections. Fewer labeled proteins were found in the thinner palatal pellicles than buccally. The thickness of the buccal pellicle was between 20 nm and 160 nm after 30 minutes (palatal: 5–30 nm). After 120 minutes, the thickness of the buccal pellicle ranged between 20 nm and 350 nm, while the palatal thickness only amounted to 5 nm to 50 nm. The increase in thickness of the pellicle over time also correlated with the number of labeled enzyme proteins in the cross-sections. On the other hand, the number of enzyme molecules exposed at the surface, as quantified with FEI-SEM, was not significantly influenced by the location or oral exposure time of the substrates. The number of detected molecules showed high intra-individual and inter-individual variability for all investigated enzymes.

3.2 Enzyme activities

For all enzymes, a high intra-individual and inter-individual variability of activities in the pellicle was recorded (Tab. 4). With amylase, peroxidase and lysozyme immobilized in the

bilisierte Amylase, Peroxidase und Lysozym konnten Substratabhängigkeiten vom Michaelis-Menten-Typ aufgezeigt werden. Die in der Pellikel immobilisierten Enzyme hatten dabei höhere K_m-Werte als die freien Enzyme im Speichel, was auf eine geringere Affinität zum Substrat hindeutet.

Amylase [13]
Es konnte auf allen untersuchten Probekörpern immobilisierte Amylaseaktivität nachgewiesen werden. Im Mittel betrug die Aktivität 1,39 ± 1,87 mU/cm². Es bestand ein partieller Einfluss der Pellikelbildungszeit auf die Amylaseaktivität. Bukkale 120-min-Proben wiesen eine höhere Aktivität auf als bukkale 3-min-Proben. Darüber hinaus war die palatinale Aktivität der 30-min-Proben signifikant geringer als die der bukkalen 30-min-Proben ($p < 0,05$, one-way ANOVA).

Lysozym [23]
Für die immobilisierte Lysozymaktivität in der Pellikel konnte ein Einfluss von oraler Expositionszeit und Lokalisation auf die oberflächlich exponierte Aktivität gezeigt werden (ANOVA, $p < 0.001$). Die ergänzend durchgeführte Scheffé-Prozedur ergab signifikante Unterschiede der bukkalen 3-min-Daten im Vergleich zu den palatinalen und bukkalen 30-min-Daten. Außerdem waren die Lysozymaktivitäten auf palatinalen 3-min-Proben signifikant geringer als die palatinalen 30-min-Daten ($p < 0,05$).

Peroxidase [24]
Alle untersuchten Pellikelproben zeigten an der Oberfläche exponierte Peroxidaseaktivität, die weder von der Lokalisation noch von der Pellikelbildungszeit beeinflusst war. Im Mittel fanden sich 24,4 ± 27,7 mU/cm². Für Peroxidase in der Pellikel konnte eine Michaelis-Menten-Kinetik nachgewiesen werden. Peroxidase in der Pellikel und im Speichel ist sehr anfällig gegenüber verschiedenen Hemmstoffen und wird auch durch das Substrat irreversibel gehemmt. Nach der *In-situ*-Applikation eines Whitestrips für 30 Minuten war in der Pellikel praktisch keine Peroxidaseaktivität mehr detektierbar, obwohl mit Hilfe der Immunolabellingtechnik noch Enzymmoleküle nachgewiesen werden konnten. Die Peroxidaseaktivität erreichte erst 40 Minuten nach der Entfernung des Whitestrips wieder den Ausgangswert (Abb. 2).

Phosphatasen [25]
Alle untersuchten Proben zeigten Aktivität der alkalischen Phosphatase (0,87 ± 0,99 mU/cm²). Ein Einfluss der Lokalisation oder der oralen Expositionszeit war nicht zu beobachten. Saure Phosphataseaktivität war demgegenüber nicht nachweisbar.

Transglutaminase [25]
Transglutaminaseaktivität war auf 97 % der untersuchten Pellikelproben detektierbar, die mittlere Aktivität betrug 16,7 ± 21,2 mU/cm². Es bestand kein signifikanter Einfluss der Pellikelbildungszeit oder der Lokalisation auf die detektierte Aktivität. Die enzymatische Reaktion dieses Enzymes ist Abbildung 3 zu entnehmen.

Proteolytische Aktivität [25]
Mit dem universalen Proteaseassay und mit dem Kollagenaseassay waren keine Enzymaktivitäten in der Pellikel nachweisbar, Elastaseaktivität fand sich nur auf 57 % der Proben (8,9 ± 22,0 mU/cm²).

pellicle, enzyme kinetics of the Michaelis-Menten type were recorded. The enzymes immobilized in the pellicle had higher K_m values than the free enzymes in the saliva, indicating lower affinity to the substrate.

Amylase [13]
Amylase activity was found in all pellicles tested. The average activity was 1.39 ± 1.87 mU/cm^2. The pellicle formation time had a partial influence on the amylase activity. Buccal 120-min samples demonstrated higher activity than buccal 3-min samples. Moreover, the palatal activity of the 30-min samples was significantly lower than that of the buccal 30-min specimens ($p < 0.05$, one-way ANOVA).

Lysozyme [23]
The oral exposure time and localization in the oral cavity had an impact on the lysozyme activity exposed at the surface of the pellicle (ANOVA, $p < 0.001$). The additional Scheffé procedure showed significant differences of the buccal 3-min data compared with the palatal and buccal 30-min results. In addition, the lysozyme activities on palatal 3-min samples were significantly lower than the palatal 30-min data ($p < 0.05$).

Peroxidase [24]
All pellicle samples showed immobilized peroxidase activity at the surface, but it was neither influenced by the location in the oral cavity nor by the pellicle formation time. An average activity of 24.4 ± 27.7 mU/cm^2 was found. Michaelis-type kinetics was recorded for peroxidase in the pellicle. Peroxidase in the pellicle and in the saliva is very susceptible to various inhibitory substances and is also irreversibly inhibited by the substrate. Directly after *in situ* application of a Whitestrip for 30 minutes, hardly any peroxidase activity was detectable in the pellicle although enzyme molecules could still be found using the immunolabeling technique. The peroxidase activity was re-established and reached the baseline level 40 minutes after removal of the Whitestrips (Fig. 2).

Phosphatases [25]
All investigated samples showed alkaline phosphatase activity (0.87 $\pm$ 0.99 mU/cm^2). An influence of the localization or oral exposure time was not observed. In contrast, acidic phosphatase activity was not detectable in the pellicle.

Transglutaminase [25]
Transglutaminase activity was detectable on 97 % of the investigated samples and the mean activity was 16.7 ± 21.2 mU/cm^2. The pellicle formation time and localization in the oral cavity had no significant influence on the detected activity. The reaction of this enzyme is shown in figure 3.

Proteolytic activity [25]
No enzyme activity was detectable in the pellicle with the universal protease assay and with the collagenase assay. Elastase activity was found on only 57 % of the samples (8.9 ± 22.0 mU/cm^2).

Glucosyltransferase [21]
Glucosyltransferase activity was detected on all tested samples. No significant impact of the localization or pellicle formation time on the activity of this enzyme were observed.

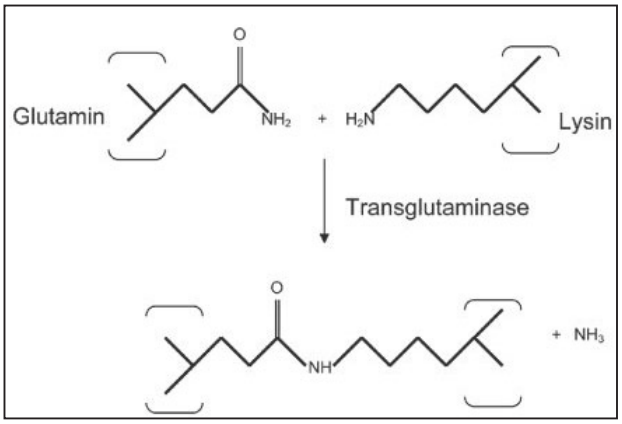

Abbildung 3 Transglutaminase: Bildung einer ε-(γ-Glutamyl)Lysin-Brücke zwischen Lysin und Glutamin katalysiert durch Transglutaminase (Protein-Glutamin-γ-Glutamyltransferase) [3, 4].
Figure 3 Transglutaminase: Formation of the ε-(γ-glutamyl)lysine bridge between lysine and glutamine catalyzed by transglutaminase (protein-glutamine-γ-glutamyltransferase) [3, 4].

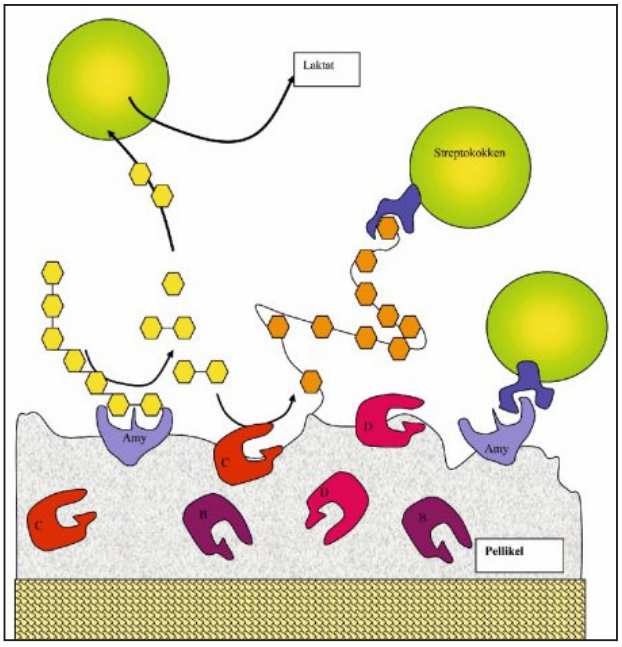

Abbildung 4 Interaktionen von Glycosyltransferasen und Amylase an der Zahnoberfläche. Amylase (Amy) und die Glycosyltransferase-Isoformen B, C und D (B, C, D) sind in aktiver Konformation in der Pellikel immobilisiert. Amylase hydrolysiert Stärke; Stärkehydrolysate können von Streptokokken zu Laktat verstoffwechselt werden: Gleichzeitig dienen sie der Glycosyltransferase als Substrat bei der Synthese von Glucanen. Glucane und Amylase wirken als spezifische Rezeptoren bei der Adhäsion von Mikroorganismen an die Pellikel. Abbildung modifiziert nach [32].
Figure 4 Interactions of glucosyltransferases and amylase on the tooth surface: amylase (Amy) and GTF isoforms B, C and D (B, C, D) are present in the pellicle in an active conformation. Amylase cleaves starch. Starch hydrolysates are either metabolized to lactate by streptococci or may act as substrate for GTF-based synthesis of glucans. Amylase, as well as glucans, serve as binding sites for adhesion of streptococci and other microorganisms. Figure modified from [32].

Glycosyltransferase [21]
Auf allen untersuchten Proben fand sich Glycosyltransferaseaktivität. Ein signifikanter Einfluss der Lokalisation oder der Pellikelbildungszeit auf die Aktivität dieses Enzyms konnte nicht aufgezeigt werden.

4 Diskussion

In der Mundhöhle unterliegt die Pellikelbildung einer Vielzahl möglicher modulierender Faktoren wie Unterschieden in der Speichelzusammensetzung, Kontakt mit Weichgeweben, Nahrungsaufnahme, Mundgesundheit etc. [15, 30, 39]. Daher wurden in vielen früheren Studien bevorzugt experimentelle Pellikel *in vitro* untersucht, um eine höhere Standardisierung zu erzielen [6, 60]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die *in situ* oder *in vivo* gebildete Pellikel deutlich von *in vitro* gebildeten Pellikeln abweicht [5]. Dies gilt sowohl für die Aminosäurezusammensetzung und die Lipidkomposition als auch für funktionelle Parameter, was den Aussagewert von Versuchen mit *in vitro* generierten Pellikelproben deutlich limitiert [5, 15, 58, 59]. Die Untersuchung von *In-vivo*-Pellikel erfordert in der Regel die mecha-

4 Discussion

Pellicle formation in the oral cavity is modulated by several factors such as differences in saliva composition, contact with oral soft tissues, food ingestion, oral health etc. [15, 30, 39]. Therefore, in many previous studies, experimental pellicles were studied preferentially *in vitro* in order to achieve a greater level of standardization [6, 60]. However, it has been shown that pellicles formed *in situ* or *in vivo* differ markedly from pellicles formed *in vitro* [5]. This applies for both the amino acid and the lipid composition as well as for functional parameters, limiting the reliability of experiments with pellicle samples generated *in vitro* [5, 15, 58, 59]. Investigation of *in vivo* pellicle usually requires mechanical removal of the pellicle in the patient's mouth, which can also cause changes [52, 53]. Thus, *in situ* approaches are preferable as a pellicle generated in the mouth can be transferred directly *ex vivo in vitro* to enzymatic assays or to preparation for electron microscopic evaluation without any desorption procedures [15, 16, 26, 29]. The combination of gold immuno labeling and modern enzymatic assays, as in the present study, enables fundamental characterization of the function and ultrastructure of the pellicle [7, 8, 20, 24, 25]. The

Enzym **Enzyme**	**Quelle** **Source**	**Funktion** **Function**	**Aktivität in der *In-situ*-Pellikel** **Activity in the *in situ* pellicle**	**Detektion von Enzymmolekülen mit Gold-Immunolabelling** **Detection of enzyme molecules by gold immunolabeling**
Amylase	Speicheldrüsen, v. a. Gld. Parotis	Hydrolyse von Stärke, bakt. Rezeptor	+++	+++
	Salivary glands, esp. the parotid gland	Hydrolysis of starch, bacterial receptor	+++	+++
Lysozym	Speicheldrüsen, v. a. Gld. submandibularis und sublingualis	Hydrolyse der Peptidoglycanhülle von Bakterien, antibakteriell	+++	+++
Lysozyme	Salivary glands, esp. the submandibular and sublingual glands	Hydrolysis of the peptidoglycan layer of bacteria, antibacterial properties	+++	+++
Peroxidase	Speicheldrüsen	Entgiftung von Peroxiden, Bildung von Hypothiocyanat	+++	+++
	Salivary glands	Detoxification of peroxides, formation of hypothiocyanate	+++	+++
Carboanhydrase I und II	Seröse Azinuszellen	Katalyse des Carbonatpuffers, pH-Homeostase	n. b.	+++
Carbonic anhydrase I and II	Serous acinar cells	Catalysis of carbonate buffer, pH homeostasis	n. t.	+++
Proteasen Kollagenase Elastase	Sulkusfluid, Bakterien	Proteolyse	– – (+)	n. b.
Proteases Collagenase Elastase	Sulcus fluid, bacteria	Proteolysis	– – (+)	n. t.
Transglutaminase	Orale Epithelien	Vernetzung von Pellikelproteinen	++	++
	Oral epithelium	Cross linking of pellicle proteins	++	++
Phosphatasen Alkalische Phosphatase Saure Phosphatase	Speichel	Proteinprozessierung durch Dephosphorylierung	++ –	n. b.
Phosphatases alkaline phosphatase acid phosphatase		Protein processing through dephosphorylation	++ –	n. t.
Glycosyltransferasen Isoformen B, C, D	Streptokokken-Spezies	Synthese von Glukanen	++	+++
Glucosyltransferase isoforms B, C, D	Streptococcal species	Synthesis of glucanes	++	+++

Tabelle 2 Charakteristika der untersuchten Enzyme und Synopsis der Enzymaktivitätstest sowie der elektronenoptischen Untersuchungen mit der Goldimmunolabellingtechnik. n. b. = nicht bestimmt.

Table 2 Characteristics of the tested enzymes and synopsis of the results; enzyme activities and electron microscopic evaluation based on the gold immunolabeling technique. n. t. = not tested.

nische Entfernung der Pellikel im Munde der Patienten, was ebenfalls Veränderungen hervorrufen kann [52, 53]. Somit sind *In-situ*-Ansätze zu bevorzugen, da hier eine in der Mundhöhle generierte Pellikel *ex vivo in vitro* ohne forcierte Desorption direkt den Enzymtests bzw. den Vorbereitungen für elektronenmikroskopische Untersuchungen zugeführt werden kann [15, 16, 26,

present investigations on the enzymology of the pellicle yielded that the pellicle layer is a complex functional structure. Within 3 minutes, lysozyme, peroxidase, amylase, alkaline phosphatase and transglutaminase are immobilized in the pellicle in active conformation [13, 16, 24, 25]. The rapid formation of the proteinaceous layer is surprising, as this is not

29]. Die verwendete Methodenkombination von Goldimmunolabelling und modernen enzymatischen Testverfahren ermöglicht dabei eine grundlegende Charakterisierung von Funktion und Ultrastruktur der Pellikel [7, 8, 20, 24, 25]. Die vorliegenden Untersuchungen zur Enzymologie der Pellikel zeigen die Pellikel als komplexe funktionelle Struktur. Innerhalb von 3 Minuten sind Lysozym, Peroxidase, Amylase, alkalische Phosphatase sowie Transglutaminase in aktiver Konformation in der Pellikel immobilisiert [13, 16, 24, 25]. Überraschend ist dabei die schnelle Ausbildung des Proteinbiofilms, die nicht durch das Adhärieren einzelner Proteine möglich ist [17, 30]. Es konnte gezeigt werden, dass mizellartige, globuläre Strukturen im Speichel vorkommen [67]. Diese globulären Strukturen sind maßgeblich an der Pellikelbildung beteiligt, wie durch die globuläre Oberflächenstruktur des initialen oralen Biofilms bestätigt wird [7, 27, 28]. Sie enthalten charakteristische Bestandteile der initialen Pellikel wie Lysozym, Amylase und Prolin-reiche Proteine, was die hohe Enzymaktivität der Kurzzeitpellikel erklärt [33, 54, 67]. Die Oberflächenstruktur der im Rahmen der vorliegenden Untersuchung evaluierten Pellikelproben wies ebenfalls globuläre Komponenten auf [7]. Die hohe Aktivität aller Enzyme auch in der initialen Pellikel belegt, dass die Pellikel innerhalb kürzester Zeit volle biologische Funktionsfähigkeit zeigt und unterstreicht ihre Ambivalenz im Spannungsfeld zwischen bakterieller Kolonisation und protektiven Mechanismen [15, 30]. Enzymproteine in der Pellikel erfüllen das Prinzip der Multifunktionalität: sie wirken als Rezeptoren für Mikroorganismen und exponieren gleichzeitig enzymatische Aktivität [15]. Nicht zuletzt wirken insbesondere Amylase und Lysozym auch als Strukturkomponenten, wie ihr Vorkommen in der frühen Pellikel (3 min) und in den globulären, mizellartigen Strukturen unterstreicht, die maßgeblich an der Pellikelbildung beteiligt sind [33, 54, 67].

Ultrastrukturelle Untersuchungen der Pellikel zeigen deutlich eine Zunahme der Pellikeldicke in Abhängigkeit vom Alter der Pellikel in den ersten 90 Minuten der Pellikelbildung [26]. In scheinbarem Widerspruch dazu werden die an der Oberfläche nachweisbaren Amylase- und Lysozymaktivitäten nur in geringem Ausmaß und andere Enzymaktivitäten nicht vom Alter und somit von der Dicke der Pellikel beeinflusst. Vielmehr sind an der Pellikeloberfläche nach 3 Minuten bereits hohe Aktivitäten nachweisbar. Die mit Hilfe der Goldimmunolabellingtechnik angefertigten elektronenoptischen Bilder der Pellikeloberfläche bzw. der Querschnitte können diesen scheinbaren Widerspruch erklären [7, 8, 21]. In den Pellikelquerschnitten (TEM) waren in Abhängigkeit von der Pellikeldicke bzw. vom Alter der Pellikel unterschiedlich viele randomisiert verteilte Enzymmoleküle in allen Schichten der Pellikel detektierbar. Demgegenüber unterschied sich die an den Oberflächen von Pellikelproben verschiedenen Alters und variierender Lokalisation nachweisbare Anzahl der markierten Moleküle nicht. Dieser Befund korrespondiert mit der Bestimmung der an der Oberfläche exponierten Enzymaktivitäten. Tiefer liegende Enzymmoleküle sind maskiert und für das Substrat nicht zugänglich. Bei Desorption äußerer Pellikelschichten sind sie jedoch für das Substrat zugänglich und aktiv (Abb. 1 c) [13]. Die Tatsache, dass auch in der Basalpellikel Enzymmoleküle visualisiert werden konnten, korrespondiert zur Messung von immobilisierten Aktivitäten in der 3-min-Pellikel [13, 16, 24, 25].

Peroxidase, Lysozym und Amylase zeigten typische kinetische Charakteristika immobilisierter Enzyme. Die immobilisierten Enzyme hatten höhere K_m-Werte als die jeweiligen freien

possible by sole adsorption of single proteins [17, 30]. It has been shown that micelle-like globular structures occur in the saliva [67]. These globular structures are substantially involved in pellicle formation, as confirmed by the globular surface structure of the initial oral biofilm [7, 27, 28]. They contain characteristic components of the initial pellicle such as lysozyme, amylase and proline rich proteins. This offers an explanation for the high enzyme activity of the initial pellicle [33, 54, 67]. The surface structure of the pellicle samples evaluated in the present study also exhibited globular components [7]. The high level of activity of all enzymes even in the initial pellicle confirms that the pellicle shows full biological activity within an extremely short time and emphasizes its ambivalent function between bacterial colonization and protective mechanisms [15, 30]. Enzyme proteins in the pellicle fulfill the principle of multifunctionality: they act as receptors for micro-organisms and at the same time they express enzyme activity [15]. Not least, amylase and lysozyme in particular also act as structural proteins, as emphasized by their occurrence in the initial pellicle (3 min) and in the globular micelle-like structures, which are substantially involved in pellicle formation [33, 54, 67].

Ultrastructural studies of the pellicle clearly indicate an increase in pellicle thickness depending on the age of the pellicle within the first 90 minutes of pellicle formation [26]. In apparent contradiction, the amylase and lysozyme activities detectable on the surface are influenced only to a small degree and other enzyme activities are not influenced by the formation time or thus by the thickness of the pellicle. Rather, high activities are detectable on the pellicle surface after just 3 minutes of pellicle formation. Electron microscopic evaluation of the pellicle surface and ultrathin cross-sections using the gold immunolabeling technique offer an explanation for this contradiction [7, 8, 21]. In the cross-sections of the pellicle (TEM), different amounts of randomly distributed enzyme molecules were detectable in all layers depending on the thickness and age of the pellicle. On the other hand, the number of labeled molecules found on the surfaces of pellicle samples of different ages and varying localizations did not differ. This finding corresponds with the determination of the enzyme activities exposed at the surface. More deeply located enzyme molecules are masked and not accessible for the substrate. However, with desorption of outer layers of the pellicle, they are accessible for the substrate and enzymatically active (fig. 1 c) [13]. The fact that enzyme molecules could also be visualized in the basal pellicle corresponds with the measurement of immobilized activities in the 3-minute pellicle [13, 16, 24, 25].

Peroxidase, lysozyme and amylase show the typical kinetic characteristics of immobilized enzymes. The immobilized enzymes had higher K_m values than the respective free salivary enzymes, indicating a lower affinity for the substrate [13, 16, 24]. The enzymes are therefore not only loosely associated with the pellicle or integrated in networks by non-covalent bonds but are bound to the pellicle tenaciously [13, 15, 16]. The irreversible conformational changes associated with such possibly covalent binding or modifications of the secondary, tertiary and quaternary structure of the enzymes explain the change in the kinetic parameters. An increased K_m value in the immobilized state was also found by another research team for glucosyltransferase, a pellicle enzyme of bacterial origin [64].

		Glycosyltransferase/Glucosyltransferase Gezählte Goldpartikel/100 µm/Counted gold particles/100 µm		
		GTF B	GTF C	GTF D
30 min	bukkal / buccal	3,25 ± 1,49	4,17 ± 3,97	11,38 ± 10,25
	palatinal / palatal	2,0 ± 1,58	1,89 ± 2,976	7,57 ± 10,34
120 min	bukkal / palatal	8,5 ± 2,82	5,86 ± 2,97	24,18 ± 16,32
	palatinal / palatal	4,38 ± 4,34	3,175 ± 1,89	9,75 ± 5,63

Tabelle 3 Glycosyltransferasen: Ergebnisse der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM): Detektion der GTF-Isoformen B, C und D mit Hilfe der Goldimmunolabellingtechnik in Pellikelquerschnitten. Die Pellikelbildung erfolgte im Oberkiefer bukkal und palatinal im Bereich der Prämolaren und des 1. Molaren, n = 5 Probanden, MW ± SD, gezählte Goldpartikel/ 100 µm Pellikellänge.

Table 3 Glucosyltransferases: Results of transmission electron microscopy (TEM): Detection of gold labeled GTF-molecules (B, C, D) in cross-sections of the pellicle. Pellicle formation took place on buccal and palatal sites of the upper premolars and 1st molar, n = 5 subjects. MV ± SD, counted gold globules/ 100 µm pellicle length.

Speichelenzyme, was eine geringere Affinität zum Substrat belegt [13, 16, 24]. Die Enzyme sind also nicht nur lose an die Pellikel assoziiert oder in nicht kovalenter Bindung in Netzwerke integriert, sondern mit relativ hoher Festigkeit an die Pellikel gebunden [13, 15, 16]. Die mit einer solchen, möglicherweise kovalenten Bindung einhergehenden irreversiblen Konformationsänderungen, bzw. Modifikationen von Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Enzyme, erklären die Veränderung der kinetischen Parameter. Auch für ein Pellikelenzym bakteriellen Ursprungs, für die Glycosyltransferase, konnte von einer anderen Arbeitsgruppe ein erhöhter K_m-Wert im immobilisierten Zustand nachgewiesen werden [64].

Neben sIgA als Vertreter der spezifischen Immunabwehr in der Pellikel ist Lysozym die wesentliche antimikrobielle Komponente der Pellikel [15]. Die Präsenz von immobilisierter Lysozymaktivität in der Pellikel erklärt auch die große Anzahl avitaler Mikroorganismen in der Pellikel [19, 23]. Peroxidase in der Pellikel trägt zur Entgiftung von Radikalen bei und synthetisiert den antibakteriellen Metaboliten Hypothiocyanat [15]. Allerdings ist die Effektivität der Peroxidase limitiert durch vom Substrat bzw. von Polyphenolen induzierte Inaktivierung [24]. Bei Belastung der Mundhöhle durch oxidativen Stress wie etwa Nikotinabusus oder Homebleaching ist eine Regenerationsphase der Peroxidase in der Pellikel zu berücksichtigen. Im Rahmen des Turnover werden dann neue, aktive Moleküle angeflutet [15].

Das Fehlen von saurer Phosphatase und das nur sporadische Auftreten proteolytischer Aktivität deuteten auf eine selektive Proteinadsorption bei der Pellikelbildung hin [25]. Für die intrinsische Reifung und Vernetzung der Pellikel sind demnach vor allem Transglutaminase und alkalische Phosphatase relevant und nicht proteolytische Prozesse [25]. Es wurde bereits in früheren *In-vitro*-Studien aufgezeigt, dass typische Pellikelkomponenten wie Prolin-reiche Proteine und Statherin durch Transglutaminase vernetzt werden [68, 69]. Der Nachweis von Transglutaminaseaktivität in der *In-situ*-Pellikel belegt diese Hypothese endgültig. Alkalische Phosphatase kann durch Dephosphorylierung die Funktionalität der Pellikelproteine modulieren [25]. Außerdem wurde postuliert, dass Phosphatasen den Fluoridstoffwechsel an der Zahnoberfläche mit beeinflussen [36].

Die Pellikel wird in der Literatur oft als Erosionsschutz angesehen [30]. Da die Pellikel jedoch keine dichte Protein-

Apart from sIgA as a representative of specific immunity in the pellicle, lysozyme is the essential antimicrobial component [15]. The presence of immobilized lysozyme activity in the pellicle also explains the large number of dead micro-organisms detectable in the initial biofilm [19, 23]. Peroxidase in the pellicle helps to detoxify radicals and catalyzes the formation of antibacterial metabolite hypothiocyanate [15]. However, the effectiveness of the peroxidase is limited by the inactivation induced by the substrate or by polyphenols [24]. When the oral cavity is subject to oxidative stress such as nicotine abuse or home bleaching, a regeneration phase of the peroxidase activity in the pellicle is recommendable. Due to the continuous turnover, new active molecules are immobilized in the pellicle [15].

The absence of acidic phosphatase and the only sporadic occurrence of proteolytic activity indicated that pellicle formation is highly selective [25]. Accordingly, transglutaminase in particular as well as alkaline phosphatase and not proteolytic processes are relevant for the intrinsic maturation and cross-linking of the pellicle [25]. It has already been shown in earlier *in vitro* studies that typical pellicle components such as proline-rich proteins and statherin are cross-linked by transglutaminase [68, 69]. The detection of transglutaminase activity in the *in situ* pellicle finally confirms this hypothesis. Alkaline phosphatase can modulate the function of the pellicle proteins by dephosphorylation [25]. It was also postulated that phosphatases influence fluoride metabolism on the tooth surface [36].

In the literature the pellicle is often described as protecting tooth surfaces from erosive mineral loss [30]. However, since the pellicle is no dense protein layer but rather a reticular, globular structure with semi permeable properties, its purely mechanical and physical protective effect against acidic agents is limited [18]. Carbonic anhydrases in the pellicle can, however, increase the anti-erosive properties of the pellicle by catalysis of the dissociation reaction of the carbonate buffer [8, 15].

The primary physiological function of amylase in the pellicle is unclear. Presumably amylase, as one of the most common salivary proteins with a high affinity to proline-rich proteins, has mainly structural significance, particularly in the rapid formation of the pellicle [13].

	Immobilisierte Enzymaktivität in der In-situ-Pellikel Immobilized enzyme activities					
	3 min		30 min		120 min	
	bukkal buccal	palatinal palatal	bukkal buccal	palatinal palatal	bukkal buccal	palatinal palatal
Peroxidase [mU/cm^2]	21,1 ± 21,6	24,1 ± 32,7	14,7 ± 15,6	26,8 ± 31,2	42,4 ± 37,0	15,9 ± 12,0
Lysozym / Lysozyme [U/cm^2]	39,7 ± 23,7	52,3 ± 32,0	80,0 ± 42,0	102,8 ± 54,7	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Transglutaminase [mU/cm^2]	12,3 ± 020,3	11,9 ± 12,6	26,0 ± 31,6	20,9 ± 23,0	16,1 ± 18,5	12,5 ± 13,8
Alkalische Phosphatase Alkaline phosphatase [mU/cm^2]	0,37 ± 0,27	0,55 ± 0,62	0,72 ± 0,79	0,85 ± 1,32	0,64 ± 0,64	0,74 ± 0,93
Amylase [mU/cm^2]	0,82 ± 0,47	0,91 ± 0,65	2,85 ± 3,65	0,63 ± 0,32	2,12 ± 2,57	1,47 ± 1,12
Glycosyltransferase [mU/cm^2]	0,05 ± 0,04	0,10 ± 0,08	0,06 ± 0,05	0,17 ± 0,21	0,18 ± 0,23	0,28 ± 0,21

Tabelle 4 Immobilisierte Enzymaktivitäten in der *In-situ*-Pellikel, Peroxidase, Lysozym, Transglutaminase, alkalische Phosphatase, Amylase und Glycosyltransferase, Angaben in mU/cm^2 bzw. in U/cm^2, MW ± SD.

Table 4 Enzyme activities immobilized in the pellicle formed *in situ*; peroxidase, lysozyme, transglutaminase, alkaline phosphatase, amylase and glucosyltransferase; data are given in mU/cm^2 or U/cm^2, respectively; mean ± SD.

schicht, sondern eine netzartige, globuläre Struktur mit semipermeablen Eigenschaften darstellt, ist ihr rein mechanisch-physikalischer Schutzeffekt gegen saure Noxen limitiert [18]. Carboanhydrasen in der Pellikel können aber durch Katalyse der Dissoziationsreaktion des Carbonatpuffers die antierosiven Eigenschaften der Pellikel steigern [8, 15].

Offen ist die primäre physiologische Funktion von Amylase in der Pellikel. Vermutlich hat die Amylase als eines der häufigsten Speichelproteine mit hoher Affinität zu Prolin-reichen Proteinen vor allem strukturelle Bedeutung bei der schnellen Ausbildung der Pellikel [13].

Das frühzeitige Auftreten erheblicher Mengen aller drei Glycosyltransferase-Isoformen ist als optimale Adaptation kariogener Mikroorganismen anzusehen [15]. Initial können aufgrund der Scherkräfte in der Mundhöhle und aufgrund der Abwehrmechanismen in Speichel und Pellikel nur wenige Mikroorganismen an der Pellikel-bedeckten Zahnoberfläche adhärieren. Vielfach werden auch devitale Mikroorganismen detektiert [19, 31]. Die Proteine scheinen also das Rennen um die Oberfläche zu gewinnen [12]. In dieser Phase schleusen die Bakterien die Glycosyltransferasen in aktiver Konformation in die Pellikel ein, die als Pioniere der mikrobiellen Besiedelung der Zahnoberfläche wirken [63, 65].

Die gleichzeitige Präsenz von Amylase- und Glycosyltransferaseaktivität bereits in der initialen Pellikel begünstigt die bakterielle Besiedelung der Zahnoberflächen und den bakteriellen Kohlenhydratstoffwechsel. Amylase hydrolysiert Stärke zu niedermolekularen Kohlenhydraten. Diese können von Streptokokken zu Laktat verstoffwechselt werden [19, 63]. Darüber hinaus stellen Maltosemoleküle ein ergänzendes Substrat bei der Synthese von Glucanen durch die Glycosyltransferase dar [63]. So-

The early occurrence of considerable quantities of all three glucosyltransferase isoforms can be regarded as an optimal adaptation of cariogenic micro-organisms to the host defense mechanisms [15]. Due to the shear forces in the oral cavity and due to the defense mechanisms in saliva and pellicle, initially only a few micro-organisms can adhere to pellicle-covered tooth surfaces. Dead micro-organisms are also detected repeatedly [19, 31]. The proteins therefore appear to win the race for the surface [12]. However, in this phase, the bacteria manage to immobilize the glucosyltransferases into the pellicle in an active conformation, where they act as pioneers for bacterial adhesion to the tooth surface [63, 65].

The simultaneous presence of amylase and glucosyltransferase activity even in the initial pellicle promotes bacterial colonization of the tooth surfaces and bacterial carbohydrate metabolism. Amylase hydrolyses starch to low molecular weight carbohydrates. These can be metabolized to lactate by streptococci [19, 63]. Moreover, maltose molecules represent an additional substrate in the synthesis of glucans by glucosyltransferase [63]. Both the glucans and amylase are specific receptors for bacterial colonization of the tooth surface (fig. 4) [30].

One possible biological modulation of the pellicle is targeted accumulation and immobilization of protective pellicle components such as lysozyme, peroxidase, IgA, statherin and lactoferrin in the form of mouth washes or other oral therapeutic agents [15]. Also conceivable is the accumulation of enzymes that do not occur physiologically in the pellicle but that can disturb the carbohydrate catabolism and anabolism of the micro-organisms. Examples are glucoseoxidase, and also dextranases and mutanases, which inhibit the synthesis of extracellular polysaccharides and thus maturation of the

wohl die Glucane als auch Amylase sind spezifische Rezeptoren für die bakterielle Besiedelung der Zahnoberfläche (Abb. 4) [30].

Eine Möglichkeit der biofunktionellen Modulation der Pellikel ist die Anflutung und Immobilisation protektiver Pellikelkomponenten wie Lysozym, Peroxidase, IgA, Statherin und Laktoferrin in Form von Mundspülungen oder anderen oralen Therapeutika [15]. Auch denkbar ist die Anreicherung von Enzymen, die nicht physiologischerweise in der Pellikel vorkommen, aber den Kohlenhydratkatabolismus und Anabolismus der Mikroorganismen stören können. Beispiele sind Glucoseoxidase, aber auch Dextranase und Mutanase, die die Synthese extrazellulärer Polysaccharide und damit die Strukturierung der Plaquematrix inhibieren [1, 10, 34, 44]. Die Entwicklung wirksamer, ortsständiger oraler Therapeutika würde vor allem Risikopatienten mit reduzierter Speichelfließrate und damit verbundenem erhöhtem Kariesrisiko zu Gute kommen. Dazu zählen neben Patienten mit Sjögrensyndrom auch Tumorpatienten post radiationem. Die bisher verfügbaren Speichelersatzstoffe werden oft als nicht optimal eingestuft, was sicherlich ganz erheblich auf die mangelnde Immobilisation der Wirksubstanzen auf die Zahnoberflächen zurückzuführen ist [42, 43]. Ein denkbarer Weg zur Optimierung der Inkorporation von Proteinen in die *In-vivo*-Pellikel ist die gleichzeitige Applikation von Transglutaminasen zur Proteinvernetzung, da Transglutaminasen auch physiologischerweise in aktiver Konformation in der *In-situ*-Pellikel vorkommen [15, 25]. Transglutaminasen werden heutzutage bereits in der Lebensmittelproduktion eingesetzt, um die Haltbarkeit proteinhaltiger Produkte, z. B. Fisch zu steigern.

Außer der Anreicherung protektiver Enzyme ist die Hemmung von bakterieller Glycosyltransferase in Speichel und Pellikel ein weiterer Ansatz in der Prophylaxe. Propolis, Xylitol, Delmopinol, Casein und Polyphenole hemmen Glycosyltransferasen und sind als Bestandteile von Biomimetika denkbar [37, 62, 66].

Neben den therapeutischen sind auch diagnostische Aspekte zu berücksichtigen. Bislang wurden die Enzyme in der Pellikel lediglich bei Probanden ohne hohes Kariesrisiko und ohne Parodontopathien untersucht. Es ist zu erwarten, dass Kariesaktive ein anderes Enzymprofil in der Pellikel aufweisen. Aufbauend auf eine epidemiologische Studie zur Aktivität und Verteilung der bedeutsamsten Pellikelenzyme bei kariesaktiven und kariesinaktiven Patienten könnte ein Kariesrisikotest erarbeitet werden, der die Aktivitäten verschiedener Pellikelenzyme erfasst. Zu berücksichtigen wären dabei Lysozym und Peroxidase als protektive Enzyme sowie Amylase und Glycosyltransferasen als Enzyme, welche die Biofilmbildung begünstigen. Bei den Glycosyltransferasen hat insbesondere GTF B eine exponierte Rolle als Virulenzfaktor. In einer klinischen Studie an Kindern mit „early childhood caries“ konnte eine Korrelation der GTF B-Konzentration im Speichel mit dem dmf-s-Index aufgezeigt werden [61].

5 Schlussfolgerungen:

- Es sind neben protektiven Speichelenzymen (Lysozym, Peroxidase) auch Enzyme in der Pellikel immobilisiert, die den bakteriellen Kohlenhydratmetabolismus begünstigen (Amylase, Glycosyltransferasen), was die ambivalente Rolle der Pellikel bei der Entstehung des bakteriellen Biofilms unterstreicht.

plaque matrix [1, 10, 34, 44]. The development of effective agents would benefit risk patients, in particular those with a reduced salivary flow rate and associated increase in caries risk. These include patients with Sjögren's syndrome and cancer patients following radiation. The saliva substitutes available hitherto are often classified as sub-optimal, which can probably be attributed to poor immobilization of the protective enzymes in the acquired pellicle [42, 43]. A possible way to optimize the incorporation of proteins in the *in vivo* pellicle is simultaneous application of transglutaminases for protein cross-linking since tranglutaminases occur physiologically in active conformation in the *in situ* pellicle [15, 25]. Transglutaminases are already in use today in food production in order to increase the shelf life of products containing protein, e.g. fish.

Apart from accumulation of protective enzymes, inhibition of bacterial glucosyltransferase in saliva and pellicle is a further approach in prevention. Propolis, xylitol, delmopinol, casein and polyphenols inhibit glucosyltransferases and might be potential components of biomimetic agents [37, 62, 66].

Apart from the therapeutic aspects, diagnostic aspects should also be considered. Hitherto, the enzymes in the pellicle have been investigated only in subjects of low caries activity and without periodontal disease. It is to be expected that patients with a high caries risk have a different enzymatic profile in the pellicle. Based on an epidemiological study investigating the activity and distribution of the most important pellicle enzymes in caries-active and caries-inactive patients, an enzymatic caries risk assessment was developed. Lysozyme and peroxidase as protective enzymes and amylase and glucosyltransferases as enzymes that promote biofilm formation would be considered. Among the glucosyltransferases, GTF B in particular plays a prominent role as a virulence factor. In a clinical study in children with early childhood caries, a correlation was shown between the GTF-B concentration in the saliva and the dmf-s index [61].

5 Conclusions

- Besides protective salivary enzymes (lysozyme, peroxidase), enzymes promoting bacterial carbohydrate metabolism are immobilized in the pellicle (amylase, glucosyltransferases). This emphasizes the ambivalent role of the pellicle in the formation of the bacterial biofilm.
- The presence of bacterial glucosyltransferase in the pellicle is an example of the optimal adaptation of micro-organisms to the host defense mechanisms.
- As cross-linking enzymes, transglutaminases are important for the intrinsic maturation of the pellicle.
- In preventive dentistry, pellicle enzymes should be considered in both diagnostic and therapeutic approaches.

Acknowledgment:
These studies were supported by the German Research Foundation (DFG proposals HA 2718/ 3–3, HA 5192/1–2). We would like to thank *W. Hoth-Hannig* and *B. Spitzmüller* for their excellent technical support. Furthermore we are most grateful to Prof. Dr. *R. Zech* (Göttingen) and Prof. Dr. *W.H. Bowen* (Rochester, NY) for assisting with scientific questions on enzymology.

- Die Präsenz von bakterieller Glycosyltransferase in der Pellikel ist ein Beispiel für die optimale Adaptation von Mikroorganismen an die körpereigenen Schutzmechanismen.
- Für die intrinsische Maturation der Pellikel sind als vernetzende Enzyme Transglutaminasen von Bedeutung.
- In der präventiven Zahnheilkunde sind Pellikelenzyme sowohl bei diagnostischen als auch bei therapeutischen Ansätzen zu berücksichtigen.

Danksagung:
Die Autoren danken der deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Pellikel im Rahmen der DFG-Projekte Ha 2718/3–3 und Ha 5192/1–2. Für die Laborarbeiten sei vor allem Frau *W. Hoth-Hannig* und Frau *B. Spitzmüller* gedankt. Ebenfalls soll Prof. Dr. *R. Zec*h (Göttingen) und Prof. Dr. *W.H. Bowen* (Rochester, NY) für die wissenschaftliche Unterstützung in enzymologischen Fragen gedankt werden.

Korrespondenzadresse:

PD Dr. med. dent. Christian Hannig,
korrespondierender Autor
Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie
Universität Freiburg
Hugstetter Str. 55
79106 Freiburg i. Brsg.
Christian.hannig@uniklinik-freiburg.de
Tel.: 07 61/ 270 48 88
Fax: 07 61/ 270 47 62

Prof. Dr. Matthias Hannig
Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,
Universitätsklinikum des Saarlandes
Gebäude 73
66421 Homburg/Saar
zmkmhan@uniklinikum-saarland.de
Tel.: 0 68 41 / 162 49 60
Fax: 0 68 41 / 162 49 54

Literatur

1. Afseth J, Rølla G: Clinical experiments with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase. Caries Res 17, 472–475 (1983)
2. Boackle RJ, Dutton SL, Fei H, Vesely J, Malamud D, Furness AR: Salivary nonimmunoglobulin agglutinin inhibits human leukocyte elastase digestion of acidic proline-rich salivary proteins. J Dent Res 80, 1550-1554 (2001)
3. Bradway SD, Bergey EJ, Jones PC, Levine MJ: Oral mucosal pellicle. Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. Biochem J 261, 887–896 (1989)
4. Bradway SD, Bergey EJ, Scannapieco FA, Ramasubbu N, Zawacki S, Levine MJ: Formation of salivarymucosal pellicle: the role of transglutaminase. Biochem J 284 (Pt 2), 557–564 (1992)
5. Carlén A, Borjesson AC, Nikdel K, Olsson J: Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. Caries Res 32, 447–455 (1998)
6. Carlén A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J: Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. Biomaterials 22, 481–487 (2001)
7. Deimling D, Breschi L, Hoth-Hannig W, Ruggeri A, Hannig C, Nekrashevych Y, Prati C, Hannig M: Electron microscopic detection of salivary alpha-amylase in the pellicle formed in situ. Eur J Oral Sci 112, 50–509 (2004)
8. Deimling D, Hannig C, Hoth-Hannig W, Schmitz P, Schulte-Mönting J, Hannig M: Non-destructive visualisation of protective proteins in the in situ pellicle. Clin Oral Investig 11, 211–216 (2007)
9. Douglas CW: Bacterial-protein interactions in the oral cavity. Adv Dent Res 8, 254–262 (1994)
10. Etemadzadeh H, Ainamo J, Murtomaa H: Plaque growth-inhibiting effects of an abrasive fluoridechlorhexidine toothpaste and a fluoride toothpaste containing oxidative enzymes. J Clin Periodontol 12, 607–616 (1985)
11. Göcke R, Gerath F, von Schwanewede H: Quantitative determination of salivary components in the pellicle on PMMA denture base material. Clin Oral Investig 6, 227–235 (2002)
12. Gristina AG, Naylor P, Myrvik Q: Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. Med Prog Technol 14, 205–224 (1988)
13. Hannig C, Attin T, Hannig M, Henze E, Brinkmann K, Zech R: Immobilisation and activity of human alphaamylase in the acquired enamel pellicle. Arch Oral Biol 49, 469–475 (2004)
14. Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T: Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. Arch Oral Biol 50, 541–552 (2005)
15. Hannig C, Hannig M, Attin T: Enzymes in the acquired enamel pellicle. Eur J Oral Sci 113, 2–13 (2005)
16. Hannig C, Hoch J, Becker K, Hannig M, Attin T: Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. Arch Oral Biol 50, 821–828 (2005)
17. Hannig C, Wasser M, Becker K, Hannig M, Huber K, Attin T: Influence of different restorative materials on lysozyme and amylase activity of the salivary pellicle in situ. J Biomed Mater Res A 78, 755–761 (2006)
18. Hannig C, Becker K, Häusler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M: Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion – an ex vivo pilot study. Arch Oral Biol 52, 444–449 (2007)
19. Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A: Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. Arch Oral Biol 52, 1048–1056 (2007)
20. Hannig C, Huber K, Lambrichts I, Gräser J, D'Haen J, Hannig M: Detection of salivary alpha-amylase and lysozyme exposed on the pellicle formed in situ on different materials. J Biomed Mater Res A 83, 98–103 (2007)
21. Hannig C, Ruggeri A, Al-Khayer B, Schmitz P, Spitzmüller B, Deimling D, Hoth-Hannig W, Bowen WH, Hannig M: Electron microscopic detection and activity of Glucosyltransferase B, C, and D in the in situ formed pellicle. Arch Oral Biol 53, 1003–1010 (2008)
22. Hannig C, Spitzmüller B, Al-Ahmad A, Hannig M: Effects of Cistus-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle. J Dent 36, 540–545 (2008)
23. Hannig C, Spitzmüller B, Hannig M: Characterization of lysozyme activity in the in situ pellicle using a fluorimetric assay. Clin Oral Investig (2008), Epub ahead of print.
24. Hannig C, Spitzmüller B, Knausenberger S, Hoth-Hannig W, Hellwig E, Hannig M: Detection and activity of peroxidase in the in situ formed enamel pellicle. Arch Oral Biol 53, 848–858 (2008)
25. Hannig C, Spitzmüller B, Miller M, Hellwig E, Hannig M: Intrinsic enzymatic crosslinking and maturation of the in situ pellicle. Arch Oral Biol 53, 416–422 (2008)
26. Hannig M: Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24h period. Clin Oral Investig 3, 88–95 (1999)

27. Hannig M, Herzog S, Willigeroth S, Zimehl R: Atomic force microscopic investigation of salivary pellicle formed on enamel and glass in vivo. Colloid Polymer Sci 279, 479–483 (2001)
28. Hannig M, Döbert A, Stigler R, Muller U, Prokhorova SA: Initial salivary pellicle formation on solid substrates studied by AFM. J Nanosci Nanotechnol 4, 532–538 (2004)
29. Hannig M, Khanafer AK, Hoth-Hannig W, Al-Marrawi F, Acil Y: Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle. Clin Oral Investig 9, 30–37 (2005)
30. Hannig M, Joiner A: The structure, function and properties of the acquired pellicle. In Duckworth R, editor. Monogr Oral Sci 2006. p. 29–64
31. Hannig M, Hannig C: Does a biofilm free of bacteria, exist in situ? J Parodontol Implantol Orale 26, 187–200 (2007)
32. Hannig M, Hannig C: Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? Oralprophylaxe 29, 73–82 (2007)
33. Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF: Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. J Dent Res 76, 734–743 (1997)
34. Johansen C, Falholt P, Gram L: Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. Appl Environ Microbiol 63, 3724–3728 (1997)
35. Kadoya Y, Kuwahara H, Shimazaki M, Ogawa Y, Yagi T: Isolation of a novel carbonic anhydrase from human saliva and immunohistochemical demonstration of its related isozymes in salivary gland. Osaka City Med J 33, 99–109 (1987)
36. Klimek J, Jung M, Jung S: Interindividual differences in degradation of sodium monofluorophosphate by saliva in relation to oral health status. Arch Oral Biol 42, 181–184 (1997)
37. Koo H, Vacca Smith AM, Bowen WH, Rosalen PL, Cury JA, Park YK: Effects of Apis mellifera propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. Caries Res 34, 418–426 (2000)
38. Kunst A, Draeger B, Ziegenhorn J: Determination of D-fructose and D-glucose. In Bermeyer HU, editor. Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie; Basel 1984. p. 163–172
39. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG: Saliva and dental pellicle-a review. Adv Dent Res 14, 2228 (2000)
40. Li J, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG: Identification of in vivo pellicle constituents by analysis of serum immune responses. J Dent Res 83, 60–64 (2004)
41. Maeda H: A new lysozyme assay based on fluorescence polarization or fluorescence intensity utilizing a fluorescent peptidoglycan substrate. J Biochem 88, 1185–1191 (1980)
42. Meyer-Lückel H, Kielbassa AM: Die Verwendung von Speichelersatzmitteln bei Patienten mit Xerostomie. Schweiz Monatsschr Zahnmed 112, 1037–1058 (2002)
43. Meyer-Lückel H, Schulte-Monting J, Kielbassa AM: The effect of commercially available saliva substitutes on predemineralized bovine dentin in vitro. Oral Dis 8, 192–198 (2002)
44. Moran J, Addy M, Newcombe R: Comparison of the effect of toothpastes containing enzymes or antimicrobial compounds with a conventional fluoride toothpaste on the development of plaque and gingivitis. J Clin Periodontol 16, 295–299 (1989)
45. Morishita Y, Iinuma Y, Nakashima N, Majima K, Mizuguchi K, Kawamura Y: Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O-beta-D-galactopyranosylmaltoside. Clin Chem 46, 928–933 (2000)
46. Parkkila S, Kaunisto K, Rajaniemi L, Kumpulainen T, Jokinen K, Rajaniemi H: Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. J Histochem Cytochem 38, 941–947 (1990)
47. Parkkila S, Parkkila AK, Juvonen T, Rajaniemi H: Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. Gut 35, 646–650 (1994)
48. Proctor GB, Chan KM: A fluorometric assay of peroxidase activity utilizing 2',7'-dichlorofluorescin with thiocyanate: application to the study of salivary secretion. J Biochem Biophys Methods 28, 329–336 (1994)
49. Pruitt KM, Caldwell RC, Jamieson AD, Taylor RE: The interaction of salivary proteins with tooth surface. J Dent Res 48, 818–823 (1969)
50. Pruitt KM, Adamson M: Enzyme activity of salivary lactoperoxidase adsorbed to human enamel. Infect Immun 17, 112–116 (1977)
51. Rogers JD, Palmer RJ, Jr., Kolenbrander PE, Scannapieco FA: Role of Streptococcus gordonii amylasebinding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. Infect Immun 69, 7046–7056 (2001)
52. Rykke M, Rølla G: Desorption of acquired enamel pellicle in vivo by pyrophosphate. Scand J Dent Res 98, 211–214 (1990)
53. Rykke M, Sønju T: Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected in vivo after 2 hours and after 24 hours. Scand J Dent Res 99, 463–469 (1991)
54. Rykke M, Smistadt G, Rølla G, Karlsen J: Micelle-like structures in human saliva. Colloids Surfaces B Biointerfaces 4, 33–40 (1995)
55. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ: Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation. Crit Rev Oral Biol Med 4, 301–307 (1993)
56. Scannapieco FA: Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. Crit Rev Oral Biol Med 5, 203–248 (1994)
57. Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ: Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. J Dent Res 74, 1360–1366 (1995)
58. Slomiany BL, Murty VL, Zdebska E, Slomiany A, Gwozdzinski K, Mandel ID: Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. Arch Oral Biol 31, 187–191 (1986)
59. Slomiany BL, Murty VL, Mandel ID, Sengupta S, Slomiany A: Effect of lipids on the lactic acid retardation capacity of tooth enamel and cementum pellicles formed in vitro from saliva of caries-resistant and cariessusceptible human adults. Arch Oral Biol 35, 175–180 (1990)
60. Stiefel DJ: Characteristics of an in vitro dental pellicle. J Dent Res 55, 66–73 (1976)
61. Vacca Smith AM, Scott-Anne KM, Whelehan MT, Berkowitz RJ, Feng C, Bowen WH: Salivary glucosyltransferase B as a possible marker for caries activity. Caries Res 41, 445–450 (2007)
62. Vacca-Smith AM, Bowen WH: The effect of milk and kappa casein on streptococcal glucosyltransferase. Caries Res 29, 498–506 (1995)
63. Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Quivey RG, Jr., Bowen WH: Interactions of streptococcal glucosyltransferases with alpha-amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxyapatite. Arch Oral Biol 41, 291–298 (1996)
64. Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Schilling KM, Bowen WH: Characterization of glucosyltransferase of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surfaces. Caries Res 30, 354–360 (1996)
65. Vacca-Smith AM, Bowen WH: In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. Arch Oral Biol 45, 277–291 (2000)
66. Vacca-Smith AM, Bowen WH: The effects of milk and kappa-casein on salivary pellicle formed on hydroxyapatite discs in situ. Caries Res 34, 88–93 (2000)
67. Vitkov L, Hannig M, Nekrashevych Y, Krautgartner WD: Supramolecular pellicle precursors. Eur J Oral Sci 112, 320–325 (2004)
68. Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG: Pellicle precursor proteins: acidic proline-rich proteins, statherin, and histatins, and their crosslinking reaction by oral transglutaminase. J Dent Res 78, 1696–1703 (1999)
69. Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG: Pellicle precursor protein crosslinking characterization of an adduct between acidic proline-rich protein (PRP-1) and statherin generated by transglutaminase. J Dent Res 79, 930–938 (2007)