

**Bioaktive, telechele Polyoxazoline mit funktionellen
Satellitengruppen für neuartige antimikrobielle
und Kollagenase-hemmende Materialien**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. rer. nat.

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen
der Technischen Universität Dortmund
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Christoph P. Fik

aus

Tichau/Oberschlesien

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg C. Tiller

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Weberskirch

Dortmund 2012

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2007 bis Dezember 2011 am Freiburger Materialforschungszentrum und Institut für Makromolekulare Chemie der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau sowie am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Jörg C. Tiller für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas, die hervorragende Betreuung dieser Arbeit und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen bedanken. Weiterhin danke ich meinem Doktorvater für seine immerwährende Kreativität und sein nie nachlassendes, konstruktives wissenschaftliches Interesse an der vorliegenden Promotionsarbeit.

Den Herren Dr. Ulrich Salz und Dr. Thorsten Bock danke ich für die ertragreiche Zusammenarbeit sowie exzellente Betreuung im Rahmen meiner Kooperation mit der Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein.

Herrn Dr. Frank Katzenberg danke ich für seine immer vorhandene Bereitschaft zur kompetenten, fachlich überragenden Unterstützung. Frau Dr. Daniela Zander danke ich für die vielen fachlichen Diskussionen. Herrn Thorsten Moll danke ich für seine Unterstützung in allen technischen und weniger technischen Belangen. Frau Monika Meuris vom Zentrum für Elektronenmikroskopie danke ich sowohl für die exzellenten Mikroskopieaufnahmen als auch für die vielen freundschaftlichen Gespräche.

Allen meinen Arbeitskollegen des Lehrstuhls Tiller danke ich für das vorbildlich kollegiale Arbeitsklima. Besonders hervorheben möchte ich meine Laborpartner Frau Ina Schönfeld, Herrn Stefan Konieczny, Herrn Christian Krumm und Herrn Stephan Dech sowie meine stets verlässlichen Bürogenossen Herrn Peter von Czarnecki und Herrn Matthias Thiel. Ich bedanke mich bei ihnen für das ausnahmslos angenehme, kameradschaftliche Miteinander zu allen Gelegenheiten.

Herrn Christian Krumm danke ich für die beeindruckenden Makrofotografien (selbstverständlich mit einer Nikon); Herrn Stefan Konieczny für die Durchführung der vielen SDS-PAGEs, Herrn Thorsten Moll für die fachmännischen Umbauarbeiten an den Synthesemikrowellen. Frau Anna Pipetz danke ich für all die Unterhaltungen, die mich meine Heimatsprache Schlesisch niemals vergessen ließen. Weiterhin bedanken möchte ich mich bei meinen äußerst motivierten und talentierten Diplomanden Herrn Christian Krumm und Herrn Jannis Küpper sowie bei meinen

nicht minder motivierten und talentierten Mitarbeiterpraktikanten Herrn Maximilian Vielhauer, Frau Christina Münnig, Frau Theresa Baur, Herrn Nils Averagesch, Herrn Julian Krings sowie Herrn Abdo Kabbani-Aldeiri. Eure Betreuung hat mir stets Freude bereitet und ich bin sehr stolz, Euch alle in meinem Team gehabt zu haben.

Bei meinen studentischen Hilfskräften Frau Andrea Breitkopf und Frau Laura-Maria Czerwonka möchte ich mich für die Probenpräparationen sowie die tatkräftige Unterstützung bei den vielen mikrobiologischen Tests bedanken.

Herrn Dr. Wolf Hiller und seinem Team von der Fakultät Chemie danke ich vielmals für die Messung unzähliger NMR Spektren.

Herrn Prof. Dr. David H. Pashley und seinen Mitarbeitern von der School of Medicine, Medical College of Georgia danke ich für die Durchführung der quantitativen MMP-9-Inhibierungsassays an meinen telechelonen Polyoxazolinsystemen sowie für die hervorragenden Untersuchungen zur Peptidfreisetzung an humanem Dentinkollagen.

Dr. Heintze und M. Forjanic von der Ivoclar Vivadent AG danke ich für die Bestimmung der Schmelz- /Dentinhaftwerte der polyoxazolinhaltigen Dentaladhäsive.

Herrn Prof. Dr. R. Hoogenboom und seinen Mitarbeitern von der Supramolecular Chemistry Group, Ghent danke ich für die Versorgung mit isoPropyloxazolin und für die konstruktiven Diskussionen zu unseren Polyoxazolinsystemen.

Den Mitarbeitern von Bayer HealthCare in Leverkusen danke ich für die freundliche Durchführung der vielen Multikeim-Mikrodilutionstests.

Meiner Frau Birgit Naujoks, meinem Ruhepol seit vielen Jahren, danke ich dafür, dass sie in guten wie in schlechten Zeiten nie den Glauben an mich verliert und stets verlässlich zu mir hält.

Abschließend danke ich meinen Eltern Dorothea und Roman Fik sowie meinem Bruder Simon Roman Fik für ihre immerwährende Unterstützung und besonders meinen Eltern, für die finanzielle Unterstützung und die Ermöglichung dieser Arbeit.

**„Kein Experiment kann ein Fehlschlag sein,
denn auch ein Fehlschlag erweitert das Wissen der Menschen“**

Dr. Katherine Pulaski, USS Enterprise
Star Trek – The Next Generation [S02E07]

Publikationen

- **Fik, C. P.**; Konieczny, S.; Krumm, C.; Schönfeld, I.; Tiller, J. C., „Telechelic Poly(oxazoline)s for Bioactive Conjugates“, *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, 32, (2), F73.
- **Fik, C. P.**; Meuris, M.; Salz, U.; Bock, T.; Tiller, J. C., „Ultra-High-Aspect Ratio Microfiber-Furs as Plant-Surface Mimics Derived from Teeth“, *Advanced Materials* **2011**, 23, (31), 3565.
- **Fik, C. P.**; Meuris, M.; Salz, U.; Bock, T.; Tiller, J. C., „From plant surfaces to ultra-high-aspect ratio microfiber-furs“, *Scientific Highlights TU Dortmund* **2011**, 13.
- **Fik, C. P.**; Krumm, C.; Münnig, C.; Baur, T.; Salz, U.; Bock, T.; Tiller, J. C., „Impact of Functional Satellite Groups on the Antimicrobial Activity and Hemocompatibility of Telechelic Poly(2-methyloxazoline)s“ *Biomacromolecules* **2012**, 13, (1), 165.
- Konieczny, S.; **Fik, C. P.**; Aversch, N. J. H.; Tiller, J. C., „Organosoluble enzyme conjugates with poly(oxazoline)s via pyromellitic acid dianhydride“, *Journal of Biotechnology* **2012**, 159, (3), 195.
- Krumm, C.; **Fik, C. P.**; Meuris, M.; Dropalla, G. J.; Geltenpoth, H.; Sickmann, A.; Tiller, J. C., „Well-Defined Amphiphilic Poly(2-oxazoline) ABA-Triblock Copolymers and Their Aggregation Behavior in Aqueous Solution“, *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, 33, (19), 1677.
- Tiller, J. C.; **Fik, C. P.**; Bieser, A. M.; Waschinski, C. J., „Telechelic bioactive poly(2-oxazoline)s with biofunctional and satellite end groups“, *Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)* **2012**, 53, (1), 316.
- Dech, S.; Wruk, V.; **Fik, C. P.**; Tiller, J. C., „Amphiphilic polymer conetworks derived from aqueous solutions for biocatalysis in organic solvents“, *Polymer* **2012**, 53, (3), 701.

- **Fik, C. P.**; Konieczny, S.; Waschinski, C. J.; Ladisch, R. S.; Pashley, D. H.; Salz, U.; Bock, T.; Tiller, J. C., „Heterogenously Telechelic Poly(2-oxazoline)s as Covalently Binding Additives for Dental Materials: Collagenase Inhibition and Long-Term Antimicrobial Efficacy”; in Vorbereitung.

Patente

- Salz, U.; Bock, T.; **Fik, C. P.**; Tiller, J. C.; Rheinberger, V., „Dentalwerkstoff auf der Basis einer antimikrobiell wirksamen Verbindung“, **2011**, EP 11154589.3.
- Salz, U.; Bock, T.; **Fik, C. P.**; Tiller, J. C.; Rheinberger, V., „Dental restorative material based on an antimicrobially active compound“, **2011**, US 2012/208917 A1.
- Salz, U.; Bock, T.; **Fik, C. P.**; Tiller, J. C.; Rheinberger, V., „Dentistry restorative material based on antimicrobial activity compound“, **2011**, JP 2012167090A.

Poster

- **Fik, C. P.**; Krumm, C.; Münnig, C.; Baur, T.; Moll, T.; Tiller, J. C., „Scale-up of Antimicrobial Polymers Using Living Anionic and Cationic Microwave-Assisted Methods and Their Biological Evaluation”, *Bayer AG PhD-course, Leverkusen*, **2010**.
- **Fik, C. P.**; Krumm, C.; Münnig, C.; Baur, T.; Moll, T.; Tiller, J. C., „Antimicrobial Poly(oxazoline)s and Their Biological Evaluation”, *Tag der Chemie, Dortmund*, **2010**.
- **Fik, C. P.**; Konieczny, S.; Krumm, C.; Schönfeld, I.; Tiller, J. C., „Telechelic Poly(oxazoline)s for Bioactive Conjugates“, *Makromolekulares Kolloquium, Freiburg/Br.*, **2011**.
- **Fik, C. P.**; Meuris, M.; Salz, U.; Bock, T.; Tiller, J. C., „Biomimetische Reproduktion Natürlicher, Haariger Oberflächentexturen mittels Methacrylatbasierter Photopolymerisation auf Mikroporösen Dentaltemplaten”, *Tag der Chemie, Dortmund*, **2011**.

Fik, C. P.; Krumm, C.; Hellinger, U.; Tiller, J. C., „Ultrahydrophobic Surfaces“, *Advanced Materials* **2011**, 23, (31); grafische Realisierung des Innencovers.

Vorträge

- **Fik, C. P.;** Tiller, J. C., „Antimikrobielle Polymersysteme für Dentale Anwendungen“, *Projekttreffen Ivoclar Vivadent AG, Freiburg/Br.*, Januar **2009**.
- **Fik, C. P.;** Tiller, J. C., „Antimikrobielle Polymersysteme für Dentale Anwendungen“ *Projekttreffen Ivoclar Vivadent AG, Freiburg/Br.*, November **2009**.
- **Fik, C. P.;** Tiller, J. C., „Antimikrobielle Polymersysteme für Dentale Anwendungen“ *Projekttreffen Ivoclar Vivadent AG, Freiburg/Br.*, Februar **2010**.
- **Fik, C. P.;** Tiller, J. C., „Antimikrobielle Polymersysteme für Dentale Anwendungen“ *Projekttreffen Ivoclar Vivadent AG, Freiburg/Br.*, Mai **2010**.
- **Fik, C. P.;** Tiller, J. C., „Antimikrobielle Polymersysteme für Dentale Anwendungen“ *Projekttreffen Ivoclar Vivadent AG, Freiburg/Br.*, Oktober **2010**.
- **Fik, C. P.;** Tiller, J. C., *Projektbericht der Kooperation mit der Ivoclar Vivadent AG, 2009/2010*.
- **Fik, C. P.;** Tiller, J. C., „Antimikrobielle Polymersysteme für Dentale Anwendungen“ *Projekttreffen Ivoclar Vivadent AG, Freiburg/Br.*, Februar **2011**.
- **Fik, C. P.;** Tiller, J. C., „Antimikrobielle Polymersysteme für Dentale Anwendungen“ *Projekttreffen Ivoclar Vivadent AG, Freiburg/Br.*, Juni **2011**.
- **Fik, C. P.,** „Entwicklung neuer Systeme für die Dentalchemie: Konzept-Anwendungen-Produkte“, *Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein*, Juli **2011**.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Antimikrobielle Polymere und Oberflächen	2
1.1.1 Vorstellung niedermolekularer Biozide und deren Nachteile	2
1.1.2 Vorteile antimikrobiell wirksamer Polymere	2
1.1.3 Klassifizierung antimikrobiell wirksamer Polymere	3
1.1.4 Funktionskonzepte antimikrobiell ausgerüsteter Oberflächen	4
1.1.5 Antimikrobieller Wirkmechanismus amphiphiler Polykationen	6
1.1.6 Mit quartären Ammoniumalkylverbindungen funktionalisierte, antimikrobiell wirksame Polyoxazoline	8
1.2 Einordnung und Struktur von Bakterien und deren Hüllen	10
1.2.1 Merkmale und Klassifikation lebender Zellen	10
1.2.2 Aufbau und Struktur von Bakterienhüllen	12
1.3 Mechanismus und Synthesen linearer Polyoxazoline	17
1.3.1 Lebende Kationische Polymerisationen sowie geeignete Monomere	17
1.3.2 Kinetik und Charakteristika der Lebend Kationischen Polymerisation ...	18
1.3.3 Lösungsmittelleffekte bei der Lebend Kationischen Polymerisation	20
1.3.4 Für die Lebend Kationische Ringöffnende Polymerisation von 2-R-Oxazolinen geeignete Initiatorsysteme	21
1.3.5 Synthesen R-substituierter 2-R-1,3-Oxazolinmonomere	22
1.3.6 Mechanismus der Lebend Kationischen Ringöffnenden Polymerisation von 2-R-Oxazolinen	23
2 Aufgabenstellung	25
3 Ergebnisse und Diskussion	27
3.1 Mikrowellensynthesen und Charakterisierung telecheler Poly-2-oxazoline mit variablen endständigen Satellitengruppen	27
3.1.1 Vorteile der Mikrowellen-Heiztechnik bei Kationisch Ringöffnenden Lebenden Polymerisationen (CROP)	27
3.1.2 Vorstellung des angewandten Synthesekonzeptes	29
3.1.3 Optimierung der Synthese des antimikrobiellen Initiators DDA-X.....	30
3.1.5 Charakterisierung des antimikrobiellen Initiators DDA-X.....	33
3.1.6 Mikrowellengestützte Synthesen der telechelen Polyoxazolinssysteme	35

3.1.7	Bestimmung der optimalen Zeit- und Temperaturparameter für MW-gestützte, DDA-X initiierte Polyoxazolinsynthesen in Chloroform	37
3.1.8	Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante k_p der MW-gestützten, DDA-X initiierten Poly-2-methyloxazolin-Synthese in Chloroform	40
3.1.9	Scale-Up der mikrowellengestützten Poly-2-oxazolinsynthesen	41
3.1.10	Analytik der telechelen, DDA-X-initiierten Poly-2-methyloxazolinsysteme 44	
3.1.11	Synthese und Charakterisierung von telechelen Copolymeren aus 2-Methyl- und 2- <i>iso</i> Propyl-1,3-oxazolinen	50
3.1.12	Bifunktionelle telechele Poly-2-ethyloxazoline als makromolekulare Linker zur Herstellung von amphiphilen Polymernetzwerken	54
3.2	Einfluss von Satellitengruppen und Monomeren auf die antimikrobielle und hämolytische Wirksamkeit telecheler PROX	58
3.2.1	Vorstellung der Untersuchungsverfahren und Methodische Abgrenzung.	58
3.2.2	Gewinnung von Erythrozyten aus Blut und deren Hämolyse.....	58
3.2.3	Antimikrobielle Wirksamkeit und Hämotoxizität der niedermolekularen Komponenten sowie des Referenz-Polyoxazolins	60
3.2.4	Antimikrobielle Wirksamkeit und Hämotoxizität der telechelen, DDA-X-initiierten Poly-2-methyloxazoline mit variablen Satellitengruppen.....	62
3.2.5	Mikrodilutionstests an tierspezifischen Bakterienstämmen	71
3.2.6	Antimikrobielle Wirksamkeit der telechelen, DDA-X-initiierten Homo- und Copolymere aus P <i>i</i> PrOX und PMOX.....	74
3.3	Antimikrobielle, telechele Poly-2-oxazoline als makromolekulare Inhibitoren dentalrelevanter Matrixmetalloproteinasen (MMPs)	76
3.3.1	Aufbau und Struktur eines Säugetierzahns.....	76
3.3.2	Dentale Erosionen und Strategien gegen Sekundärkaries.....	77
3.3.3	Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bei Sekundärkaries	78
3.3.4	Strategien zur Inhibierung dentaler Matrixmetalloproteinasen (MMPs).	79
3.3.5	Chlorhexidin und Nachteile niedermolekularer MMP-Inhibitoren.....	80
3.3.6	Klassifikation der Einzelkomponenten der bioaktiven Poly-2-oxazoline ...	80
3.3.7	Einfluss der Polymerkomponenten auf die MMP-inhibierende Effektivität gegenüber bakterieller Kollagenase in wässrig gepufferter Lösung	81
3.3.8	Quantitativer Inhibierungsassay an rekombinanter, humaner Matrixmetalloproteinase rhMMP-9 in wässrig gepufferter Lösung	87

3.3.9	Entwicklung von Abbauassays an demineralisiertem Rinderzahndentin ..	90
3.3.10	Evaluierung der MMP-inhibierenden Effektivität antimikrobieller Poly-2-oxazoline mit Ankergruppen in Abbauassays an demineralisierten Rinderdentin ..	95
3.3.11	MMP-inhibierende Effektivität antimikrobieller AMA-Poly-2-oxazoline in quantitativen Peptidfreisetzungssassays an demineralisierten Humandentin.....	97
3.4	Antimikrobielle und MMP-inhibierende, telechele Poly-2-oxazoline als kontaktaktive Wirkstoffe an Dentaladhäsivoberflächen.....	100
3.4.1	Vorstellung des Gesamtkonzepts einer „intrinsischen Trifunktionalität“ ..	100
3.4.2	Evaluierung der Wirksamkeit der „intrinsisch trifunktionellen“ Poly-2-oxazoline in einem selbststützendem Dentaladhäsiv auf Rinderdentinsscheiben	102
3.4.3	Wässrige Elutionstests an polymerisierten Dentaladhäsivoberflächen mit „intrinsisch trifunktionellen“ Poly-2-oxazolinen als immobilisierten Additiven	105
3.4.4	Wässrige Langzeit-Elutionstests an DDA-X-PMOX ₃₇ -AMA-ausgerüsteten Dentaladhäsivoberflächen zur Untersuchung der kontaktaktiven Wirksamkeit....	112
3.4.5	Resistenz der kontaktaktiven, DDA-X-PMOX ₃₇ -AMA-ausgerüsteten Dentaladhäsivoberflächen gegen hartnäckige bakterielle Biofilme	114
3.4.6	Evaluation der dentalrelevanten Haft- und Adaptionparameter von Poly-2-oxazolin-haltigen SE-Dentaladhäsivformulierungen	115
3.4.7	Ermittlung der minimalen Wirkkonzentration an DDA-X-PMOX ₃₇ -AMA gegen <i>S. aureus</i> und <i>S. mutans</i> in der Harzformulierung	119
3.5	Ankergruppenfunktionalisierte telechele Poly-2-oxazoline zur kovalenten Anbringung an Dental-relevanten Materialoberflächen.....	122
3.5.1	Konzept der selektiv-kollagenaffinen Ankergruppen an telechelen PMOX	122
3.5.2	Optimierung und Kinetik der polymeranalogen Umsetzung mit PMS-DA	123
3.5.3	Evaluierung der Langzeitwirksamkeit ankergruppenfunktionalisierter, telecheler Poly-2-methyloxazoline auf Rinderdentin	127
3.5.4	Quantitative Bestimmung der Reaktionsdauer sowie Belegungsdichte an wirksamen Gruppen auf Aminogruppen-modifizierten Glasoberflächen	130
3.5.5	Darstellung Langzeitaktiver, DDA-PMOX-funktionalisierter Oberflächen unter Verwendung oberflächenreaktiver Terminierungsmittel.....	133
3.6	Biomimetische Oberflächentexturen zur bequemen Erhöhung der Gruppendichte exponierter chemischer Funktionen	137

3.6.1	Motivation und Vorstellung eines geeigneten Reproduktionstemplats natürlichen Ursprungs.....	137
3.6.2	Vergleich und Auswahl bekannter Verfahren zur Texturreproduktion .	138
3.6.3	Texturreproduktion und Entfernung des Dentintemplats	140
3.6.4	Optimierung der Harzmatrix unter REM-Kontrolle.....	143
3.6.5	Wasserspeichernde Oberflächentexturen an Pflanzen	145
3.6.6	Auswertung und Vergleich beider Oberflächentexturen im Mikro- und Nanobereich mittels REM-Aufnahmen.....	147
3.6.7	Nachbearbeitung der Textur für Nano-Rauigkeit und Hydrophobie.....	149
3.6.8	Makroskopisches Verhalten der Oberflächentexturen gegenüber Wasser	151
4	Zusammenfassung.....	153
4.1	Mikrowellengestützte Synthesen telecheler Polyoxazoline	153
4.2	Bioaktive Wirksamkeit der Polyoxazoline gegenüber lebenden Bakterien und Erythrozyten in wässriger Lösung	155
4.3	Hemmung bakterieller und dentalrelevanter Matrixmetallo-proteinasen durch bioaktive, telechele Polyoxazolin-Inhibitoren.....	157
4.4	Bioaktive Polyoxazolin-Additive in Langzeit-Kontaktaktiven und Biofilm-resistenten Oberflächen kommerzieller Dentaladhäsive	159
4.5	Kovalent immobilisierte, bioaktive Polyoxazoline für eine abwaschresistente Wirksamkeit auf dentalrelevanten Oberflächen.....	162
4.6	Biomimetische Reproduktion natürlich vorkommender Textu-ren zur Vergrößerung der aktiven Oberfläche und Gruppendichte.....	164
5	Experimenteller Teil.....	166
5.1	Materialien	166
5.1.1	Gase und Flüssiggase	166
5.1.2	Chemikalien und Lösungsmittel	166
5.1.3	Bakterien	169
5.1.4	Blut.....	169
5.2	Geräte.....	170
5.2.1	FOURIER-transformierte Infrarotspektroskopie (ATR-FT-IR)	170
5.2.2	Gaschromatografie mit Massenspektroskopie (GC-MS)	170
5.2.3	Gelpermeationschromatografie (GPC).....	170
5.2.4	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	171

5.2.5	Mikrowellensynthesen (MW-Synthesen).....	171
5.2.6	Fotopolymerisation (LC, engl. <i>light curing</i>)	171
5.2.7	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	171
5.2.8	Röntgen-Fotoelektronenspektroskopie (XPS)	171
5.2.9	Thermogravimetrische Analyse (TGA).....	172
5.2.10	Ultraviolett-/visuelle Licht-Spektroskopie (UV/Vis).....	172
5.2.11	Sonstige Materialien und Geräte	172
5.3	Herstellungsvorschriften.....	173
5.3.1	Puffer und Lösungen	173
5.3.2	Herstellung von Nährlösungen.....	175
5.3.3	Herstellung und Verwendung von Nähragar.....	176
5.3.4	Herstellung von Erythrozytenkonzentraten	176
5.3.5	Herstellung von Dentintemplaten aus Rinderzähnen.....	176
5.3.6	Herstellung von Piraña-Lösung (CARO'sche Säure).....	177
5.3.7	Darstellung der Polymethacrylat-Harzmischungen.....	177
5.3.8	Beschichtung des Rinderdentin-Templats mit den Polymethacrylat-Harzmischungen und Fotopolymerisation	178
5.3.9	Entfernung des Rinderdentin-Templats	178
5.3.10	Nanopartikelbeschichtung und Silanisierung der Oberflächentexturen	179
5.3.11	Herstellung von Gelen für die SDS-PAGE.....	179
5.4	Methoden	180
5.4.1	Bestimmung des Wassergehalts von Lsm. mittels KARL-FISCHER-Titration	180
5.4.2	Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit in wässrigen Medium (MIC-Tests)	181
5.4.3	Bestimmung der medianen hämolytischen Konzentration in wässrigen Medium (HC ₅₀ -Tests)	182
5.4.5	Durchführung der Mikrodilutionstests an tierspezifischen Bakterientypen	183
5.4.6	Ermittlung der dentalrelevanten Haftwerte auf Dentin und Schmelz....	183
5.4.7	Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Bestimmung der enzyminhibierenden Effektivität beim Abbau von Gelatine.....	183

5.4.8	Kollagenabbau-Tests an Probenkörpern aus Rinderzahn-Dentin	184
5.4.9	Marginale Adaption in Rinderdentin	185
5.4.10	Oberflächenbeschichtungen mit Dentaladhäsiven an Glasobjektträgern 186	
5.4.11	Peptidfreisetzungssassay an menschlichen Dentalkollagen.....	186
5.4.12	Quantitative Bestimmung der Aminogruppenkonzentration	188
5.4.13	Darstellung NH ₂ -funktionalisierter Glasoberflächen, Aminogläser ...	188
5.4.14	Quantitativer Inhibierungsassay an rekombinanten, humanen rhMMP- 9	189
5.4.15	Untersuchung der antimikrobiellen Langzeit-Wirksamkeit von Dental- adhäsivoberflächen (Langzeit-Elutionstests)	190
5.5	Synthesen.....	191
5.5.1	4-(Bromomethyl)- <i>N</i> -dodecyl- <i>N,N</i> -dimethylbenzylammoniumbromid ... (DDA-X)	191
5.5.2	Polymerisationen einseitig gestarteter, telecheler Polyoxazoline	192
5.5.3	Terminierung und Aufreinigung telecheler Polyoxazoline	193
5.5.4	Polymerisationen, Terminierung und Aufreinigung mittig gestarteter, bifunktionaler Polyoxazolin-Linker.....	196
Literaturverzeichnis.....		198
Abstract		227
Kurzzusammenfassung.....		228
Lebenslauf.....		229

Abkürzungsverzeichnis

#	Positions-, Proben- oder Formulierungsnummer
A	Fläche
Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. <i>atomic force microscope</i>)
Ala	L-Alanin
AMA	<i>N</i> -[3-(Dimethylamino)-propyl]-methacrylamid
ATTC	Bakterienstamm (engl. <i>american type culture collection</i>)
BHT	3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxytoluol
(bi)dest.	(zweifach) destilliert
<i>bis</i> GMA	Bisphenol A-glycidyl dimethacrylat, BOWEN'S Harz
bspw.	beispielsweise
c	Konzentration
<i>C. cotoneaster</i>	<i>Corokia cotoneaster</i> , (Familie der <i>Argophyllaceae</i>)
CDCl ₃	Deuteriertes Chloroform
CHCl ₃	Chloroform
CPD	Citratpufferlösung (engl. <i>citrate phosphate dextrose buffer</i>)
CROP	Lebend Kationische Ringöffnende Polymerisation (engl. <i>living cationic ring-opening polymerization</i>)
δ	Chemische Verschiebung, in ppm (10 ⁻⁶)
d	Tage
DDA	<i>N,N</i> -Dimethyldodecylamin
DDA-X	4-(Bromomethyl)- <i>N</i> -dodecyl- <i>N,N</i> -dimethyl-benzylammonium bromid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP _{set}	Eingestellter/berechneter Polymerisationsgrad
DTAC	Dodecyltrimethylammoniumchlorid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , Darmbakterium (GRAM-negativ)
EDA	Ethylendiamin
EDTA-Na ₂	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz (Dihydrat)
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>

EOX	2-Ethyloxazolin
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
F _c	COULOMB-Wechselwirkung
FT-IR	FOURIER-transformierte Infrarotspektroskopie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
Gew.%	Gewichtsprozent
GDMA	1,2-/1,3-Glyzerindimethacrylat, Isomeregemisch
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
Gly	Glycin
GPC	Gelpermeationschromatografie
h	Stunden
HC ₅₀	Hämolytische Konzentration von 50 Gew.% an Erythrocyten
HEMA	2-Hydroxyethyl methacrylat
HEMA-P	2-Hydroxyethyl methacrylat-phosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
[I]	Konzentration (der Komponente I)
k _i	Geschwindigkeitskonstante der Initiierung
kDa	kilo-DALTON (1,000 g·mol ⁻¹)
konz.	konzentriert
k _p	Geschwindigkeitskonstante der Propagation
k _t	Geschwindigkeitskonstante der Terminierung
λ	Wellenlänge (in nm)
<i>L. caseii</i>	<i>Lactobacillus caseii</i> , Milchsäurebakterium (GRAM-positiv)
LCST	untere Entmischungstemperatur (engl.: <i>lower critical solution temperature</i>)
Lsg.	Lösung
Lsm.	Lösungsmittel
LTA	Lypoteichonsäuren
Lys	L-Lysin
M	Molkonzentration in mol·L ⁻¹
[M ₀]	Monomerkonzentration zu Polymerisationsbeginn
Me	Methylgruppe, (-CH ₃)

MeOH	Methanol
MeOTs	Methyl- <i>para</i> -toluolsulfonat
MIC	Minimale Inhibierungskonzentration (engl. <i>minimal inhibitory concentration</i>)
MMPs	Matrixmetalloproteinasen (Enzymklasse)
M_n	Zahlenmittleres Molekulargewicht
MOX	2-Methyloxazolin
MPa	Megapascal
M_p	Eingestellte/berechnete Molmasse
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
M_w	Gewichtsmittleres Molekulargewicht
MW	Mikrowellen
MWCO	Porengröße der Dialysemembran (engl. <i>molecular weight cut-off</i>)
m/z	Masse-zu-Ladung-Werte bei Ionen (bei GC-MS)
n	Stoffmenge
n. d.	Wert nicht bestimmbar/detektierbar
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
PAA	Polyacrylsäure
PBS	Phosphatpuffer-Lösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
p DBX	α,α' -Dibromo- <i>p</i> -xylol
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
PEOX	Poly-2-ethyloxazolin
P <i>i</i> PrOX	Poly-2- <i>isopropyloxazolin</i>
PMOX	Poly-2-methyloxazolin
PMS-DA	Pyromellitsäure-Dianhydrid
PMS-IA	Pyromellitsäure-Imid-Anhydrid
Pos.	Signal-/Peakposition in einem Spektrum
PROX	Poly-2-R-oxazolin mit variabler Seitengruppe (R = M, E, <i>i</i> Pr)
ppm	Anteil, (engl. parts per million), entspricht $c = [\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$
PYR	Pyridin (als Polymerterminal)

QUART	Quartäre Ammonium(alkyl)-Verbindung (engl. <i>quarternary ammonium compound</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskop (engl. <i>scanning electron microscopy</i>)
RI	Brechungsindex (engl. <i>refractive index</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S	Eukaryot-zu-Prokaryot-Selektivität
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , pathogenes Bakterium (GRAM-positiv)
sdp.	Siedepunkt
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Typ der Gelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SE	selbststehend (Dentaladhäsiv)
SBF	Künstliche Körperflüssigkeit (engl. <i>simulated body fluid</i>)
SBS	Haftung des Dentaladhäsiv-Komposit-Verbundes bei Abscherung (engl. <i>shear bond strength</i>)
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i> , Kariesbakterium (GRAM-positiv)
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEGDMA	Triethylenglykoldimethacrylat
THF	Tetrahydrofuran
TMAPS	Trimethoxyaminopropylsilan
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoessäure
TNP	2,4,6-Trinitrophenol, Pikrinsäure
TTC	2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid
UDMA	Urethandimethacrylat
UV/vis	Ultraviolette/visuelle (Spektroskopie)
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche (bezogen auf Abbildung, Tabelle oder Kapitel)
Vol.%	Volumenprozent
x_{MOX}	Einbaugrad des Monomers MOX im (Co)Polymer
v	Reaktions- oder Umsetzungsgeschwindigkeit

1. Einleitung

Eine der dringendsten Aufgaben unserer kontinuierlich wachsenden Weltbevölkerung ist die Etablierung einer zuverlässigen Infektionskontrolle zur Vorbeugung und Behandlung weltweit auftretender Krankheiten. Obwohl die globale Nachfrage nach Arbeitskräften in den vergangenen sechzig Jahren nur geringfügig zugenommen hat, ist der weltweite Luft-, Schiffs- und Bahnverkehr nahezu exponentiell gewachsen. Dabei nehmen sowohl die durchschnittliche jährliche Reiseentfernung pro Passagier, als auch dessen Reishäufigkeit stetig zu.

Dieser hohe Grad an weltweiter Mobilität trägt jedoch im erheblichen Maße zur unkontrollierbaren Verbreitung hartnäckiger bakterieller Krankheitserreger bei.^{1, 2} Aktuelle Beispiele für derartige Epidemien sind das gehäufte Auftreten „community“-assoziierter, methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA)^{3, 4} in Krankenhäusern der USA im Jahre 2010^{5, 6} und die europaweite Ausbreitung von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) im vergangenen Jahr.^{7, 8} Beide Erkrankungen wurden durch infizierte Personen oder befallene Lebensmittel eingeschleppt und obwohl sie rechtzeitig eingedämmt wurden, hätten sie unter ungünstigen Bedingungen zu einer überregionalen Problematik werden können.

Im Umgang mit derartigen Bakterieninfektionen lassen sich drei grundsätzliche Herangehensweisen ausmachen: (a) Diagnose mit medikamentöser Behandlung der auftretenden Symptome, (b) Vorbeugung durch erregerspezifische Impfung und Erwerb einer vorübergehenden oder dauerhaften Immunität sowie (c) die rechtzeitige Erforschung zugehöriger Verbreitungswege und deren Unterbindung. Zu den klassischen und wichtigsten Verbreitungsmechanismen bakterieller Infektionen gehört der Kontakt mit den allgegenwärtigen, bakteriell kontaminierten Oberflächen. Obwohl die Gesamtzahl der verfügbaren Biozide, wirksamen Desinfektionsmittel und Antibiotika kontinuierlich ansteigt,^{9, 10} wird deren Verwendbarkeit aus Umweltgründen (bspw. Grundwasserkontamination)¹¹ und aufgrund von Sicherheitsbedenken immer weiter eingeschränkt. Insbesondere die zunehmende Entwicklung äußerst widerstandsfähiger Biofilme¹² und multiresistenter Bakterienarten¹³⁻¹⁵ zählt zu den größten Herausforderungen der modernen Medizin.

Eine effektive Strategie zur dauerhaften Keimfreiheit von Oberflächen spielt daher die Schlüsselrolle bei der Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten und ist Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte.¹⁶⁻³⁹ Die vorliegende Arbeit greift diese Herausforderung auf und präsentiert eine Strategie zur dauerhaften, antimikrobiellen Ausrüstung von Oberflächen unter Verwendung antimikrobieller Polymere.

1.1 Antimikrobielle Polymere und Oberflächen

1.1.1 Vorstellung niedermolekularer Biozide und deren Nachteile

Eine Klassifikation aller bis zum heutigen Tage bekannten, biozid wirksamen chemischen Verbindungen kann nach den unterschiedlichsten Kriterien erfolgen. Eine Möglichkeit wäre die grobe Einteilung der Substanzen nach ihren Molmassen. Zu der ersten Klasse der niedermolekularen Biozide zählen vor allem Bestandteile von Desinfektionslösungen⁴⁰ wie Alkohole,⁴¹ Povidon-Iod-Gemische,^{42, 43} Benzalkoniumchlorid,⁴⁴ Chlorhexidin,^{45, 46} Hydrogenperoxide und Hypochlorite.⁴⁷ Weiterhin zählen dazu niedermolekulare Freisetzungssysteme, die mit Silber,^{48, 49} Triclosan,⁵⁰ Antibiotika oder quartären Ammoniumverbindungen⁵¹ versetzt sind.

Die kontinuierliche und daher erschöpfende Abgabe (engl. *leeching*) niedermolekularer Biozide an die Umgebung,⁵² kann, wie beispielsweise im Falle des Triclosans und seiner Metaboliten,⁵³ oder der bei der Tierzucht weit verbreiteten Sulfonamid-Antibiotika,⁵⁴ zu einer problematischen Anreicherung in der Umwelt führen.⁵³ Zudem trägt die stetige Akkumulation niedermolekularer Biozide im erheblichen Maße zur Ausbildung von resistenten Bakterienstämmen bei.⁵⁵⁻⁵⁷

1.1.2 Vorteile antimikrobiell wirksamer Polymere

Bei den antimikrobiellen Polymeren handelt es sich um hochmolekulare Biozide, die eine interessante Alternative zu den ökologisch problematischen niedermolekularen Bioziden, Desinfektionsmitteln und sogar Antibiotika darstellen. Einige von ihnen sind bekannt für ihre geringe Tendenz zur Ausbildung resistenter Bakterienstämme.³²

Einige aktuelle Übersichtsartikel diskutieren die große Vielfalt und die daraus resultierenden Vorteile dieser makromolekularen, bioaktiven Systeme.^{17, 19, 58, 59}

Zum einen bieten sie, in Kombination mit einer materialspezifischen Ankergruppenfunktion, die Möglichkeit einer kovalenten Immobilisierung und damit der permanenten antimikrobiellen Ausrüstung von Oberflächen (vgl. **Kap.1.4.1**). Zum anderen besitzen Polymere einen vernachlässigbaren Dampfdruck, was ihre Freisetzung in die Gasphase aus einer Matrix heraus verhindert. Ihr hohes Molekulargewicht bietet zudem den Vorteil, dass sie eine Bakterienzelle zwar penetrieren-, aber nur äußerst langsam als ganzes Molekül in das Innere des Bakteriums diffundieren können. Diese wichtige Charakteristik antibakterieller Polymere unterbindet intrinsisch die Ausbildung bakterieller Resistenzen,³² weil diese nicht oder nur unzureichend durch den Einsatz bakterieller Membrantransporter aus dem prokaryotischen Cytoplasma hinauszubefördern sind (vgl. **Kap.1.3.2ff**).

In vielen Fällen wirkt sich die polymere Komponente günstig auf die antibakteriellen Eigenschaften der Gesamtverbindung aus, so dass polymergebundene Biozide deutlich höhere molare Wirksamkeiten aufweisen als die entsprechenden niedermolekularen Referenzsubstanzen. Mit antibakteriellen Polymersystemen können auch oft geringere Toxizitäten gegenüber eukaryotischen Zellen (bspw. Erythrozyten) realisiert werden, was in Vergleich zu nieder-molekularen Bioziden, zu ungleich höheren Selektivitäten und damit breiteren therapeutischen Wirkungsfenstern in der Medizin führen kann (vgl. **Kap.1.3.5**).

1.1.3 Klassifizierung antimikrobiell wirksamer Polymere

Aus systematischen Erwägungen heraus werden antimikrobiell wirksame Polymere in drei Klassen eingeteilt: die polymeren Biozide, die biozid-freisetzenden Polymere sowie die antimikrobiellen/bioziden Polymere.⁵²

Bei der ersten Klasse der polymeren Biozide handelt es sich um Polymere, deren Monomere/Repetiereinheiten selbst aus einer antimikrobiellen Verbindung bestehen. Formell handelt es sich hierbei also um eine kovalente Aneinanderreihung einzelner Biozidmoleküle. Wegen der hohen sterischen Raumbeanspruchung des Polymerückgrats sollte diese Polymerklasse jedoch, in Vergleich zu den niedermolekularen Pendants, eine verringerte Wirksamkeit aufweisen. Eine Polymerisation des antimikrobiell wirksamen Monomers 4-Vinyl-*N*-benzylpyridiniumbromids beispielsweise führt nach dessen Vernetzung zu einem wasserunlöslichen Polymer, das Bakterien zwar einzufangen, jedoch nicht abzutöten vermag.^{52, 60}

Bei der Klasse der biozid-freisetzenden Polymere handelt es sich um Zwei-Komponenten-Systeme: Antimikrobiell-unwirksame Polymere bilden eine Matrix, die als Träger für die darin enthaltenen, niedermolekularen Biozide fungiert. Die antimikrobielle Effizienz derartiger Systeme ist im allgemeinen höher als die der enthaltenen Biozide, weil diese in der Regel eine hohe lokale Konzentration an Bioziden in der Nähe der Bakterienzelle gewährleisten.⁵² Die von SCHOENFISCH *et al.* vor kurzem beschriebenen, auf verzweigten Polyestern basierenden Materialien setzen beispielsweise bei ihrem Abbau kontinuierlich das biozide Stickstoffmonoxid frei und gehören damit ebenfalls in diese Polymergruppe.⁶¹

Die dritte und interessanteste Klasse der antimikrobiell wirksamen Polymere stellen die antimikrobiellen/bioziden Polymere dar. Hierbei bedarf es nicht unbedingt biozider Repetiereinheiten, da die antimikrobielle Wirksamkeit von einzelnen, kovalent am Polymer angebrachten biofunktionellen Gruppen im „synergistischen Zusammenspiel“ mit der gesamten Polymerstruktur erbracht wird.⁵² Mit anderen Worten: die biozide Effektivität des Gesamtmoleküls hängt entscheidend von der Struktur und den Eigenschaften des nicht-antimikrobiellen Polymers ab. Die Synthese, Charakterisierung, Evaluierung und oberflächliche Immobilisierung derartiger antimikrobiellen/bioziden Polymere ist Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit und wird in den nachfolgenden Kapiteln näher vorgestellt.

1.1.4 Funktionskonzepte antimikrobiell ausgerüsteter Oberflächen

Antimikrobiell wirksame Oberflächen lassen sich konzeptionell in zwei Kategorien einteilen. Unter Anwendung eines abstoßenden Konzepts (engl.: *repellent surfaces*) werden Bakterien von der Oberfläche ferngehalten und so an der Ausbildung eines hartnäckigen Biofilms gehindert. Erreicht wird dies entweder durch eine ultrahydrophile Beschichtung auf der Basis eines Polyethylenglykol-Hydrogels oder durch eine ultrahydrophobe Bistrukturierung im Mikro- und Nanobereich (Lotus-Effekt) und die daraus resultierende Herabsetzung der Oberflächenenergie. Eine dritte Möglichkeit stellt die elektrostatische COULOMB-Abstoßung unter Verwendung negativ geladener Oberflächen auf der Basis von Polyacrylsäure. In **Abb. 1.1** werden diese drei Hauptvarianten der Abstoßung von Bakterien an entsprechend ausgerüsteten Oberflächen schematisch vorgestellt.

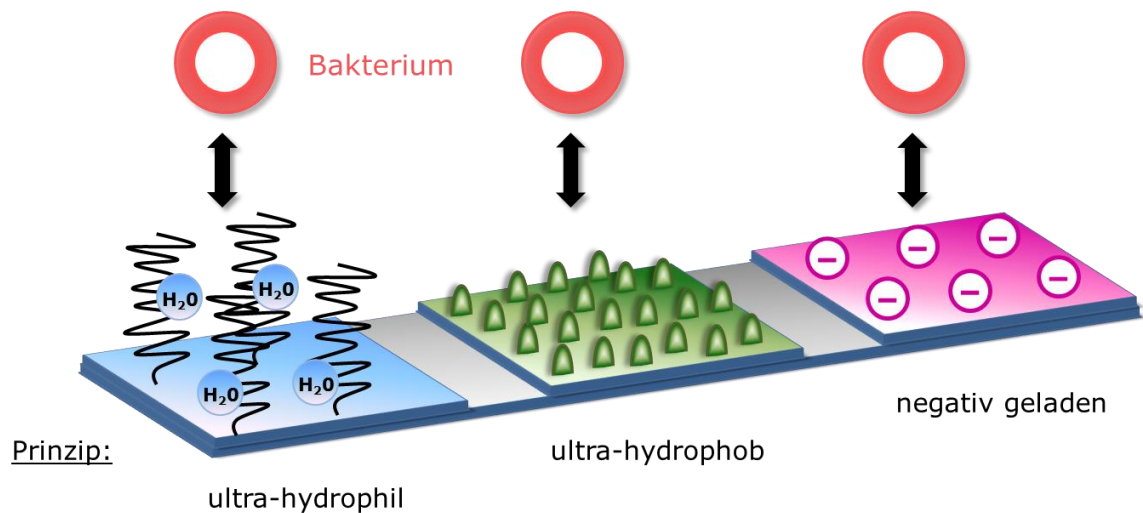


Abb.1.1: Schematische Darstellung der Abstoßung von Bakterien (rote Ringe) an antimikrobiellen Oberflächen mit ultrahydrophiler (links), ultrahydrophober (Lotus-Effekt; mitte) sowie negativ geladener Ausrüstung (rechts).

Die zweite Kategorie antimikrobiell ausgerüsteter Oberflächen basiert auf dem Konzept der Eliminierung, wobei Bakterien bei Annäherung abgetötet werden (engl.: *killing surfaces*). Die abtötende Wirkung wird hierbei bspw. realisiert durch die Freisetzung von niedermolekularen Bioziden wie Antibiotika oder kolloiden Silber-Nanopartikeln⁶² welche vorher in der Beschichtungsmatrix inkorporiert wurden. Auch bei einer *in situ* Erzeugung von reaktiven Bioziden wie Stickstoffoxiden (NO_x) aus nachvernetzten Polyestern⁶¹ oder der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff an konjugierten Polyelektrolyten⁶³ handelt es sich um ein Freisetzungssystem.

Der gravierendste Nachteil derartiger Beschichtungen ist der bereits genannte, aus der kontinuierlichen Freisetzung (engl: *leeching*) resultierende Wirksamkeitsverlust und die Anreicherung der Biozide in der Umwelt (Akkumulation). In **Abb. 1.2** wird das Konzept der Eliminierung von Bakterien an Oberflächen schematisch dargestellt.

Eine Alternative hierzu stellen die sog. Kontaktaktiv-wirksamen Oberflächen dar. Diese werden erzeugt durch die Anbindung antimikrobiell wirksamer Polymere an die Oberflächen. Unter Verwendung von hochmolekularen und zudem kovalent immobilisierten polymeren Bioziden kommt es zu keiner Erschöpfung der Biozidkapazität, weshalb sich solche Systeme ausgezeichnet zur Realisierung von langzeit-wirksamen, nicht freisetzenden antimikrobiell ausgerüsteten Oberflächen eignen.

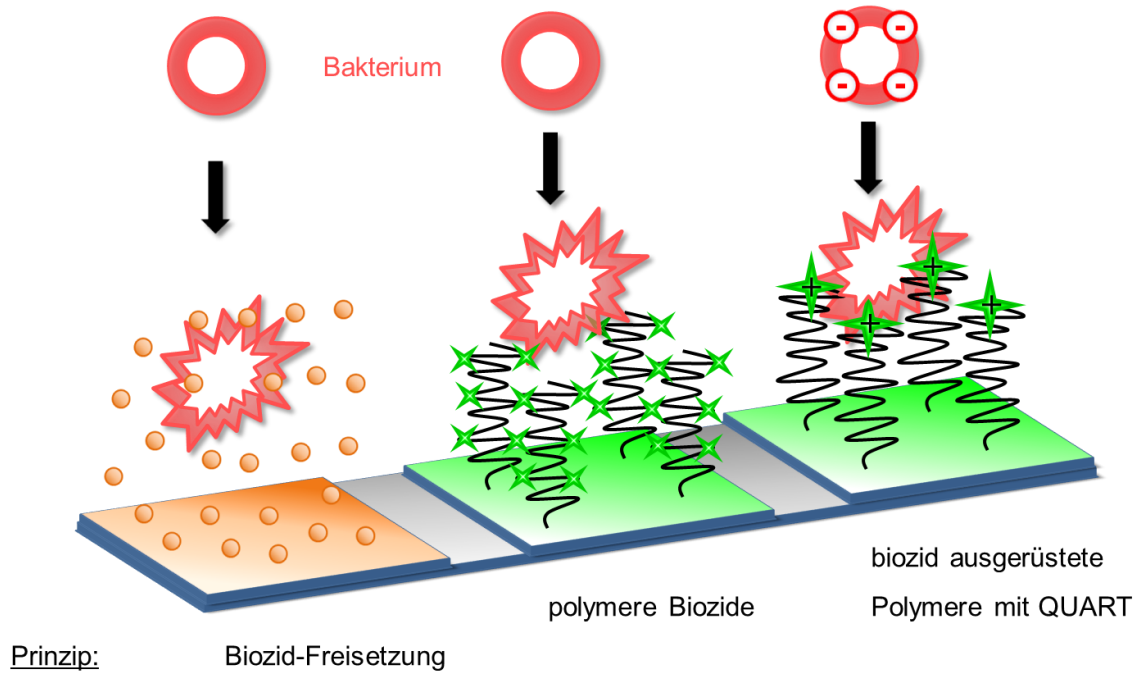


Abb.1.2: Schematische Darstellung der Eliminierung von Bakterien (rote Ringe) an antimikrobiellen Oberflächen mit Biozid-Freisetzung (orange, links), kovalent immobilisierten polymeren Bioziden (mitte) mit mehreren antimikrobiellen Funktionen im Polymerrückgrat (grüne Sterne) sowie einem biozid ausgerüsteten Polymer (rechts) mit jeweils einer endständigen, antimikrobiell wirksamen / kationisch geladenen (Ammoniumalkyl)-Gruppe pro Polymerkette (QUART).

Bei den antimikrobiell ausgerüsteten Polymeren werden solche mit einer bioziden Wiederholungseinheit (Monomer) als „polymere Biozide“ bezeichnet und von den „biozid ausgerüsteten Polymeren“ unterschieden, die nur eine, meist endständige (terminale) antimikrobielle Funktion aufweisen.⁵²

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten, biozid ausgerüsteten Polymere wiesen kationische Ammoniumalkyl-Funktionen (QUARTs) am Anfang einer jeden Polymerkette auf und entsprachen so dem rechten Schema in **Abb.1.2**.

1.1.5 Antimikrobieller Wirkmechanismus amphiphiler Polykationen

Zusätzlich zu den oxidativen¹⁸ oder Biozid-freisetzenden Polymeren besteht die überwiegende Mehrheit der antimikrobiellen Polymerklassen aus einer amphiphilen Grundstruktur, die mit einer oder mehreren kationischen Gruppen funktionalisiert wurden. Dazu zählen vor allem tertiäre Sulfonium-,⁶⁴ quartäre Phosphonium-⁶⁵ sowie primäre, tertiäre und quartäre Ammoniumverbindungen.

Wie von TEW, DEGRADO, LIENKAMP und BARRON *et al.* dargestellt,⁶⁶⁻⁶⁸ ahmen solche quaternisierten Polymersysteme die Funktionsweise antimikrobieller membranaktiver Peptide nach.^{69, 70} In Anlehnung an „Abwehrproteine“ wie Mellitin, Magainin⁷¹ oder Pexiganan, die während des bakteriellen Abwehrprozesses eingesetzt werden, lassen sich auch Oligomere mit peptidomimetischen Sequenzen realisieren.

Diese als „Ampetotide“ bezeichneten, meist helikalen Strukturen sind durch eine hohe antimikrobielle Wirksamkeit in Kombination mit einer sehr geringen Zytotoxizität gegenüber Eukaryoten (humanen Erythrozyten) charakterisiert.^{27, 68} Nicht zuletzt spielt die richtige Balance zwischen der Hydro- und der Lipophilie des eingesetzten Polykations eine entscheidende Rolle bei dessen antimikrobieller Wirksamkeit und hämolytischer Aktivität; also dem Grad an Selektivität.⁷²

Im Folgenden ist die antimikrobiellen Wirkung eines polymer-funktionalisierten, quartären Ammoniumalkyls (QUARTs) an der Phospholipid-Doppelmembran eines GRAM-positiven Bakteriums (bspw. *S. aureus*, vgl. **Abb.1.5**) am Beispiel von *N,N*-Dimethyldodecylamin (DDA) grafisch dargestellt (vgl. **Abb.1.3**). Zur effektiven Penetration der Cytoplasmamembran muss die *n*-Alkylkette des QUARTs ausreichend lang und hydrophob sein (mindestens 8 Kohlenstoffeinheiten),^{34, 73-75} um die äußere, relativ dicke Zellwand des Erregers durchdringen zu können.

Zunächst kommt es wegen der elektrostatischen COULOMB-Wechselwirkung ($F_c \sim r^{-2}$) des kationischen QUARTs mit der negativ geladenen Cytoplasmamembran zu einer Adsorption des DDA-Polymers an die Hülle. Im weiteren Verlauf dringt das langkettig alkylierte QUART in die Membran ein, was zu einer Perforation und damit zu einer Störung der zelleigenen Stoffwechselforgänge führt. Die Wiederherstellung der Membranordnung sowie des elektrochemischen Zellpotentials erfordert einen erheblichen Energieaufwand.

Kann dieser nicht von der Zelle aufgebracht werden und ist eine mechanische Entfernung des DDA-Polymer-Fremdkörpers nicht möglich, kommt es schließlich zum Zusammenbruch der Grenzschicht und damit zum Tod/Lyse der Bakterienzelle.

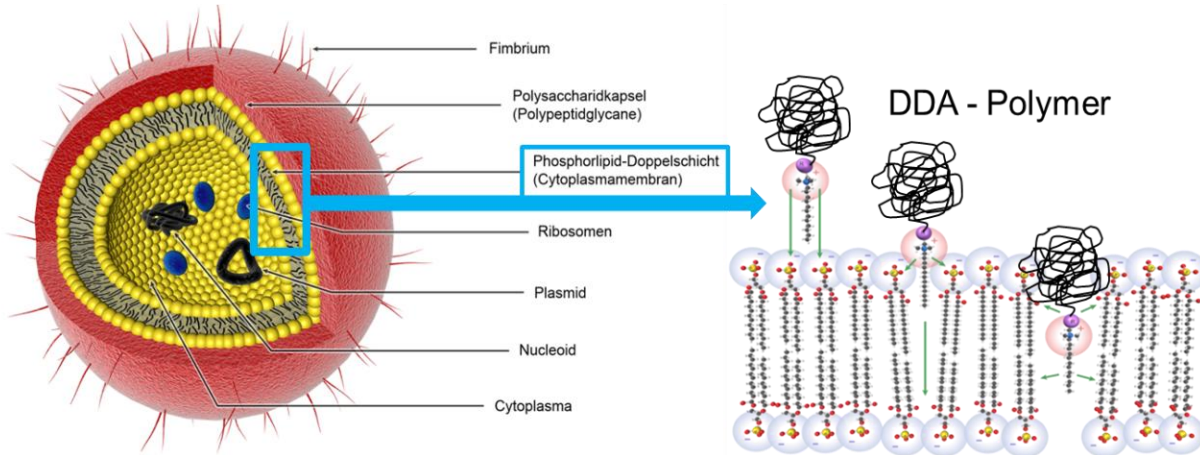
S. aureus Bakterium

Abb.1.3: Schematische Darstellung der antimikrobiellen Wirksamkeit eines QUART-funktionalisierten Polymersystems (hier: QUART \equiv DDA) an der Phospholipid-Doppelmembran des pathogenen GRAM-positiven Bakteriums *S. aureus*.

1.1.6 Mit quartären Ammoniumalkylverbindungen funktionalisierte, antimikrobiell wirksame Polyoxazoline

Nicht nur die Polymerkette selbst, sondern auch einzelne, daran gebundene Gruppen können die biozide Effizienz des Gesamtsystems positiv beeinflussen. Unlängst ist festgestellt worden, dass Poly-2-oxazolin-Homopolymere (vgl. **Kap.1.4.2**), die mit dem langkettigen Trialkylamin *N,N*-Dimethyldodecylamin (DDA) funktionalisiert wurden, ebenfalls antimikrobiell wirksam sind.⁷³

Im Rahmen des von TILLER und WASCHINSKI *et al.* erstmals beschriebenen Satellitengruppeneffekts an Polyoxazolinen⁷⁶ wurde die antibakterielle Effizienz heterogen-telecheler Poly-oxazolin-Homopolymere untersucht. Dabei wurden, unter Einbau einer antibakteriell wirksamen Funktion an einem Polymerkettenende, die unwirksamen Endgruppen am entgegengesetzten (distalen) Kettenende variiert.⁷⁵ Durch die Auswahl geeigneter Endgruppen ließ sich die antibakterielle Wirksamkeit der sogenannten telechelen⁷⁷ antimikrobiellen Polyoxazoline über einen Konzentrationsbereich von drei Größenordnungen steuern. Im besten Fall war die antimikrobielle Aktivität des gesamten, antimikrobiell ausgerüsteten Polyoxazolin-Moleküls signifikant höher als die des entsprechenden niedermolekularen Biozids.⁷⁴

Dieser Effekt einer Wirkungspotentierung macht die Herstellung definierter, einseitig kationisch funktionalisierter antimikrobieller Polymersysteme interessant. Insbesondere der große Einfluss von Teilstrukturen oder Endgruppen auf den antimikrobiellen Mechanismus und die Bestimmung ihrer möglichst effektiven Anordnung am Polymer ist Gegenstand aktueller Forschung. Untersuchungsergebnisse an kationisch geladenen, antimikrobiellen Peptiden (vgl. **Kap.1.4.3**) lassen darauf schließen, dass es sich lohnt, das Anwendungspotential des vorgestellten Satellitengruppenkonzepts noch weiter auszuschöpfen.⁷⁸⁻⁸¹

Als Konsequenz aus der soeben geführten Diskussion des antimikrobiellen Wirkmechanismus quartärer Ammoniumalkyle (**Kap. 1.2.6**) resultiert, dass die kovalent am Polymer angebrachte biozide Gruppe zwar einen tensidischen Charakter benötigt, das Polymer selbst aber gut wasserlöslich sein sollte. Zudem sollte sich das Polymer der Bakterienhülle gegenüber möglichst inert verhalten, um eine ungestörte Penetration des Biozids zu gewährleisten.

Eines der pharmakologisch am besten untersuchten Polymerklassen mit dem geforderten Anforderungsprofil ist lineares Polyethylenglykol (PEG), welches keine adhäsiven Wechselwirkungen mit Bakterienmembranen⁸² oder adsorptiven Effekte mit Proteinen^{83, 84} zeigt. Auch für das stark verwandte Polymethylglyzerol konnten von HAAG *et al.* dieselben Effekte nachgewiesen werden.⁸⁵

Poly-*n*-alkylglykole können bequem mittels einer lebend kationischen (oder anionischen) ringöffnenden Polymerisation als definierte Produkte mit engen Molmassenverteilungen hergestellt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Polymerisationstechnik ist die Möglichkeit zur stöchiometrischen Einführung funktioneller Gruppen zu Beginn und zum Ende der Polymerisation. Dennoch stellte sich die Funktionalisierung von niedermolekularen Bioziden wie beispielsweise Antibiotika mit PEG-Derivaten oft als kontraproduktiv heraus.⁸⁶ Auch die „PEGylierung“ von quartären Ammoniumalkylen generierte bei WASCHINSKI *et al.* eine deutliche Verschlechterung der antimikrobiellen Wirksamkeit der resultierenden Polymere.⁷³

Dem gegenüber stellt die Klasse der Polyoxazoline (PROX) eine vielversprechende und ausbaufähige Alternative zu PEG dar (vgl. **Kap.1.3**). Neben der Möglichkeit zur Steuerung der Wasserlöslichkeit durch die Auswahl entsprechend hydrophiler, hydrophober oder fluorierter Monomere,⁸⁷ vermochten bereits mehrere Arbeiten das

enorme Potential von Polyoxazolinen zur signifikanten Erhöhung der antimikrobiellen Effektivität makromolekular gebundener QUARTs belegen.⁷³⁻⁷⁶

Da insbesondere die Syntheseroute des bislang eingesetzten bioziden Initiators einer weiteren Optimierung bedurfte, die Polymerisationsdauern dringend verkürzt werden sollten und die erzeugten, sehr potenten antimikrobiellen Polyoxazoline noch nicht in dentalrelevanten Formulierungen eingesetzt und hierfür optimiert wurden, wurden diese Arbeiten zum Ausgangspunkt der vorliegenden Dissertation gewählt.

Zum besseren Verständnis der bakterioziden Eigenschaften antimikrobieller Polymere wird an dieser Stelle zunächst die systematische Einordnung von Bakterien als „lebenden Zellen“ durchgeführt. Dem folgt eine weitergehende Diskussion der strukturellen und chemischen Zusammensetzung ihrer Hüllen.

1.2 Einordnung und Struktur von Bakterien und deren Hüllen

1.2.1 Merkmale und Klassifikation lebender Zellen

Jede lebende Zelle beinhaltet einen vollständigen zur Reproduktion benötigten Satz an Erbinformation (Genom) inklusive des zugehörigen Reproduktionsapparates und einer eigenen, autarken Energieversorgung. Die Zellkomponenten (Organellen) liegen innerhalb eines wässrigen Kompartimentes (Cytoplasma) vor, das von einer semi-permeablen, mehrschichtigen Cytoplasmamembran umgeben ist.

Mittels einer systematischen Einteilung der Zelltypen nach Domänen wird zwischen den prokaryotischen, unabhängig voneinander existierenden Bakterienzellen und den eukaryotischen Zellen von vielzelligen Lebewesen wie Tieren, Pilzen und Pflanzen unterschieden. Abweichend hiervon zählen die Einzeller (Protozoen) sowie die als Mehr- und Einzeller auftretenden Algen ebenfalls zu den Eukaryoten. Auf die verbleibende dritte und letzte Domäne der zellulären Lebewesen, die Archaeen (Urbakterien) wird an dieser Stelle nicht weiter eingegangen.

Das wichtigste Strukturmerkmal der eukaryotischen Zelle ist der Zellkern (Nucleus), der die zu Chromosomen aufgewickelte Desoxyribonukleinsäure (DNA) enthält und durch eine Doppelmembran vom Cytoplasma abgegrenzt wird.

Weiterhin enthalten die meisten Eukaryoten Mitochondrien, die bei Prokaryoten nicht vorkommen. Hierzu ist festzustellen, dass es sich bei Mitochondrien mit hoher Wahrscheinlichkeit um symbiotisch einverleibte (vgl. Phagozytose), spezialisierte Prokaryoten innerhalb der eukaryotischen Zelle handelt:⁸⁸ sie haben einen Stoffwechsel, eine prokaryotische Innenmembran sowie ein vollständiges Genom.⁸⁹

Im Gegenzug dazu liegt die Erbinformation bei Prokaryoten in einer näherungsweise ringförmig geschlossenen, geknäulten Form (Kernäquivalent, Nucleoid) frei im Cytoplasma vor. Entsprechend der Evolutionstheorie sind prokaryotische Zellen (Bakterien) zuerst entstanden.⁹⁰⁻⁹² Daher sind sie einfacher aufgebaut und in der Regel eine Dimension kleiner (1-10 μm)^{93, 94} als Eukaryoten (10-100 μm).⁹⁵

In **Abb.1.4** werden die wichtigsten Strukturunterschiede von Eukaryoten (links) und Prokaryoten (rechts) schematisch gegenübergestellt.

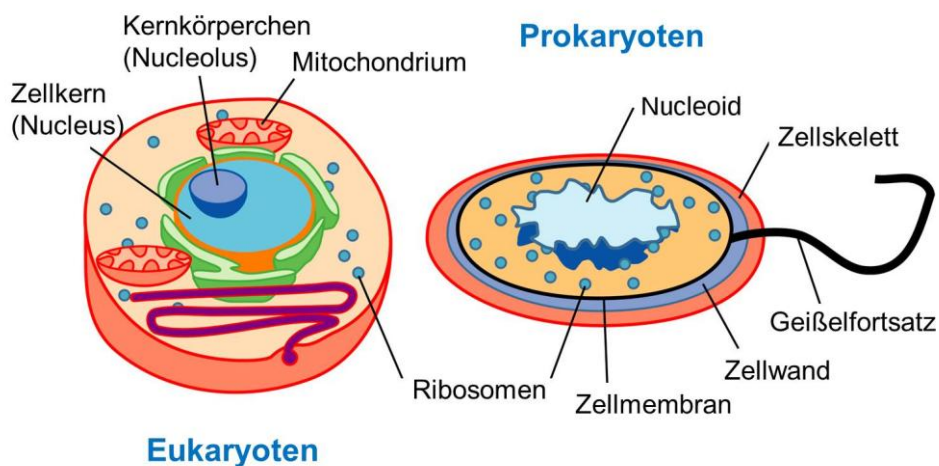


Abb.1.4^a: Schematische Darstellung der Strukturunterschiede von Eukaryoten (links) und Prokaryoten (rechts); das relative Größenverhältnis entspricht nicht der Realität.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zellspezifische Charakterisierungen sowohl an eukaryotischen als auch an prokaryotischen Zelltypen durchgeführt. Als Eukaryoten kamen Säugetiererythrozyten, als Prokaryoten die Bakterien *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) sowie *Escherichia coli* (*E. coli*) zum Einsatz.⁹⁶ **Abb.1.5** zeigt rasterkraftelektronische (REM) Aufnahmen einer *S. mutans*-Kolonie (Biofilm) und einzelner Erythrozyten aus Säugetierblut.

^a Abbildung nach <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, National Center for Biotechnology Information, USA.

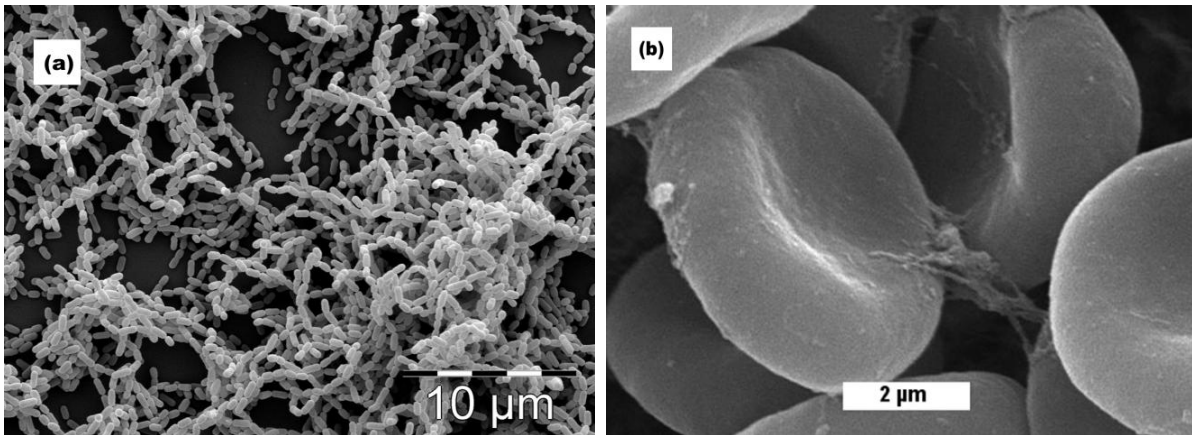


Abb.1.5: REM-Aufnahmen (a)^b eines frischen Biofilms des Karieserregers *S. mutans* (Prokaryot) auf einer Glasoberfläche, (b)^c einzelner tellerförmiger Erythrozyten (Eukaryoten) aus dem Blut eines Menschen unter isotonischen Bedingungen.

1.2.2 Aufbau und Struktur von Bakterienhüllen

Je nach Annahme der blauen GRAM-Färbung⁹⁷ werden Bakterien zur GRAM-positiven (bspw. *S. aureus*, *S. mutans*) oder GRAM-negativen Gruppe (bspw. *E. coli*)^{98, 99} zugeordnet.¹⁰⁰ Des Weiteren existieren auch GRAM-unbestimmte und GRAM-variable Bakterienarten, auf die hier nicht näher eingegangen wird.

GRAM-positive Bakterien besitzen eine einzelne, aus einer Phospholipid-Doppelschicht bestehende Cytoplasmamembran. GRAM-negative Bakterien besitzen zwei Hüllen: die innere Cytoplasmamembran und die äußere Membran, die durch einen periplasmatischen Raum voneinander separiert vorliegen. Beide Bakterienarten werden zusätzlich von einer Zellwand aus Peptidoglycanen (dem Murein-Sacculus) umhüllt. Diese fällt bei GRAM-positiven Erregern relativ dick (20-80 nm),¹⁰¹⁻¹⁰³ bei GRAM-negativen Keimen mit 5-10 nm relativ dünn^{104, 105} aus und befindet sich im letzten Fall unterhalb der äußeren Membran im periplasmatischen Raum.

In **Abb.1.6** werden die Strukturunterschiede im Schichtaufbau der Membranen von GRAM-positiven bzw. GRAM-negativen Bakterien schematisch verdeutlicht.

^b Abbildung verwendet mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. A. A. Scheie, Oral Biology, Universitetet i Oslo, NO.

^c Abbildung nach <http://www.unsw.edu.au>, Department of Embryology, Author: Dr. M. Hill, AUS.

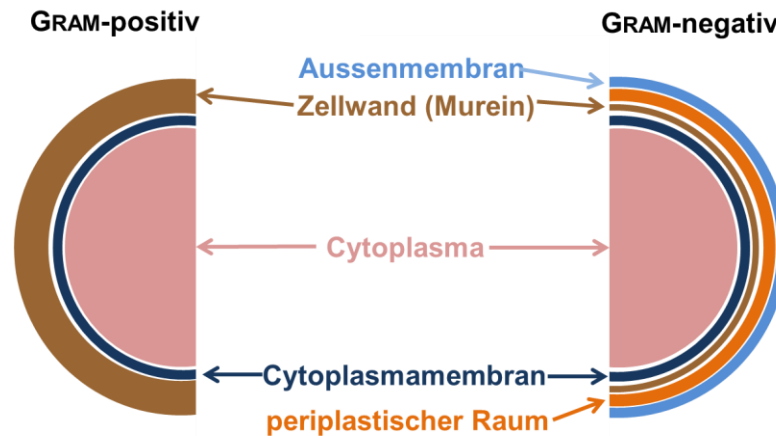


Abb.1.6: Schematischer Vergleich des schichtweisen Membranaufbaus von GRAM-positiven (links) und GRAM-negativen Bakterien (rechts).

Die Aussen- sowie Cytoplasmamembran von Bakterien besteht aus stäbchenförmig angeordneten Phospholipiden unterschiedlicher Zusammensetzung. Dabei handelt es sich um stark hydrophile Glycerinphosphate, die an zwei der drei Hydroxypositionen mit langkettigen, hydrophoben Fettsäuren verestert sind.

Die Länge der unverzweigten *n*-Alkylketten beträgt 10-20 Kohlenstoffeinheiten, wobei sowohl gesättigte (bspw. Palmitinsäure) wie auch einfach ungesättigte (bspw. Oleinsäure) Reste vorkommen. Bedingt durch den hydrophil-hydrophoben, sog. „Kopf-Schwanz“-Aufbau ergibt sich bei Phospholipiden ein amphiphiler Charakter eines Tensids. Die endständige Phosphorsäureposition liegt ebenfalls verestert vor; die wichtigsten Vertreter dieser Reste am Phosphatidyl sind Lecithine (mit Cholin), Kephaline (mit Ethanolamin), Glycerole und Serine. **Abb.1.7** zeigt den chemischen Aufbau eines typischen Phospholipids und der vier genannten Phosphatidyle.

GRAM-negative Bakterien enthalten in ihren Aussenmembranen zusätzlich Lipo-oligo- und polysaccharide. Diese ebenfalls tensidischen Hybridstrukturen weisen eine oder zwei *N*-Acetylglucosamin-Einheiten zwischen den Phosphatgruppen auf und können damit 4-6 hydrophobe Fettsäuregruppen pro Kopf-Schwanz-Einheit tragen. Das enthaltene *N*-Acetylglucosamin stellt eine freie Hydroxylgruppe zur Verfügung, an der weitere Saccharidringe verknüpft werden können. Diese bilden Oligo-/Polysaccharidketten, die als Seitenketten an der Aussenmembran des Erregers exponiert werden.

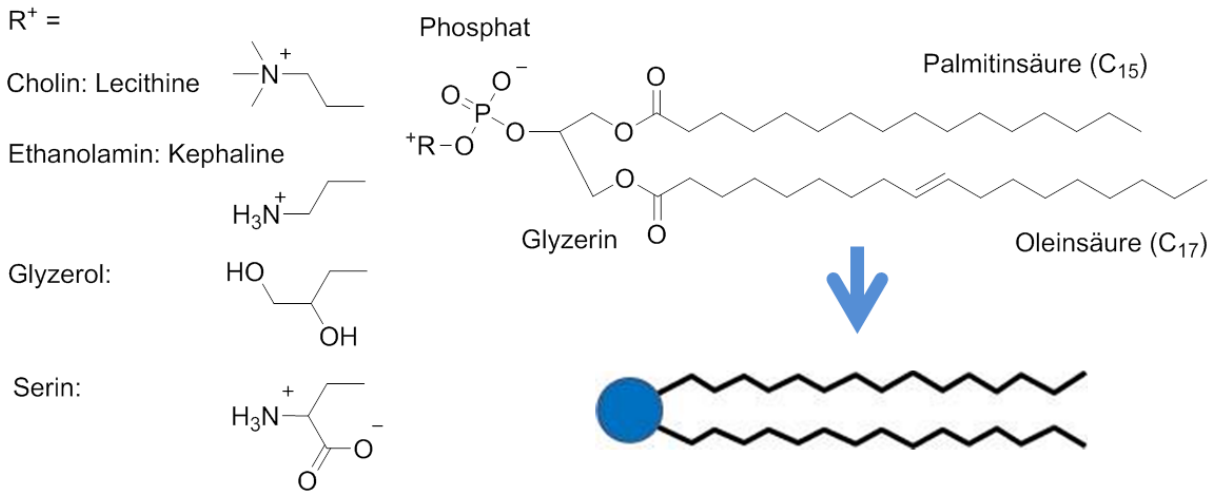


Abb.1.7^d: Chemischer Aufbau (oben) und symbolische Darstellung (unten) eines Phospholipids mit Cholin-, Ethanolamin-, Glycerol- und Serinresten (links).

In **Abb.1.8** wird der chemische Aufbau eines typischen GRAM-negativen Lipooligosaccharides mit einer *N*-Acetylglucosamin-Einheit und vier *n*-Alkylketten sowie dessen symbolische Darstellung gezeigt.

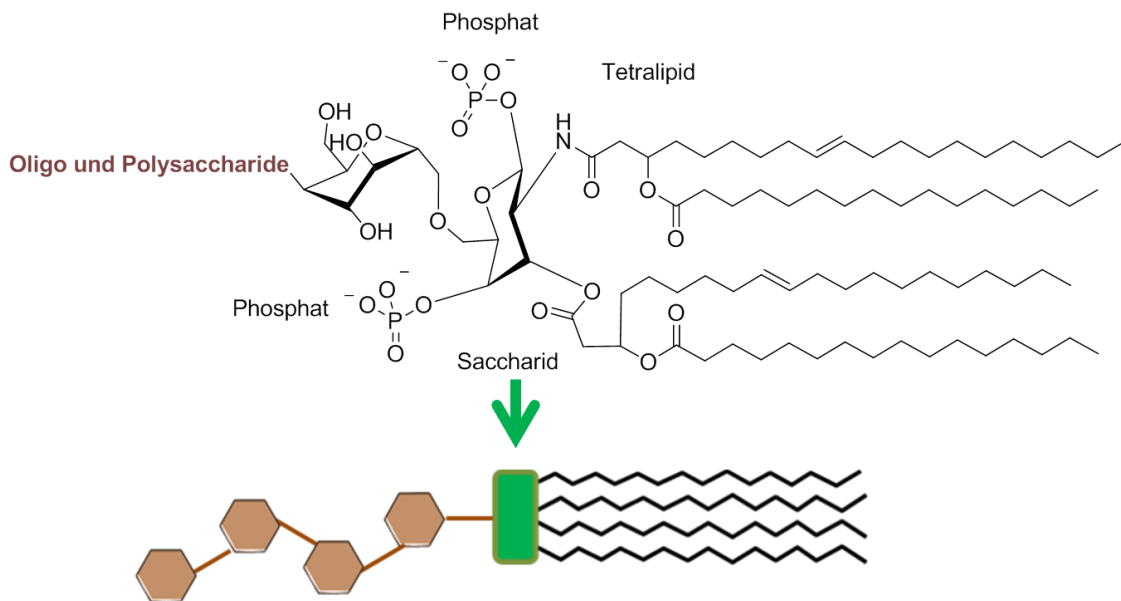


Abb.1.8: Chemischer Aufbau (oben) und symbolische Darstellung (unten) eines Lipooligosaccharids aus der Aussenmembran eines GRAM-negativen Bakteriums.

^d Abbildung nach Krishnan, S; Ward, R. J.; Hexemer, A.; Sohn, K. E.; Lee, K. L.; Angert, E. R.; Fischer, D. A.; Kramer, E. J.; Ober, C. K. *Langmuir* **2006**, 22, (26), 11255.

Die Zellwand beider Bakterienarten (Murein-Sacculus) besteht aus zwei unterschiedlichen Peptidoglycanen, die über Tetrapeptidbrücken vernetzt sind. Das *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) sowie *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) sind β -1,4-glykosidisch miteinander verbunden und bilden das Grundgerüst.^{106, 107} **Abb.1.9** zeigt den chemischen Aufbau und die Verknüpfungsstruktur der bakteriellen Zellwand.

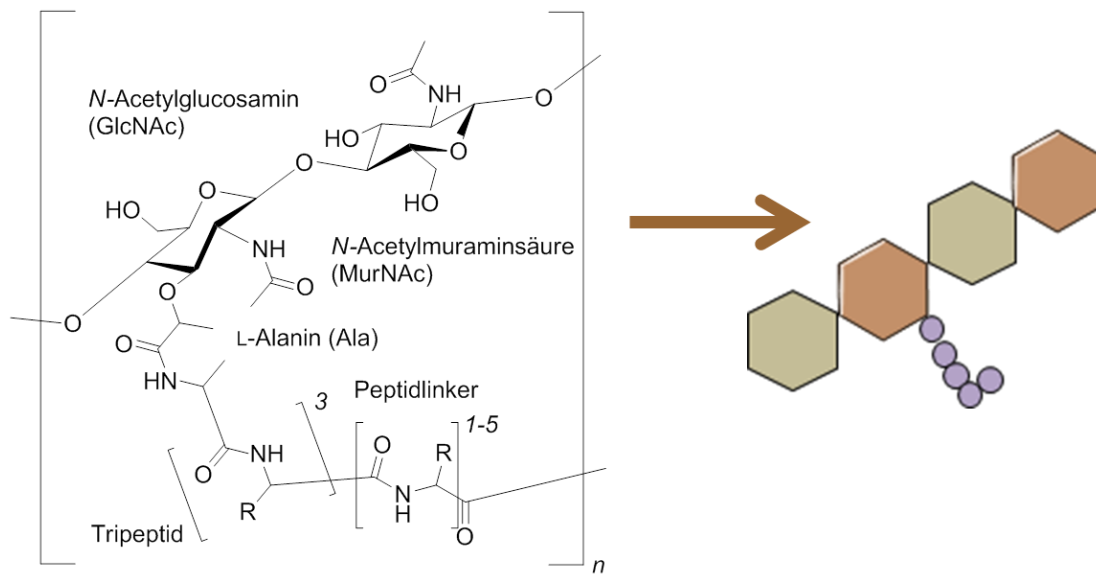


Abb.1.9: Chemischer Aufbau (links) und symbolische Darstellung (rechts) der bakteriellen Zellwand aus verknüpften Peptidoglycanen und Tetrapeptidbrücken.

Am COOH-Terminal von MurNAc sind tetrapeptidischen Verknüpfungen angefügt, die stets mit der Aminosäure L-Alanin beginnen und enden. GRAM-positive Bakterien enthalten in der Tetrapeptidbrücke noch eine zusätzliche „Verlängerung“ aus einem Glycin(Gly)-Pentapeptid.¹⁰⁸ Die Verbindung der beiden gegenläufigen Tetrapeptide erfolgt über bifunktionelle Aminosäuren wie bspw. L-Lysin (Lys).

In **Abb.1.10** und **Abb.1.11** werden die Unterschiede im Schichtaufbau der Membranen von GRAM-positiven bzw. GRAM-negativen Bakterien unter Verwendung der eingeführten (vgl. **Abb.1.7-1.9**) schematischen Strukturelemente in der auftretenden Reihenfolge und im relativen Größenverhältnis (vgl. **Abb.1.6**) präsentiert. Die Farbkodierung der Schichten wurde zum besseren Verständnis beibehalten.

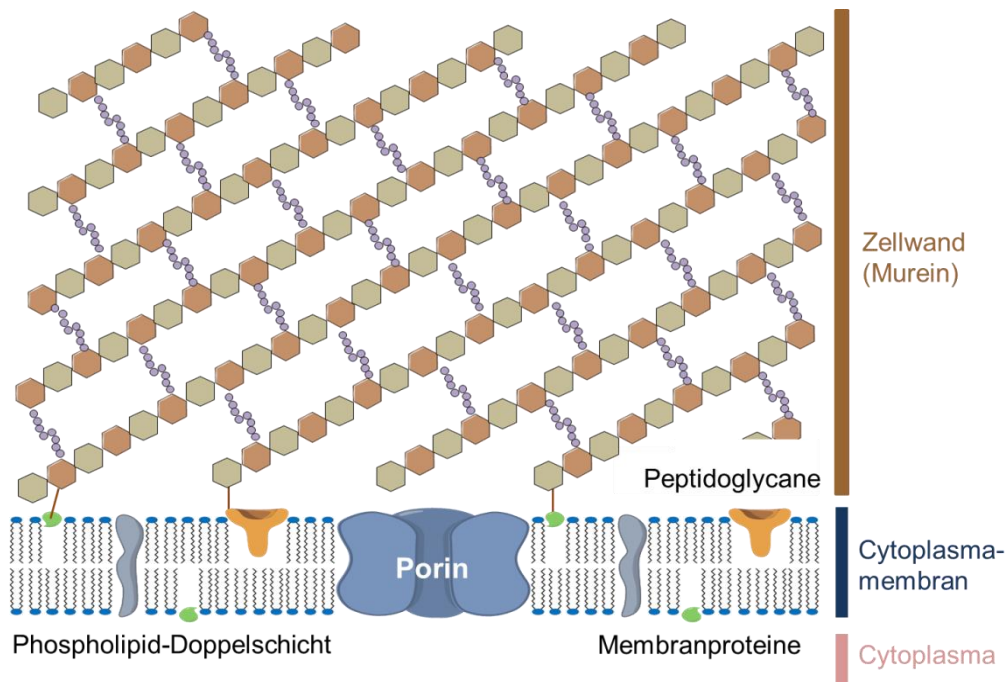


Abb.1.10: Schematischer Schnitt durch eine GRAM-positive Bakterienmembran mit dem Cytoplasma (rosa, unten), der Cytoplasmamembran aus einer Phospholipid-Doppelschicht (dunkelblau, mitte) und der Peptidoglycan-Zellwand (braun, oben).

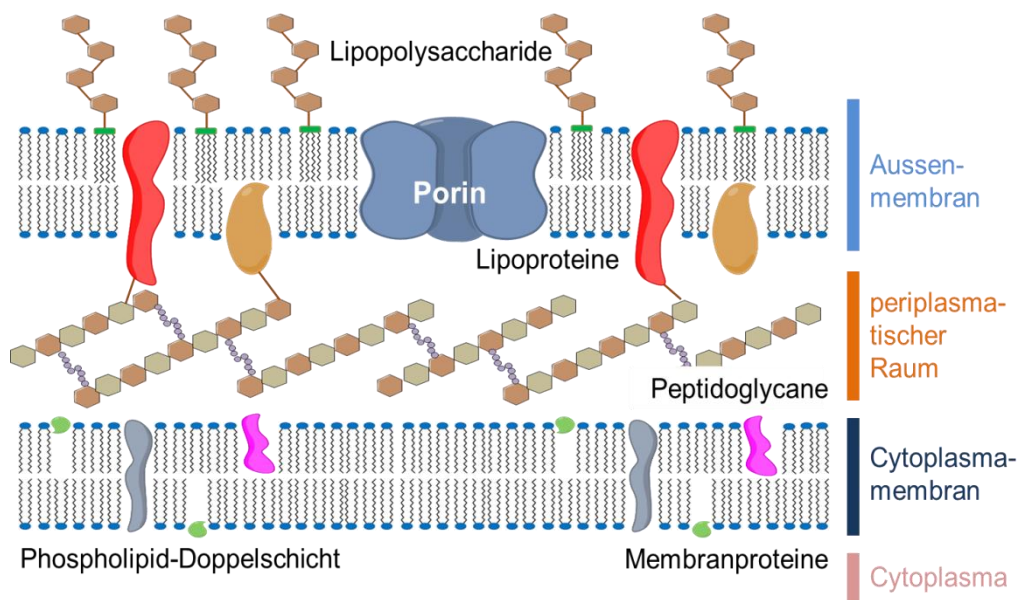


Abb.1.11: Schematischer Schnitt durch eine GRAM-negative Bakterienmembran mit dem Cytoplasma (rosa, unten), der inneren Cytoplasmamembran (dunkelblau) sowie dem darüberliegenden periplastischen Raum mit Peptidoglycanen (orange, mitte) sowie der Aussenmembran mit exponierten Lipopolysacchariden (hellblau, oben).

GRAM-positive Bakterien enthalten in ihrer äußeren Zellwand zusätzlich 20-40 Gew.% an (Lipo)Teichonsäuren.¹⁰⁹ Diese kovalent an die Lipoproteine angebondenen Phosphatpolymere sorgen für die Adhäsion bei der Ausbildung eines Biofilms.¹¹⁰

Zusätzlich regulieren Teichonsäuren die Enzyme, die während der bakteriellen Fortpflanzung (Zellteilung nach Ausknospung) die Zellwand abbauen. In **Abb.1.12** findet sich die chemische Strukturformel einer an MurNAc mit Alanin veresterten Teichonsäure von *S. aureus*, aufgebaut aus einer Polyglycerolphosphat-Hauptkette (links) sowie eines am GlcNAc veresterten Diphosphats (mitte). Über den angefügten Undecaprenyl-Rest (rechts) ist die Teichonsäure in der Zellwand verankert.

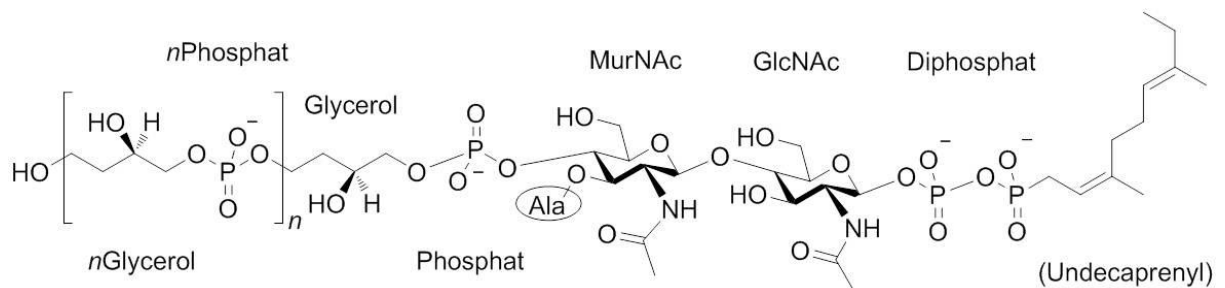


Abb.1.12: Strukturbeispiel einer mit Alanin veresterten Lipoteichonsäure aus der Zellwand des GRAM-positiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

1.3 Mechanismus und Synthesen linearer Polyoxazoline

1.3.1 Lebende Kationische Polymerisationen sowie geeignete Monomere

Die formell und mechanistisch zu den Ionischen Verfahren gehörenden Kationischen Polymerisationen setzen die Bildung einer aktiven, kationisch geladenen Spezies zu Initiierung voraus. Dafür eignen sich beispielsweise Carbenium-, $C^+(R)_3$, Sulfonium- $S^+(R)_3$, Phosphonium- $P^+(R)_4$, Nitronium- $N^+(R)_4$ oder Oxonium- $O^+(R)_3$ -Ionen, die durch elektronenschiebende Gruppen (Alkyle, Aromaten) oder Elektronenpaar-donoren (Heteroatome: N, O) stabilisiert werden können.

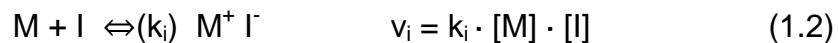
Diese Polymerisationsmethode eignet sich für aromatische Vinylmonomere wie (Methyl)Styrol, Inden, Alkyl- und Arylvinylother ($H_2C-CH-OR$), Isobutylen, 1,3-Diene wie Butadien und Isopren, und als ringöffnende Variante der Lebenden Kationischen Ringöffnenden Polymerisation (engl. *living cationic ring-opening polymerization*, CROP) für Epoxide, Aziridine Ethylenimine, Benzofurane und Laurinlactame

unterschiedlicher Ringgröße (C₂R-Oxirane, C₃R-Oxitane, C₄-Hydrofurane C₆-Oxepane). Auch nicht-aromatische Ringsysteme mit zwei oder drei (gleichen oder unterschiedlichen) Heteroatomen wie 1,4-Dioxan, 2-Alkyloxazoline¹¹¹⁻¹¹³ oder 1,3,5-Trioxan (*para*-Formaldehyd) sind CROP-geeignet.

1.3.2 Kinetik und Charakteristika der Lebend Kationischen Polymerisation

Eine CROP wird durch einen dreistufigen Wachstumsmechanismus, bestehend aus der Start- (Initiierung), Wachstums- (Propagation) und Abbruchsreaktion (Terminierung), beschrieben. Die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten werden im Folgenden mit k_i , k_p und k_t abgekürzt, die entsprechenden Umsatzgeschwindigkeiten mit v . Das nachfolgende, dreiteilige Gleichungsschema fasst die Kinetik der Lebend Kationischen Ringöffnenden Polymerisation zusammen.

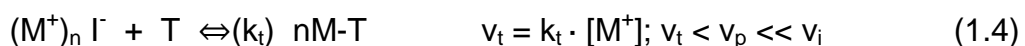
Initiierung: das Monomer M und der Initiator I reagieren unter Ringöffnung mit der Initiationsgeschwindigkeit v_i zum Ionenpaar $M^+ I^-$. Hierbei handelt es sich um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Polymerisation. Die eckigen Klammern $[M]$, $[I]$ stehen für die molare Konzentration der Komponente im Reaktionsgemisch.



Weitere Monomere M werden mit der Propagationsgeschwindigkeit v_p n-mal an das „lebende“ Kettenende M^+ angefügt.



Der Kettenabbruch (Terminierung) mit der zugehörigen Terminierungsgeschwindigkeit v_t erfolgt nach Zugabe eines Terminierungsmittels T (meist im deutlichen molaren Überschuss). Da die Konzentration an Terminierungsmittel $[T]$ höher ist als die molare Konzentration an Lebenden Ketten $[(M^+)_n]$, kann hierbei eine Reaktionskinetik 1. Ordnung postuliert werden. $nM-T$ bezeichnet das nicht mehr lebende („tote“), terminierte Polymer der Länge n.



Das angestrebte Molekulargewicht M_P ist proportional zur Initiatorkonzentration bei der Initiierung $[I]_0$ und zum Molekulargewicht des Monomers M und wird über das Stoffmengenverhältnis des Monomers n_M zum Initiator n_I berechnet.

$$M_P = n_M \cdot n_I^{-1} = M \cdot [M] \cdot [I]_0^{-1} \quad (1.5)$$

Charakteristisch für eine „Lebende“ Polymerisation ist das vollständige Fehlen von Kettenübertragungsreaktionen; die Propagation findet also so lange statt, bis jegliches Monomer aufgebraucht ist. Eine ideale Lebend Kationische Ringöffnende Polymerisation ist bei Erfüllung fünf weiterer, teilweise voneinander abgeleiteter Voraussetzungen gegeben:

- (a) alle Reaktionsschritte sind irreversibel
- (b) alle Initiatormoleküle I reagieren („zündend“) zu Beginn der Polymerisation gleichzeitig bei $t = 0$
- (c) die Initiatorkonzentration ist stationär im Verlauf der Reaktion: $[I]_0 = [I]_t$
- (d) die effektive Konzentration der aktivierten Kettenspezies (aktiven Zentren) ist stationär im Verlauf der Reaktion und gleich der Initiatorkonzentration:

$$[M^+]_0 = [M^+]_t = [I]_0 (= [I]_t) \quad (1.6)$$

- (e) die chemische Reaktivitäten während der Propagation und Terminierung sind unabhängig vom Molekulargewicht/Molmasse

Aus den Kriterien lässt sich ableiten, dass der Polymerisationsgrad DP einer ideal Lebend Kationischen Polymerisation linear mit dem Umsatz p ansteigt.

In **Abb. 1.13** ist diese Kinetik 1. Ordnung anhand der roten Geraden L (unten) grafisch dargestellt. Die Kurven R sowie R-G bilden radikalische Polymerisationen, die Kurve C die als Stufenreaktionen ablaufenden Polykondensationen ab.

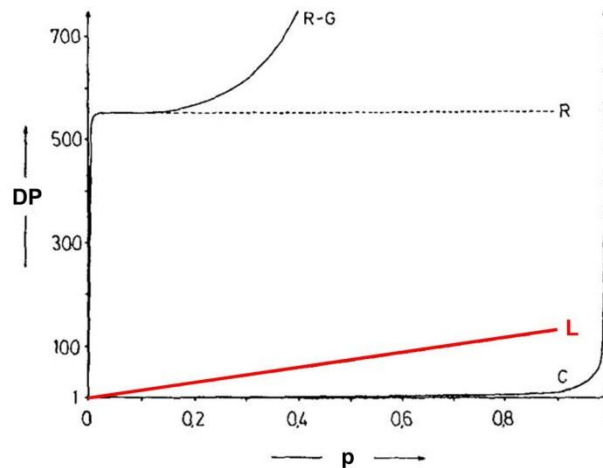


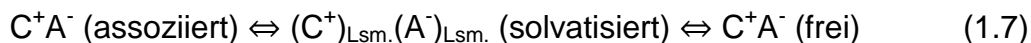
Abb.1.13^e: Grafische Darstellung der Reaktionskinetik 1. Ordnung einer Lebend Kationischen Polymerisation mittels der unteren Geraden L. Der Polymerisationsgrad DP ist eine lineare Funktion des Umsatzes p . Die Kurven R und R-G bilden radikalische, die Kurve C die als Stufenreaktionen verlaufenden Polykondensationen.

1.3.3 Lösungsmittelleffekte bei der Lebend Kationischen Polymerisation

Das Kettenwachstum k_p der CROP erfolgt durch Monomereinbau an das lebende kationische Terminal unter Erhalt des lebenden Kations und hängt im Wesentlichen von der Art des Monomers, der Temperatur der Art des Gegenions (Anions A^-) und des Lsm. ab. Das Letztere führt zur Solvatation des Gegenions und entscheidet so über die Distanz des resultierenden Ionenpaars; die kinetische Reaktionskontrolle erfolgt auch über dessen sterische Beschaffenheit. In Gleichung (1.7) findet sich eine schematische Darstellung der Lsm.-bedingten Kation (C^+)-Anion (A^-)-Abstände des Ionenpaars, auf die Darstellung der ebenfalls auftretenden, kovalenten Bindung C-A oder eines prozentualen kovalenten Bindungsanteils an der ionischen Bindung C^+A^- wird an dieser Stelle verzichtet.

Nichtsdestoweniger sind diese Bindungsanteile wichtig bei der Lebend Kationischen Ringöffnenden Polymerisation. Bei Verwendung von n -Alkylbromiden überwiegt, wegen der Restnukleophilie der resultierenden Abgangsgruppe (Br^-) der kovalente Anteil. Bei sehr guten Abgangsgruppen wie dem Tosylatanion (OTs^-) überwiegt der ionische Charakter der assoziierten Bindung.¹¹⁴ Bei Benzylbromiden oder Alkyljodiden¹¹⁵ handelt es sich um eine Mischform aus beiden Bindungsanteilen.¹¹⁶

^e Abbildung nach Elias, H. G., *An Introduction to Polymer Science*, VCH, Weinheim, 1997, S. 51.



Hierbei gilt: je größer die Dielektrizitätskonstante (Permittivität ϵ) des verwendeten Lsm., desto größer ist der resultierende Kation-(C^+)-Anion-(A^-)-Abstand. CROP-geeignete Initiatoren sollten mit der Initiierung eine möglichst unreaktive, nicht-nucleophile Abgangsgruppe erzeugen. So kommt es zu keiner kontaktierten Anlagerung des Gegenanions an das lebende Kettenende und damit zu keiner negativen Reaktionsbeeinflussung. Beispiele für derartige, potentiell nicht-nucleophile Abgangsgruppen sind Triflat- (OTf^-), Tosylat- (OTs^-) oder Mesylatanionen (OMe^-), aber auch benzyliche Bromide (Br^-) sind gut geeignet.

1.3.4 Für die Lebend Kationische Ringöffnende Polymerisation von 2-R-Oxazolinen geeignete Initiatorsysteme

Wie anhand der möglicherweise auftretenden Lsm.-Effekte diskutiert, müssen Initiatorsysteme für Lebende Kationische Ringöffnende Polymerisationen (CROP) nach erfolgter Initiierung ein möglichst wenig nucleophiles, stabiles Gegenion (Anion) abspalten. Zudem sollen eine quantitative Umsetzung zum funktionalisierten Oxazolinium-Kation in einem möglichst breiten Konzentrations- und Temperaturbereich bieten. Einer der zuverlässigsten, für die CROP von 2-R-Oxazolinen eingesetzten Initiatoren ist Methyl-*p*-toluolsulfonat (auch: Methyltosylat, MeOTs), das eine Methylgruppe ($-CH_3$) am Polymer einführt.

Von WEBERSKIRCH, NUYKEN *et al.*¹¹⁷ wurden bereits komplexere, auf fluorierten Alkylen basierende CROP-Initiatoren zur bequemen Einführung einer Funktionalität am Anfang einer Polymethyloxazolin-kette eingesetzt. Von WASCHINSKI *et al.*⁷⁴ wurden ebenfalls unterschiedlich lange *n*-Alkyl- (butyl-,¹¹⁸ hexyl-, octyl-, decyl-, dodecyl- und hexadecyl-) bromide erfolgreich als CROP-Initiatoren für 2-R-Oxazoline eingesetzt. Alternativ wurden derartige Alkylbromide bereits zur Darstellung antimikrobiell wirksamer Methacrylate eingesetzt.¹¹⁹ Ebenfalls als CROP-Initiator geeignet war das aromatische *para*-Dibromxylole (*p*DBX), welches mittels einer nucleophilen Substitutionsreaktion mit dem niedermolekularen Biozid DDA zum potenten, antimikrobiellen CROP-Initiator 4-(Bromomethyl)-*N*-dodecyl-*N,N*-dimethyl-benzyl-ammoniumbromid umgesetzt werden kann.⁷⁶ In **Abb.1.14** zeigt die chemischen Strukturformeln der vorgestellten CROP- Initiatoren.

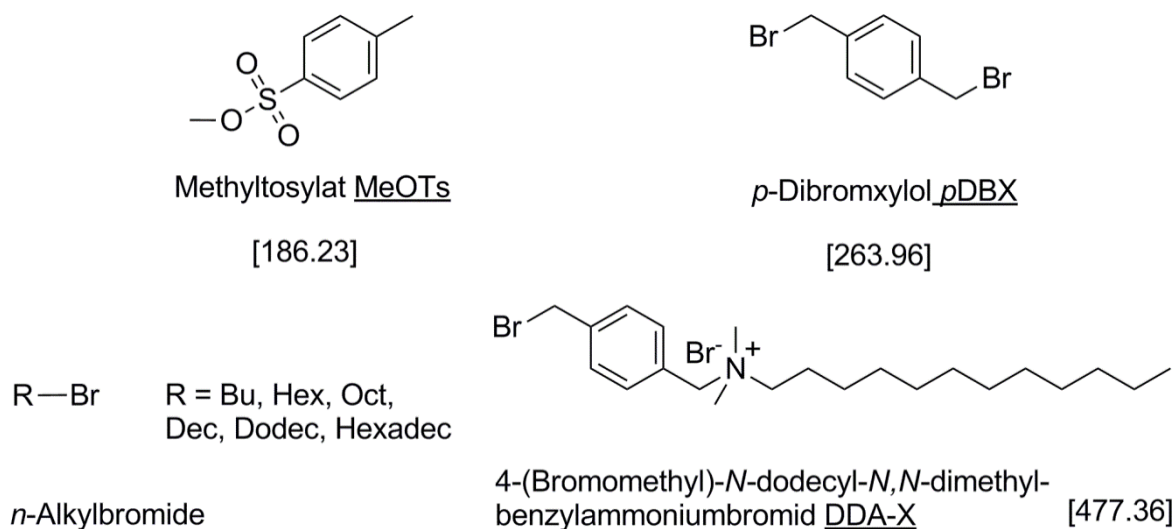


Abb.1.14: Übersicht über die chemischen Strukturen der zur Darstellung linearer Polyoxazolin-Homopolymere geeigneten CROP-Initiatoren; inklusive der hierfür üblicherweise verwendeten Abkürzungen.

1.3.5 Synthesen R-substituierter 2-R-1,3-Oxazolinmonomere

Bei der Lebend Kationischen Ringöffnenden Polymerisation (CROP) handelt es sich um die im Rahmen dieser Arbeit bevorzugt eingesetzte Polymerisationsmethode. Durchgeführt wurde diese ausgehend von 2-R-1,3-Oxazolinen. Diese ringförmigen (cyclischen), 5-gliedrigen Iminoether sind über eine übergangsmetallkatalysierte (bspw. $\text{Zn}(\text{OAc})_2$), Lsm.-freie Additionsreaktion eines R-funktionalisierten Nitrils mit 2-Aminoalkohol via 1,3-Ringschluss zugänglich.^{120, 121}

Durch die Variation der Gruppe R lässt sich ein Vielzahl von Strukturen realisieren, die nachfolgend präsentierten Synthesen basieren auf drei, an der 2-R-Position *n*-alkylierten Oxazolinen: dem Methyl- (CH_3 -; MOX), dem Ethyl- (C_2H_5 -; EOX) sowie dem *iso*Propyl- (C_3H_7 -; *i*PrOX)-Oxazolin.

In **Abb.1.15** finden sich sowohl die Ursynthese von 2-R-Oxazolinen als auch die Strukturformeln der drei zur Darstellung von telechelen Polyoxazolineneingesetzten Monomere MOX, EOX und *i*PrOX.

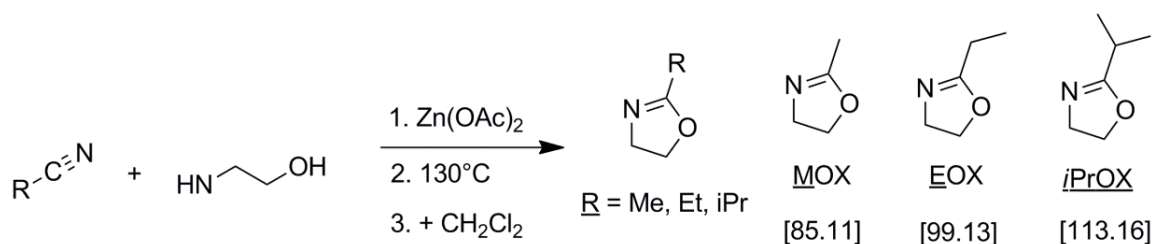


Abb.1.15: Schematische Darstellung der Ursynthese von 2-R-Oxazolinen (cyclischen 5-gliedrigen Imidoethern) aus R-Nitrilen und Aminoalkoholen.^{120, 121}

Der wichtigste synthetische Zugang zu 2-R-Oxazolinen besteht über (α -funktionalisiertes) Aminoethanol und dessen Umsetzung mit Nitrilen (WITTE-SEELIGER-Rxn.), Aldehyden (zyklisiert zu Oxazolidinen) oder Carbonsäuren (via Carbonsäurechloriden mittels Thionylchlorid). Alternative Syntheserouten zur Darstellung von 2-R-Oxazolinen basieren auf *N*-Alkenylamiden, die mit *tert*-Butylhypoiodit cyclisiert werden,¹²² auf einer *one-pot* Kondensation von α -substituierten, mesylatgeschützten β -Hydroxyketonen¹²³ oder auf einer Umsetzung von α,α -Difluoroalkylaminen mit 2-Aminoalkoholen.¹²⁴ Die mildesten Oxazolinsynthesen finden bei RT oder max. 50°C statt. Sie gehen von arylischen¹²⁵ oder alkylischen Aldehyden aus, die unter Verwendung nicht-nucleophiler Basen binnen Stunden (1.5-24 h) und meist oxidativ^{126, 127} zu Imidoethern cyclisieren.

1.3.6 Mechanismus der Lebend Kationischen Ringöffnenden Polymerisation von 2-R-Oxazolinen

Die Lebend Kationische Ringöffnende Polymerisation (CROP) von 2-R-Oxazolinen folgt dem Mechanismus einer bimolekularen, nucleophilen Substitutionsreaktion ($\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion), welche in **Abb.1.16** am Beispiel der Reaktion von Methyltosylat (MeOTs) mit einem beliebigen 2- R_1 -Oxazolin (R_1OX) schematisch dargestellt ist. Die Terminierung soll dabei mit einem beliebigen primären Amin ($\text{R}_2\text{-NH}_2$) erfolgen. Im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Initiierung (vgl. **Kap.1.5.2**) fungiert das Valenzelektronenpaar des Oxazolin-Stickstoffs als Nucleophil und greift als solches den elektrophilen Kohlenstoff eines Initiators an, wodurch eine kovalente Bindung etabliert wird. Der verbleibende Rest des Initiators verlässt als (möglichst wenig nucleophile) Abgangsgruppe den elektrophilen Kohlenstoff und fungiert fortan als Gegenion des neu gebildeten Oxazolinium-Kations.

Ein weiteres MOX greift regioselektiv den elektrophilsten Kohlenstoff an (O-nahes C), wobei durch die Aufgabe der Ringspannung Energie frei wird und die oxazolintypische $-NC=O-R_1$ -Seitengruppe (ein *N*-Acyl) ausgebildet wird.

Diese Propagation der PR_1OX -Kette wird so lange fortgesetzt, bis alle R_1OX -Monomere aufgebraucht wurden oder ein Terminierungsmittel wie bspw. ein primäres Amin H_2N-R_2 zugesetzt wird. Triebkraft der Reaktion ist die Entstehung eines offenkettigen Amids (=Poly-2-oxazolin) aus einem ringförmigen Imid (=2-Oxazolin) und die daraus resultierende Zunahme der thermodynamischen Stabilität.

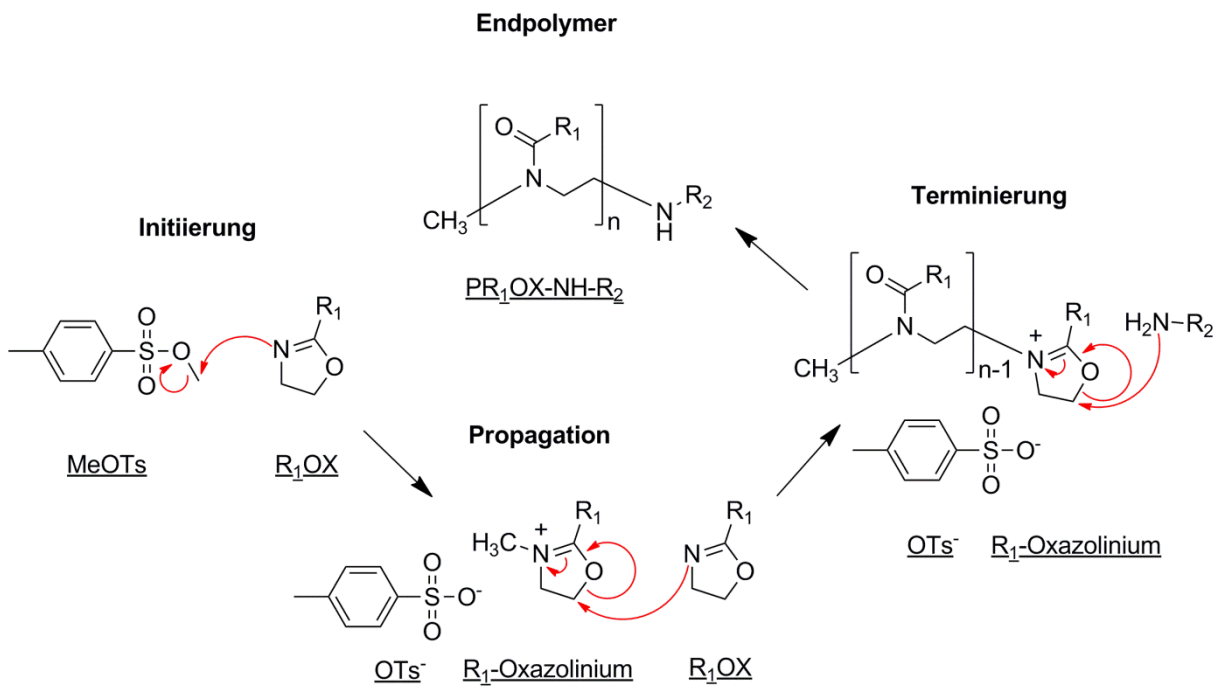


Abb.1.16: Schematische Darstellung des S_N2 -Reaktionsmechanismus der Lebend Kationischen Ringöffnenden Polymerisation (CROP) von 2-R-Oxazolinen; gezeigt am Beispiel des Initiators Methyltosylat (MeOTs) und eines beliebigen 2- R_1 -Oxazolins (R_1OX). Die Terminierung soll mit einem beliebigen primären Amin (R_2-NH_2) erfolgen. Bei der Terminierung greift das als Nucleophil fungierende Valenzelektronenpaar des primärenamins zum letzten Mal regioselektiv den elektropositivsten Kohlenstoff an. Dabei wird unter Ringöffnung der letzte *N*-Acylrest und eine kovalente Bindung zum primären Amin ausgebildet. Aufgrund dieser Nomenklatur können Polyoxazoline auch als Poly-*N*-acylierte (funktionalisierte) Polyethylenimine aufgefasst werden.

2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Synthese bioaktiver Homo- und Copolymere mit variabler Kettenlänge auf der Basis beidseitig funktionalisierter 2-R-1,3-Oxazoline mit frei wählbaren Seitengruppen R. Methodisch soll hierzu die kationisch ringöffnende lebende Polymerisation unter Einsatz der Mikrowellenheiztechnik genutzt werden. Die bioaktive Wirksamkeit der Polyoxazoline soll generiert werden durch den Einsatz eines bioziden, auf einem quartären Ammoniumalkyl basierenden Initiators. Mittels Terminierung/polymeranaloger Umsetzung sollen die resultierenden Polyoxazoline mit endständigen, funktionellen Satellitengruppen versehen werden. Zudem sollen beidseitig mit reaktiven Ankergruppen funktionalisierte, nicht-bioaktive Polyoxazolinlinker hergestellt werden. Die Charakterisierung der Polymere soll über $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR, GPC, GC-MS, ATR-FT-IR und UV/vis erfolgen. Anschließend soll der Einfluss der Satellitengruppen auf die bioaktive Wirksamkeit der resultierenden Polyoxazoline untersucht werden. Hierzu soll die antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber Bakterien in Lösung und auf Oberflächen sowie die Toxizität gegenüber Schweineblut-Erythrozyten in Lösung ermittelt werden. Als typische Repräsentanten pathogener Bakterien sollen die GRAM-positiven Keime *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* sowie der GRAM-negative Keim *Escherichia coli* eingesetzt werden. Ergänzend soll die Breite der antimikrobiellen Effektivität an weiteren, biomedizinisch relevanten Bakterienstämmen bestimmt werden. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit soll das Potential der bioaktiven Polyoxazoline zur Hemmung bakterieller, humaner Kollagenasen sowie dentaler Matrixmetalloproteinasen (MMPs) evaluiert werden. Die Kollagenasehemmung soll an unterschiedlichen Kollagenarten in Lösung sowie an dentalrelevanten Oberflächen belegt und quantifiziert werden. In einem weiteren Teil der Arbeit sollen Polyoxazoline als immobilisierbare, bioaktive Polymeradditive zur Modifikation kommerzieller Dentaladhäsive eingesetzt werden. Die für eine dentale Langzeit-Anwendung wichtigen, bioaktiven und mechanischen Kenngrößen sollen an polymermodifizierten, lichtgehärteten Adhäsivschichten im wässrigen Milieu ermittelt werden. Der letzte Abschnitt der vorliegenden Arbeit soll sich der Erhöhung der bioaktiv verfügbaren Dichte an kovalent immobilisierten Polyoxazolingruppen auf Modelloberflächen widmen. Neben unterschiedlichen chemischen Immobilisierungsmethoden sollen abschließend biomimetische Reproduktionstechniken eingesetzt werden, die die verfügbare Größe einer Gesamtoberfläche zu erhöhen vermögen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Mikrowellensynthesen und Charakterisierung telecheler Poly-2-oxazoline mit variablen endständigen Satellitengruppen

Die Zielstellung dieses Kapitels war die Etablierung der Mikrowellen-Heiztechnik für unterschiedliche 2-R-1,3-Oxazolin-Monomere (R = Methyl, Ethyl, *iso*Propyl), die Herstellung und Charakterisierung des bioaktiven Initiators für die Kationisch Ring-öffnende Lebende Polymerisation sowie dessen Einsatz zur Mikrowellensynthese telecheler, mit Satellitengruppen funktionalisierter Polyoxazoline. Diese wurden anschließend systematisch nach Homo- und Copolymeren klassifiziert und mittels gängiger chemischer Analysemethoden umfassend charakterisiert.

3.1.1 Vorteile der Mikrowellen-Heiztechnik bei Kationisch Ringöffnenden Lebenden Polymerisationen (CROP)

Viele der bislang vorgenommenen Polymer- und Makromonomersynthesen, so auch die von WASCHINSKI *et al.* generierten telechelen Polyoxazolinsysteme^{73, 74, 76} wurden klassisch-organisch im Mehrhalskolben mit aufgesetztem LIEBIGKühler und unter konventioneller Ölbadheizung durchgeführt. Als druckloses System konzipiert waren darin nur Umsetzungen bei Temperaturen um den Lösungsmittel-Siedepunkt möglich (beispielsweise CHCl_3 , Sdp. = 61°C).

Nachteilig war hier die lange Synthesedauer im Bereich von 5-7 Tagen. Daraus resultierte der erhöhte apparative Aufwand, die erforderliche Schutzgasinertheit (Argon) und Gerätedichtigkeit und gleichbleibende Qualität des Reaktionsgemisches über einen langen Zeitraum aufrechtzuerhalten. Charakteristisch für diese konventionelle Methode der Ölbadheizung war, dass zunächst die Behälterwand und erst anschließend der Behälterinhalt mittels Wärmetransport (Konvektion) erhitzt wurde. Dieses sogenannte Kontaktheizen hatte schließlich den Nachteil eines hohen Temperaturgradienten entlang des Behälterradius was, trotz Rührens, zu thermischen Zersetzungsprozessen an der Behälterwand führte.

Im Gegensatz dazu beruht die im Jahre 1986 erstmals für chemische Synthesen eingesetzte Mikrowellenheizung^{128, 129} auf einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung der Mikrowellenstrahlung mit einem Lösungsmittel (Lsm.).

Dieses wird gleichmäßig im Gesamtvolumen erhitzt; das umgebende Gebinde bleibt zunächst kalt. Ein solcher direkter Energieeintrag hat den Vorteil eines, in Vergleich zur konventionellen Ölbadheizung, deutlich niedrigeren Temperaturgradienten und generiert dadurch eine erheblich geringe Rate an thermischen Zersetzungsprozessen.¹³⁰ In **Abb.3.1** werden die beiden Heizmethoden anhand eines simulierten Temperaturprofils gegenübergestellt.

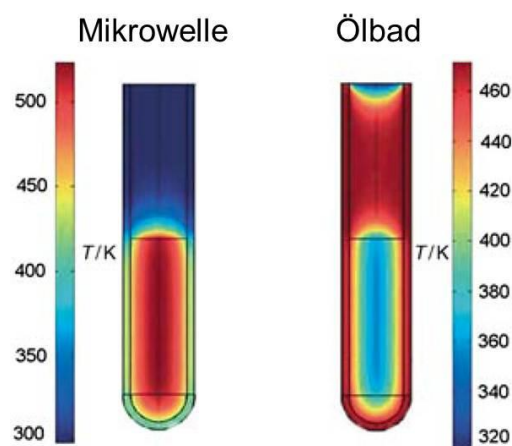


Abb.3.1^f: Simulierte Darstellung der in einer Glasphiole auftretenden, invertierten Temperaturgradienten bei Mikrowellenbeheizung (links) vs. Ölbadheizung (rechts) nach 1 min Beheizung; die Temperaturwerte (in K) wurden berechnet nach der Finite Elemente-Methode und mittels Farbskala dargestellt. Während die Mikrowellenheizung nur das Volumen beheizt, beheizt das Ölbad zunächst nur den Behälter.

Ein weiterer Vorteil der Mikrowellenheiztechnik war –wegen der fehlenden Erwärmung des Gebindematerials– die bessere Eignung zur Verwendung geschlossener Autoklaven. Diese mussten durchlässig sein für Mikrowellenstrahlung mit einer Frequenz von $\nu_{MW} = 2.45$ GHz. Das galt nicht für die üblichen Autoklavenschlässe, aber für die meisten Silikat- und Boratgläser (bspw. SCHOTT-Flaschen).¹³¹

^f Abbildung entnommen aus: Kappe, C. O. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, 43, (46), 6250.

3.1.2 Vorstellung des angewandten Synthesekonzeptes

Die im **Kap.1.3.4** diskutierten, für die Lebend Kationische Ringöffnende Polymerisation (CROP) von Polyoxazolinen (PROX) geeigneten Initiatoren führen, mit Ausnahme des 4-(Bromomethyl)-*N*-dodecyl-*N,N*-dimethyl-benzylammonium-bromids (DDA-X), zu unreaktiven und antimikrobiell-unwirksamen Gruppen am Polymerrückgrat. Da Methyltosylat (MeOTs) hiervon das Reaktivste ist, wurde es im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Standardinitiator zur Synthese von Referenzsystemen eingesetzt. Die daraus resultierenden Polyoxazoline wurden an ihren Kettenanfangspositionen mit einer einfachen Methylgruppe (-CH₃) versehen.

Die Entwicklung des antimikrobiellen Initiators DDA-X durch WASCHINSKI *et al.*⁷⁶ erlaubte die quantitative antimikrobielle Ausrüstung einer jeden Polyoxazolinkette gleich zu Beginn der Polymerisation. So stand das entgegengesetzte Polyoxazolinterminal (Kettenende) für eine Funktionalisierung zur Verfügung und das Satellitengruppenkonzept von WASCHINSKI *et al.*⁷³⁻⁷⁶ wurde um eine breite Auswahl an funktionellen Gruppen erweitert. Konkret handelte es sich hierbei um Hydroxylgruppen (OH-), eingeführt per Terminierung mit einer wässrigen Kaliumcarbonat-Lsg; primäre Aminogruppen, eingeführt durch eine Terminierung mit Ethylendiamin (EDA), quartäre Ammoniumalkylgruppen, eingeführt durch Terminierung mit *N,N*-Dimethyldodecylamin (DDA) sowie quaternisierte, doppelbindungshaltige Funktionen; eingeführt durch die Verwendung von *N*-[3-(dimethylamino)-propyl]-methacrylamid (AMA) als Terminierungsmittel. Als Monomer der vorliegenden Polyoxazolinklasse wurde zunächst 2-Methyloxazolin (MOX) gewählt, was zu einem sehr hydrophilen Polymethyloxazolin-Rückgrat führte.

In Vergleich zu vorangehenden Arbeiten mit DDA-X^{76, 132, 133} wurde zunächst die Synthese des antimikrobiellen, quaternären CROP-Initiators hinsichtlich des Syntheseaufwands und der erzielbaren Ausbeute optimiert. Auch wurden alle Polymerisationen mikrowellengestützt im überhitzten Lsm. (hier: CHCl₃) durchgeführt, was die Synthesedauer pro Polymer drastisch reduzierte¹³⁴ und die Herstellung größerer Produktmengen im Rahmen eines Scale-Ups erheblich vereinfachte.¹³⁵ In **Abb.3.2** wird das mikrowellengestützte Synthesekonzept der telechelen, DDA-X-basierten linearen Polymethyloxazoline (PMOX) und die hierzu verwendeten Satellitengruppen (OH, EDA, DDA und AMA) schematisch dargestellt.

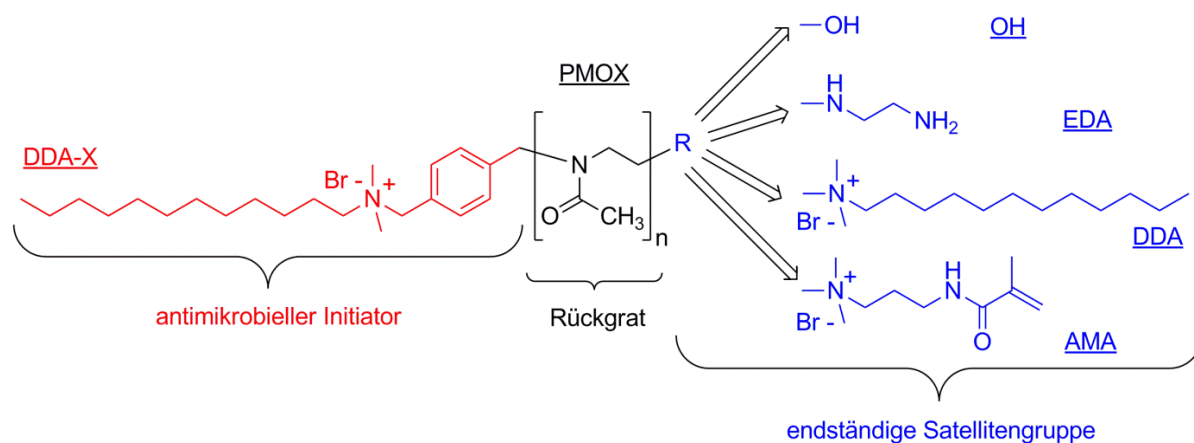


Abb.3.2: Telechele, lineare Polymethyloxazolin-Homopolymere (PMOX), gestartet mit einem antimikrobiellen Initiator (DDA-X, rot) und terminiert mit unterschiedlichen funktionellen Satellitengruppen (OH = Hydroxyl, EDA = Ethylen-1,2-diamin, DDA = *N,N*-Dimethyldodecylammoniumbromid sowie AMA = 3-(Methacryloylamino)-*N,N*-dimethylpropan-1-ammoniumbromid, blau) am distalen Ende der PMOX-Kette.

Bevor näher auf die Etablierung der im Rahmen des vorgestellten Synthesekonzepts verwendeten, mikrowellengestützten Polyoxazolinsynthese eingegangen wird, soll im folgenden Kapitel zunächst auf die Syntheseoptimierung des antimikrobiellen Initiators DDA-X eingegangen werden.

3.1.3 Optimierung der Synthese des antimikrobiellen Initiators DDA-X

Zur Erhöhung der Ausbeute an 4-(Bromomethyl)-*N*-dodecyl-*N,N*-dimethylbenzylammoniumbromid (DDA-X) und Minimierung des Nebenproduktanteils wurde der von WASCHINSKI *et al.* vorgeschlagene, synthetische Zugang zu DDA-X⁷⁶ hinsichtlich des eingesetzten Lsm., der Umsetzungstemperatur und Synthesedauer variiert.

Zunächst wurde die Initiatorsynthese in drei unterschiedlichen Lsm. (Diethylether, Toluol und Chloroform) durchgeführt; das flüssige DDA wurde im jeweiligen Lsm. vorgelöst und äquimolar einer Suspension von pDBX bei 50°C innerhalb von 2 h zugetropft; bis auf die Variation der Lsm. wurden zunächst alle Syntheseparameter aus der Urvorschrift beibehalten. Die Synthese in Et₂O und CHCl₃ lieferte das gesuchte DDA-X, allerdings in stark unterschiedlichen Anteilen.

Bei Verwendung von Toluol als Lsm. wurden mittels ¹H-NMR Analytik nur Spuren (<10 Gew.%) des gewünschten DDA-X Produktes nachgewiesen; hierbei wurde zu

über 80 Gew.% das *bis*-substituierte, unerwünschte Nebenprodukt *bis*DDA-X vorgefunden. Dieses ist in Ermangelung einer elektrophilen Abgangsgruppe als Initiator für die Lebend Kationische Ringöffnende Polymerisation unbrauchbar und musste daher entweder restlos vom gewünschten Hauptprodukt DDA-X abgetrennt oder durch die Syntheseführung vermieden werden. In **Abb.3.3** ist der Syntheseweg zur Darstellung von DDA-X inklusive der problematischen Folgereaktion zum unerwünschten Nebenprodukt *bis*DDA-X dargestellt.

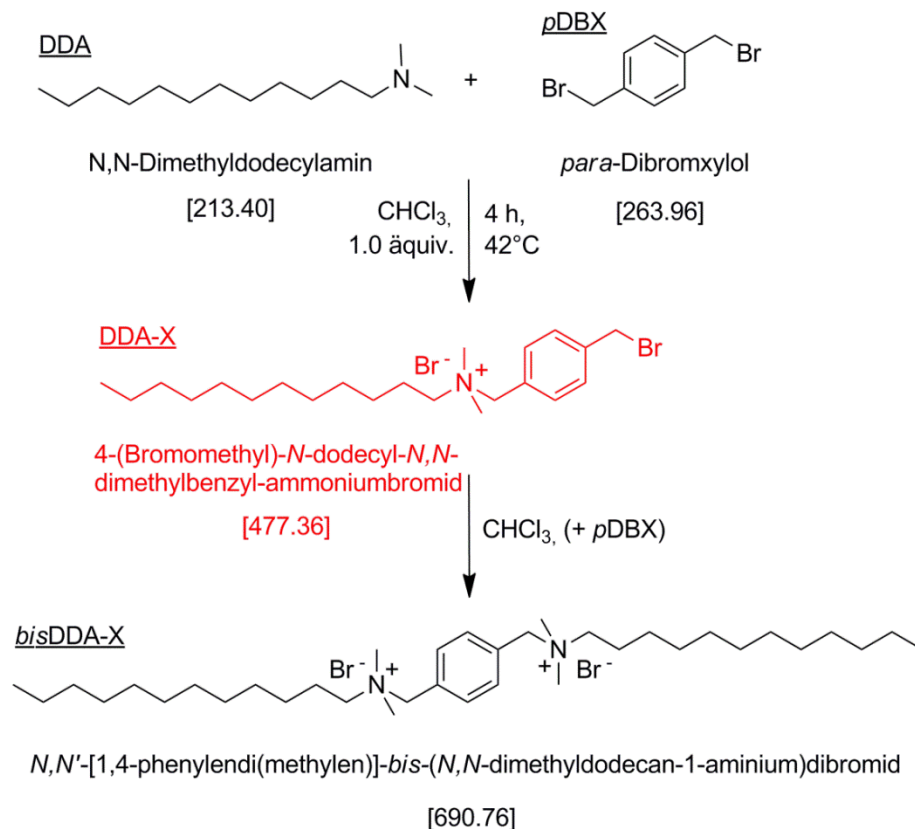


Abb.3.3: Schematische Darstellung des Syntheseweges zur Gewinnung des antimikrobiellen Initiators (DDA-X; rot, mitte) aus den äquimolar eingesetzten Edukten (DDA und *p*DBX; oben); inklusive der Folgereaktion zum unerwünschten, bis-funktionalisierten Nebenprodukt (*bis*DDA-X; unten).

Da mit CHCl_3 als Lsm. der höchste Anteil an DDA-X (> 70 Gew.%, via $^1\text{H-NMR}$) erzielt wurde, wurde es als geeignetes Solvens für die Initiatorsynthese beibehalten. Weitere Versuchsreihen zur Temperaturabhängigkeit der Reaktion im Bereich von 0-60°C (durchgeführt bei 0, 25, 42, 50 und 60°C) zeigten, dass Umsetzungen im

unteren Temperaturfenster von 0-25°C hauptsächlich zur Reisolierung der Edukte ohne signifikanten Umsatz (< 17 Gew.% an DDA-X) führten.

Umsetzungen im oberen Temperaturfenster von 50-60°C führten zu größeren Ausbeuten an unerwünschten Nebenprodukt *bis*DDA-X (> 45 Gew.%). Somit wurden 42°C als Kompromiss gewählt und schließlich, unter weiterer Verwendung von CHCl₃ als Lsm., die Zeitabhängigkeit der Reaktion bestimmt. Hierbei wurde festgestellt, dass sich längere Umsetzungsdauern (langsames Zutropfen) günstig auf die DDA-X Ausbeuten auswirkten. Durch die Verdopplung der DDA-Zutropfdauer auf insgesamt 4 h und die Synthese in CHCl₃ bei 42°C ließ sich der Anteil an *bis*-substituierten Nebenprodukt *bis*DDA-X auf 15-10 Gew.% verringern.

Eine Umsetzung ohne jegliches *bis*DDA-X gelang trotz umfangreicher Versuchsreihen nicht. Auch die Reduktion des stöchiometrischen Anteils an *p*DBX auf 0.5 Äquivalente (bezogen auf DDA) oder eine deutlich höhere Eduktverdünnung konnte die Entstehung des Nebenproduktes nicht nennenswert unterbinden; insbesondere durch die letztgenannte Maßnahme erhöhte sich nur die Restmenge an *p*DBX, die im Rahmen der Aufreinigung abgetrennt werden musste. Offenbar stellte das *bis*DDA-funktionalisierte, unerwünschte Syntheseresultat ein thermodynamisch bevorzugtes, stabiles Endprodukt dar. Es war insgesamt nur möglich, dessen Auftreten durch lange Umsetzungsdauern (4 h), moderate Temperaturen (42°C) und die Auswahl des entsprechenden Lsm. (CHCl₃) zu minimieren. Auch bei optimaler Reaktionsführung wurden geringe Mengen an *p*DBX (< 5 Gew.%) vorgefunden, welches nach Aufkonzentrierung der Reaktionsmischung bei Kühlschrankschlagerung (4-8°C, 6-12 h) als kristalliner weißer Feststoff ausfiel und mittels Sedimentation abtrennbar war.

Die Abtrennung von *bis*DDA-X gelang durch Aufschlammung des Rohproduktes in Tetrahydrofuran (THF); woraus es als weißer, perlmuttartiger Feststoff sedimentierte. Nach fünfmaliger Aufkonzentrierung und wiederholter Durchführung der Sedimentationsprozedur lag der *bis*DDAX-Anteil im Endprodukt bei 1.0-0.5 Gew.%. Diese Spuren wurden durch Filtration (0.45 µm) nahezu vollständig entfernt und so das reine DDA-X in Ausbeuten um 80 % erhalten; die größten durchgeführten DDA-X-Synthesen ergaben 15.0 g an reinem Produkt.

3.1.5 Charakterisierung des antimikrobiellen Initiators DDA-X

Die Analytik der hochviskosen, honigartigen Zielverbindung DDA-X wurde zunächst mittels $^1\text{H-NMR}$ durchgeführt. **Abb.3.4** zeigt ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung; gelöst in $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ und aufgezeichnet bei 400 MHz. Alle im Spektrum auftretenden Signale konnten eindeutig zugeordnet werden.

Die als charakteristisch zu bezeichnenden DDA-X Signale waren das Multipllett der beiden Ammoniumbromid-Methylgruppen bei 3.23 ppm (Pos.5; 6H), das Multipllett des *n*-Alkylkettenbereichs bei 1.21 ppm (Pos.8-16; 18H) und das Triplet der endständigen Methylgruppe bei 0.82 ppm (Pos.1; 3H). Das Signal bei 7.30 ppm stammt vom *p*DBX-Edukt, das zugehörige Integral entsprach jedoch weniger als 0.1 Gew. % und war daher vernachlässigbar. Bei dem Signal um 2.05 ppm handelte es sich um eine Spülkontamination mit Ethylacetat.

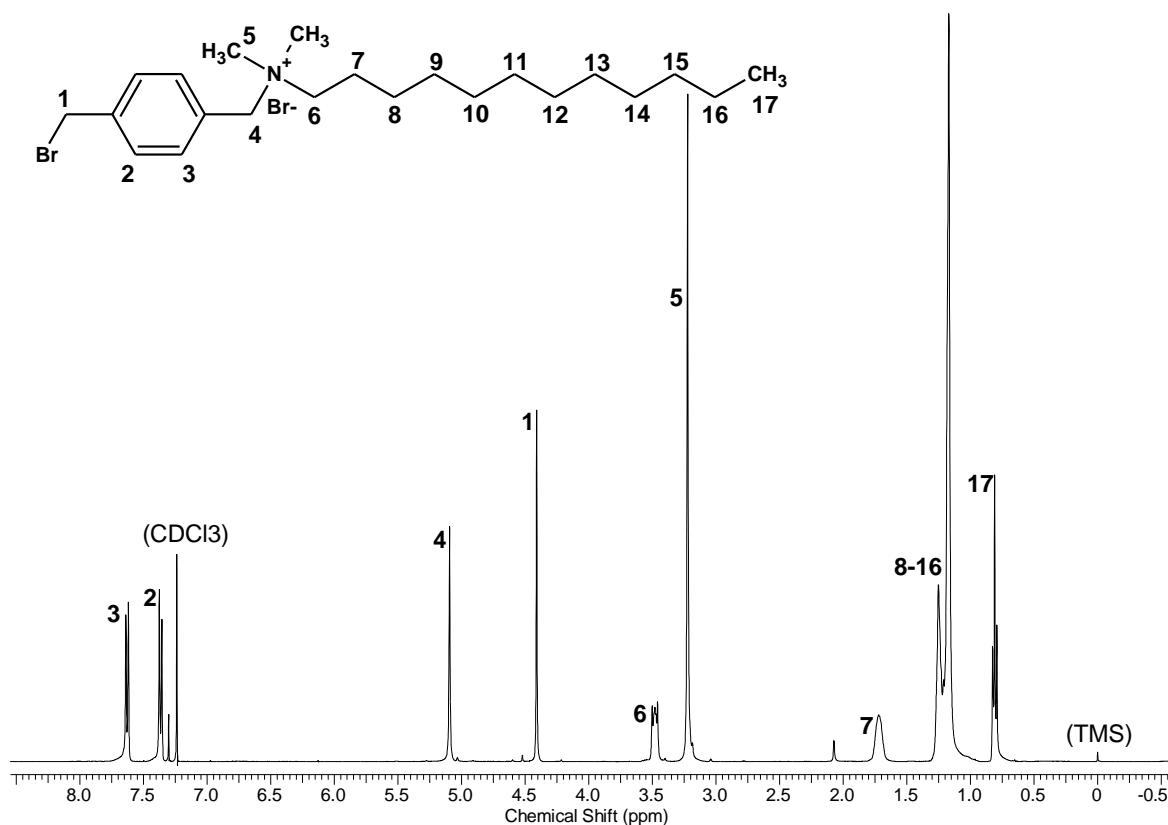


Abb.3.4: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Reinverbindung 4-(Bromomethyl)-*N*-dodecyl-*N,N*-dimethylbenzyl ammoniumbromid \equiv **DDA-X**, aufgenommen in $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ bei 400MHz.

Im tieffeldigen Aromatenbereich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von DDA-X (8.0-7.0 ppm) zeigte sich ein produktspezifisches Kopplungssignal (Pos.3, 7.63 ppm; Pos.2, 7.38 ppm), das im Spektrum nicht auftretende Nebenprodukt würde ein singulettähnliches Signal bei 7.86 ppm generieren. Anhand dieses Signals konnte das unerwünschte *bis*DDAX nachgewiesen bzw. während der Aufreinigung ausgeschlossen werden.

In **Abb.3.5** wird die elektronische Situation an den planaren, HÜCKEL-aromatischen Ringsystemen veranschaulicht. Diese führt im Falle des unsymmetrisch *para*-(1,4)-disubstituierten DDA-X (unterschiedlich funktionalisierte Benzylpositionen) zu einem charakteristischen AA'-BB'-Kopplungssignal (linke Abb.). Eine symmetrische *para*-(1,4)-Disubstitution, wie sie im Falle von *bis*DDA-X auftritt, führt zu gleichberechtigten aromatischen Ringprotonen, was sich in dem bereits angeführten, singulettähnlichen Signal ohne jegliche Kopplung äußert (rechte Seite der **Abb.3.5**). An dieser Stelle ist explizit darauf hinzuweisen, dass ein solches, bei DDA-X beobachtetes Kopplungsverhalten eine Besonderheit darstellt und daher nicht zwingend bei allen *para*-(1,4)-substituierten Aromaten auftreten muss.

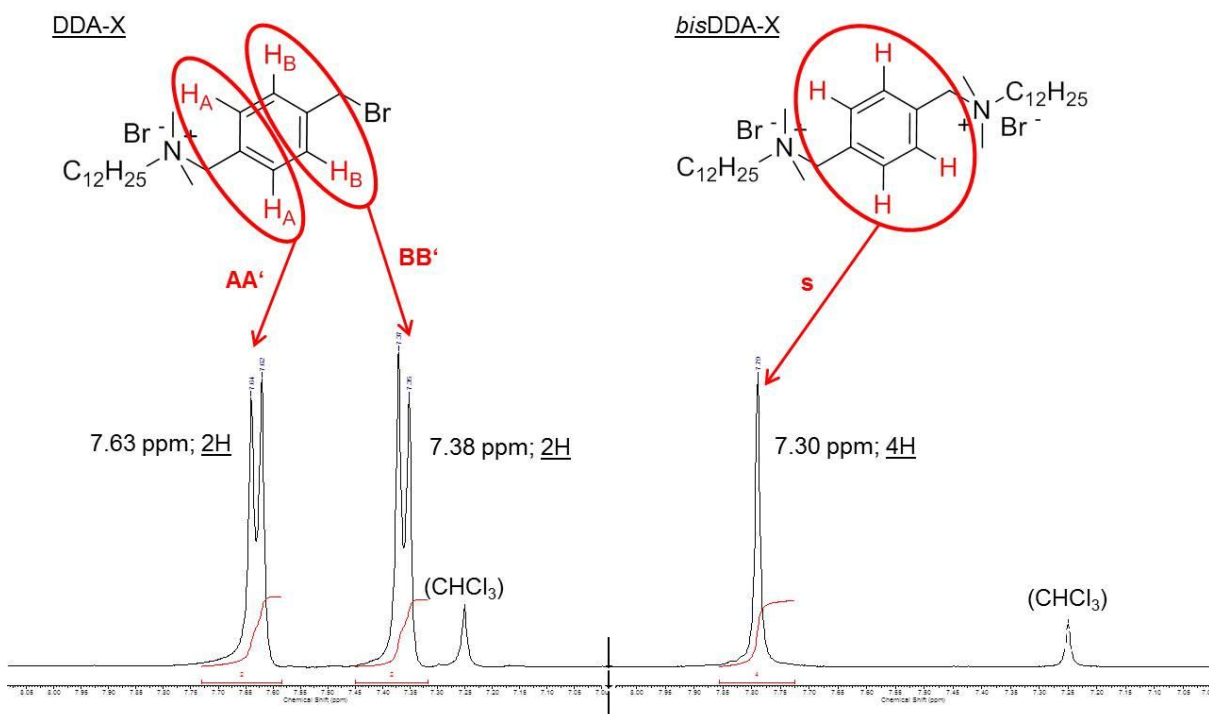


Abb.3.5: Vergleich der tieffeldigen, aromatischen $^1\text{H-NMR}$ -Signalgruppen mit der charakteristischen AA'BB'-Aufspaltung im Falle des antimikrobiellen Initiators DDA-X (links) und eines singulettähnlichen Signals des *bis*DDAX-Nebenproduktes (rechts).

Zur weiteren Charakterisierung des Initiators DDA-X wurde eine gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS) durchgeführt. Bei dieser Analytikmethode wurde die Substanz zunächst gaschromatographisch aufgetrennt, anschließend ionisiert und fragmentiert. Die entstandenen Bruchstücke gaben die Strukturcharakteristika wieder; sie wurden anhand ihrer Masse-zu-Ladungs-Werte (m/z) im Spektrum aufgetrennt. Dabei wurden bei spezifischen Elementen wie Brom, das ein Bestandteil von DDA-X war ($m/z = 79$), die natürlichen Isotopenanteile als Signalhöhenverhältnis wiedergegeben ($^{79}\text{Br} = 50.7 \text{ Gew.}\%$ zu $^{81}\text{Br} = 49.3 \text{ Gew.}\%$).

Die Abspaltung von Brom vom Radikalkation war bei den Signalen $m/z = 183.0$ und $m/z = 104.1$ ($-m/z = 79$) gut erkennbar. **Abb.3.6** ist das GC-MS Spektrum von DDA-X inklusive einer strukturellen Fragmentzuordnung der wichtigsten m/z -Peaks, wobei weitere Strukturmerkmale der Zielverbindung zugeordnet werden konnten.

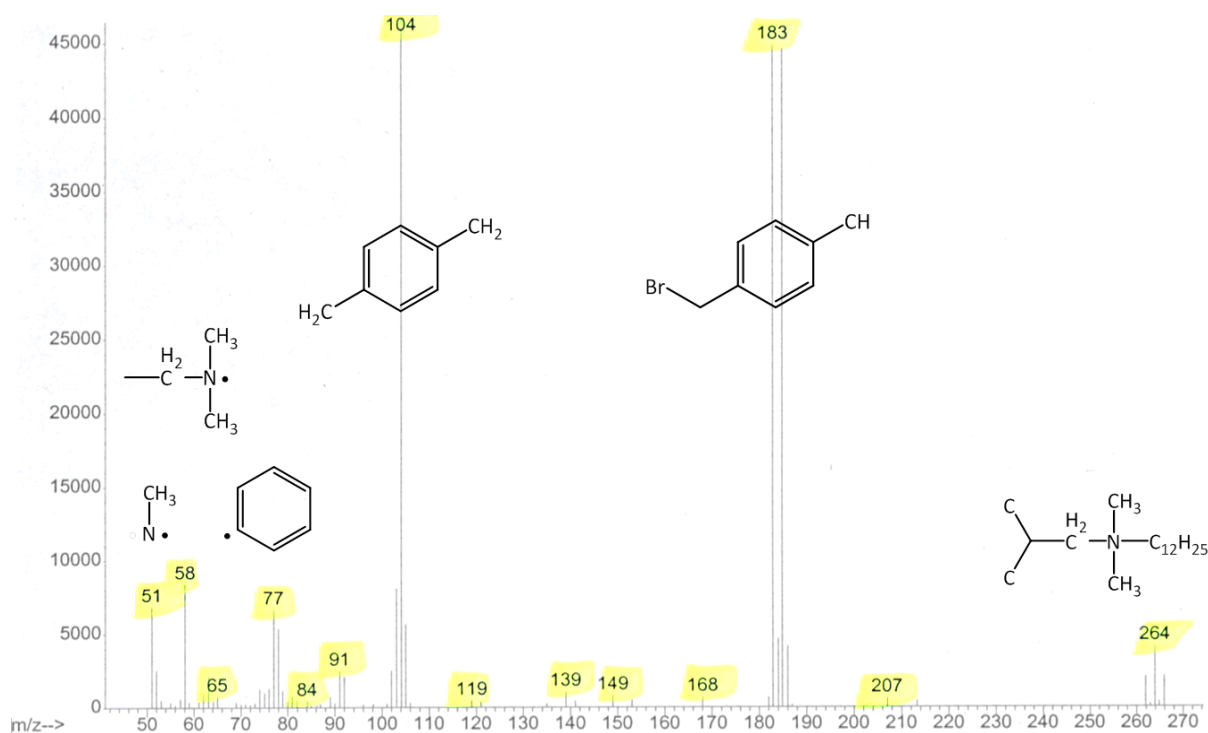


Abb.3.6: GC-MS Spektrum des antimikrobiellen Initiators DDA-X, aufgenommen in Toluol inklusive einer Zuordnung der wichtigsten, strukturelevanten m/z -Fragmente. Die Ordinate wurde, bezogen auf den intensivsten Peak ($m/z = 104.1$), auf 100% skaliert. Die an die Signale angefügten Zahlenwerte stellen die auf eine Kommastelle aufgerundeten m/z -Werte einzelner Radikalkationen dar.

3.1.6 Mikrowellengestützte Synthesen der telechelen Polyoxazolinsysteme

Die Pioniere der mikrowellengestützten Herstellung von Polyoxazolinen mittels der Lebend Kationischen Ringöffnenden Polymerisation (CROP), HOOGENBOOM, SCHUBERT, RITTER *et al.*,^{121, 136-139} empfehlen Acetonitril als das am Besten hierfür geeignete Lösungsmittel. Das Hauptargument hierfür waren die damit realisierbaren, höheren Umsatzgeschwindigkeiten.^{139, 140}

Dennoch wurden alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung der Mikrowellentechnik hergestellten telechelen, antimikrobiell ausgerüsteten Polyoxazoline, in trockenem, überhitztem Chloroform (CHCl_3) synthetisiert.

Hierfür gab es mehrere wichtige Gründe (vgl. Diskussion in **Kap.3.1.2**): zunächst hat sich CHCl_3 im Arbeitskreis als Lsm. in der konventionellen PROX-Synthese (Ölbadheizung) tausendfach bewährt.^{34, 73-76, 132, 133} Weiterhin war CHCl_3 , in Vergleich zu AcCN deutlich schneller und zuverlässiger zu trocknen. Unter dem Aspekt der anschließenden Evaluierung der antimikrobiellen Wirksamkeit mussten jegliche Lsm.-Spuren im untersuchten Produkt ausgeschlossen werden.

Die vollständige Entfernung von CHCl_3 aus den Polyoxazolinen gelang recht einfach durch eine mehrstündige Evakuierung am Feinvakuum (mindestens 16 h, $p < 1 \cdot 10^{-3}$ mbar), zur vollständigen Entfernung von AcCN aus den Polymeren bedurfte es zusätzlich einer mehrtägigen (> 3 d), wässrigen oder methanolischen Dialyse.

Der wichtigste Grund zur Nutzung von CHCl_3 bei der MW-gestützten PROX-Synthese war jedoch seine bessere Eignung zur quantitativen Einführung von funktionellen Gruppen während der Initiierung. Eine Modellpolymerisation von 2-Methyloxazolin unter Verwendung von Benzylbromid ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{Br}$)⁹ als einen gut NMR-detektierbaren, aromatischen Initiator in Acetonitril ergab zwar ein eng verteiltes, monomodales Polymer der angestrebten mittleren Molmasse M_p (bestimmt via GPC). Laut NMR-Auswertung enthielten aber nur ca. 70 % aller Polymerketten eine benzyliche Funktionalisierung.

⁹ Die Modellpolymerisationen von MOX mit Benzylbromid als Initiator wurden durchgeführt und ausgewertet von C. Krumm, Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften, TU Dortmund.

Wurde dieselbe Modellpolymerisation unter analogen Bedingungen in CHCl_3 als Solvens durchgeführt, wurde wiederum ein eng verteiltes, monomodales Polymer der angestrebten mittleren Molmasse M_P erhalten, diesmal waren aber mehr als 95% aller Polymerketten benzylich funktionalisiert.

Bei der Verwendung des antimikrobiellen Initiators DDA-X zur Polymerisation entsprechend funktionalisierter Polymethyloxazoline (DDA-X-PMOX) in AcCN wurden ebenfalls Voruntersuchungen durchgeführt. Bei derselben Umsetzungstemperatur (100°C, 2 h) lagen bereits ca. 20 % der PMOX-Ketten unfunktionalisiert vor, selbst bei einer Herabsetzung der Temperatur (80°C, 6h) wurden ca. 6 % an Kettenübertragungsprodukten beobachtet (per $^1\text{H-NMR}$).

Somit wurde CHCl_3 bei der Etablierung der MW-gestützten Synthese zum Lsm. der Wahl bestimmt und hierfür weiter optimiert.

Im Folgenden soll auf die Bestimmung der optimalen Zeit- und Temperaturparameter für die MW-Synthesen telecheler, antimikrobieller Poly-2-oxazoline in CHCl_3 unter Initiierung mit DDA-X, eingegangen werden.

3.1.7 Bestimmung der optimalen Zeit- und Temperaturparameter für MW-gestützte, DDA-X initiierte Polyoxazolinsynthesen in Chloroform

Zur Bestimmung der thermischen Belastbarkeit des antimikrobiellen Initiators und seiner Eignung zur Polymerinitiation bei höheren Umsetzungstemperaturen in überhitzten Chloroform ($> 61^\circ\text{C}$) wurde eine TG-Analyse unter synthetischer Luft durchgeführt. Dabei wurde für DDA-X Zerfallstemperatur von $\theta = 230 \pm 2^\circ\text{C}$ ermittelt.

In weiteren Versuchsreihen wurden die optimalen Zeit- und Temperaturparameter zur CROP-Polymerisation von drei unterschiedlichen 2-R-Oxazolinmonomeren mit DDA-X als Initiator und CHCl_3 als Lsm. bestimmt. Bei den einzelnen Monomeren handelte es sich um 2-Methyl- (MOX), 2-Ethyl- (EOX) sowie um 2-*iso*Propyl- (*i*PrOX)-oxazolin. Das hierbei eingestellte Molekulargewicht betrug jeweils $M_P = 3,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, alle Polymere wurden im $m_{\text{Monomer}} = 3.0 \text{ g}$ Maßstab und einer maximalen MW-Leistung von $P_{\text{max}} = 300 \text{ W}$ in CHCl_3 (12.0 mL) hergestellt.

In **Tab.3.1** sind die erhaltenen Ergebnisse für die MOX-Untersuchungsreihe inklusive der nach ARRHENIUS ermittelten Beschleunigungsfaktoren zusammengefasst. Diese wurden bezogen auf die Starttemperatur ($\theta = 60^\circ\text{C}$), die der Umsetzungstemperatur der bisherigen, mittels Ölbad beheizten PMOX-Synthesen entsprach, berechnet.^{73, 76} Bei Temp. von mehr als 120°C wurden Nebenreaktionen wie beispielsweise β -H-Eliminierungen^{141, 142} beobachtet. Eine anschließende, quantitative Bestimmung der unfunktionalisierten Gewichtfraktion mittels Gelpermeationschromatografie (GPC) ergab bei Umsetzungstemperaturen unterhalb 110°C kein polymeres Nebenprodukt: Bei 120°C wurden jedoch 3 Gew.%, bei 130°C 5 Gew.% und bei 140°C mehr als 10 Gew.% einer unfunktionalisierten Gewichtfraktion vorgefunden.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des bei 140°C hergestellten PMOX fanden sich, trotz der sehr kurzen Polymerisationsdauer von 18 min deutliche, unspezifische Fremdsignale, die auf unerwünschte Nebenreaktionen deuteten.

Tab.3.1: Übersicht der Reaktionszeiten, der Beschleunigungsfaktoren sowie der Nebenproduktanteile bei verschiedenen Reaktions-Temperaturen der MW-gestützten MOX-Polymerisation ($M_P = 3,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 3.0 g), initiiert mit DDA-X (CHCl_3 , 12.0 mL).

Temperatur ^a	Dauer ^b	Beschleunigung ^d	Nebenprodukt ^e
[°C]	[h]	[x-fach]	[Gew.%]
60	72 ^c	-	0
70	35	2.1	0
80	17	4.2	0
90	8.5	8.5	0
100	4.0	18	0
110	2.0	36	0
120	1.0	72	3
130	0.5	144	5
140	0.3	240	> 10 ^f

[a] Überwacht während der gesamten Reaktionsdauer mittels IR-Sensor des MW-Gerätes, [b] Festgelegt nach vollständigem Umsatz an Monomer, [c] Bekannte und bewährte Reaktionsdauer bei konventioneller Ölbadbeheizung, [d] Bezogen auf Umsetzungsdauer bei 60°C (72 h), [e] Ermittelt aus GPC- und $^1\text{H-NMR}$ -Analytik, [f] $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum enthielt deutliche, nicht-produktspezifische Signale.

Die hierbei auftretenden β -H-Eliminierungen^{141, 142} führten am PMOX-Kettenende zu ungeladenen Enamin-Terminals,¹⁴³ die nicht weiter mittels einer Terminierung funktionalisierbar waren. Durch die daraus resultierenden, reaktiven Protonen (H^+) wurden weitere, nicht-DDA-X-funktionalisierte PMOX-Ketten verzögert initiiert, was die Molekulargewichtsverteilung (PDI) der Polymere unnötig verbreitete. In **Abb.3.7** ist die thermisch bedingte Enamin-Nebenreaktion am Beispiel von PMOX dargestellt.

Um Neben- und Kettenübertragungsprodukte möglichst vollständig auszuschließen, wurde die Reaktions-Temperatur für MOX in überhitztem $CHCl_3$ auf $100^\circ C$ festgelegt. Die optimalen Umsetzungstemperaturen für die anderen beiden eingesetzten Oxazolin-monomere EOX und *i*PrOX wurden analog zu $120^\circ C$ bzw. $140^\circ C$ ermittelt.

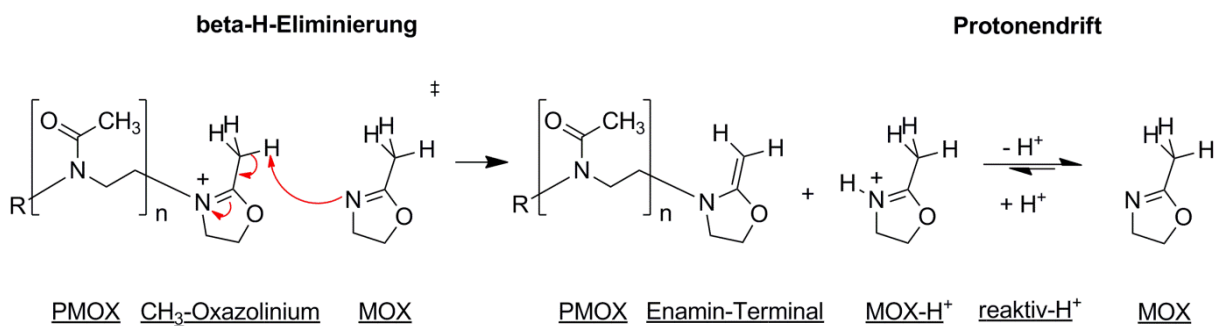


Abb.3.7: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus einer β -H-Eliminierung^{141, 142} an lebenden PMOX-Oxazoliniumterminalen unter Ausbildung eines unerwünschten Enamin-Terminals (E) sowie eines reaktiven Protons (H^+).

Alle Reaktionen wurden zunächst mit einer Gesamtdauer von 4 h betrieben ($M_p = 3,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, $m_{\text{Monomer}} = 3.0 \text{ g}$); bei der Polymerisation von *i*PrOX wurde erst nach 6.0 h ein vollständiger Umsatz beobachtet. Dessen Bestimmung erfolgte durch die Auswaage des bei der Aufarbeitung zurückerhaltenen Restmonomers (nach dem Einengen aller Lsm.-Fraktionen am Rotationsverdampfer). In **Tab.3.2** wurden alle so ermittelten Zeit (t)/-Temperatur(T)-Parameter für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Monomersorten MOX, EOX und *i*PrOX zusammengefasst.

Tab.3.2: Ermittelte Temperatur-Zeit-Parameter zur Polymerisation der verwendeten, drei Monomersorten MOX, EOX und *i*PrOX; als Initiator wurde stets DDA-X, als überhitztes Lsm. CHCl₃ (12.0 mL) eingesetzt ($M_P = 3,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $m_{\text{Monomer}} = 3.0 \text{ g}$).

Monomersorte	Reaktions-Temperatur ^d	Reaktions-Dauer ^d
-	[°C]	[h]
MOX ^a	100	4.0
EOX ^b	120	4.0
<i>i</i> PrOX ^c	140	4.0

[a] 2-Methyloxazolin, [b] 2-Ethyloxazolin, [c] 2-*iso*Propyloxazolin, [d] In dieser Kombination wurden keine Neben- oder Kettenübertragungsprodukte beobachtet.

3.1.8 Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante k_P der MW-gestützten, DDA-X initiierten Poly-2-methyloxazolin-Synthese in Chloroform

Hierzu wurde eine Reihe von DDA-X-initiierten MOX-Polymerisationen angesetzt; analog zu den vorangehenden Experimenten wurde ein Molekulargewicht von $M_P = 3,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ aus einer Monomereinwaage von $m_{\text{Monomer}} = 3.0 \text{ g}$ eingestellt. Die Reaktionen wurden bei 100°C in CHCl₃ (12.0 mL) in einer Synthesemikrowelle ($P_{\text{max}} = 300 \text{ W}$) durchgeführt und nach definierten Zeiten ($t = 0.5, 1, 2$ und 3 h) vorzeitig abgebrochen. Anschließend wurde das entstehende Polymer durch Umfällen aufgereinigt und alle hierzu benötigten Lsm.-Fraktionen vorsichtig am Rotationsverdampfer bis zur Gewichtskonstanz eingengt. Aus der Masse des so erhaltenen, flüssigen Monomers MOX wurde dessen Restkonzentration im Polymeransatz, $[M]_t$ berechnet.

Die zu Beginn der Polymerisation zugesetzten Startkonzentration an MOX $[M]_0$ wurde unter der Annahme einer Kinetik 1.Ordnung (vgl. **Kap.1.3.2**) mit der Restkonzentration $[M]_t$ in Verhältnis gesetzt:

$$\ln ([M]_0 \cdot [M]_t^{-1}) = k_P \cdot [I]_0 \cdot t \quad (3.1)$$

Die in **Gl.3.1** aufgeführte Größe $[I]_0$ war die Konzentration des Initiators DDA-X, $([M]_0 \cdot [M]_t^{-1})$ war das Verhältnis der zeitabhängigen Monomerkonzentration zur Startkonzentration; k_P war die gesuchte Geschwindigkeitskonstante der Reaktion.

In **Abb.3.8** wurde $\ln([M]_0 \cdot [M]_t^{-1})$ als Funktion der Reaktionszeit t aufgetragen.

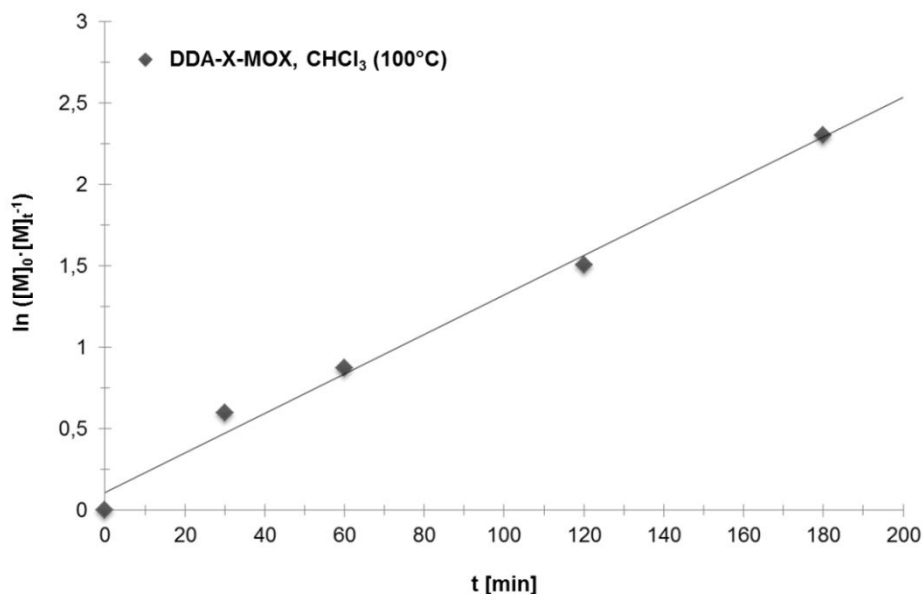


Abb.3.8: Auftragung des Verhältnisses der Monomerkonzentrationen $\ln([M]_0 \cdot [M]_t^{-1})$ an MOX (an der Ordinate) als Funktion der Reaktionszeit t (an der Abszisse); $R^2 = 0.9896$. Die Reaktion wurde in überhitztem CHCl_3 bei 100°C mit DDA-X als Initiator durchgeführt und zeigte eine Kinetik 1. Ordnung.¹³⁶ Die Linie repräsentiert eine Lineare Regression an den experimentell ermittelten Datenpunkten (grau).

Die nach **Gl.3.1** für dieses Polymerisationssystem ermittelte Geschwindigkeitskonstante k_p betrug $2.93 \pm 0.17 \times 10^{-3} \text{ [L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$ und ermöglichte eine präzise Beschreibung der optimalen Zeit-Temperatur-Parameter bei gegebener Monomer- $[M]_0$ und Initiatorkonzentration $[I]_0$ zu Beginn der Polymerisation. Die Reaktionszeiten t für die Darstellung von DDA-X-PMOX-Systemen bei vollständigem Umsatz konnten damit noch weiter angepasst/verringert werden. Alle im folgenden vorgestellten PROX wurden in überhitztem CHCl_3 (12.0 mL; 100°C) innerhalb von 2 ($\text{DP}_{\text{set}} = 20$) bis 16 Stunden ($\text{DP}_{\text{set}} = 80$) hergestellt. Nach erfolgter Terminierung wurden so, unter effektiver Ausnutzung der Mikrowellenheiztechnik, in weniger als zwei Tagen vollständig funktionalisierte, heterogen-telechele Poly-2-methyloxazoline erhalten.

3.1.9 Scale-Up der mikrowellengestützten Poly-2-oxazolinsynthesen

Die eingesetzten Labormikrowellen waren herstellerseitig für den Betrieb mit Glasphiolen (10 mL) oder Rundkolben (max. 50 mL) ausgelegt.

Mit den bereits diskutierten Syntheseparametern (Lsm.-, Initiator- und Monomerkonzentrationen und Volumina) waren die maximalen Ansatzgrößen damit zunächst auf 3.0 g pro Charge beschränkt. In einer ersten Stufe wurden, durch die Verwendung SCHOTT-Flaschen (50 mL) als Reaktionsgefäße, Produktausbeuten von maximal 5.0 g zugänglich. Für eine weitergehende Erhöhung der Chargengrößen waren Umbauarbeiten am Garraum der Mikrowellengeräte in Form gefäßspezifischer Ringadapter notwendig. Diese sollten die Verwendung größerer Reaktionsgefäße bei gleichzeitigem Erhalt aller Geräte- und Sicherheitsfunktionen ermöglichen. Die maximale Kapazität des Mikrowellengarraums wurde mit 250 mL SCHOTT-Flaschen erreicht, dabei handelte es sich um zylindrische, bedingt druckfeste Glasbehälter aus Borosilikatglas mit Schraubverschlüssen aus thermostabilem Kunststoff. In **Abb.3.9** sind die eingesetzten Geräte inklusive der variablen Garraumadapter dargestellt.

Während der Synthesen der telechelen Poly-2-oxazoline bei Temperaturen weit über dem Sdp. des als Lsm. eingesetzten Chloroforms (61.5°C) traten in geschlossenen Glasgefäßen erwartungsgemäß Überdrücke auf, weshalb diese wie Syntheseautoklaven mit allen zugehörigen Vorsichtsmaßnahmen behandelt wurden.



Abb.3.9^h: Skizzen der eigens hergestellten, variablen Garraumadapter (aus Aluminium) sowie zugehörige, für PROX-Synthesen eingesetzten Mikrowellengeräte.

Anhand der Kesselformel ließen sich über den Innendruck p die axialen und tangentialen Spannungsbelastungen σ_a/σ_t eines dünnwandigen (Aussendurchmesser d_A ; Innendurchmesser $d_i^{-1} < 1.2$), zylindrischen Behälters der Wanddicke s als Funktion des mittleren Zylinderdurchmessers angeben (vgl. **Gl.3.2**).

^h Alle Modifikationsarbeiten wurden fachmännisch durchgeführt von der mechanischen Werkstätten der TU Dortmund (BCI) unter Aufsicht von Hr. T. Moll.

$$\sigma_{\text{ax}} = p \cdot d \cdot 4s^{-1} \quad \sigma_{\text{tan}} = p \cdot d \cdot 2s^{-1} \quad \sigma_{\text{tan}} \cdot \sigma_{\text{ax}}^{-1} = 2 \quad (3.2)$$

Die tangentielle Spannung σ_t in einem zylindrischen Reaktionsgefäß betrug das Doppelte der axialen Spannung σ_a ; sie war zudem proportional zum Durchmesser d und umgekehrt proportional zur Wanddicke s des Behälters. Daher wurden die zur Verwendung angedachten, größeren 250 mL SCHOTT-Flaschen ($d_A = 70$ mm) bei gleichem Innendruck p und vergleichbarer Wandstärke s deutlich stärker belastet als die kleineren, zuvor eingesetzten 50 mL SCHOTT-Flaschen ($d_A = 46$ mm). Somit wurde beim Scale-Up der MW-gestützten Poly-2-oxazolinsynthesen auf druckresistentere, 250 mL SCHOTT-Flaschen (Duran[®] pressure plus) zurückgegriffen. Zudem wurden die Polymerisationstemperaturen zu Lasten der Umsetzungsdauer weiter reduziert. Die jeweils als sicher abgeschätzte Reaktionstemperatur für ein Reaktionsvolumen V wurde bei den Polymersynthesen um weitere 5 K verringert. Alle Kombinationen aus Gebindegröße/Reaktionsvolumen wurden vor Beginn der Polymersynthesen mit reinem CHCl_3 getestet. In **Tab.3.3** sind die bewährten Gebinde/Volumen-Kombinationen zur Polymerisation telecheler DDA-X-PMOX mit einem eingestellten Molekulargewicht von $3,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($\text{DP}_{\text{set}} \approx 30$) aufgelistet.

Tab.3.3: Experimentell bewährte Zeit-Temperatur-Parameter der MW-gestützten, CROP von 2-Methyl-1,3-oxazolin in Glasbinden unterschiedlicher Volumina. Als Initiator wurde DDA-X verwendet, das Lsm. war CHCl_3 . Das eingestellte Molekulargewicht der Verbindung DDA-X-PMOX betrug $3,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($\equiv \text{DP}_{\text{set}} \approx 30$).

Ansatzgröße ^a	Gefäßvolumen ^b	Reaktionstemperatur ^c	Umsetzungsdauer ^d
[g]	[mL]	[°C]	[h]
1.0	10	100	3.5
3.0	50	100	4.0
6.0	50	95	6.0
12	250	90	9.0
21	250	85	14.5
25	250	85	16.0
30	250	80	20.0

[a] Bezogen auf die Gesamtmasse an Monomer pro Charge, [b] 10 mL: Glasviolen mit Septum, 50 und 250 mL: SCHOTT-Glasflaschen aus Duran[®]-Borosilikatglas, [c] Über die gesamte Reaktionsdauer, [d] Experimentell bestimmt für einen vollständigen Umsatz.

Nach erfolgter Geräteanpassung und Adaption der Zeit- und Temperaturparameter and die benötigten Gebindevolumina waren Ansatzgrößen bis max. 30 g an MOX-Monomer pro Charge zugänglich. **Abb.3.10** zeigt das Scale-Up der drei genutzten Synthesgefäße (10-250 mL) und der damit realisierten PMOX-Produktchargen.



Abb.3.10: Scale-up der eingesetzten Glasgefäße für die MW-Synthese (10-250 mL, links) und die daraus gewonnenen Produktchargen an DDA-PMOX (1-21 g, rechts).

3.1.10 Analytik der telechelen, DDA-X-initiierten Poly-2-methyloxazolinsysteme

In einer ersten Syntheseriehe wurden insgesamt dreizehn telechele Polymethyloxazoline der Klasse DDA-X-PMOX_n-T unter Verwendung des antimikrobiellen Initiators DDA-X in Chloroform bei 100°C hergestellt und mittels ¹H-/¹³C-NMR und GPC vollständig charakterisiert (#1-13). In allen Fällen wurden definierte Polymere mit einer engen Molmassenverteilung erhalten.

Die zugehörigen Polydispersitätsindizes (PDIs) lagen im Bereich von 1.14 bis 1.28 und damit im typischen Bereich Kationisch Lebender Ringöffnender Polymerisationen, die mit dem selbst-synthetisierten, antimikrobiellen Initiator DDA-X durchgeführt wurden.⁷⁶ Im Vergleich mit MeOTs-oder Methyltriflat-initiierten, unfunktionalisierten PMOX-Systemen, die üblicherweise im Bereich von 1.10¹⁴⁴ bis 1.22^{111, 145} lagen, waren die unter Einsatz von DDA-X erhaltenen PDIs leicht erhöht. Im Vergleich zu anderen, chemisch nur unwesentlich komplexeren Initiatoren, die PDI-Werte um 2.02 bei ansonsten relativ kurzkettigen (DP_{GPC} = 22) PMOX erzeugten,¹⁴⁶ konnten die hierbei erhaltenen PDIs als vertretbar angesehen werden. In **Tab.3.4** finden sich die analytischen Kenndaten der DDA-X initiierten, heterogentelechelen Polymethyloxazoline **#1-13** inklusive ihrer variierten, terminalen Satellitengruppen (-OH, -EDA, -DDA sowie -AMA; vgl. **Kap.3.2.1**).

Tab.3.4 Analysedaten der heterogen-telechelen Polymethyloxazoline PMOX-; hergestellt in einer Mikrowellensynthese in überhitztem CHCl_3 bei 100°C .

#	Struktur	$\text{DP}_{\text{set}}^{\text{a}}$	$M_{\text{NMR}}^{\text{b}}$	$\text{DP}_{\text{N}}^{\text{c}}$	M_{n}^{d}	M_{w}^{d}	$\text{DP}_{\text{G}}^{\text{e}}$	PDI^{f}	Y^{g}	$f_{\text{i}}/f_{\text{T}}^{\text{h}}$
			[g·mol ⁻¹]		[g·mol ⁻¹]	[g·mol ⁻¹]				[g·mol ⁻¹]
1	DDA-X-PMOX ₂₃ -OH	20	2,400	22	1,800	2,050	21	1.14	86	n. d. ⁱ
2	DDA-X-PMOX ₃₅ -OH	30	3,400	35	3,600	4,200	37	1.15	90	n. d. ⁱ
3	DDA-X-PMOX ₄₈ -OH	50	4,600	48	4,600	5,400	49	1.16	84	n. d. ⁱ
4	DDA-X-PMOX ₇₇ -OH	70	7,050	77	6,700	8,000	73	1.19	92	n. d. ⁱ
5	DDA-X-PMOX ₃₅ -EDA	30	3,400	35	3,600	4,200	37	1.15	86	> 94 ^j
6	DDA-X-PMOX ₄₈ -EDA	50	4,600	48	4,600	5,400	49	1.16	81	> 94 ^j
7	DDA-X-PMOX ₈₁ -EDA	60	7,400	81	5,800	7,000	63	1.20	90	> 90 ^j
8	DDA-X-PMOX ₇₇ -EDA	80	7,100	77	6,700	8,000	73	1.19	89	> 92 ^j
9	DDA-X-PMOX ₂₃ -DDA	20	2,650	23	2,400	2,800	20	1.15	79	96
10	DDA-X-PMOX ₃₁ -DDA	30	3,350	31	3,300	3,900	31	1.16	81	94
11	DDA-X-PMOX ₃₇ -DDA	30	3,850	37	3,300	4,300	31	1.28	85	90
12	DDA-X-PMOX ₅₃ -DDA	50	5,200	53	5,100	6,400	52	1.25	89	92
13	DDA-X-PMOX ₂₈ -AMA	20	3,000	28	2,700	3,200	24	1.19	82	94

[a] Berechnet aus dem $[\text{M}_0]\cdot[\text{DDA-X}]^{-1}$ -Verhältnis mit Umsatzzeiten zwischen 2 h ($\text{DP}_{\text{set}} = 20$) und 16 h ($\text{DP}_{\text{set}} = 80$), [b] Der Polymerisationsgrad im NMR wurde berechnet aus dem Integralverhältnis des charakteristischen Initiatorsignals bei 0.84 ppm (t, 3H, $-\text{CH}_3$) vs. dem Mittelwert des PMOX-Rückgratsignals bei 3.3 ppm (b, n-4H, $\text{N}(\text{CH}_2)_2$) und 2.0 ppm (b, n-3H, NCOCH_3), [c] Aus dem ^1H -NMR-Spektrum berechneter, mittlerer Polymerisationsgrad, [d] Ermittelt aus dem GPC-Eluogramm m Vergleich mit einer Kalibrierkurve, [e] Aus dem GPC-Eluogramm berechneter, mittlerer Polymerisationsgrad, [f] Polydispersitätsindex, bestimmt aus dem $(M_{\text{w}}/M_{\text{n}}^{-1})$ -Quotienten, [g] Produktausbeute in % nach vollständiger Aufreinigungsprozedur und mehrtägiger Dialyse; bestimmt durch Vergleich mit den Anfangseinwaagen von Initiator und MOX-Monomer, [h] Verhältnis der Initiierungs- (f_{i}) zur Terminierungsfunktionalisierung (f_{T}), [i] Aufgrund eines fehlenden $-\text{OH}$ -Signals im ^1H -NMR war der Grad der Terminierungsfunktionalisierung (f_{T}) nicht zuverlässig bestimmbar, [j] Bestimmt mit einem quantitativen Aminogruppenassay, basierend auf einen Charge-Transfer-Komplex zwischen den primären Aminogruppen des EDA-Terminals und 2,4,6-Trinitrophenol (TNP, Pikrinsäure).

Bei allen Polymeren stimmten die per ^1H -NMR und GPC ermittelten Polymerisationsgrade (DP_{NMR} bzw. DP_{GPC}) gut mit den eingestellten Werten (DP_{set}) überein. Die Produktausbeuten lagen, trotz aufwendiger Umfällprozedur und einer mehrtägigen Dialyse, im Bereich von 79–92 % der Theorie. Im Falle der OH-Terminierung **#1-4** wurde im ^1H -NMR-Spektrum selten und nur unter Verwendung von DMSO-d_6 ein breites Singulett um 4.0 ppm beobachtet. Der Grad der OH-Terminierung (f_{T}) war daher nicht zuverlässig bestimmbar. Im Falle der Terminierung mit Ethylendiamin (EDA) waren die zugehörigen Signale **#5–8** von den Signalen des PMOX-Rückgrats verdeckt und wurden in $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ nicht und in DMSO-d_6 nur selten vorgefunden.

Abb.3.11 zeigt eines der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (DMSO- d_6 , 400 MHz), in dem die EDA-Terminierungsmittelsignale deutlich im Bereich von 2.50-2.75 ppm (Pos.22-24) zu erkennen waren. Alle weiteren, im Spektrum auftretenden Signale konnten ebenfalls eindeutig dem Produkt DDA-X-PMOX-EDA **#6** zugeordnet werden. Im tieffeldigen Bereich befanden sich die aromatischen Signale des antimikrobiellen Initiators DDA-X (7.60-7.10 ppm, Pos.15,16; 4H) sowie das sekundäre Ammoniumbromid der EDA-Gruppe (Pos.21; 1-2H). Weitere für DDA-X-initiierte PMOX wichtige Signale waren das Multiplett der beiden Ammoniumbromid-Methylgruppen bei 2.92 ppm (Pos.13; 6H), das Multiplett eines *n*-Alkylkettenbereichs bei 1.24 ppm (Pos.2-9; 18H) sowie das Triplet der endständigen, alkylichen Methylgruppe bei 0.84 ppm (Pos.1; 3H).

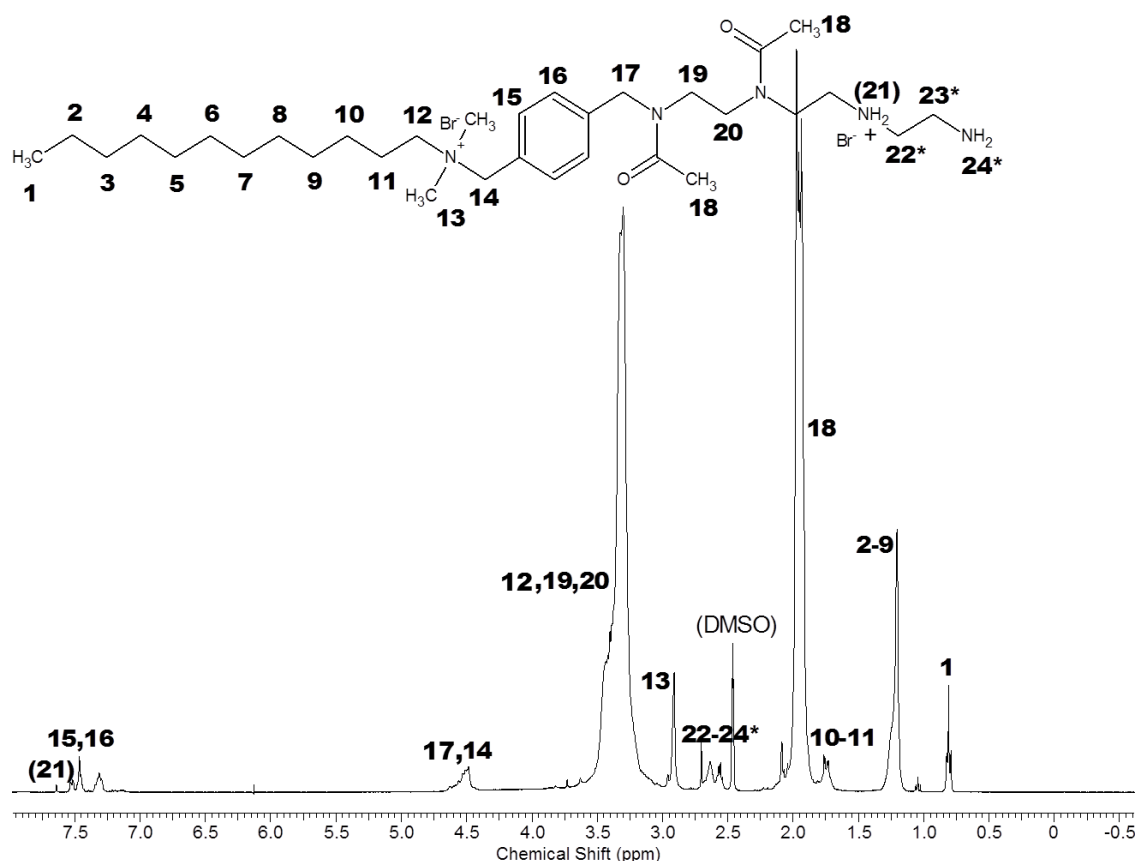


Abb.3.11: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des DDA-X initiierten, EDA-terminierten Poly-2-methyloxazolins (**#6**, DDA-X-PMOX₄₈-EDA) nach 6-fachen Umfällen in Et₂O aus CHCl₃ und 4-tägiger Dialyse in MeOH; aufgenommen in DMSO- d_6 bei 400MHz. * Die EDA-Signale (2.50-2.75 ppm, 6H) waren hier hinreichend vom Polymerückgratsignal (2.80-3.75 ppm) isoliert und daher auswertbar; dies war aber nicht bei allen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der DDA-X-PMOX-EDA-Klasse der Fall.

Im Vergleich zum $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des niedermolekularen DDA-X (vgl. **Abb.3.4**) waren die kopplungsnahen Positionen signifikant ins Hochfeld verschoben: die Signale der Methylgruppen-**Pos.13** um ca. 0.30 ppm, die Signale der Benzyl-**Pos.14** um ca. 0.60 ppm und die Signale der nun PMOX-nächsten Benzyl-**Pos.17** um mehr als 1.00 ppm. Diese Hochfeldverschiebung war auf die Substitution des elektronegativen Broms (Elektronegativität EN_P nach PAULING: Br = 3.0) durch das insgesamt weniger elektronegative PMOX-Rückgrat ($\text{EN}_\text{P}(\text{N}) = 3.0$; $\text{EN}_\text{P}(\text{C}_{\text{sp}3}) = 2.5$; $\text{EN}_\text{P}(\text{H}) = 2.2$) zurückzuführen und belegte so eine erfolgreiche Initiierung.

Die breiten Multiplettsignale des PMOX-Rückgrats befanden sich im Bereich um 3.65-3.00 ppm (**Pos.19,20**; $n\cdot 4\text{H}$), die 2-Methylgruppenreste bildeten das breite Multiplett um 2.15-1.85 ppm (**Pos.18**; $n\cdot 3\text{H}$).

Wegen den überwiegend fehlenden EDA-Signalen in den $^1\text{H-NMR}$ -Polymerspektren wurde ergänzend ein quantitativer Test auf Aminogruppen durchgeführt. Dieser basierte auf der selektiven Ausbildung eines Charge-Transfer-Komplexes zwischen der primären NH_2 -Funktion des EDA-Terminals und trockenem 2,4,6-Trinitrophenol (TNP). Nach Ablösung des aminisch angebondenen TNPs durch ein polares Lsm.-Gemisch (Methanol:Triethylamin, 1:1) wurde der Grad der NH_2 -Funktionalisierung (f_T) mittels UV/Vis-Absorptionsmessungen ($\lambda = 358 \text{ nm}$) an stark verd. Lsg. bestimmt. Als Referenz diente ein aminogruppenfreies, OH-terminiertes Polymethyloxazolin mit einer vergleichbaren Polymerkettenlänge (**#1-4**).

Dabei wurden NH_2 -Funktionalisierungsgrade in Höhe von 90-94 % ermittelt; der Bestimmungsfehler dieses colorimetrischen Verfahrens war allerdings, in Vergleich zu der integralbasierten Bestimmungsmethode ($^1\text{H-NMR}$), mit $\pm 7 \%$ recht hoch. In **Tab.3.4** sind daher die Mittelwerte der TNP- NH_2 -Bestimmung angegeben.

Im Fall der DDA- und AMA-terminierten PMOX **#9-13** wurde das Integralverhältnis zwischen Initiator- (f_i) und Terminalfunktionalisierung (f_T) anhand charakteristischer Initiator- und Terminierungsmittelpeaks im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestimmt. In allen Fällen wurden Funktionalisierungsgrade $> 90 \%$ erhalten. Dieses Verfahren soll im Folgenden anhand des telechelen, doppelbindungsfunktionalisierten Poly-2-methyloxazolins DDA-X-PMOX₂₈-AMA **#13** diskutiert werden.

In **Abb.3.12** ist zunächst das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Terminierungsmittels *N*-[3-(Dimethylamino)-propyl]-methacrylamid (AMA); aufgenommen nach zweifacher fraktionierter Destillation, zu sehen.

Alle im Spektrum auftretenden Signale konnten eindeutig AMA zugeordnet werden. Für die Verbindung charakteristische Signale waren die Doppelbindungssingulets bei 5.58 und 5.13 ppm (**Pos. 6_{cis}** und **6_{trans}**; je 1H), das Singulett der beiden *N,N*-Methylgruppen bei 2.10 ppm (**Pos. 1**) sowie der singulettähnliche Peak der doppelbindungsnahen Methylgruppe bei 1.78 ppm (**Pos. 7**).

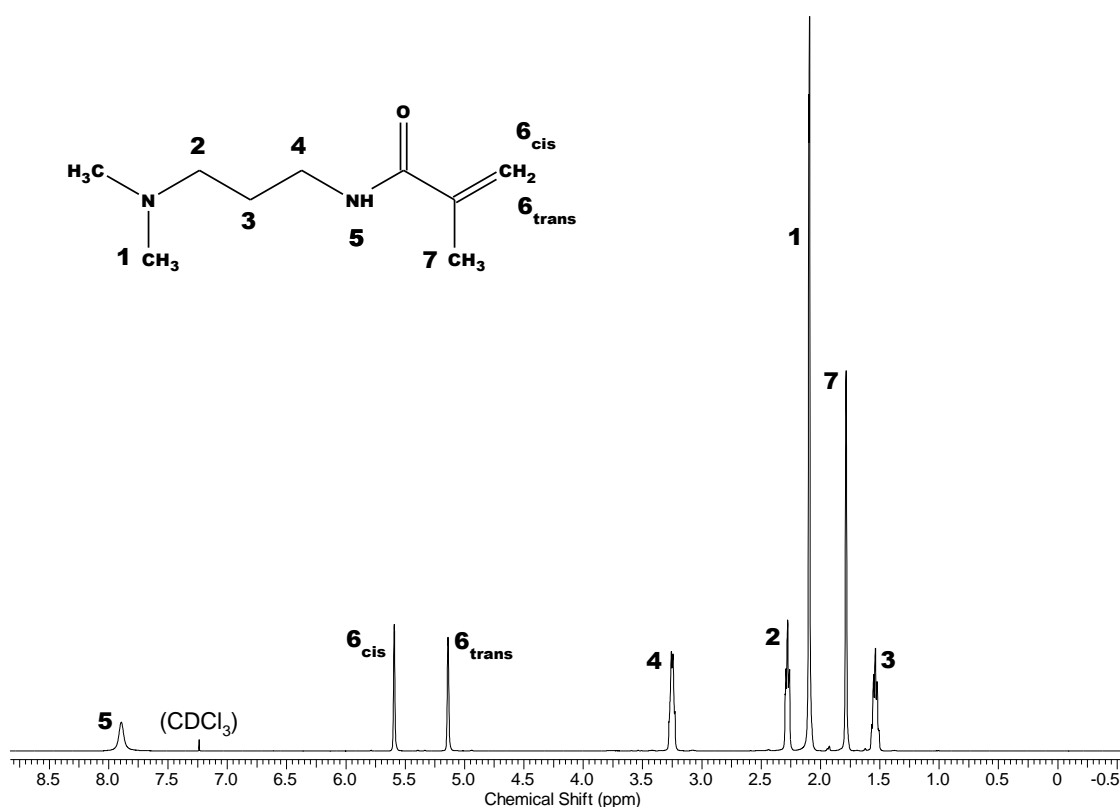


Abb.3.12: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des niedermolekularen Terminierungsmittels *N*-[3-(Dimethylamino)-propyl]-methacrylamid (AMA) nach zweifacher Destillation (über BHT; 0.05 Gew.%); aufgenommen in $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ bei 400MHz.

In **Abb.3.13** findet sich das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des zugehörigen AMA-terminierten, DDA-X-initiierten PMOX #13. Alle im Spektrum auftretenden Signale konnten eindeutig dem polymeren Produkt mit der Zielstruktur DDA-X-PMOX-AMA zugeordnet werden; der besseren Löslichkeit des Polymers wegen wurde das Spektrum in MeOH-d_4 aufgenommen.

Neben den bereits besprochenen DDA-X-PMOX-Signalpositionen finden sich die beiden AMA-Doppelbindungssignale bei 5.73 und 5.38 ppm (**Pos.26; 2H**) und der Peak der doppelbindungsnahen Methylgruppe (**Pos.27; 3H**) vollständig wieder, allerdings sind diese um ca. 0.10-0.15 ppm ins Hochfeld verschoben. Da diese Verschiebung bei allen Signalen des Spektrums beobachtet wurde, ist sie wahrscheinlich auf die Verwendung unterschiedlicher NMR-Lösungsmittel zurückzuführen ($\text{CHCl}_3\text{-d}_1$ vs. MeOH-d_4).

Da gleichzeitig mit der AMA-Funktionalisierung auch eine Quartärnisierung erfolgte, waren die Positionen der beiden *N,N*-Methylgruppen (**Pos.21; 6H**) um 1.08 ppm signifikant ins Tieffeld verlagert (von 2.10 nach 3.18 ppm).

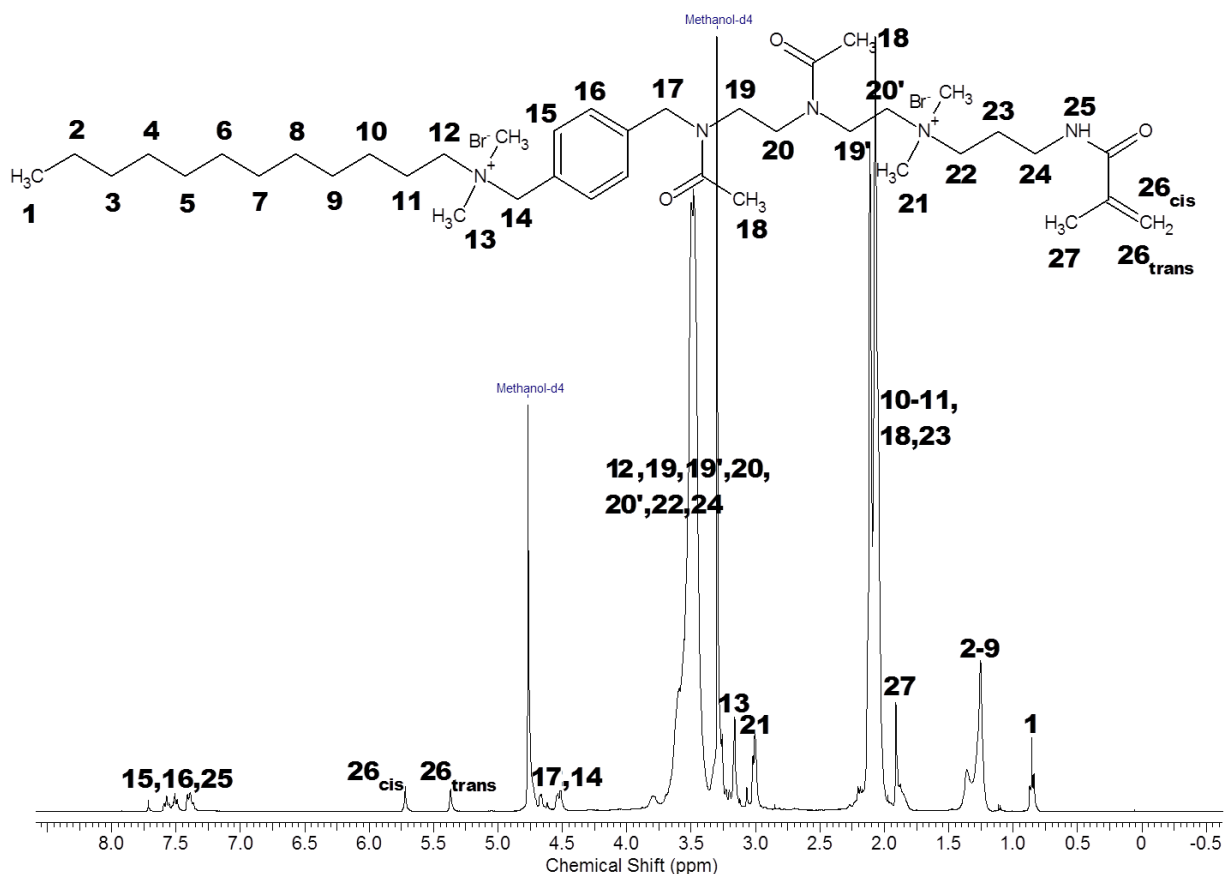


Abb.3.13: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des DDA-X initiierten, AMA-terminierten Poly-2-methyloxazolins DDA-X-PMOX₂₈-AMA nach 6-fachen Umfällen in Et_2O aus CHCl_3 und 4-tägiger Dialyse in MeOH ; aufgenommen in MeOH-d_4 bei 400MHz.

3.1.11 Synthese und Charakterisierung von telechelen Copolymeren aus 2-Methyl- und 2-*iso*Propyl-1,3-oxazolinen

Analog zu den bereits vorgestellten kationisch lebenden, ringöffnenden Polymerisationen (CROP) von 2-Methyl-1,3-oxazolinen (MOX) wurden die hydrophoberen, am Alkylrest R verzweigten 2-*iso*Propyl-1,3-oxazoline (*i*PrOX) mit DDA-X zu linearen, telechelen Poly-2-oxazolinen umgesetzt. Bedingt durch die geringere Umsetzungsgeschwindigkeit wurden diese zwar in Chloroform als Lösungsmittel, jedoch bei einer erhöhten Temperatur von 140°C hergestellt ($M_P = 3,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $m_{iPrOX} = 1.0 \text{ g}$; vgl. **Tab.3.3**). Zunächst wurde ein DDA-X-*i*PrOX-Homopolymer mit einer Polymerkettenlänge von $DP_{set} = 50$ Repetiereinheiten mikrowellengestützt polymerisiert. Mittels Ausfällversuchen mit Bestimmung des Restmonomergehalts (vgl. **Kap.3.1.8**) wurde nach einer Reaktionsdauer von 3.5 h ein vollständiger Umsatz ermittelt. In einem weiteren Schritt sollten mittels einer Eintopfsynthese Copolymere aus *i*PrOX und MOX erzeugt werden; dabei sollte das Verhältnis der beiden Monomersorten im finalen Poly-2-oxazolin 50:50 betragen. Das Ziel der Synthese war die Erhöhung der membranaktiven Potentials des QUART-basierten Kettenanfangs DDA-X an bakteriellen Zellmembranen. In **Tab.3.5** sind die analytischen Daten aller *i*PrOX-basierenden, in Chloroform bei 140°C 5 h lang unter Anwendung der Mikrowellen-Heiztechnik synthetisierten DDA-X-*Pi*PrOX_{*n*}/*PMOX*_{*m*}-Systeme zusammengefasst.

Tab.3.5 Analysedaten der telechelen Homo- und Copolymere aus MOX und *i*PrOX; hergestellt mittels Mikrowellensynthese in überhitzten CHCl₃ bei 140°C.

#	Struktur	DP _{set} ^a	M _N ^b	DP _N ^c	DP _{<i>i</i>PrOX}} ^d	DP _{MOX}} ^e	DP _G ^f	PDI ^g
			[g·mol ⁻¹]					
14	DDA-X- <i>Pi</i> PrOX ₄₉ -EDA	50	5,400	42	42	0	49	1.20
15	DDA-X- <i>Pi</i> PrOX ₁₂ -PMOX ₂₈ -EDA	25/25	4,200	40	12	28	47	1.25
16 _o	DDA-X- <i>Pi</i> PrOX ₆ -PMOX ₁₆ -EDA ^h	25/25	2,500	22	6	16	34	1.69
16 _u	DDA-X- <i>Pi</i> PrOX ₁₀ -PMOX ₂₀ -EDA ^h	25/25	3,300	30	10	20	38	1.74

[a] Berechnet aus dem $[M_0]\cdot[DDA-X]^{-1}$ -Verhältnis mit einer Umsatzzeit von 5 h und den Einwaagen der Monomersorten *i*PrOX/MOX, [b] Der Polymerisationsgrad im NMR wurde berechnet aus dem Integralverhältnis des charakteristischen Initiatorsignals bei 0.84 ppm (t, 3H, -CH₃) vs. dem Mittelwert der PROX-Rückgratsignale bei 3.3 ppm (b, *n*4H, N(CH₂)₂) und der R-Gruppensignale bei 2.7 ppm (b, *n*1H, NCOCH(CH₃)₂; *Pi*PrOX), 2.0 ppm (b, *n*3H, NCOCH₃; PMOX) und 1.1 ppm (b, *n*6H, NCOCH(CH₃)₂; *Pi*PrOX), [c] Aus dem ¹H-NMR-Spektrum berechneter, mittlerer Polymerisationsgrad des Gesamtpolymers, [d] Aus dem ¹H-NMR-Spektrum berechneter, mittlerer Polymerisationsgrad der *Pi*PrOX-Komponente, [e] Aus dem ¹H-NMR-Spektrum berechneter, mittlerer Polymerisationsgrad der PMOX-Komponente, [f] Aus dem GPC-Eluogramm berechneter, mittlerer Polymerisationsgrad des Gesamtpolymers, [g] Polydispersitätsindex, bestimmt aus dem $(M_w\cdot M_n^{-1})$ -Quotienten, [h] Beide Komponenten (16_u ≡ untere Phase, 16_o ≡ obere Phase); nach Aufarbeitung separat charakterisiert.

Die erhaltenen, DDA-X-initiierten Homo- (**#14**) und Copolymere (**#15-16**) auf *i*PrOX-Basis wurden mehrfach aus Chloroform in Diethylether umgefällt, anschließend 4 d lang gegen Methanol dialysiert (MWCO = 1,000 kDa) und mittels ¹H-/¹³C-NMR und GPC vollständig charakterisiert. In allen Fällen wurden definierte Polymere erhalten, deren Molmassenverteilung im Falle der Systeme **#14** und **#15** eng verteilt und monomodal war. Die zugehörigen Polydispersitätsindizes (PDI = 1.20-1.25) lagen im Bereich der DDA-X-initiierten Poly-2-methyloxazoline (vgl. **Tab.3.4**).

Der Ansatz **#15** wurde aus äquimolaren Mengen der beiden Monomerkomponenten *i*PrOX und MOX durchgeführt. Damit sollten im resultierenden Copolymer die gleichen Monomeranteile an MOX und *i*PrOX (50 : 50, je 25 Einheiten pro Kette) erzeugt werden. Obwohl die Charakterisierung mittels GPC ein monomodales, eng verteiltes Copolymer von etwa 47 Monomereinheiten ($\equiv DP_{GPC}$) belegte, wurde nach integralischer Auswertung des ¹H-NMR-Spektrums ein reduzierter Polymerisationsgrad von nur 40 Monomereinheiten ($\equiv DP_{NMR}$) vorgefunden. Darüberhinaus wurde der angestrebte Einbaugrad von 50 % *i*PrOX mit dem aus dem ¹H-NMR-Spektrum berechneten Wert von 33 % ($x_{iPrOX, NMR} = 0.33$, $y_{MOX, NMR} = 0.67$) nicht erreicht. Zudem wurden während der Aufarbeitung von **#15** deutliche Mengen der eingesetzten Monomere vorgefunden.

Da ein *i*PrOX:MOX-Gemisch im Falle von **#15** erstaunlicherweise langsamer polymerisierte als reines *i*PrOX (**#14**) unter denselben Bedingungen, wurde die Polymerisationsdauer im nachfolgenden Ansatz des analogen Copolymers **#16** um weitere 1.5 h verlängert.

Die vor der Polymerisation vollkommen homogenen, CHCl₃-löslichen Ansätze **#15** und **#16** entmischten sich nach erfolgter Polymerisation bei Raumtemperatur in zwei (**#15**) oder sogar drei (**#16**), davon eine bzw. zwei, CHCl₃-unlösliche Phasen (vgl. **Abb.3.14**). Der Ansatz des Copolymers **#16** wurde aufgrund seines Verhaltens in CHCl₃, in seine CHCl₃-unlöslichen Komponenten **#16_o** (\equiv kleinere, obere Phase) sowie **#16_u** (\equiv größere, untere Phase) aufgeteilt; diese wurden getrennt voneinander charakterisiert. Nach Erwärmung > 80°C wurden die Ansätze wieder löslich in CHCl₃.

Eine derartige, temperaturabhängige Phasentrennung ließ die Existenz einer oberen kritischen Entmischungstemperatur^{147, 148} in CHCl_3 vermuten. Bekannt bei P*i*PrOX war eine untere kritische Entmischungstemperatur (LCST-Verhalten) in H_2O .^{149, 150}

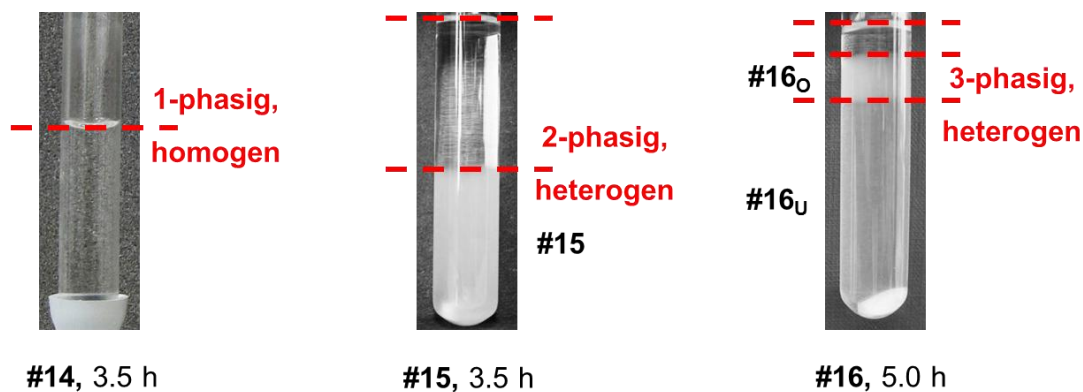


Abb.3.14: Fotografische Dokumentation der *i*PrOX-basierten Poly-2-oxazoline #14-#16 bei RT nach erfolgter MW-Polymerisation (3.5 – 5.0 h) in Chloroform bei 140°C.

Obwohl der Ansatz **#16** insgesamt 5 h lang bei 140°C polymerisiert wurde, stieg das P*i*PrOX-zu-PMOX-Verhältnis bei keinem der aus dem Ansatz gewonnenen, getrennt charakterisierten Copolymere **#16_O** oder **#16_T** an. Selbst im Falle der P*i*PrOX-reicheren, unteren Phase **#16_T** wurde der schon zuvor bei **#15** festgestellte Anteil von 33 % an P*i*PrOX ($x_{\text{P}i\text{PrOX}, \text{NMR}} = 0.33$, $y_{\text{MOX}, \text{NMR}} = 0.67$) nicht überschritten.

Der aus dem ¹H-NMR-Spektrum kalkulierte P*i*PrOX-Anteil des Copolymers der oberen Phase **#16_O** war mit 27 % noch geringer. Auffällig war zudem die erhebliche Reduzierung der mittleren Kettenlängen der telechelen, DDA-X-initiierten Copolymere in der Reihe **#16**.

In **Abb.3.15** findet sich das ¹H-NMR-Spektrum des Copolymers **#16_O**. Alle im Spektrum auftretenden Signale konnten eindeutig dem polymeren Produkt mit der Zielstruktur $\text{DDA-X-(P}i\text{PrOX)}_x\text{-(PMOX)}_y\text{-EDA}$ zugeordnet werden; der besseren Löslichkeit des Polymers wegen wurde das Spektrum in DMSO-d_6 aufgenommen.

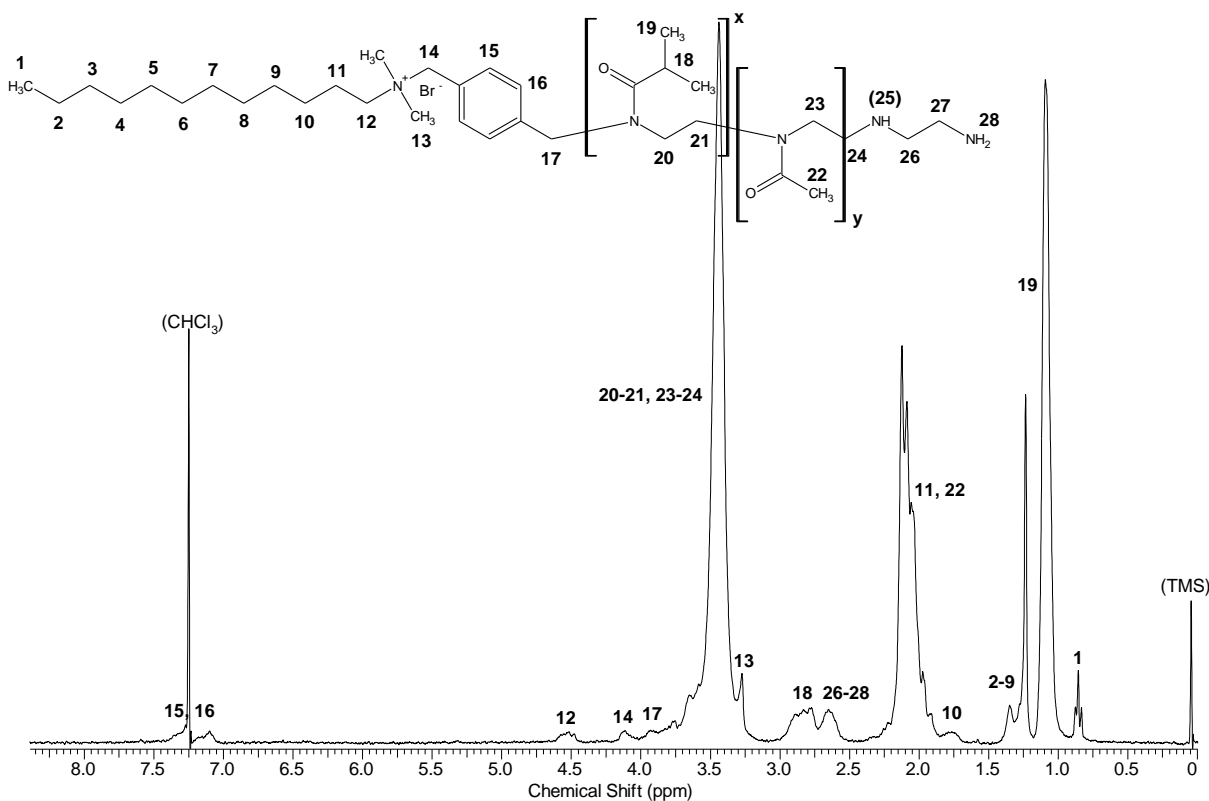


Abb.3.15: ^1H -NMR-Spektrum des DDA-X-initiierten, EDA-terminierten Copolymers #16_O DDA-X-P/PrOX₆-PMOX₁₆-EDA nach 6-fachen Umfällen in Et₂O aus CHCl₃ und 4-tägiger Dialyse in MeOH; aufgenommen in DMSO-d₆ bei 400MHz.

Bei einer Betrachtung der GPC-Elugramme der Proben #16_O/#16_U zeigte sich, im Vergleich mit dem kürzer synthetisierten #15 ($t_{\#15} = 3.5$ h vs. $t_{\#16} = 5.0$ h), eine signifikante Zunahme der Polydispersitätsindizes ($\text{PDI}_{\#15} = 1.25$, $\text{PDI}_{\#16} = 1.69 - 1.74$; vgl. **Tab.3.5**). sowie eine bimodale Form der Molekulargewichtsverteilung. Wahrscheinlich fanden bei 140°C und 5 h Polymerisationsdauer, ausgehend vom reaktiveren MOX, bereits Kettenübertragungsreaktionen statt (vgl. **Kap.3.1.7**).

Ein mögliches Indiz hierfür wäre, im Falle des Ansatzes #16, der Nachweis von Poly-2-methyl- und Poly-2-isopropylloxazolinen in der obersten, homogenen Phase der Glasphiole (vgl. **Abb.3.14**, rechts). Diese waren zwar löslich in CHCl₃, wiesen im zugehörigen ^1H -NMR-Spektrum keinerlei charakteristischen DDA-X-Signale auf. Da aber die heterogenen, in CHCl₃ ausgefallenen Copolymere #15 und #16_{O/U} eine quantitative Funktionalisierung mit DDA-X aufwiesen, wurden sie in nachfolgenden Untersuchungen auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit hin untersucht.

3.1.12 Bifunktionelle telechele Poly-2-ethyloxazoline als makromolekulare Linker zur Herstellung von amphiphilen Polymernetzwerken

Alle bislang vorgestellten Poly-2-oxazoline wurden entweder unter Verwendung des Vergleichsinitiators MeOTs (vgl. **Abb.1.16**) oder des QUART-basierten, selbst synthetisierten antimikrobiellen Initiators DDA-X hergestellt, (vgl. **Tab.3.4**).

Aber auch eines der Edukte von DDA-X, das aromatische *para*-1,4-Dibromxylo (*p*DBX, vgl. **Abb.1.14** & **Abb.3.3**) zeigte bei der initialen Bestimmung des Monomerumsatzes in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer, (vgl. **Kap.3.1.8**) eine ausreichend hohe Aktivität. Probeentnahmen einer MW-gestützten Polymerisation von MOX ($DP_{\text{set}} = 30$) mit *p*DBX als Initiator bei 100°C zeigten, im Vergleich zu analogen, mit DDA-X initiierten Systemen, eine um etwa 50 % erhöhte Umsatzgeschwindigkeit. Bei einem Transfer von MOX- zu EOX-Polymerisationen hat sich zudem eine Erhöhung der Reaktionstemperatur um 20 K bewährt (vgl. **Tab.3.2**).

Größere PROX-Ansätze sollten jedoch nur bei maximal 90°C polymerisiert werden (vgl. **Tab.3.3**). Aus diesem Grund fanden die nachfolgenden, *p*DBX-initiierten EOX-Polymerisationen (je 10.00 g/Charge) in CHCl_3 bei 90°C und erhöhten Umsetzungsdauern von 14 ($DP_{\text{set}} = 30$) bis 22 ($DP_{\text{set}} = 50$) Stunden statt.

Im Gegensatz zu den bisher verwendeten CROP-Initiatoren besitzt *p*DBX zwei ausreichend elektrophile, potentielle Abgangsgruppen (Br), so dass es beidseitig mit zwei Äquivalenten EOX (S_N2 -Reaktions) reagierte. Das Resultat waren „aus der Mitte heraus“ initiierte, zweiseitig kationisch geladene (lebende) α,ω -Dikationen.

Diese wurden nach der anschließenden Terminierung mit einem Methacrylamid (AMA) beidseitig mit je einer distalen Doppelbindung funktionalisiert. Der Reaktionsmechanismus zur Darstellung dieser bifunktionell-telechelen Poly-2-ethyloxazoline der Strukturklasse $\text{AMA-PEOX}_n\text{-}p\text{DBX-PEOX}_n\text{-AMA}$ findet sich in **Abb.3.16**.

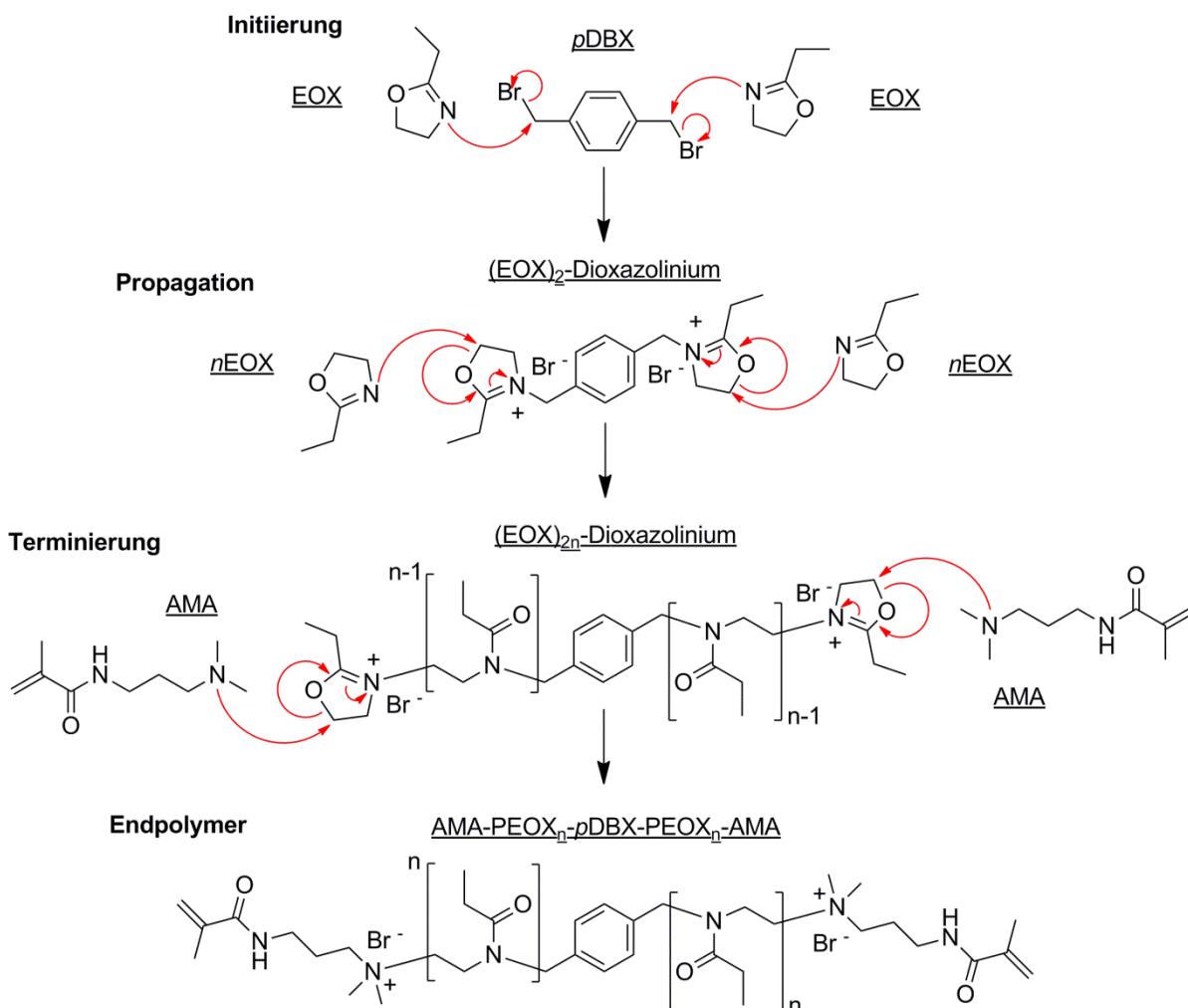


Abb.3.16: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus zur Darstellung telecheler Poly-2-ethyloxazoline unter Verwendung von *p*DBX als bifunktionellen CROP-Initiator sowie AMA als doppelbindungshaltiges Terminierungsmittel. Die resultierenden, bifunktionellen Polymere der Klasse $\text{AMA-PEOX}_n\text{-pDBX-PEOX}_n\text{-AMA}$ wurden erhalten nach einer MW-gestützten Synthese bei 90°C in CHCl_3 (14-22 h).

Unter Anwendung dieses Verfahrens wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit drei telechere, mit AMA-bifunktionalisierte Poly-2-ethyloxazoline unterschiedlicher Kettenlänge hergestellt **#17-19**, vgl. **Tab.3.6**. Das Molekulargewicht der Systeme **#17-19** wurde berechnet mittels integralischer Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektre und variierte von 3,300 bis 5,700 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Der Funktionalisierungsgrad an AMA wurde berechnet anhand des Integralverhältnisses charakteristischer NMR-Signale des Initiators *p*DBX f_i bei 4.5 ppm (Benzylpositionen) zu den Doppelbindungssignalen des Terminierungsmittels AMA f_T bei 5.8 (H_{cis}) und 5.3 ppm (H_{trans}), vgl. **Abb.3.17**.

Tab.3.6 Analysedaten der telechelen, bifunktionellen PEOX; hergestellt mit *p*DBX als Initiator in einer MW-Synthese in CHCl_3 bei 90°C ; beidseitig terminiert mit AMA.

#	Struktur	$\text{DP}_{\text{set}}^{\text{a}}$	$M_{\text{NMR}}^{\text{b}}$	$\text{DP}_{\text{N}}^{\text{c}}$	Y^{d}	$f_{\text{T}}/f_{\text{T}}^{\text{e}}$
			[g·mol ⁻¹]			
17	AMA-PEOX ₁₄ - <i>p</i> DBX-PEOX ₁₄ -AMA	30	3,300	28	90	93
18	AMA-PEOX ₂₂ - <i>p</i> DBX-PEOX ₂₂ -AMA	50	4,800	44	88	96
19	AMA-PEOX ₂₅ - <i>p</i> DBX-PEOX ₂₅ -AMA	50	5,700	50	89	94

[a] Berechnet aus dem $[\text{M}_0]:[\text{DDA-X}]^{-1}$ -Verhältnis mit Umsatzzeiten zwischen 14 h ($\text{DP}_{\text{set}} = 30$) und 22 h ($\text{DP}_{\text{set}} = 50$), [b] Der Polymerisationsgrad im NMR wurde berechnet aus dem Integralverhältnis des charakteristischen Initiatorsignale bei 4.5 ppm (m, 4H, CH_2ArCH_2) vs. dem Mittelwert aus den PEOX-Rückgratsignal um 3.4 ppm (b, $n \cdot 4\text{H}$, $\text{N}(\text{CH}_2)_2$) und den Seitengruppensignalen um 2.2 (b, $n \cdot 2\text{H}$, $\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$) und 1.0 ppm (b, $n \cdot 3\text{H}$, $\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$), [c] Aus dem ^1H -NMR-Spektrum berechneter, mittlerer Polymerisationsgrad, [d] Produktausbeute in % nach vollständiger Aufreinigungsprozedur und mehrtägiger Dialyse; bestimmt durch Vergleich mit den Anfangseinwaagen von Initiator *p*DBX und EOX-Monomer, [e] Verhältnis der Initiierungs- (f_{I}) zur Terminierungsfunktionalisierung (f_{T}), bestimmt aus dem Integralverhältnis der *p*DBX-Initiatorsignale bei 4.5 ppm (m, 4H, CH_2ArCH_2) vs. der AMA-Terminierungsmittelsignale bei 5.8 (H_{cis}) und 5.3 ppm (H_{trans}).

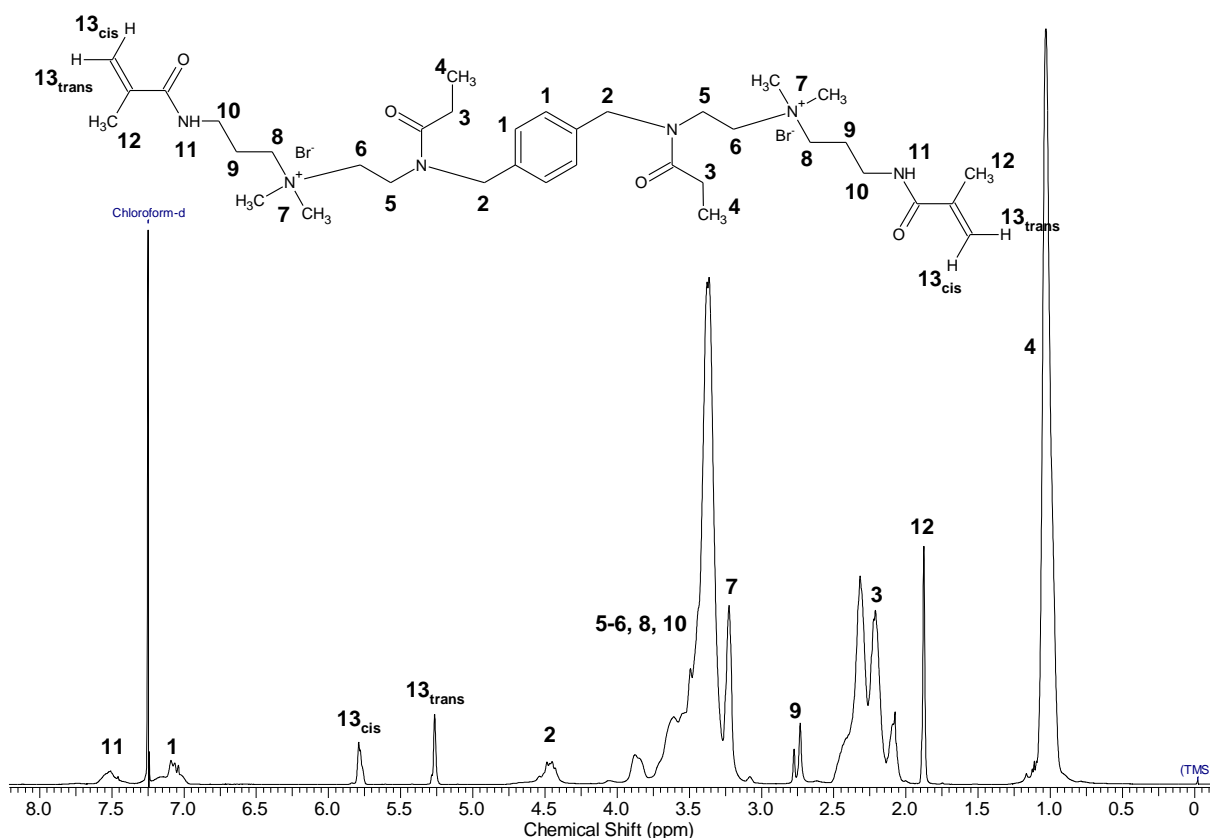


Abb.3.17: ^1H -NMR-Spektrum des *p*DBX-initiierten, AMA-terminierten bifunktionellen Linkers #17 AMA-PEOX₁₄-*p*DBX-PEOX₁₄-AMA nach 6-fachen Umfällen in Et_2O aus CHCl_3 und 4-tägiger Dialyse in MeOH ; aufgenommen in CDCl_3 bei 400MHz.

Bei allen drei Polymeren **#17-19** lagen die Funktionalisierungsraten f_I/f_T zwischen 93 und 96 %. Nach einer erfolgreichen, vollständigen Terminierung/Quaternisierung von AMA am PEOX verschoben sich die zugehörigen Doppelbindungssignale um etwa 0.2 ppm ins Tieffeld (niedermolekulares AMA: $H_{cis} \equiv 5.6$ ppm, $H_{trans} \equiv 5.1$ ppm; vgl. **Abb.3.13**). Ein Versuch zur Charakterisierung der bifunktionellen AMA-PEOX_n-pDBX-PEOX_n-AMA-Systeme mittels GPC wurde unternommen, gelang jedoch nicht. In keinem der Lsm.-Systeme ließ sich die unerwünschte Wechselwirkung der Polymerproben mit dem verwendeten Säulenmaterial (Polystyrol-Divinylbenzol) eliminieren. Daher erfolgte die Charakterisierung der Poly-2-ethyloxazoline ausschließlich auf Basis zugehöriger ¹H-NMR-Spektren (vgl. **Tab.3.6**).

In Kombination mit einem hydrophilen Monomer wie dem 2-Hydroxyethylacrylat (HEA) stellten die bifunktionellen AMA-PEOX_n-pDBX-PEOX_n-AMA-Systeme eine hydrophobe Komponente dar. Da beide Komponenten, HEA und der PEOX-Linker radikalisch polymerisierbare Doppelbindungen enthielten, wurden sie zur Darstellung neuartiger, amphiphiler Polymer-co-netzwerke der Klasse PHEA-*l*-PEOX eingesetzt. Diese Netzwerksysteme besaßen, aufgrund ihrer Nanophasenseparation im Bulk, sowohl organo- (Toluol, *n*-Heptan), als auch H₂O-quellbare Eigenschaften. **Abb.3.18** zeigt rasterkraftmikroskopische Aufnahmen derartiger Conetzwerke; diese wurden hergestellt und charakterisiert von Dipl.-Chem. S. Dech und Dipl.-Ing. V. Wruk an der Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen (BCI) der TU Dortmund.

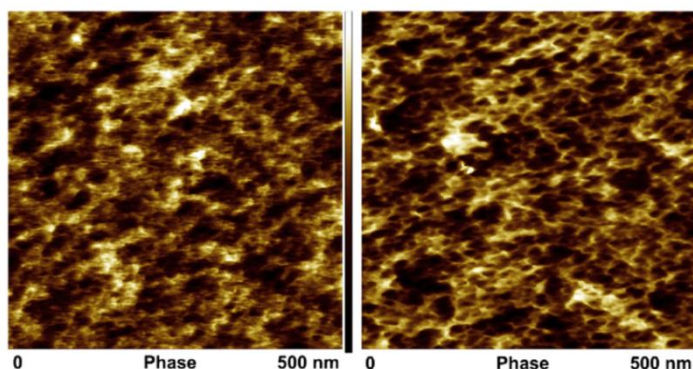


Abb.3.18:ⁱ Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von PHEA-*l*-PEOX-Conetzwerken mit 50 (links) bzw. 70 (rechts) Gew.% des AMA-PEOX₂₂-pDBX-PEOX₂₂-AMA-Linkers **#18**. Aufgenommen im Phasenkontrast-Modus mit einem zugehörigen Phasenwinkel von 8° (links) bzw. 21° (rechts).

ⁱ Abbildung entnommen aus: Dech, S; Wruk, V; Fik, C. P.; Tiller, J. C. *Polymer* **2012**, 53, (3), 701.

3.2 Einfluss von Satellitengruppen und Monomeren auf die antimikrobielle und hämolytische Wirksamkeit telecheler PROX

Die Zielstellung dieses Kapitels war die Charakterisierung der antimikrobiellen und hämotoxischen Eigenschaften der synthetisierten Polyoxazolin-Homo- und Copolymere gegenüber GRAM-positiven und –negativen Bakterien sowie lebenden Erythrozyten aus Schweineblut. Zudem sollte die Breite eines Wirksamkeitsfensters zwischen prokaryotischen (Bakterien) und eukaryotischen (Säugetier-)Zellen sowie innerhalb weiterer, biomedizinisch relevanter Bakterienstämme bestimmt werden.

3.2.1 Vorstellung der Untersuchungsverfahren und Methodische Abgrenzung

Alle DDA-X-initiierten, telechelen Poly-2-oxazoline **#1-13** sowie **#14-16** (vgl. **Tab.3.4** & **Tab.3.5**) wurden nach Variation ihrer terminalen Satellitengruppen (T = OH, EDA, DDA und AMA) auf die antimikrobielle Wirksamkeit des Gesamtmoleküls untersucht. Zusätzlich zur Bestimmung der prokaryotischen Wirksamkeit wurde die Kompatibilität gegenüber eukaryotischen Zellen bestimmt. Aus den Größen der minimalen bakteriellen Inhibierungskonzentration (MIC) und der medianen hämolytischen Konzentration (HC_{50})¹⁵¹ wurden erregerspezifische Selektivitätswerte (S) berechnet. Eine Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit erfolgte zunächst gegenüber zwei Bakterienarten: dem nosokomialen (Krankenhauskeim) *S. aureus* und dem interstinalen (Darmkeim) *E. coli*. Beide unterschieden sich im GRAM-Typ (Annahme der GRAM-Färbung):¹⁵²⁻¹⁵⁵ *S. aureus* war ein Vertreter einer GRAM-positiven-, *E. coli* ein Vertreter einer GRAM-negativen Bakteriengattung. Die zugehörigen MIC-Werte wurden mittels eines bekannten Bestimmungsverfahrens für potentiell antimikrobielle Substanzen ermittelt.⁷³ Die toxikologische Kompatibilität gegenüber roten Blutkörperchen¹⁵⁶ wurde an selbst-isolierten Schweineblut-Erythrozyten bestimmt.

3.2.2 Gewinnung von Erythrozyten aus Blut und deren Hämolyse

Blut ist das für den Stoffwechsel eines lebenden Säugetierorganismus notwendige Transportmittel. Bei Blut handelt es sich um eine Dispersion, die feste und flüssige Bestandteile enthält. Die flüssigen, meist löslichen Blutbestandteile werden als Blutplasma bezeichnet, das neben Wasser (ca. 90 Vol.%) auch Proteine, Nährstoffe, Salze, Stoffwechselprodukte, Hormone und Enzyme enthält und ca. 55 Vol.% des Vollblutes ausmacht. Die festen Bestandteile bestehen aus Blutzellen, die ca. 45 % des Gesamtblutvolumens ausmachen und grob in drei Klassen eingeteilt werden

können: die roten- und die weißen Blutkörperchen (Erythrozyten und Leukozyten) sowie die Blutplättchen (Thrombozyten). Erythrozyten sind dabei verantwortlich für den Sauerstofftransport im Körper. Obwohl es sich bei den Erythrozyten mehrzelliger Wirbeltiere um echte Eukaryoten handelt (vgl. **Kap.1.2.1**), fehlen ihnen einige spezifische Strukturmerkmale: sie besitzen keinen Zellkern und daher auch keine eigenen Mitochondrien und keine eigene DNA. Erythrozyten haben einen Durchmesser von ungefähr 7 μm und sind etwa 2 μm dick. Sie haben eine Lebensdauer von ca. 100-120 Tagen. Bei den reifen Erythrozyten handelt es sich um tellerförmige und flache Scheiben (vgl. **Abb.1.5**).

Zur Gewinnung von Erythrozyten wurde Vollblut (hier: Schweineblut) mittels Zentrifugation in seine Bestandteile zerlegt. In der unteren Phase sedimentierten die Erythrozyten, in der Interphase (dem sog. *buffy coat*), befanden sich die Leuko- und Thrombozyten; das zellfreie Blutplasma bildete die obere Phase. In **Abb. 3.19** wird eine Vollblutprobe vor (links) und nach der Zentrifugation (rechts) dargestellt; die sedimentierten, lebenden Erythrozyten sind als dunkelrot gefärbte untere Phase erkennbar (da venöses Blut verwendet).

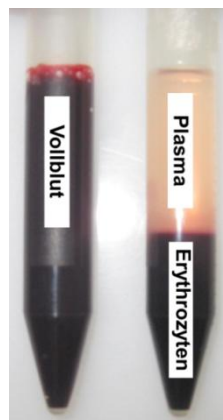


Abb.3.19 Vollblutprobe aus Schweineblut vor (links) und nach der Zentrifugation (20 min, RZB = 1,700 x-g, rechts). Das sedimentierte Erythrozytenkonzentrat ist an der dunkelroten-, der Plasmaüberstand an der rötlich-gelben Färbung erkennbar.

Die Hämolytische Aktivität ist ein Maß für die Eigenschaften von Polymeren und anderen Stoffen, Erythrozyten abzubauen; Hämolyse resultiert immer aus einer Schädigung der Membran. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Messung der hämolytischen Aktivität photometrisch mittels UV/Vis-Spektroskopie.

Hierzu wurden frische Erythrozytenkonzentrate durch mehrmaliges Waschen mit einem isotonischen Puffer (CPD-Puffer) vollständig von Plasma Leukozyten befreit. Die zu untersuchenden niedermolekularen Substanzen und Polymere wurden in abnehmender Konzentration (Verdünnungsreihe) zugegeben und kurz inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wird der Überstand photometrisch vermessen. Die bakterienspezifische Selektivität S (vgl. **Gl.3.3**) wurde berechnet als Quotient der medianen Hämolysekonzentration gegenüber Erythrozyten HC_{50} zur minimalen Inhibierungskonzentration MIC .⁵⁶ Sie diene als Bewertungsgröße des Wirkfensters zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen (vgl. **Kap.1.2.1**).

$$S = HC_{50} \cdot MIC^{-1} \quad (3.3)$$

Je höher die Selektivität, desto besser geeignet wäre ein Biozid zum Einsatz im oder am Körper (*in vivo*) eines Säugetieres oder Menschen. Dabei gilt die Regel, dass maximale Selektivitäten S (und damit minimale Hämotoxizitäten HC_{50}) maximalen antimikrobiellen Wirksamkeiten MIC vorzuziehen sind.

3.2.3 Antimikrobielle Wirksamkeit und Hämotoxizität der niedermolekularen Komponenten sowie des Referenz-Polyoxazolins

Um Vergleichswerte zu erhalten und um Störeffekte durch Verunreinigungen auszuschließen, wurden die Untersuchungen (MIC & HC_{50} -Tests) zunächst mit allen niedermolekularen Edukten durchgeführt. Voraussetzung war, dass die Substanzen wasserlöslich oder gut wasser-suspendierbar waren; was für alle außer den 2-Methyloxazolin-Monomeren galt. Unter Verwendung des Standardinitiators MeOTs wurde ein nicht mit DDA-X-funktionalisiertes Referenz-PMOX ($2,900 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) synthetisiert und analog untersucht.

Aus praktischen Gründen wurden MIC -Werte höher als 256 ppm als nicht antimikrobiell wirksam eingestuft. Hierbei handelte es sich um eine Scheidelinie zwischen Mikroorganismen, die anfällig ($< 256 \text{ ppm}$) oder unempfindlich ($> 256 \text{ ppm}$) gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen waren.¹⁵⁷

Alle Bestimmungsverfahren wurden in dreifacher Ausfertigung durchgeführt. Weil alle Messreihen mittels einer Verdünnungsmethode hergestellt wurden, in der jede nachfolgende Probe jeweils um die Hälfte verd. wurde (vgl. **Tab.5.4**), lag der

tatsächliche Wert zwischen dem Messwert und dem doppelten des Messwertes. Betrag der Messwert beispielsweise 19.5 ppm, so musste der tatsächliche Wert mindestens 19.5 ppm betragen, durfte jedoch zwischen 19.5 und 39.1 ppm liegen.

Zur Erfüllung des Signifikanzkriteriums müssen sich zwei Messwerte um mindestens Faktor 2 unterscheiden (mindestens zwei Proben voneinander entfernt sein). Dieses Kriterium wurde auch bei der Ermittlung der Standardabweichungen und der Auftragung von Fehlerbalken in allen nachfolgenden Graphen berücksichtigt. Nachfolgend werden zunächst die MIC/HC₅₀-Resultate der niedermolekularen Edukte und des MeOTs-initiierten Referenzpolymers diskutiert (vgl. **Tab.3.8**).

Tab.3.7 Resultate der antimikrobiellen (MIC_{S.a.}, MIC_{E.c.}) und hämotoxischen (HC₅₀) Evaluierung der niedermolekularen Edukte (#0a-0f) sowie der Polymethyloxazolin-Referenz (#0g) inklusive der Berechnung erregerspezifischer Selektivitätswerte (S).

Struktur #	M _{NMR} [g·mol ⁻¹]	MIC _{S. aureus} ^a		MIC _{E. coli} ^a		HC ₅₀ ^a		S ^b	
		[ppm]	[μmol·L ⁻¹]	[ppm]	[μmol·L ⁻¹]	[ppm]	[μmol·L ⁻¹]	S. a. ^c	E. c. ^d
pDBX 0a ^e	263.96	>2,500	>9,400	>2,500	>9,400	800	>3,000	<1	<1
EDA 0b	60.1	>2,500	>40,000	>5,000	>80,000	>2,500	>40,000	1	<1
DDA 0c ^f	213.4	>2,500	>11,700	>2,500	>11,700	1150	5400	<1	<1
AMA 0d ^e	170.25	>5,000	>29,000	>5,000	>29,000	1600	9400	<1	<1
DDA-X 0f ^f	477.36	19.5	40.8	39.1	81.8	100	209	5	3
CH ₃ -PMOX ₃₃ ⁻ EDA 0g ^g	2,900	>5,000	>1,700	>5,000	>1,700	>1,250	>400	<1	<1

[a] Alle MIC- und HC₅₀-Werte wurden mindestens dreimal pro Verbindung bestimmt, die Standardabweichung zwischen den Messreihen betrug max. 15% (HC₅₀) bzw. bis zum jeweils nächsthöheren Messwert der Verdünnungsreihe (MIC), [b] Erregerspezifische Selektivitäten wurden berechnet aus den jeweiligen HC₅₀-MIC⁻¹-Verhältnissen, [c] *Staphylococcus aureus*, GRAM-positives Bakterium; Krankenhauskeim, [d] *Escherichia coli*, GRAM-negatives Bakterium, Darmkeim, [e] Unlöslich im wässrigen Nährmedium/Puffer; Verdünnungsreihen durchgeführt mit einer fein verteilten US-Dispersion, [f] Schlecht löslich im Nähr-medium/Puffer; Verdünnungsreihen durchgeführt mit einer fein verteilten US-Suspension, [g] Poly-2-methyloxazolin, initiiert mit dem Standardinitiator Methyltosylat (MeOTs) und terminiert mit Ethylendiamin (EDA).

Mit Ausnahme des bekanntermaßen antimikrobiellen Initiators DDA-X **#0f**⁷⁶ war keine der niedermolekularen Verbindungen (**#0a-0d**) antimikrobiell wirksam; für diese Verbindung wurde bereits von C. WASCHINSKI ein vergleichbarer MIC-Wert von 11 μmol·L⁻¹ gegen *S. aureus* bestimmt.¹⁵⁸ Die beiden Substanzen pDBX (**#0a**) sowie DDA (**#0c**) wiesen zudem eine geringfügige Hämotoxizität auf.

Die antimikrobielle Wirksamkeit von DDA-X (MIC) betrug 19.5 ppm gegenüber *S. aureus* und 39.1 ppm gegenüber *E. coli*. Diese hohe prokaryotische Wirksamkeit wurde begleitet durch eine eukaryotische Hämotoxizität (HC_{50}) von 100 ppm, was zu Selektivitätswerten (S) von 5 im Falle von *S. aureus* sowie von 3 im Falle von *E. coli* führte. Das mit dem Initiator Methyltosylat (MeOTs) gestartete PMOX wurde, analog zu den Poly-2-methyloxazolin **#4-8** (vgl. **Tab.3.4**), mit Ethylendiamin (EDA) terminiert. Erhalten wurde ein gegen beide Bakterienarten unwirksames, ω -monofunktionalisiertes Referenzpolymer mit einer geringen Hämotoxizität von 1,250 ppm und marginalen Selektivitäten von unter 1.

Durch das letztgenannte Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination von PMOX-Rückgrat und einer EDA-Terminierung nicht für die Ausbildung einer antimikrobiellen Wirksamkeit ausreichend waren. Das Homopolymer-Terminierungsmittel-System (PMOX-EDA) stellte auch keine besondere toxikologische Belastung für eukaryotische Erythrozyten dar.

3.2.4 Antimikrobielle Wirksamkeit und Hämotoxizität der telechelen, DDA-X-initiierten Poly-2-methyloxazoline mit variablen Satellitengruppen

Alle Ergebnisse der antimikrobiellen (MIC) und hämotoxischen Evaluierung (HC_{50}) der telechelen, mit dem antimikrobiellen Initiator DDA-X (#0f) gestarteten und mit variablen Satellitengruppen (OH, EDA, DDA und AMA) terminierten Poly-2-methyloxazoline (PMOX) sowie die daraus berechneten, erregerspezifischen Selektivitätswerte (S) finden sich in **Tab.3.8**.

Die exemplarische Dokumentation einer inkubierten Verdünnungsreihe zur Bestimmung des MIC-Wertes findet sich in **Abb.3.20**. Bei dem dabei untersuchten Poly-2-oxazolin handelte sich um DDA-X-PMOX₂₈-AMA (**#13**, vgl. **Tab.3.8**), der eingesetzte Keim war *S. aureus* und der zugehörige MIC-Wert betrug 19.5 ppm; entsprechend $6.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (8-te Probe blieb klar, vgl. **Tab.5.4**).

Der ermittelte MIC-Wert gegen *S. aureus* zeigte zudem eine gute Übereinstimmung mit dem von C. WASCHINSKI bereits für derartige, DDA-X-initiierte und AMA-terminierte Poly-2-methyloxazolin-Systeme ermittelten MIC-Werten von $7.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.¹⁵⁸

Tab.3.8 Resultate der antimikrobiellen ($MIC_{S.a.}$, $MIC_{E.c.}$) und hämotoxischen (HC_{50}) Evaluierung der telechelen, mit dem antimikrobiellen DDA-X initiierten und mit variablen Satellitengruppen (OH, EDA, DDA, AMA) terminierten Poly-2-methyloxazoline (PMOX, #1-13) inklusive erregerspezifischer Selektivitätswerte (S).

Struktur #	M_{NMR}^a [g·mol ⁻¹]	$MIC_{S. aureus}^b$		$MIC_{E. coli}^b$		HC_{50}^b		S^c	
		[ppm]	[$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] ^b	[ppm]	[$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] ^b	[ppm]	[$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] ^b	S.a. ^d	E.c. ^e
DDA-X-PMOX ₂₃ - OH 1	2,400	313 ^f	130	1,250 ^f	521	419	175	1	<1
DDA-X-PMOX ₃₅ - OH 2	3,400	625 ^f	184	1,250 ^f	368	536	158	1	<1
DDA-X-PMOX ₄₈ - OH 3	4,600	625 ^f	136	2,500 ^f	544	719	156	1	<1
DDA-X-PMOX ₇₇ - OH 4	7,050	2,500 ^f	355	5,000 ^f	709	1,126	160	<1	<1
DDA-X-PMOX ₃₅ - EDA 5	3,400	9.8	2.9	39.1	11.5	135	40	14	3
DDA-X-PMOX ₄₈ - EDA 6	4,600	19.5	4.2	78.1	17.0	259	56	13	3
DDA-X-PMOX ₈₁ - EDA 7	7,400	19.5	2.6	78.1	10.6	214	29	11	3
DDA-X-PMOX ₇₇ - EDA 8	7,100	39.1	5.5	156	22.0	387	55	10	2
DDA-X-PMOX ₂₃ - DDA 9	2,650	9.8	3.7	19.5	7.4	54	20	6	3
DDA-X-PMOX ₃₁ - DDA 10	3,350	9.8	2.9	39.1	11.7	60	18	6	2
DDA-X-PMOX ₃₇ - DDA 11	3,850	19.5	5.1	39.1	10.1	100	26	5	3
DDA-X-PMOX ₅₃ - DDA 12	5,200	19.5	3.8	39.1	7.5	104	20	5	3
DDA-X-PMOX ₂₈ - AMA 13	3,000	19.5	6.5	39.1	13.0	90	30	5	2

[a] Molare Konzentrationen wurden berechnet unter Verwendung der per ¹H-NMR ermittelten, mittleren Molekulargewichte, [b] Alle MIC- und HC₅₀-Werte wurden mindestens dreimal pro Poly-2-oxazolinsystem bestimmt, die Standardabweichung zwischen den Messreihen betrug max. 15% im Falle der MIC-Werte und max. 25% im Falle der HC₅₀-Werte, [c] Erregerspezifische Selektivitäten wurden berechnet aus jeweiligen HC₅₀·MIC⁻¹-Verhältnissen, [d] *Staphylococcus aureus*, GRAM-positives Bakterium; Krankenhauskeim, [e] *Escherichia coli*, GRAM-negatives Bakterium; Darmkeim, [f] Als unwirksam eingestuft (> 256 ppm, vgl. Diskussion in **Kap.3.3.1**).

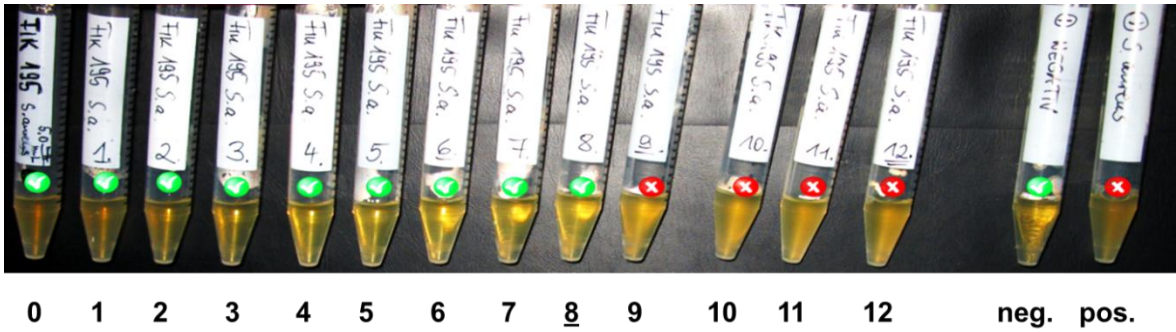


Abb.3.20: Dokumentation einer Verdünnungsreihe zur Ermittlung der minimalen Inhibierungskonzentration (MIC-Wert) gegen den GRAM-positiven Keim *S. aureus*. Das untersuchte telechele Poly-2-oxazolin war DDA-X-PMOX₂₈-AMA (#13, vgl. **Tab.3.8**), die Anfangskonzentration (der 0-ten Probe, links) betrug 5.00 mg·mL⁻¹ (≡ 5,000 ppm). Die Negativ- (klare Lsg.) sowie Positivkontrollen (trübe Lsg.) befinden sich rechts. Der ermittelte MIC-Wert betrug 19.5 ppm (8-te Probe der Verdünnungsreihe).

Die exemplarische Dokumentation einer inkubierten Verdünnungsreihe zur Bestimmung der medianen hämolytischen Konzentration (HC₅₀) findet sich in **Abb.3.21**. Bei dem dabei untersuchten Poly-2-oxazolin handelte sich um DDA-X-PMOX₃₅-EDA (#5, vgl. **Tab.3.8**), der zugehörige, mittels Interpolation ermittelte HC₅₀-Wert betrug 135 ppm (vgl. **Tab.5.4**) und lag zwischen der 5-ten und der 6-ten Probe der Verdünnungsreihe (jedoch unmittelbar an der 5-ten Probe ≡ 156 ppm).

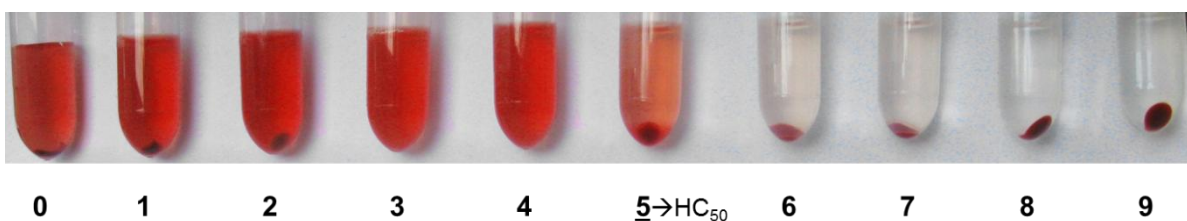


Abb.3.21: Dokumentation einer Verdünnungsreihe zur Ermittlung der medianen hämolytischen Konzentration (HC₅₀-Wert) von Schweineblut-Erythrozyten. Das untersuchte telechele Poly-2-oxazolin war DDA-X-PMOX₃₅-EDA (#5, vgl. **Tab.3.8**), die Anfangskonzentration (der 0-ten Probe, links) betrug 5.00 mg·mL⁻¹ (≡ 5,000 ppm). Der mittels Interpolation ermittelte HC₅₀-Wert betrug 135 ppm und lag damit zwischen der 5-ten und 6-ten Probe der Verdünnungsreihe.

In **Abb.3.22** erfolgt eine Auftragung der molaren minimalen Inhibierungskonzentrationen (MIC-Werte) der telechelen Poly-2-oxazoline gegen die beiden, im Rahmen der Arbeit untersuchten Bakterienarten (*S. aureus* und *E. coli*). Diese werden verglichen mit den respektiven MIC-Werten des eingesetzten, antimikrobiellen Initiators DDA-X. Für die Darstellung wurden DDA-X-PMOX-Systeme mit vergleichbaren mittleren Molekulargewichten ($3,000-3,400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ausgewählt und die unterschiedlichen Satellitengruppen (OH, EDA, DDA und AMA) für jede der beiden untersuchten Bakterienarten gesondert abgebildet. Wie zu erkennen ist, beeinflusste die jeweils eingesetzte, terminale Satellitengruppe signifikant die antimikrobielle Wirksamkeit (den MIC-Wert) des Gesamtmoleküls.

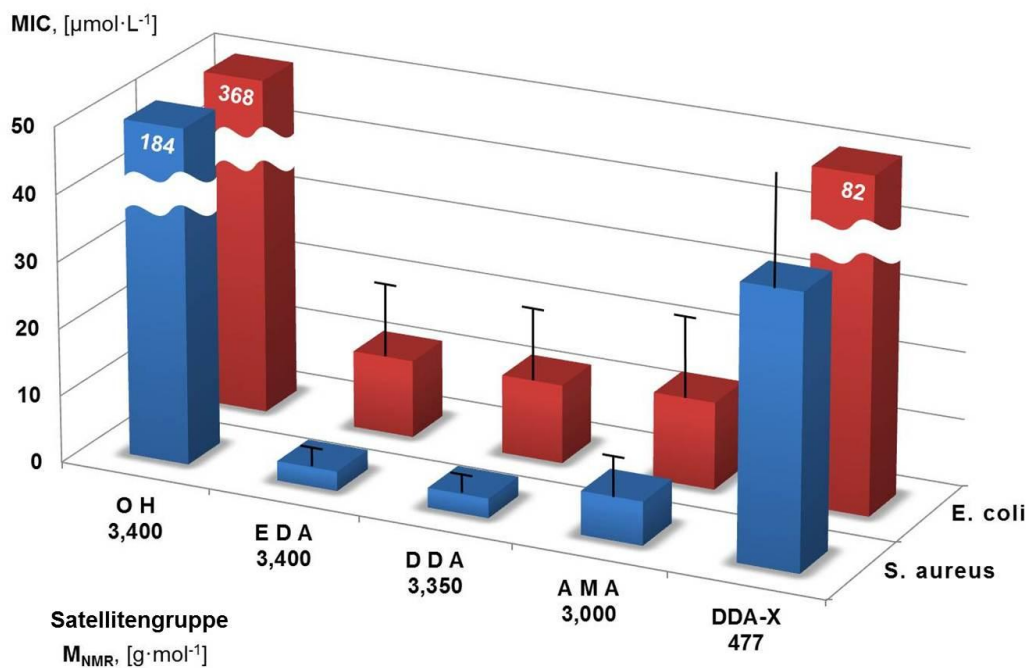


Abb.3.22: Graphische Darstellung der MIC-Werte der telechelen Poly-2-methyl-oxazoline der Klasse DDA-X-PMOX-SAT mit variablen Satellitengruppen (SAT = OH, EDA, DDA und AMA) und vergleichbaren mittleren Molekulargewichten ($3,000-3,400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$); ermittelt gegen *S. aureus* und *E. coli* und verglichen mit dem niedermolekularen, antimikrobiellen Initiator DDA-X. Die Fehlerbalken geben die maximale Messwertabweichung der Methode wieder (vgl. Diskussion in **Kap.3.2.3**).

Überraschenderweise führte die Einführung von Hydroxylgruppen als Satellitengruppen zu einer vollständigen Rückbildung der antimikrobiellen Effizienz der in allen vier Fällen (**#1-4**) am PMOX-Rückgrat vorhandener, antimikrobieller DDA-X-Funktion. Sogar das Polymer mit dem niedrigsten Molekulargewicht ($M_{\text{NMR}} = 2,400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **#1**) zeigte weder gegen *S. aureus*, noch gegen *E. coli* eine antimikrobielle Wirksamkeit. In Übereinstimmung mit dem diskutierten Wirkmechanismus⁷³⁻⁷⁵ (vgl. **Kap.1.1.3**) verringert das Einführen einer terminalen Hydroxylgruppe (OH) offensichtlich die intrinsische Fähigkeit telecheler, antimikrobiell ausgerüsteter Polyoxazoline, Bakterienmembranen effektiv zu penetrieren und zu perforieren. Möglicherweise verhindert diese nicht-antimikrobielle, stark hydrophile Gruppe die Anlagerung des gesamten Polymers an die bakterielle Zelloberfläche. In direktem Gegensatz dazu erhöht die Anbringung einer primären Aminogruppe als terminale Satellitengruppe (EDA) signifikant die molekulare antimikrobielle Effizienz der telechelen Polymersysteme. Im Vergleich zur molaren Effizienz des antimikrobiellen Initiators DDA-X ($\text{MIC}_{\text{S.a.}} = 40.8$, $\text{MIC}_{\text{E.c.}} = 81.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) stieg die Wirksamkeit der damit initiierten, EDA-funktionalisierten Polymethyloxazoline (**#4-8**) um mehr als das 15-fache auf MIC-Werte von unter $3.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (vgl. **Tab.3.8**).

Da durch die Einführung der Satellitengruppe DDA eine weitere, bekanntermaßen antimikrobielle Funktion⁷³ am PMOX-Rückgrat angebracht wurde (mittels einer DDA-X-analogen Quartärnierung), wurde bei den resultierenden, telechelen DDA-X-PMOX-DDA Polymersystemen (**#9-12**) eine Steigerung in der antimikrobiellen Wirksamkeit erwartet. Erstaunlicherweise besaßen die DDA-terminierten, α,α' -bifunktionalisierten Polymethyloxazoline (**#9-12**) dieselbe antimikrobielle Wirksamkeit wie ihre EDA-funktionalisierten Schwesterverbindungen (**#4-8**). Im Falle des relativ kurzkettigen, EDA-terminierten Poly-2-methyloxazolins **#5** ($M_{\text{NMR}} = 3,400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) war der dreifach bestimmte, absolute MIC-Wert gegen *S. aureus* (9.8 ppm) sogar geringer als der des zugehörigen antimikrobiellen Initiators DDA-X (19.5 ppm).

Im Vergleich der relativen, molaren MIC-Werte der Polymethyloxazoline **#5-8** mit den für DDA-X bestimmten, molaren MIC-Werten (vgl. **Tab.3.8**) wurde im Schnitt eine mehr als 10-fache Wirksamkeitssteigerung gegenüber *S. aureus* sowie eine mehr als 5-fache Wirksamkeitssteigerung gegenüber *E. coli* realisiert.

Der hier beobachtete „Faktor-2“-Unterschied zwischen den MIC-Werten von GRAM-positiven und GRAM-negativen Bakteriengattungen wurde bereits früher bei synthetischen, antimikrobiellen Polymersystemen festgestellt, die natürlichen antimikrobiellen Peptiden (vgl. **Kap.1.1.3**) nachempfunden waren.^{67, 159, 160}

Eine Erklärung für die außergewöhnlich hohe antimikrobielle Wirksamkeit der telechelen, EDA-terminierten und DDA-X-initiierten Polymethyloxazoline (#5-8) wäre die Annahme, dass die endständigen Aminogruppen die die Anlagerung an die negativ geladene Bakterienmembran (vgl. **Kap.1.2.2**) unterstützen.¹⁵⁶

Eine weitere Hypothese wäre, dass die DDA- und EDA-Terminale zur Komplexbildung zweiwertiger Metallionen wie Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mo^{2+} oder Fe^{2+} beitragen und damit zur Desaktivierung diverser metallhaltiger Bakterienenzyme¹⁶¹⁻¹⁶⁷ führten.

Mehrere dieser sogenannten „Metalloenzyme“ sind offensichtlich essentiell für das Bakterienwachstum,¹⁶⁸ vor allem die Biofilmbildung¹⁶⁹⁻¹⁷² und tragen so zur Aufrechterhaltung des prokaryotischen Metabolismus bei. Aber auch eukaryotische, metallhaltige Matrixmetalloproteinasen (MMPs) spielen eine wichtige Rolle bei körpereigenen Zersetzungsprozessen,¹⁷³⁻¹⁷⁵ weshalb deren Inhibierung ein eigenes Kapitel der vorliegenden Arbeit gewidmet wurde (vgl. nachfolgendes **Kap.3.3ff**).

Das bereits zuvor beschriebene Polymethyloxazolin⁷⁶ mit einer terminalen AMA-Satellitengruppe zeigte ebenfalls hohe, mit den beiden zuvor diskutierten Funktionen EDA und DDA vergleichbare, antimikrobielle Wirksamkeiten von 19.5 ppm ($6.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) gegenüber *S. aureus* und 39.1 ppm ($13.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) gegenüber *E. coli*. Im Falle dieser Terminierung kann angenommen werden, dass die endständige AMA-Funktion die Penetration der antimikrobiellen DDA-X-Funktion auf eine ähnliche Art und Weise unterstützt, wie sie zuvor bei DDA-terminierten, jedoch mit einem unwirksamen *n*-Alkylketteninitiator gestarteten Polyoxazolinen beobachtet wurde.⁷⁵

Nach der quantitativen Bestimmung der Auswirkungen der unterschiedlichen funktionalen Satellitengruppen auf die antimikrobielle Gesamtwirksamkeit DDA-X-initiiertter Polymethyloxazoline, wurde die Hämokompatibilität der unterschiedlichen Polymersysteme untersucht. Dabei wurden frische Schweinebluterythrozyten mit Verdünnungsreihen der gepufferten Polymerproben (in physiologischen CPD-Puffer) inkubiert und diejenige Polymerkonzentration ermittelt, bei der 50 Gew.% aller

zugesezter Erythrozyten zerstört wurden. Die Quantifizierung erfolgte mittels UV/vis-Absorptionsmessungen bei 541 nm. In **Abb.3.23** sind die gemessenen, molaren HC_{50} -Werte für DDA-X-initiierte Polymethyloxazoline vergleichbarer Kettenlänge und variierten terminalen Satellitengruppen (OH, EDA, DDA und AMA) im Vergleich zum eingesetzten, niedermolekularen Initiator DDA-X grafisch dargestellt.

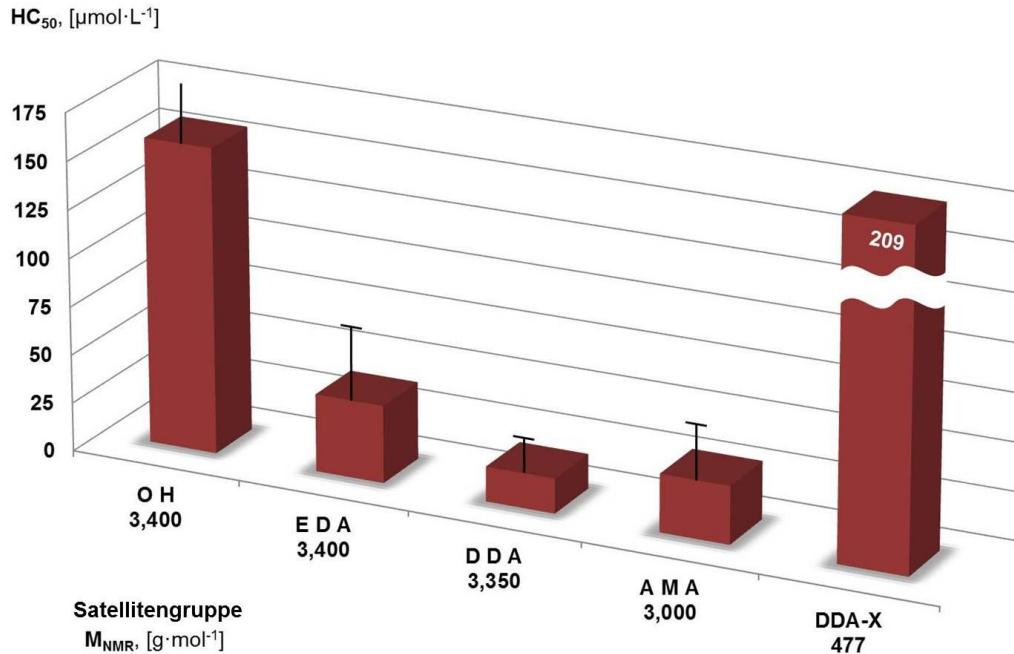


Abb.3.23: Graphische Darstellung der HC_{50} -Werte der telechelen Poly-2-methyloxazoline der Klasse DDA-X-PMOX-SAT mit variablen Satellitengruppen (SAT = OH, EDA, DDA und AMA) und vergleichbaren mittleren Molekulargewichten (3,000-3,400 $g \cdot mol^{-1}$); ermittelt mit lebenden Schweinebluterythrozyten und verglichen mit dem niedermolekularen, antimikrobiellen Initiator DDA-X. Die Fehlerbalken geben die maximal mögliche Messwertabweichung der Methode wieder.

Wie für membranaktive Substanzen zu erwarten war, wiesen alle untersuchten DDA-X-PMOX-SAT-Systeme eine signifikante Hämotoxizität mit zugehörigen HC_{50} -Werten unterhalb von $200 \mu mol \cdot L^{-1}$ auf. Die niedrigste Hämotoxizität in der untersuchten Gruppe wies das hydroxylterminierte-PMOX ($158 \mu mol \cdot L^{-1}$) auf. Dabei war der für den antimikrobiellen, niedermolekularen Initiator DDA-X ermittelte HC_{50} -Wert von $209 \mu mol \cdot L^{-1}$ nur unwesentlich höher.

Im Vergleich zur vorangehenden Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit (MIC-Reihen) war der Einfluss der jeweiligen Satellitengruppe auf die Hämotoxizität deutlich ausgeprägter, folgte aber insgesamt demselben Aktivitätsmuster. Während die MIC-Werte der am schwächsten antibakteriell aktivierenden OH-Satellitengruppe (vgl. **Tab.3.8**) 100-fach höher waren als diejenigen der am stärksten aktivierenden EDA- und DDA-Gruppen, waren die Hämotoxizitäten der DDA-X-PMOX-OH-Systeme nicht einmal vierfach höher als die der vergleichbaren EDA-terminierten- und nicht einmal 10-fach höher als die der vergleichbaren DDA-terminierten, telechelen DDA-X-Polymethyloxazoline. Auffällig war auch, dass das EDA-terminierte Polymer geringfügiger hämotoxisch war als die DDA- und AMA-terminierten Polymere vergleichbarer Kettenlänge. In **Abb.3.24** sind die aus den molaren, medianen hämolytischen- und minimalen Inhibierungskonzentrationen berechneten, erregerspezifischen Selektivitätswerte ($S = HC_{50} \cdot MIC^{-1}$) grafisch dargestellt.

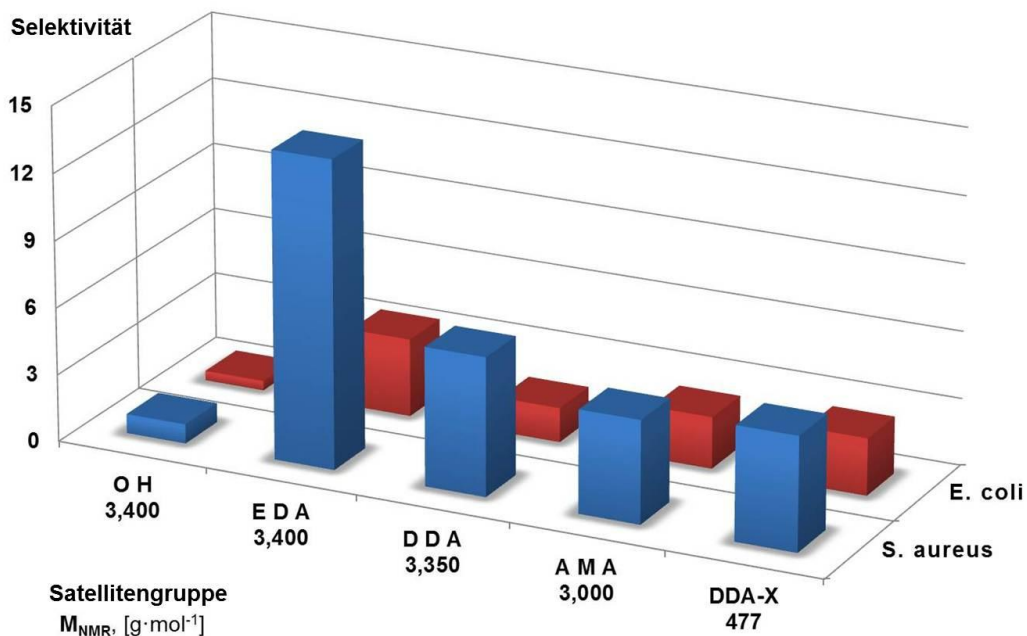


Abb.3.24: Graphische Darstellung der erregerspezifischen Selektivitäten S ($S = HC_{50} \cdot MIC^{-1}$) der telechelen Poly-2-methyloxazoline der Klasse DDA-X-PMOX-SAT mit variablen Satellitengruppen (SAT = OH, EDA, DDA und AMA) und vergleichbaren mittleren Molekulargewichten (3,000-3,400 $g \cdot mol^{-1}$) in Vergleich zu den S -Werten des niedermolekularen, antimikrobiellen Initiators DDA-X.

Es wurden die DDA-X-initiierten Polymethyl-oxazoline vergleichbarer Kettenlänge und variierten terminalen Satellitengruppen (OH, EDA, DDA und AMA) aus den **Abb.3.22** und **Abb.3.23** gewählt und mit dem eingesetzten, niedermolekularen Initiator DDA-X verglichen. Die Selektivität S ermöglichte eine erste Abschätzung des therapeutischen Fensters zwischen pro-karyotischen und eukaryotischen Zellen bei einer dentalmedizinischen Anwendung der antimikrobiellen, PMOX.

Ein signifikanter Einfluss der terminalen Satellitengruppen auf die Selektivität der untersuchten, heterogen-telechelen Polymethyloxazoline war deutlich erkennbar. Die hydroxylterminierten Systeme DDA-X-PMOX-OH (**#1-4**, vgl. **Tab.3.8**) waren im besten Fall mindestens so hämotoxisch wie antimikrobiell wirksam gegen *S. aureus* (um die $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Für eine biomedizinische Applikation wären diese telechelen Polymethyloxazoline nicht geeignet, denn sie würden, noch bevor sie ihre volle Wirksamkeit an prokaryotischen Bakterienzellen entfalten würden, unnötig viele eukaryotische Erythrozyten zerstören.

Diese zunächst überraschende Erkenntnis spiegelte sich auch in den ermittelten Selektivitätswerten ($S_{\text{OH}} \leq 1$) wieder und unterstützte somit die bereits diskutierte mechanistische Hypothese, wonach die terminale OH-Gruppe offensichtlich in der Lage war, das gesamte Polymerelement wirksam abzuschirmen und so einen Membranangriff zu erschweren. Wenn dies der Fall wäre, würde die (negative) Oberflächenladung der Membran, die außer dem Cholesterolgehalt eine der wichtigsten Unterscheidungsmerkmale zwischen Säugetierzell- und Bakterienhüllen darstellt,¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ keine Rolle mehr spielen. Bei einer Annäherung des Polymers an die Membranoberfläche könnte dieses die bakterielle Doppelschicht-Phospholipidmembran^{73, 180} (vgl. **Kap.1.2.2**) ausschließlich aufgrund des amphiphilen Charakters der antimikrobiellen, *n*-alkylierten DDA-X-Gruppe penetrieren.¹⁸¹

Im Gegensatz dazu zeigten alle EDA-terminierten Polymethyloxazoline der DDA-X-PMOX-EDA-Klasse (**#4-8**) eine gute, erregerspezifische Selektivität zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Zellarten. Gegenüber den GRAM-positiven Keimen *S. aureus* wurden Selektivitätswerte von bis zu 14, gegenüber den GRAM-negativen *E. coli* von bis zu 3 ermittelt, was diese Polyoxazolinklasse zu den bislang geeignetsten antimikrobiellen, telechelen Polyoxazolinen machte. Ihre relativ geringe

Hämotoxizität war ein mögliches Indiz für die Annahme, dass die terminale EDA-Satellitengruppe weniger für die Penetration, als vielmehr für die Adhäsion des gesamten Polymers an die Membran verantwortlich war.¹⁵⁷ Somit würde die negativ geladene, prokaryotische *S. aureus*-Membran das kationisch geladene DDA-X-PMOX-EDA-Polymer aufgrund der COULOMB-Wechselwirkung viel effektiver anziehen als die ungeladene Außenmembran von Säugetiererythrozyten.

Die telechelen, α,ω -bifunktionalisierten Polymethyloxazolin-Homopolymere der DDA-X-PMOX-DDA- **#9-12** und der DDA-X-PMOX-AMA-Klasse **#13** wiesen Selektivitätswerte von etwa 5 im Falle von *S. aureus* und etwa 3 im Falle von *E. coli*, auf. In diesen Fällen waren die Polymere offensichtlich stärker membranaktiv und daher weniger anfällig für die Auswirkungen unterschiedlicher Ladungsdichten,¹⁵⁶ als die EDA-terminierten Schwesterpolymere (**#5-8**). Nichtsdestoweniger waren die Selektivitätswerte aller EDA-, DDA- und AMA-terminierten DDA-X-PMOX-Systeme signifikant größer als 1.

Dies machte alle synthetisierten, DDA-X-initiierten telechelen Poly-2-methyloxazoline, mit Ausnahme der OH-terminierten Spezies, attraktiv zur dentalrelevanten Anwendung als antimikrobielle Polymeradditive. Diesem Aspekt widmet sich ein weiteres Kapitel der vorliegenden Arbeit (vgl. **Kap.3.4ff**).

Zudem wurde ein ausgewähltes, telecheles Poly-2-methyloxazolin der Klasse DDA-X-PMOX-EDA hinsichtlich seiner antimikrobiellen Wirksamkeit gegenüber weiteren, teilweise hoch anspruchsvollen, tierspezifischen Bakterienstämmen untersucht. Die Resultate dieser Untersuchungsreihe finden sich im nachfolgenden Kapitel.

3.2.5 Mikrodilutionstests an tierspezifischen Bakterienstämmen

Unter Verwendung des EDA-terminierten, antimikrobiellen Polymethyloxazolins (**#6**, DDA-X-PMOX₄₈-EDA) wurde von Mitarbeitern der Fa. Bayer HealthCare in Leverkusen ein erweiterter Mikrodilutionstest an einigen ausgewählten, biomedizinisch-relevanten Bakterienstämmen durchgeführt. Die hierfür eingesetzten Erreger wurden, der betroffenen Tierart nach geordnet, mit einer Verdünnungsreihe (256-0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) des telechelen Polyoxazolins in Nährbouillon inkubiert. Nach 24 h wurden anhand einer UV/Vis-Trübungsmessung die minimalen, keim-/tierspezifischen Hemmkonzentrationen bestimmt (MIC₂₄) (siehe **Tab.3.9**).

Tab.3.9: Resultate der Mikrodilutionstests an tierspezifischen Bakterienstämmen,⁹⁶ durchgeführt mit dem antimikrobiellen Polymethyloxazolin (#6, DDA-X-PMOX₄₈-EDA). MIC₂₄ war die minimale Inhibierungskonzentration 24h Inkubation bei 37°C.

Gattung (Genus)	Bakterium		Tier	MIC ₂₄ ^a	MIC-Bereich ^b [ppm]	
	GRAM-Typ	Art (Spezies)				
<i>Escherichia</i>	negativ (-)	<i>coli</i>	Hund	128/128	128-128	
			Kuh ^c	128/128		
			Kalb ^d	128/128		
			Schwein ^f	128/128		
			Kaninchen	128/128		
<i>Salmonella</i>	negativ (-)	<i>species pluralis</i>	Hund	256/256	128-256	
			<i>anatum</i>	Pute		128/256
			<i>enterica</i>	Kalb ^d		128/128
				Schlange		128/128
			<i>hadar</i>	Hähnchen ^h		256/256
			<i>indiana</i>	Pute		128/128
			<i>stanley</i>	Pute		128/128
			<i>typhimurium</i>	Schwein ^f		128/256
Geflügel ⁱ	128/128					
<i>Staphylococcus</i>	positiv (+)	<i>aureus</i>	Schwein ^f	64/64	16-64	
			Rind ^e	16/16		
			Kaninchen	64/64		
			Kuh ^c	64/64		
			Schildkröte	64/64		
			Katze	32/32		
<i>Streptococcus</i>	positiv (+)	<i>uberis</i>	Hund	32/32	16-64	
			Kalb ^d	64/64		
			Rind ^e	64/64		
			Kuh ^c	16/16		
		<i>suis</i>	Ferkel ^g	64/64		
			Schwein ^f	16/32		
<i>Enterococcus</i>	positiv (+)	<i>species pluralis</i>	Hund	32/32	32-64	
			Schwein ^f	64/64		
				Broiler ^j		64/64
		<i>faecalis</i>	Pute	64/64		
			Huhn ^k	64/64		

[a] Minimale Hemmkonzentration nach 24-stündigen Bakterienbewuchs, [b] Wirksamkeitsfenster zwischen dem minimalen und maximalen ermittelten MIC-Wert einer Bakteriengattung, [c] Geschlechtsreifes Hausrind nach der ersten Kalbung, [d] Noch nicht adultes Hausrind, Geschlecht nicht spezifiziert, [e] Adultes Hausrind, Geschlecht nicht spezifiziert, [f] Geschlechtsreifes, adultes Hausschwein, Geschlecht nicht spezifiziert, [g] Jungschwein vor der Geschlechtsreife, Geschlecht nicht spezifiziert, [h] Junges Haushuhn vor der Geschlechtsreife, Geschlecht nicht spezifiziert, [i] Bei Federgeflügel auftretende Bakterienspezies, [j] Masthuhn zur Fleischerzeugung, Geschlecht nicht spezifiziert, [k] Adultes Haushuhn weiblichen Geschlechts nach der Geschlechtsreife.

Das verwendete telechele, EDA-terminierte Polymethyloxazolin **#6** (DDA-X-PMOX₄₈-EDA) zeigte mit MIC₂₄-Werten zwischen 16 und 256 ppm gute antimikrobielle Wirksamkeit gegen alle untersuchten Bakterienspezies. Die ermittelten Werte waren geringfügig höher als die zuvor in **Tab.3.8** präsentierten MIC-Werte gegen *S. aureus* und *E. coli*. Bei dieser vorangegangenen Untersuchung wurden die MIC-Werte simultan mit dem bakteriellen Bewuchs der Positivreferenz (im Schnitt nach 6-8 h) ermittelt, weshalb ein direkter Vergleich mit diesen, erst nach 24h abgelesenen MIC₂₄-Werten nicht zulässig ist. Auch waren die eingesetzten Bakterienstämme der beiden durchgeführten MIC-Untersuchungsreihen nicht identisch.

Das Ausmaß der antibakteriellen Wirksamkeit (Effektivität) im Mikrodilutionstest war stark von der Bakteriengattung abhängig und unterschied sich maximal um vier Verdünnungsstufen. Insgesamt war das eingesetzte antimikrobielle PMOX um den Faktor 2-4 effektiver gegen GRAM-positive- (*Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Enterococcus*) als gegen GRAM-negative (*Escherichia*, *Enterococcus*) Keime.

Dieser oft beobachtete Faktor kann mit dem signifikant unterschiedlichen Aufbau der Membranen dieser beiden Bakterientypen sowie der daraus resultierenden, erschwerten Penetration von GRAM-negativen Keimen durch die verwendete Biozidklasse (QUARTs) korreliert werden (vgl. **Kap.1.2.3**).^{73, 157, 176-180}

Im Falle von *E. coli* (MIC₂₄ = 128 ppm) wurde kein Unterschied bei den betroffenen Tierarten festgestellt; im Falle von sieben unterschiedlichen Salmonellenarten war die beobachtete Varianz bezüglich der Tier- und Bakterienarten mit Werten von 128-256 ppm gering. Bei den GRAM-positiven Keimgattungen wurde, außer den insgesamt höheren Wirksamkeiten (16-64 ppm), eine stärkere Tierartabhängigkeit der Messwerte beobachtet. Die höchste Effektivität in Höhe von 16 ppm wurde im Falle von *Staphylo*- und *Streptokokken* erzielt.

Auffällig war zudem die Auswirkung der Geschlechtsreife auf die Empfindlichkeit der GRAM-positiven Keime innerhalb einer Gattung (bspw. *Streptokokken*), die sich um einen Faktor 3 unterschied.

3.2.6 Antimikrobielle Wirksamkeit der telechelen, DDA-X-initiierten Homo- und Copolymere aus P*i*PrOX und PMOX

Analog zu den bisher untersuchten, telechelen PMOX-Homopolymeren, wurde das ebenfalls DDA-X initiierte, EDA-terminierte Homopolymer aus Poly-2-*isopropyl*- #14 sowie die Copolymere aus Poly-2-*isopropyl*- und Poly-2-methyloxazolin #15-16_{O/U} (vgl. **Tab.3.5**) auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit untersucht. Die Ergebnisse der antimikrobiellen Evaluation dieser Polymerklasse DDA-P*i*PrOX_n-EDA bzw. DDA-X-P*i*PrOX_n/PMOX_m-EDA finden sich in **Tab.3.10**.

Tab.3.10 Resultate der antimikrobiellen (MIC_{S.a.}, MIC_{E.c.}) Wirksamkeit der telechelen, mit DDA-X initiierten und EDA terminierten Homo- und Copolymere aus P*i*PrOX und PMOX, (#14-16_{O/U}) gegen die Keime *S. aureus* und *E. coli*.

#	Struktur	M _{NMR} ^a	MIC _{S. aureus} ^{b,c}		MIC _{E. coli} ^{b,d}	
		[g·mol ⁻¹]	[ppm]	[μmol·L ⁻¹]	[ppm]	[μmol·L ⁻¹]
14	DDA-X-P <i>i</i> PrOX ₄₉ -EDA	5,400	2,500 ^e	463	5,000 ^e	926
15	DDA-X-P <i>i</i> PrOX ₁₂ -PMOX ₂₈ -EDA	4,200	1,250 ^e	298	625 ^e	149
16 _O	DDA-X-P <i>i</i> PrOX ₆ -PMOX ₁₆ -EDA	2,500	156	62.4	313 ^e	125
16 _U	DDA-X-P <i>i</i> PrOX ₁₀ -PMOX ₂₀ -EDA	3,300	313 ^e	94.8	625 ^e	189

[a] Molare Konzentrationen wurden berechnet unter Verwendung der per ¹H-NMR ermittelten, mittleren Molekulargewichte, [b] Alle MIC- wurden mindestens zweimal pro Poly-2-oxazolinsystem bestimmt, die Standardabweichung zwischen den Messreihen betrug max. 15%, [c] *Staphylococcus aureus*, GRAM-positives Bakterium; Krankenhauskeim, [d] *Escherichia coli*, GRAM-negatives Bakterium; Darmkeim, [e] Als unwirksam eingestuft (> 256 ppm, vgl. Diskussion in **Kap.3.3.1**).

Alle vier Polymere waren in der erforderlichen MIC-Startkonzentration von 5.00 mg·mL⁻¹ löslich im Nährmedium. Jedoch keines der untersuchten Polymersysteme, mit Ausnahme des Copolymers #16_O, zeigte eine ausreichende antimikrobielle Wirksamkeit von mehr als 256 ppm (vgl. Diskussion in **Kap.3.2.3**).

Die mangelnde Effektivität des DDA-X-P*i*PrOX₄₉-EDA-Homopolymers #14 beispielsweise war vergleichbar mit der eines OH-terminierten DDA-X-PMOX-Homopolymers gleicher Monomeranzahl (#3, DP_{NMR} = 48; vgl. **Tab.3.4**). EDA-terminierte PMOX-Systeme vergleichbarer Polymerkettenlänge hingegen (#6, DP_{NMR} = 48, vgl. **Tab.3.4**) wiesen im Vergleich eine 110-fach höhere molare antimikrobielle Wirksamkeit gegen *S. aureus* (463 vs. 4.2 μmol·L⁻¹) und eine 54-fach höhere molare Wirksamkeit gegen von *E. coli* auf (926 vs. 17 μmol·L⁻¹).

Der immer wiederkehrende „Faktor-2“-Unterschied in der antimikrobiellen Wirksamkeit zwischen GRAM-positiven und GRAM-negativen Keimen wurde auch hier vorgefunden. Selbst das relativ kurz-kettige System DDA-X-PiPrOX₆-PMOX₁₆-EDA (**#16_o**, $M_{\text{NMR}} = 2,500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) war nur gegen den GRAM-positiven Keim *S. aureus* und mit 156 ppm auch nur leidlich antimikrobiell wirksam. Im Vergleich mit einem DDA-X-PMOX-Homopolymer ähnlicher Länge (**#9**, $M_{\text{NMR}} = 2,650 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; vgl. **Tab.3.4**) wurde bei dem Copolymer **#16_o** nur eine 17-fach geringere (*S. aureus*: 3.7 vs. 62.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) eine (*E. coli*: 125 vs. 7.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) molare Wirksamkeit erreicht.

Verantwortlich für diese geringen Effektivitäten der PiPrOX-basierten Homo- und Copolymere war wahrscheinlich das bereits beobachtete LCST-Verhalten in wässrigen Medien.^{182, 183} Offensichtlich wurde damit die Effektivität der antimikrobiellen DDA-X-Funktion am Rückgrat des Poly-2-oxazolins und damit eine effektive Penetration/Perforation von Bakterienmembranen nachteilig beeinflusst.

Von einer hämotoxischen Evaluierung der PiPrOX-basierten Systeme **#14-16** wurde daher, mangels einer konkreten Anwendungsperspektive, abgesehen.

3.3 Antimikrobielle, telechele Poly-2-oxazoline als makromolekulare Inhibitoren dentalrelevanter Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Die Zielstellung dieses Kapitels war die Evaluierung des Einsatzes telecheler, bereits als antimikrobiell klassifizierter Polyoxazoline als hochmolekularer Kollagenase- und Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren. Neben einer Untersuchung des zugehörigen Wirkpotentials in wässrig gepufferten Lösung und auf kollagenhaltigen Templaten sollte das Ausmaß der Wirksamkeit quantifiziert und eine minimal notwendige Polymerkonzentration bestimmt werden. Der Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf dem angestrebten Einsatz in dentalrelevanten Oberflächenapplikationen.

3.3.1 Aufbau und Struktur eines Säugetierzahns

Bei Säugetierzähnen handelt es sich um organisch-anorganische Kompositmaterialien, die aus hochspezialisierten Schichten aufgebaut sind (vgl. **Abb. 3.25**). Ihr aus dem Kiefer hervorstehender, von außen sichtbarer Bereich wird als Krone bezeichnet und besteht aus Zahnschmelz.

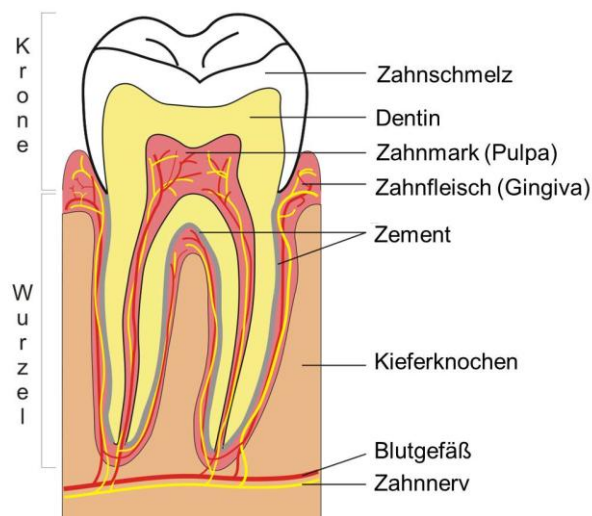


Abb.3.25^j: Schematische Darstellung des Schichtaufbaus eines menschlichen Zahns aus dem hinteren Bereich des Kiefers (den sogenannten Molaren).

Dieses ist ausmineralisiert mit dem anorganischen Hydroxylapatit, was in einer mikroporösen, von Mikro- und Nanokanälchen (sogenannten *tubulis*) durchzogenen,

^j Abbildung entnommen aus <http://wikipedia.org>, frei nach Wikimedia Commons (vom 28.02.2007), Urheber-User: Uwemuell

anorganisch-organischen Hybridstruktur resultiert. Hierbei handelt es sich um eine stark mineralisierte, abrasionsbeständige aber spröde Substanz, die zum überwiegenden Teil aus dem anorganischen, teilfluorierten Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3[\text{OH}]_x[\text{F}]_y$) mit geringen Beimengungen von Wasser und Proteinen (Enamelin), besteht. In der darunterliegenden Dentinschicht bildet eine organische Matrix, bestehend aus miteinander verknüpften Kollagenfasern (Tripelhelices), ein elastisches Grundgerüst. Das Zahnmark (Pulpa) als zentraler Bestandteil eines jeden Säugetierzahns stellt den Stoffwechsel (Metabolismus) zur Zahnwurzel und zum Kieferknochen sicher. Die Pulpa beherbergt, neben den dentinproduzierenden, sogenannten odontoblastischen Zellen, auch die Blutgefäße sowie die beiden inneren Nervenfasern des Zahns.

3.3.2 Dentale Erosionen und Strategien gegen Sekundärkaries

Im Falle einer klinisch manifesten dentalen Erosion, die noch mittels einer zahn-erhaltenden Methode (restorativ) behandelt werden kann, ist eine mechanische Entfernung der bereits zerstörten Zahnanteile („Ausbohren“) unausweichlich. Die dabei geformte Aushöhlung im Dentin (Kavität) wird zunächst mit einem blaulichhärtenden (LC, engl.: *light-cured*) Dentaladhäsiv ausgekleidet (gebondet) und anschließend mit einem anorganisch hochgefüllten Kompositmaterial aufgefüllt.

Für eine dichte und haltbare Kompositversiegelung ist eine starke mechanische Verzahnung des Dentin-Adhäsiv-Kompositverbunds essentiell. Im Detail besteht dieser Verbund drei Schichten: aus dem zahnseitigen Dentin (i), einer Hybridschicht aus Kollagenfasern, die in das Adhäsivpolymer ragen (ii) und dem Adhäsiv-Kompositverbund selbst (iii). In **Abb.3.26** ist die schrittweise Versorgung dentaler Erosionen und der nach erfolgter zahnärztlicher Fachversorgung resultierende Schichtaufbau schematisch und vereinfacht dargestellt.

Die aus dentalchemischer Sicht problematische Zersetzung der kollagenhaltigen Hybridschicht (ii) zwischen Dentin und dem Adhäsiv wird in Verbindung gebracht mit einem unvollständigen Eindringen des Adhäsivs ins Dentinsubstrat,¹⁸⁴ einer inhomogenen Monomerverteilung, unvollständiger Polymerisation, Nanophasen-separation,^{185, 186} einer enzymatischen Zersetzung^{187, 188} oder einer Hydrolyse. Eine Wasseraufnahme durch die Adhäsivschicht oder das Komposit scheint der Hauptgrund für den Abbau des Dentin-Komposit-Verbundes in vivo zu sein.¹⁸⁹⁻¹⁹⁶

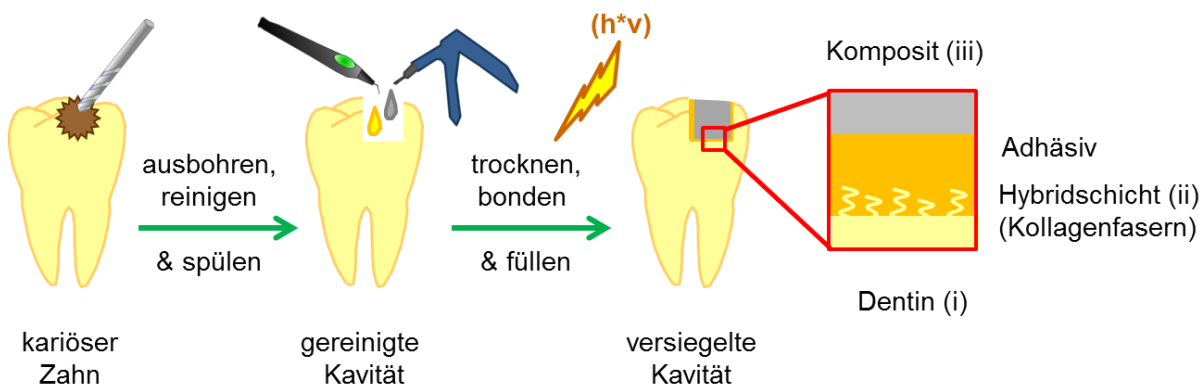


Abb.3.26: Schematische Darstellung der zahnärztlichen Versorgung eines kariösen Zahns mit einer vereinfachten Abfolge der zugehörigen Arbeitsschritte. Rechts im Bild ist der Haftverbund aus Dentin-Adhäsiv-Komposit vergrößert dargestellt.

Die Bedeutung der wässrigen Quellung für die Abnahme der Verbundfestigkeit konnte anhand von Lagerungsversuchen in Wasser und Öl nachgewiesen werden. Während eine Öllagerung keinen negativen Einfluss hatte,¹⁸⁹ führte eine Lagerung in Wasser zu deutlich reduzierten Haftwerten.¹⁹¹⁻¹⁹⁶ In elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden dabei freiliegende und abgerissene Kollagenfasern^{197, 198} sowie eine Ausbildung von nanoskaligen Wasserkanälchen beobachtet.¹⁹⁹

Mittels RAMAN-Spektroskopie konnte zudem aus dem Mikrobereich ausgewaschenes (eluiertes), vom Adhäsiv stammendes Restmonomer nachgewiesen werden.²⁰⁰

Darüberhinaus sind oft kariogene Bakteriengattungen wie *Lactobacillaceae* und *Streptococcaceae* für den Abbau des Dentinsubstrates, der daraus ragenden Kollagenfasern und damit für das Versagen des Dentin-Adhäsiv-Kompositverbunds verantwortlich. Sie besiedeln selbst kleinste Randspalte, wo ihre sauren Stoffwechselprodukte zur Demineralisierung des Hydroxylapatites und so zum Auftreten von (teilanaeroben) Sekundärkaries unter der Füllung führen.²⁰¹

3.3.3 Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bei Sekundärkaries

Begleitet wird dieser Demineralisierungsprozess von einer enzymatischen Zersetzung der organischen Kollagenmatrix, bei der Matrixmetalloproteinasen (MMP) eine Schlüsselrolle spielen.¹⁷³⁻¹⁷⁵ Die Struktur,²⁰² Herkunft, biochemische Funktion²⁰³ sowie Voraussetzungen für die maximale Aktivität dieser Zink(Zn^{2+})-basierten, proteolytischen Enzymklasse wurden ausführlich beschrieben.^{204, 205}

Die meisten MMPs im Dentin²⁰⁶ werden von den odontoblastischen Zellen hergestellt,²⁰⁷ in Form von zunächst inaktiven Enzymvorstufen (Proenzymen, Zymogenen) freigesetzt²⁰⁸ und müssen erst mittels des sogenannten „Cysteinschalters“ aktiviert werden.^{209, 210} Zymogene stammen also nicht von den Karieserregern, sondern liegen bereits im Dentin des Wirtes vor. Ihre Aktivierung im Rahmen der Entstehung von Sekundärkaries²¹¹ erfolgt durch die Freisetzung von Milchsäure und die resultierende Herabsetzung des pH-Wertes.^{173, 207} Auch von sauren Monomeren, die ein gängiger Bestandteil von Dentaladhäsiven sind, werden MMP-Zymogene aktiviert.^{212, 213} Diese werden nach ihrer Applikationsmethode in einstufige, selbst-konditionierende (engl. *self-etch*; SE) sowie in zweistufige, „Ätz- und-Spül“ (engl. *etch- and rinse/total etch*) Systeme unterteilt.^{214, 215} Beide, sowohl die *self-etch*-²¹² als auch die *total-etch*-basierenden^{216, 217} Systeme aktivieren die im Humandentin enthaltenen Gelatinasen der Typen MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) und mutmaßlich auch MMP-8 (Kollagenase 2).²¹⁸

Dentale MMPs sind stark an die organische Kollagenmatrix des Zahns gebunden. Obwohl die an Kollagen bindende Position der dentalen MMPs (MMP-2, -8 und -9) sich nahe an ihrem katalytischen Zentrum („aktive Tasche“) befindet, sind alle Kollagenasen in der Lage, die dentale Kollagenmatrix schnell und effektiv zu wasserlöslichen Peptiden abzubauen.²¹⁹ Von VAN MEERBEEK *et al.* wurde festgestellt, dass MMPs bei niedrigen, sauren pH-Werten nicht mehr effizient funktionieren.²²⁰

3.3.4 Strategien zur Inhibierung dentaler Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Unter Anwendung einer zur Detektion von Proenzymen geeigneten Nachweismethode (*in-vivo*-Zymographie), konnte LEHMANN *et al.* an odontoblastischen Zellen nachweisen, dass nach der Stimulation mit einem SE-Adhäsiv unverzüglich Matrixmetalloproteinasen (MMP-2 und MMP9-Zymogene) freigesetzt wurden.²²¹

Die Zugabe selektiver MMP-Inhibitoren zur Adhäsivformulierung wird folglich als eine elegante dentalchemische Strategie zur Erhöhung der Langzeithaltbarkeit des Dentin-Adhäsiv-Kompositverbunds angesehen. GENDRON *et al.* berichtet von einer vollständigen MMP-Inhibierung nach dem Zusatz geringster Mengen an Chlorhexidin-*bis*-D-glukonat („Chlorhexidin“). Als Nachweis der Inhibierung diente hierbei die proteolytische Zersetzung von Gelatine, die mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Coomassie®-Blau-Färbung analytisch verfolgt wurde.²²²

Ausgehend von diesem Resultat sind viele *in-vivo*-/*in-vitro*-Studien durchgeführt worden, die den positiven Einfluss von Chlorhexidin auf die Stabilität des Dentin-Adhäsiv-Kompositverbunds^{223, 224} und den Schutz der Hybridschicht zwischen Dentinkollagen und Adhäsiv (vgl. **Kap.1.7.2**) belegen.^{223, 225-228} Von BRESCHI *et al.* wurde vor kurzem auch ein synthetisches Amid (Galardin) als hochspezifischer MMP-Inhibitor in einem Dentaladhäsiv eingesetzt.²²⁹

3.3.5 Chlorhexidin und Nachteile niedermolekularer MMP-Inhibitoren

Ein großer Vorteil von Chlorhexidin ist seine intrinsisch vorhandene, antimikrobielle Wirksamkeit, die in der Kavität einen gewissen Grad an Desinfektion bietet. Eindeutig nachteilig bei einem dentalchemischen Einsatz von Chlorhexidin sind seine Tendenz zur Ausbildung brauner Verfärbungen²³⁰ sowie sein kontinuierlicher Abbau zum toxischen Zersetzungsprodukt *para*-Chloranilin.^{231, 232}

Werden niedermolekulare MMP-Inhibitoren wie Chlorhexidin nicht in der Adhäsivmatrix verankert, so ergibt sich ein Freisetzungssystem, bei dem der Inhibitor kontinuierlich in die Mundhöhle abgegeben wird (engl. *leeching*). Bei einer mittelfristigen Freisetzung kann es zu einer Diffusion von Chlorhexidin ins Zahnmark kommen, was zu einer temporären Reizung des Zahnnerves führen kann. Nach langfristiger Anwendung von Chlorhexidin kommt es gehäuft zu oral auftretenden Pilzinfektionen (*Candida albicans*) und zu Wundheilungsstörungen im Mundraum.

Auch wird damit die Entwicklung hartnäckig chlorhexidinresistenter Bakterienstämme unnötig vorangetrieben. Zudem ist Chlorhexidin ein bekanntes Zellgift,²³³ dessen Wirkmechanismus gegenüber fibroblastischen²³⁴ und menschlichen osteoblastischen Zellen²³⁵ erst vor kurzem genauer untersucht wurde. Weniger bekannt ist schließlich, dass Chlorhexidin ein bekanntes Ototoxin ist, d.h. bei einem Übertritt ins Mittelohr zu temporärer oder permanenter Taubheit führen kann.²³⁶

3.3.6 Klassifikation der Einzelkomponenten der bioaktiven Poly-2-oxazoline

Im ersten Schritt wurde die Inhibierungseffektivität telecheler Poly-2-oxazolinsysteme gegenüber MMPs in wässriger Lsg. untersucht. Als Vorbild dienten hierzu Vorarbeiten von C. J. WASCHINSKI, in denen das Kollagenase-inhibierende Potential von analogen antimikrobiellen DDA-X-PMOX-Makromeren untersucht wurde.¹⁵⁸

Durch die Kombination eines Kollagenase-Substratsatzes mit einer UV/Vis-Methode wurden darin deutliche Hinweise auf eine inhibierende Wirkung des Makromers auf

die Aktivität von Kollagenase erhalten. Als leicht verfügbare, bakterielle Gelatinase wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Kollagenase *Typ 1* des Gasbranderregers *Clostridium histolyticum* eingesetzt. Als niedermolekulare Vergleichssysteme dienten das antimikrobielle QUART *N*-Dodecyl-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid (DTAC)^{73, 237, 238} und der als starker MMP-Inhibitor hinreichend bekannte Chelatbildner Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz (EDTA- Na_2).^{206, 239, 240}

Besonderes Augenmerk wurde gelegt auf den Einfluss der jeweiligen Polymerkomponenten auf den hieraus resultierenden Grad der Kollagenaseinhibierung in wässriger Lösung. Das Aufbauprinzip der im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten, telechelen Poly-2-oxazoline ließ sich vereinfachend in drei hierarchisch aufgebauten Abschnitte unterteilen (vgl. **Kap.3.1**):

Den Kettenanfang *I*-, eingeführt mittels Initiierung; das Polymerrückgrat der Länge *n* (\equiv Polymerisations-grad DP), linear aufgebaut aus 2-*R*-Oxazolinmonomeren mit unterschiedlich hydrophilen/hydrophoben Seitengruppen *R* sowie die mittels Terminierung eingeführte, endständige Satellitengruppen *T*.

3.3.7 Einfluss der Polymerkomponenten auf die MMP-inhibierende Effektivität gegenüber bakterieller Kollagenase in wässrig gepufferter Lösung

Jeder der drei vorgestellten Bereiche wurde im folgenden variiert und die resultierenden telechelen Poly-2-oxazoline hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit und ihrer MMP-inhibierenden Effektivität unter verschiedenen Bedingungen untersucht. In **Tab. 3.11** sind die analytischen Daten der telechelen Poly-2-oxazoline der Klasse *I*-(*PROX*)_{*n*}-*T* (#13-19) zusammengefasst. Alle dort aufgeführten Polymere wurden vollständig mittels ¹H-/¹³C-NMR sowie Gelpermeationschromatografie (GPC) charakterisiert; die zugehörigen GPC-Elugramme zeigten eng verteilte, monomodale Molekulargewichtsverteilungen.

Die Effektivität der Kollagenaseinhibierung von unterschiedlich aufgebauten Poly-2-oxazolen der Klasse *I*-(*PROX*)_{*n*}-*T* wurde anhand von Abbaubersuchen in wässrigem Citratpuffer (0.1 mol·L⁻¹, pH=6.30) bestimmt. Unter Verwendung von Gelatine (denaturiertes Kollagen) und DTAC als niedermolekularen, QUART-basierten MMP-Inhibitor wurde der Grad des Gelatineabbaus mittels einer reduzierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), einem bereits bewährten, schnell durchführbaren Detektionsverfahren,^{241, 242} verfolgt.

Tab.3.11: Analytische Daten der telechelen Poly-2-oxazoline der Klasse $I-(PROX)_n-T$ (#13-19) mit zwei unterschiedlichen Kettenanfangsgruppen $I = \text{Me}$ (MeOTs-initiiert), DDA-X (initiiert mit dem antimikrobiellen QUART-Initiator); zwei unterschiedlichen Oxazolin-Seitengruppen $R = \text{M}$ (Methyl-), E (Ethyl-) und variierten Satellitengruppen $T = \text{OH}$, PYR (Pyridiniumbromid), EDA, DDA und AMA (vgl. **Kap.3.1**).

#	Struktur	DP _{set} ^a	M _{NMR} ^b	DP _{NMR} ^c	M _n ^d	M _w ^d	DP _{GPC} ^e	PDI ^f	Y ^g
			[g·mol ⁻¹]		[g·mol ⁻¹]				[%]
14	Me-PMOX ₃₇ -OH ^h	30	n. d. ^h	n. d. ^h	3,200	3,750	37	1.16	92
15	Me-PEOX ₂₄ -OH ^h	20	n. d. ^h	n. d. ^h	2,400	2,700	24	1.15	90
16	Me-PEOX ₅₃ -PYR	50	5,400	53	5,200	6,000	51	1.16	85
17	Me-PMOX ₂₂ -DDA	20	2,100	22	2,300	2,700	24	1.15	80
18	DDA-X-PMOX ₁₇ -EDA	20	2,000	17	2,300	2,600	21	1.13	79
13	DDA-X-PMOX ₂₈ -AMA	20	3,000	28	2,700	3,200	24	1.19	82
19	DDA-X-PMOX ₃₇ -AMA ⁱ	30	3,800	37	3,300	3,900	31	1.20	86 ⁱ

[a] Berechnet aus dem $[M_0] \cdot [DDA-X]^{-1}$ -Verhältnis, Umsetzungstemperatur PMOX = 100°C, PEOX = 120°C, [b] Der Polymerisationsgrad im NMR wurde berechnet aus dem Integralverhältnis des charakteristischen DDA-X-Signals bei 0.84 ppm (t, 3H, -CH₃) vs. dem PROX-Rückgratsignal bei 3.3 ppm (b, n4H, N(CH₂)₂), [c] Aus dem ¹H-NMR-Spektrum berechneter, mittlerer Polymerisationsgrad, [d] Ermittelt aus dem GPC-Elugramm im Vergleich mit einer Kalibrierkurve, [e] Aus dem GPC-Elugramm berechneter, mittlerer Polymerisationsgrad, [f] Polydispersitätsindex, bestimmt aus dem $(M_w \cdot M_n^{-1})$ -Quotienten, [g] Produktausbeute in % nach vollständiger Aufreinigungsprozedur und mehrtägiger Dialyse; bestimmt durch Vergleich mit den Anfangseinwaagen von Initiator und MOX-Monomer, [h] Mangels eines Referenzsignals waren M_{NMR} und DP_{NMR} nicht bestimmbar, [i] Es handelte sich um eine Scale-Up-Synthese mit 14.0 g an Produkt.

Für die Etablierung dieses auf bekannten zymografischen Verfahren aufbauenden,²¹⁸ sehr sensiblen Gelatineabbauassays^{216, 220} wurde EDTA-Na₂ als niedermolekulare Positivreferenz verwendet. In Verbindung mit einem Gemisch aus gepufferter, gelöster Gelatine (2.0 mg·mL⁻¹) und der bakteriellen Kollagenase (*C. histolyticum* Typ I, 1.0 mg·mL⁻¹)²⁴³ hemmten sowohl wässriges EDTA-Na₂ als auch wässriges DTAC den Kollagenabbau in Konzentrationen um 25.0 mmol·L⁻¹. Somit wurde bestätigt, dass es sich bei der eingesetzten bakteriellen *C. histolyticum* Typ I-Kollagenase um eine klassische Matrixmetalloproteinase (MMP) handelte.

Die beobachtete, ausgezeichnete Inhibition stimmte gut mit den bekannten MMP-Inhibitionsraten von EDTA-Na₂ überein.^{244, 245} In **Abb.3.27** ist die SDS-PAGE eines solchen Gelatineabbauassays dargestellt (Fotoscan nach Coomassie®-Färbung). Diese wurde freundlicherweise durchgeführt von Herrn Dipl.-Ing. S. Konieczny am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften (BCI) der TU Dortmund.

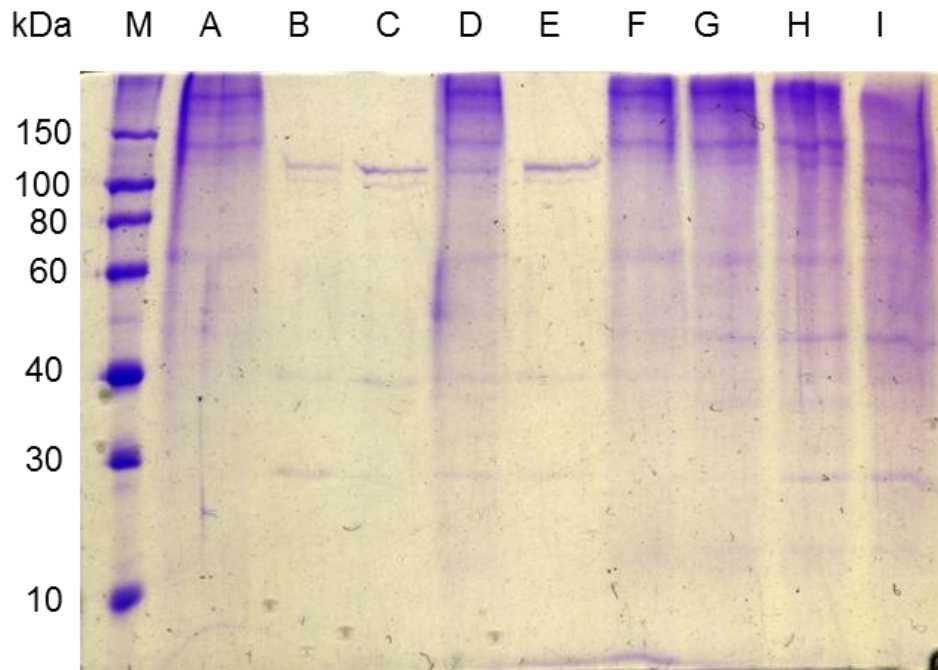


Abb.3.27:^k SDS-PAGE des Gelatineabbau-Assays mit wässrigen Lsg. (Citratpuffer, $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=6.30$). **Spalte M:** Molekulargewichtsmarker ($150\text{-}10 \text{ kDa}$), **Spalte A:** nur Gelatine ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), **Spalte B:** nur bakterielle Kollagenase (*C. histolyticum* Typ I, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), **Spalte C:** Gelatine/Kollagenase-Gemisch ($2.0/1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), **Spalte D:** Gelatine/Kollagenase-Gemisch mit DTAC ($25.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), **Spalte E:** Gelatine/Kollagenase-Gemisch mit Me-PMOX₃₇-OH (**#14**, $18.75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), **Spalten F-I:** Gelatine/Kollagenase-Gemisch unter Zugabe des inhibierenden DDA-X-PMOX₁₇-EDA (**#18**) in abnehmender Konzentration: **F:** $13.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, **G:** $3.28 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, **H:** $1.60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, **I:** $0.80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Alle Proben-Lsg. wurden für 35 min bei 37°C , $1,400 \text{ rpm}$ in einem temperierten Thermomixer vorinkubiert.

Die linke, erste **Spalte M** beinhaltet den Molekulargewichtsmarker. Dieser überstreicht den Bereich von $150\text{-}10 \text{ kDa}$ ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) mit sieben diskreten Banden bei $150, 100, 80, 60, 40, 30$ und 20 kDa . Die gepufferte Gelatine ohne Enzymzusatz wurde in **Spalte A** aufgetragen und zeigte eine breite Bande vom Beginn des Trenngels bis 20 kDa . Der überwiegende Anteil der Komponenten war $> 60 \text{ kDa}$, es wurden zudem drei diskrete Banden bei $> 150, 140$ sowie 65 kDa ausgemacht.

^k SDS-PAGE wurde durchgeführt von Herrn Dipl.-Ing. S. Konieczny am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften (BCI) der TU Dortmund.

Die bakterielle Kollagenase aus *C. histolyticum* Typ I wurde in **Spalte B** aufgetragen und zeigte vier diskrete Banden bei 125, 105, 50 und 27 kDa, wobei die 125 kDa die intensivste (die mit der höchsten relativen Konzentration) war. Nach Auftragung eines vorinkubierten (5 min bei 37°C, 1,400 rpm) Gelatine/Kollagenase-Gemisches ($2.0/1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in **Spalte C** wurden ausschließlich von Kollagenase stammende Banden ausgemacht. Das Fehlen jeglicher Gelatinebanden belegte den vollständigen Abbau des zugesetzten Gelatinecollagens durch die Kollagenase. In einem weiteren, analog durchgeführten Versuch wurde ein Gelatine/Kollagenase-Gemisch ($2.0/1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) mit dem niedermolekularen Referenz-QUART DTAC ($25.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) versetzt und in **Spalte D** aufgetragen. Hierbei wurde ein vollständig erhaltenes Spektrum an Gelatinebanden (vgl. **Spalte A**) beobachtet, was ein Beleg für die hinreichende Inhibierung der bakteriellen Kollagenase durch DTAC war; denn die verbleibende Restaktivität der Kollagenase konnte offensichtlich keinen detektierbaren Gelatineabbau bewirken.

Im Gegensatz dazu führte die äquimolare Zugabe des MeOTs-initiierten und hydroxylterminierten Poly-2-methyl-oxazolins Me-PMOX₃₇-OH (**#14**, $18.75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) zu keiner signifikanten Inhibierung der Kollagenaseaktivität, so dass in **Spalte E** nur die Kollagenasebanden und keine Gelatine mehr vorgefunden wurden (vgl. **Spalte C**). Ein nicht-QUART-funktionalisiertes, hydroxylterminiertes Poly-2-methyloxazolin war im Rahmen der Untersuchung kein makromolekularer Kollagenaseinhibitor. Das antimikrobielle, QUART-funktionalisierte (DDA-X als Initiator) Poly-2-methyl-oxazolin DDA-X-PMOX₁₇-EDA **#18**, zugesetzt zu den Proben in den **Spalten F-I** hemmte signifikant die bakterielle Kollagenase des Gasbranderregers in allen vier Verdünnungsschritten: **Spalte F**: $13.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, **Spalte G**: $3.28 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, **Spalte H**: $1.60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sowie **Spalte I**: $0.80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Die ersten drei PMOX-Konzentrationen (**#18**, $13.3\text{-}1.60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) der **Spalten F-H** konnten eine nahezu vollständige Kollagenaseinhibierung bewirken; die geringste Konzentration an MMP-inhibierenden PMOX-Makromer ($0.80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), aufgetragen in **Spalte I**, deutete aufgrund der geringeren Bandenintensität auf eine partielle, unvollständige Kollagenaseinhibierung. In **Tab.3.12** wurden alle Resultate der MMP-inhibierenden Effektivität, verglichen mit der niedermolekularen QUART-Referenzverbindung DTAC und geordnet nach Strukturmerkmalen der Polymere $I\text{-}(\text{PROX})_n\text{-T}$, zusammengefasst. Zusätzlich enthalten sind die minimalen Inhibierungskonzentrationen (MIC-Werte), gegenüber dem GRAM-positiven Karieskeim *S. mutans*.

Tab.3.12: Zusammenstellung der antimikrobiellen Wirksamkeiten der telechelen Poly-2-*R*-oxazoline der Klasse I-(*PROX*)_{*n*}-*T* gegenüber dem Karieskeim *S. mutans* in Vergleich zu ihren MMP-inhibierenden Effektivitäten gegenüber der bakteriellen Kollagenase des Gasbranderregers *C. histolyticum Typ I* in gepufferter Lösung (Citratpuffer, 0.1 mol·L⁻¹, pH=6.30). Von einer antimikrobiellen Wirksamkeit („ja“) wurde bei MIC-Werten < 256 ppm ausgegangen; von einer MMP-Inhibierung der telechelen Polyoxazoline in Lösung („ja“) wurde bei minimalen Enzyminhibierungskonzentrationen von ≥ 1.60 mmol·L⁻¹ ausgegangen. Variiert wurden der Kettenanfang *I*, die Monomersorte *R*, die Polymerkettenlänge *n* und die Satellitengruppe *T*.

#	Struktur	<i>I</i> ^a	<i>R</i> ^b	<i>N</i> ^c	<i>T</i> ^d	MIC _{s.m.} ^e [ppm]	Antimikro- biell ^f	MMP-inhi- bierend ^g
				[-]				
0h	DTAC	-	-	-	-	4.9	ja	ja
14	Me-PMOX ₃₇ -OH	Me	M (CH ₃)	37	OH	> 2,500	nein	nein ^h
15	Me-PEOX ₂₄ -OH	Me	E (C ₂ H ₅)	24	OH	> 2,500	nein	nein ^h
16	Me-PEOX ₅₃ -PYR	Me	E (C ₂ H ₅)	53	PYR	> 100 ⁱ	ja	nein
17	Me-PMOX ₂₂ -DDA	Me	M (CH ₃)	22	DDA	39.1	ja	ja
18	DDA-X-PMOX ₁₇ -EDA	DDA-X	M (CH ₃)	17	EDA	4.9	ja	ja
13	DDA-X-PMOX ₂₈ -AMA	DDA-X	M (CH ₃)	28	AMA	9.8	ja	ja
19	DDA-X-PMOX ₃₇ -AMA ^j	DDA-X	M (CH ₃)	37	AMA	19.5	ja	ja

[a] Mittels Initiierung eingeführte funktionelle Gruppe am Polymerkettenanfang, [b] Art und chemische Struktur der alkyliischen Seitengruppe des jeweils polymerisierten 2-*R*-1,3-oxazolinmonomers, [c] Monomeranzahl, ermittelt mittels GPC (#14,15) bzw. mittels ¹H-NMR (#13, #16-9), [d] Mittels Terminierung eingeführte distale Satellitengruppe am Polymerkettenende, [e] Minimale Inhibierungskonzentration gegen den GRAM-positiven Karieskeim *S. mutans*; bestimmt dreimal pro Verbindung, die signifikante Standardabweichung lag jeweils bis zum nächsthöheren Wert der Verdünnungsreihe, [f] Bewertung der antimikrobiellen Wirksamkeit bei MIC-Werten unterhalb der Wirksamkeitsgrenze von 256 ppm (vgl. Kap.3.3.1), [g] Bewertung der MMP-inhibierenden Effektivität gegenüber gepufferter bakterieller Kollagenase aus *C. histolyticum Typ I*; detektiert mittels Gelatinabbau-Assays an SDS-PAGEs, [h] Keine MMP-Inhibierung beobachtet, [i] Literaturwert gegen den Keim *S. aureus*,⁷³ [j] Es handelte sich um eine Scale-Up-Synthese mit 14.0 g an Produkt.

Für das in gepufferter Lsg. zuverlässig MMP-inhibierende DTAC (vgl. **Spalte D** in **Abb.3.27**) wurde mit 4.9 ppm (18.6 μmol·L⁻¹) eine sehr gute antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber *S. mutans* ermittelt. Das analog zum Poly-2-methyloxazolin #14 aufgebaute Poly-2-ethyloxazolin Me-PEOX₂₄-OH (#15, 18.75 mmol·L⁻¹, nicht aufgetragen in **Abb.3.27**) zeigte sogar in hohen Anteilen (untersucht bis 7.50 Gew.%) keinerlei MMP-inhibierenden Effekt.

Mit diesem Ergebnis konnte ein Einfluss sowohl des Poly-2-*R*-oxazolin-Rückgrats (R = Methyl-, Ethyl-) als auch der Methyl- und Hydroxylgruppen (eingeführt durch den Initiator/Terminierungsmittel) auf die enzymatische Effektivität der bakteriellen Kollagenase ausgeschlossen werden.

Unter Beibehaltung des nicht quaternisierten Initiatorsystems (MeOTs), der daraus resultierenden Methylgruppe am Polymerkettenanfang sowie derselben Monomersorte (2-Ethyl-1,3-oxazolin), jedoch einer Terminierung zum Pyridiniumbromid (PYR) wurde das telechele Poly-2-ethyloxazolin Me-PEOX₅₃-PYR (**#16**) synthetisiert. Für diese Polymere wurden bereits antimikrobielle Wirksamkeiten von mehr als 100 ppm (gegen *S. aureus*) ermittelt.⁷³ Diese waren höher als die MIC-Werte vergleichbarer, DDA-X initiierten, telechelen Poly-2-oxazoline (vgl. **Kap.3.2**).

Obwohl durch die Pyridinterminierung am Polymerkettenende ebenfalls eine kationische QUART-Funktion (Pyridiniumbromid) generiert wurde, wurde nach Zugabe dieser Polyoxazolinspezies zu einem Gelatine/Kollagenase-Gemisch selbst bei 5.0 Gew.% Anteil keine MMP-inhibierende Effektivität festgestellt. Offensichtlich war das terminal vorhandene, aromatische QUART hierbei deutlich weniger effektiv als langkettige, hydrophobe (C₁₂)-Alkylbromid-QUARTs (wie bspw. DDA-X).

Die Terminierung eines MeOTs-initiierten Poly-2-methyloxazolins mit DDA führte zu einer DDA-X-analogen, jedoch *para*-1,4-xylyl-freien, distalen QUART-Funktion. Das resultierende Me-PMOX₂₂-DDA (**#17**, vgl. **Tab.3.12**) zeigte sowohl eine gute antimikrobielle Wirksamkeit von 39.1 ppm (18.6 μmol·L⁻¹) gegenüber *S. mutans*, als auch eine beachtliche MMP-Inhibierungseffektivität. Nach der Inkubation mit einem gepufferten Gelatine/Kollagenase-Gemisch (2.0/1.0 mg·mL⁻¹) zeigte Me-PMOX₂₂-DDA **#17** selbst in sehr geringen Anteilen eine vollständige Kollagenaseinhibierung. Erstaunlicherweise war der aus der Molmasse M_{NMR} berechnete MIC-Wert dieses Makromeren gegen *S. mutans* identisch mit dem molaren MIC-Wert des niedermolekularen QUARTS DTAC (beide 18.6 μmol·L⁻¹).

Damit erfüllte das PMOX-gebundene und chemisch betrachtet, DTAC-analoge DDA bereits die Anforderungen der „intrinsischen Bifunktionalität“ von antimikrobieller Wirksamkeit und MMP-inhibierender Effektivität; synergistisch vereint in einem einzigen Polyoxazolin-basierten, telechelen Makromer. Die Anforderungen dieser im Rahmen der vorliegenden Arbeit angestrebten, intrinsischen Bifunktionalität erfüllte

auch das DDA-X initiierte und EDA-terminierte, telechele Poly-2-methyloxazolin-Makromer DDA-X-PMOX₁₇-EDA (**#18**, vgl. **Tab.3.12**). Es besaß eine ausgezeichnete antimikrobielle Wirksamkeit von 4.9 ppm ($2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) gegen *S. mutans* sowie zeigte eine vollständige Inhibierung der bakteriellen Kollagenase bei Konzentrationen von bis zu $1.60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (vgl. **Abb.3.27, Spalten F-G**).

Zur oberflächenwirksamen distalen Immobilisierung der intrinsisch-bifunktionellen, telechelen Poly-2-oxazoline wurde jedoch eine endständige, reaktive Gruppe (beispielsweise eine Doppelbindung) benötigt. Aus diesem Grunde wurden die beiden methacrylat-funktionalisierten, AMA-terminierten Systeme DDA-X-PMOX_n-AMA (**#13** und **#19**, vgl. **Tab. 3.12**) hergestellt und charakterisiert; im Falle des DDA-X-PMOX₃₇-AMA **#19** handelte es sich um eine Scale-Up-Synthese mit 14.0 g an polymeren Produkt. Beide telechelen, AMA-terminierten PMOX-Systeme waren durch sehr gute antimikrobielle Wirksamkeiten (niedrige MIC-Werte) von 19.5-9.8 ppm ($5.1\text{-}3.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) gegen den Karieskeim *S. mutans* gekennzeichnet.

Zudem wiesen beide PMOX-Systeme in geringen Anteilen (von unter 2.50 Gew.%) eine hinreichend hohe MMP-inhibierende Effektivität in gepufferter Lsg. gegenüber der bakteriellen *C. histolyticum* Typ I-Kollagenase des Gasbranderregers auf.

Abschließend ließ sich feststellen, dass bei Vergleich der drei distalen Satellitengruppen EDA, DDA und AMA (**#13** und **#17-19**) kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der MMP-inhibierenden Effektivität der QUART-Funktion am Poly-2-oxazolin-Rückgrat zu beobachten war. Ein signifikanter Einfluss der Kettenlänge der Poly-2-oxazoline auf die selektive Inhibierung der bakteriellen Matrixmetalloproteinase in Lsg. war nicht zu beobachten, wie der Vergleich der beiden unterschiedlich langen PMOX-Systeme **#13** vs. **#19** (vgl. **Tab.3.12**) zeigte.

3.3.8 Quantitativer Inhibierungsassay an rekombinanter, humaner Matrixmetalloproteinase rhMMP-9 in wässrig gepufferter Lösung

Die in diesem Teilkapitel diskutierten, quantitativen rhMMP-9-Inhibierungsassays wurden freundlicherweise durchgeführt von Herrn Prof. D. H. Pashley (D.M.D, Ph.D) und seinen Mitarbeitern am Medical College of Georgia, USA.

Die DDA-X-initiierten, telechelen Poly-2-methyloxazoline der DDA-X-PMOX-AMA-Klasse waren, außer der bereits nachgewiesenen intrinsischen Bifunktionalität gegenüber Bakterien und MMPs, aufgrund der reaktiven AMA-Funktionalisierung über ihre Doppelbindungen immobilisierbar. Im Hinblick auf den angestrebten dentalen Anwendungsbereich dieser QUART-basierten, makromolekularen MMP-Inhibitoren wurde im Folgenden die MMP-inhibierende Effektivität in gepufferter, wässriger Lösung gegenüber rekombinanten, zuvor isolierten humanen Matrixmetalloproteinasen rhMMP-9 quantitativ bestimmt.

Ermittelt wurde dabei die Dosis-Wirkungs-Beziehung steigender Konzentrationen des AMA-terminierten, DDA-X initiierten Poly-2-methyloxazolins (**#19**; DDA-X-PMOX₃₇-AMA). Verwendet wurde ein kommerzielles MMP-Assay-Kit. Der Nachweis erfolgte über die Spaltung eines Thiopeptidsubstates (R-S-S-R) unter Freisetzung einer Sulfhydrylgruppe (R-SH) unter Bildung eines gelben Produktes (2-Nitro-5-thiobenzoessäure, TNB), dessen Konzentration alle 10 min per Extinktionsmessungen im UV/Vis ($\lambda = 412 \text{ nm}$) bestimmt wurde.

Die mehrstufige Inkubationsprozedur bei 37°C dauerte pro Probe insgesamt 2.5 h. Eine MMP-Inhibitor-freie Negativreferenz und Vergleichskurven von Standardsubstanzen einer bekannten Aktivität wurden aufgezeichnet. Alle rhMMP-9-Assays wurden in 5-facher Ausführung durchgeführt. In **Abb.3.28** wurden die dabei gewonnenen Messwerte grafisch dargestellt.

Bei den beiden geringsten Konzentrationen an DDA-X-PMOX₃₇-AMA (**#19**, vgl. **Tab.3.12**) von 0.50 und 1.00 Gew.% wurde die rekombinante humane Kollagenase MMP-9 nur zu etwa 15 % inhibiert. Wurde der PMOX-Anteil auf 2.50 bzw. 5.00 Gew.% verdoppelt, erhöhte sich der rhMMP-9-Inhibierungsgrad auf ca. 26 bzw. 33 %. Nach einer weiteren Erhöhung der PMOX-Anteils auf 10.0 Gew.% stieg die Inhibierungsrate auf ca. 45 %; allerdings wurde hierbei mit $\pm 8.9 \%$ auch der größte Bestimmungsfehler der Messreihe erhalten.

In einem letzten Schritt wurde der PMOX-Anteil auf 15.0 bzw. maximal 25 Gew.% erhöht. Dabei wurden die mittels der eingesetzten Bestimmungsmethode maximal erzielten Inhibierungsgrade von $66.92 \pm 3.53 \%$ bzw. $64.70 \pm 3.58 \%$ ermittelt.

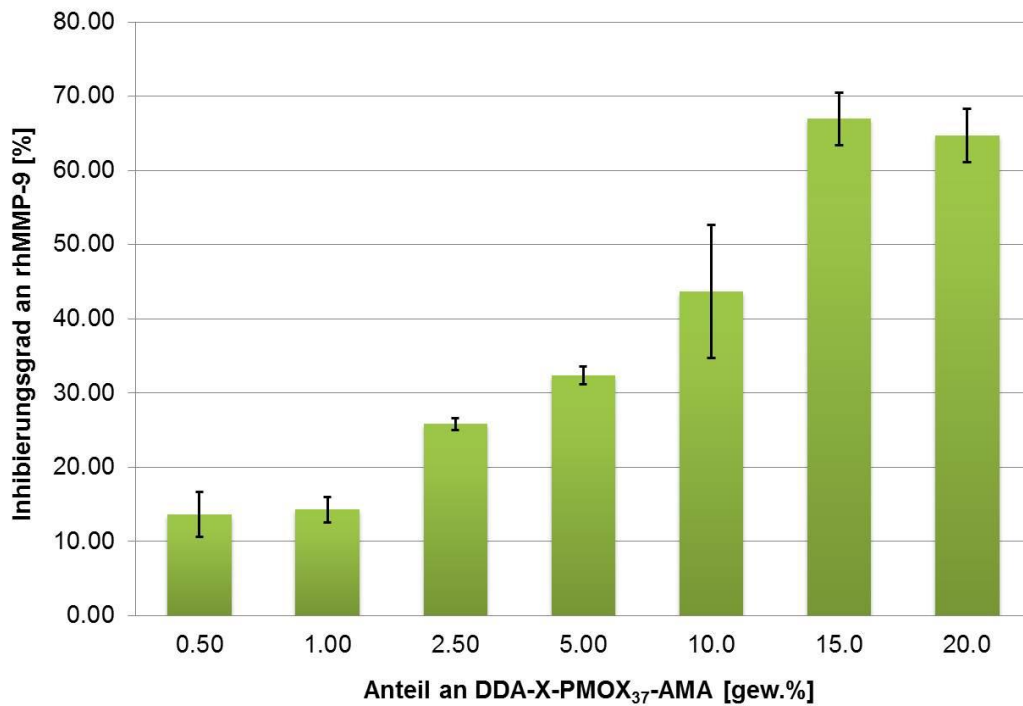


Abb.3.28:¹ Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von steigenden Konzentrationen (0.50-20.0 Gew.%) des telechelen, makromolekularen rhMMP-9-Inhibitors DDA-X-PMOX₃₇-AMA und des ermittelten Inhibierungsgrades in %; gleiche Buchstaben (a-d) kennzeichnen Messwerte der gleichen Signifikanzgruppe. Die Fehlerbalken geben die ermittelte max. Messwertabweichung der Methode wieder.

Daher wurden im nächsten Schritt weitere dentalrelevante Methoden zur Ermittlung der MMP-inhibierenden Effektivität auf dem betroffenen Dentinsubstrat entwickelt und angewandt. Der angestrebte Einsatzbereich der makromolekularen, PMOX-basierten Inhibitoren dentaler MMPs waren die mittels Blaulicht auspolymerisierten Oberflächen selbststützender Dentaladhäsive. Bedingt durch ihren Wirkmechanismus stehen diese Adhäsive stets in Kontakt zu bereits angeätzten Dentin.

Wie von TJADERHANE, TAY, BRESCHI, CARRILHO, PASHLEY *et al.* vor kurzem gezeigt wurde, befinden sich die soeben betrachteten MMP-9 vorwiegend in mineralisierten Dentinkompartimenten; die effektiv wirksamsten Kollagenasen im demineralisierten Dentin waren MMP-2 und bedingt, MMP-8.²⁴⁶

¹ Die quantitativen rhMMP-9-Inhibierungsassays wurden durchgeführt von Herrn Prof. D. H. Pashley (D.M.D, Ph.D) und seinen Mitarbeitern am Medical College of Georgia, USA.

Nichtsdestoweniger wurden in vorangehenden Arbeiten von TJADERHANE *et al.* die Matrixmetalloproteinasen des Typs MMP-8 als die wichtigsten dentalen Kollagenasen eingestuft.^{247, 248} Daher konzentrierte sich die nachfolgende Methodenentwicklung auf demineralisiertes Dentin. Da zudem nachgewiesen wurde, dass Rinderzahndentin ein verlässliches Substrat zur Ermittlung der MMP-2- (und auch MMP-9) Aktivität darstellt,²⁴⁹ wurden in den nachfolgenden Untersuchungen demineralisierte, standardisierte Rinderdentinscheiben als Substrat eingesetzt.

3.3.9 Entwicklung von Abbauassays an demineralisiertem Rinderzahndentin

Hierfür wurde zunächst ein an den Assay optimal angepasstes Puffersystem ermittelt und mit unterschiedlichen Probenkörpern aus demineralisierten Rinderzahndentin korreliert. Aufbauend auf dem wässrig applizierbaren „Collagenase Substrate Kit“ (Fa. Fluka) und den guten Resultaten der MMP-Inhibierung in Puffer-Lsg. (vgl. **Kap.3.3.8**) wurde die aus dem GRAM-positiven, obligat anaeroben Gasbranderreger *Clostridium histolyticum* isolierte bakterielle Typ I-Kollagenase verwendet²⁵⁰⁻²⁵²

Die zu verwendeten Puffersysteme wurden auf zwei mögliche Kandidaten eingengt: Eine maximale Abbauaktivität der bakteriellen *C. histolyticum* Typ I-Kollagenase wurde vom organischen Einkomponenten-Puffersystem aus 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES, $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) bei physiologischen pH-Wert um 7.30 berichtet²⁴¹. Einige Quellen befanden auch die Zugabe von Calciumionen als Calciumacetat-Monohydrat ($\text{Ca}(\text{OAc})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, $5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^{133, 212} oder Zinkionen²⁵³ als essentiell für die Langzeitstabilität von bakteriellen MMPs,^{205, 243} insbesondere der von *C. histolyticum*-Kollagenasen.²⁴³

In anderen, abweichenden Quellen hingegen wurde eine optimale Spaltung der relevanten Glycin-Glycin-Bindungen des Kollagens im eingesetzten, anorganischen Citratpuffer ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) bei einem marginal sauren pH-Wert von 6.30 beobachtet.²⁵⁴

In einer ersten Versuchsreihe wurden die beiden soeben vorgestellten Puffersysteme (organisch \equiv HEPES; anorganisch \equiv Citratpuffer) mit drei unterschiedlichen Größen und Schnittarten von standardisierten Rinderdentin-Probenkörpern getestet. Diese wurden nach vollständiger Demineralisierung in drei Gewichtsklassen von 25 mg (Typ A), 50 mg (Typ B) sowie 100 mg (Typ C) eingeteilt (vgl. **Abb.3.29**).

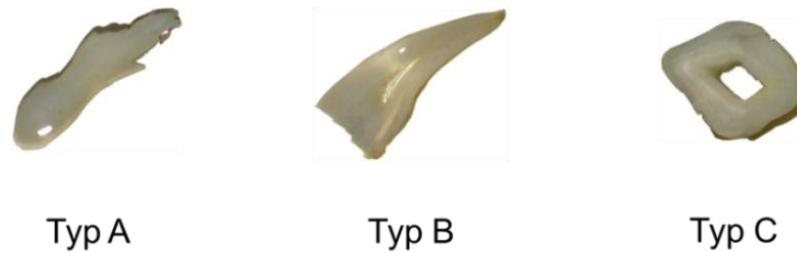
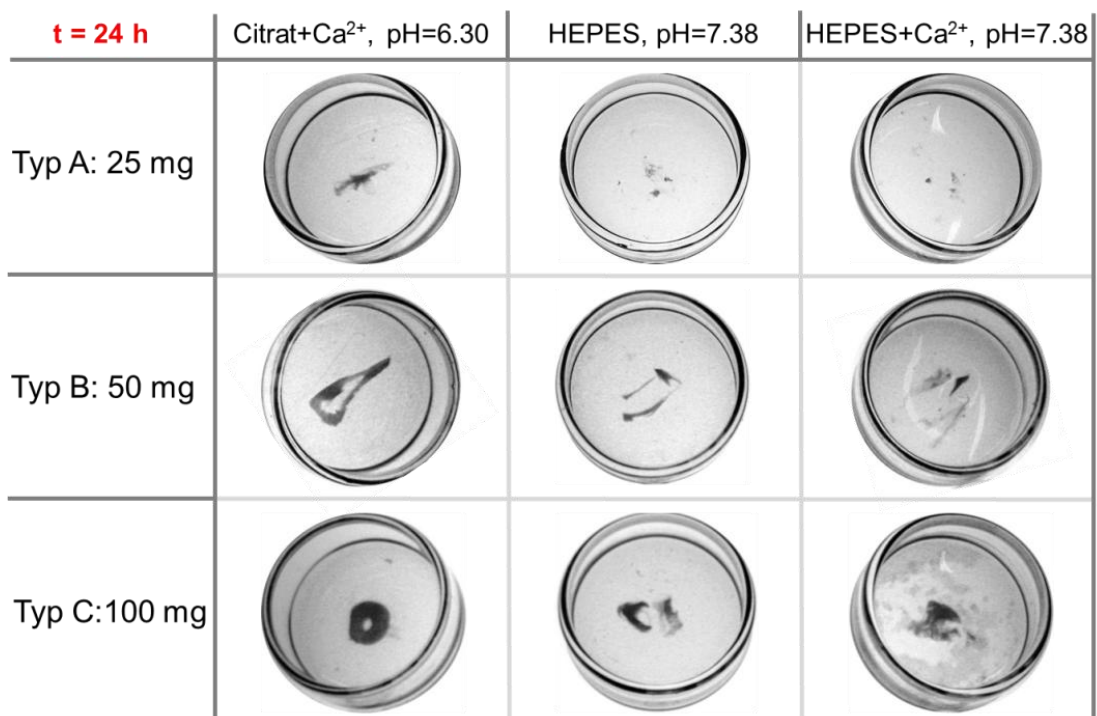
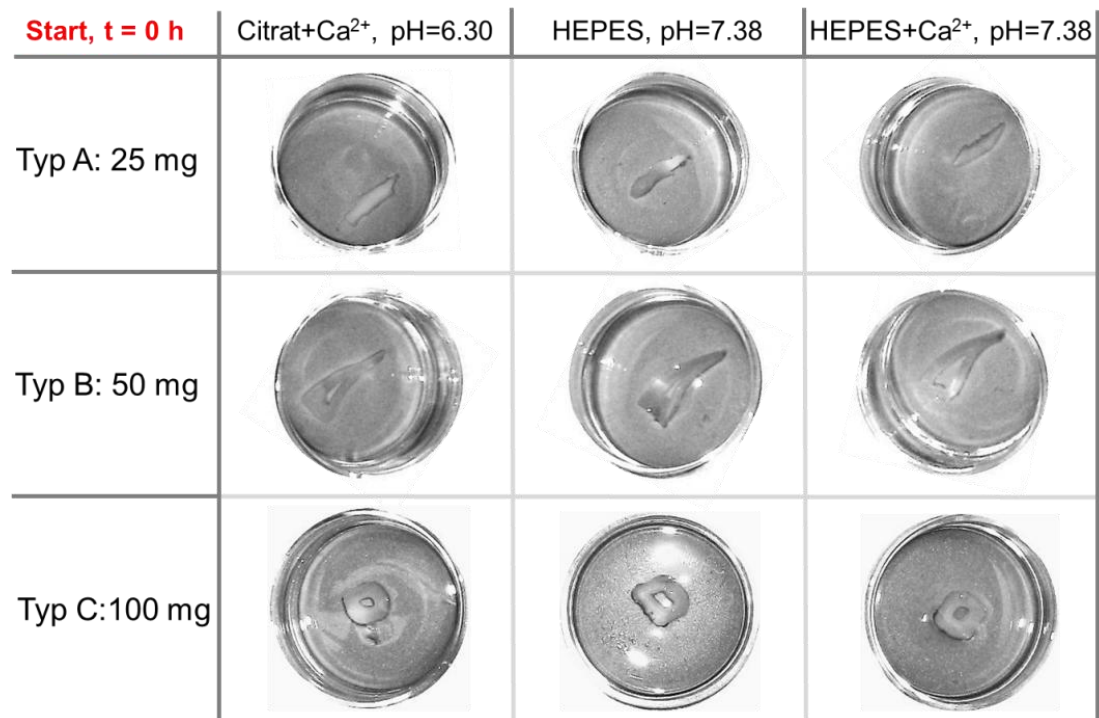


Abb.3.29: Übersicht der hergestellten Dentintemplate aus Rinderzahnscheiben: *Typ A*, *längs*: horizontal herausgeschälte Dentinstücke ohne Schmelzanteil (1.0 ± 0.1 mm, 25 ± 8 mg), *Typ B*, *längs*: horizontal geschnittene, dünne Scheiben mit Schmelzrand (1.5 ± 0.2 mm, 50 ± 12 mg), *Typ C*, *quer*: vertikal geschnittene, dicke Vollscheiben mit Schmelzrand (3.0 ± 0.5 mm, 100 ± 20 mg).

Die Konzentration der bakteriellen *C. histolyticum Typ I*-Kollagenase wurde mit $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ konstant gehalten, die Menge der gepufferten Kollagenase-Lsg. pro demineralisierten Probenkörper aus Rinderdentin betrug 2.0 mL. Der HEPES-Puffer wurde sowohl ohne, als auch mit Zusatz von $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Calciumkationen eingesetzt.

Die vollständig demineralisierten und neutralisierten Rinderdentin-Probenkörper der Typen A-C wurden mit den unterschiedlichen Kollagenase-Puffer-Lsg. (Citrat+Ca²⁺, pH = 6.30; HEPES, pH = 7.38 und HEPES+Ca²⁺, pH = 7.38) überschichtet und der Zustand der Probenkörper zu Beginn des Abbauassays mittels Durchlichtfotografie dokumentiert. Anschließend wurden alle Probenreihen bei 37°C ohne Rühren inkubiert und der Abbauprozess nach 24/48 h festgehalten. (siehe **Abb.3.30**).

Der Probenzerfall den beiden (Ca²⁺-freien und haltigen) HEPES-Puffern bei pH=7.38 war der schnellste der Testreihe; damit wurde die in der Literatur genannte, hohe Aktivität der bakteriellen *C. histolyticum Typ I*-Kollagenase in HEPES-Puffer bestätigt.



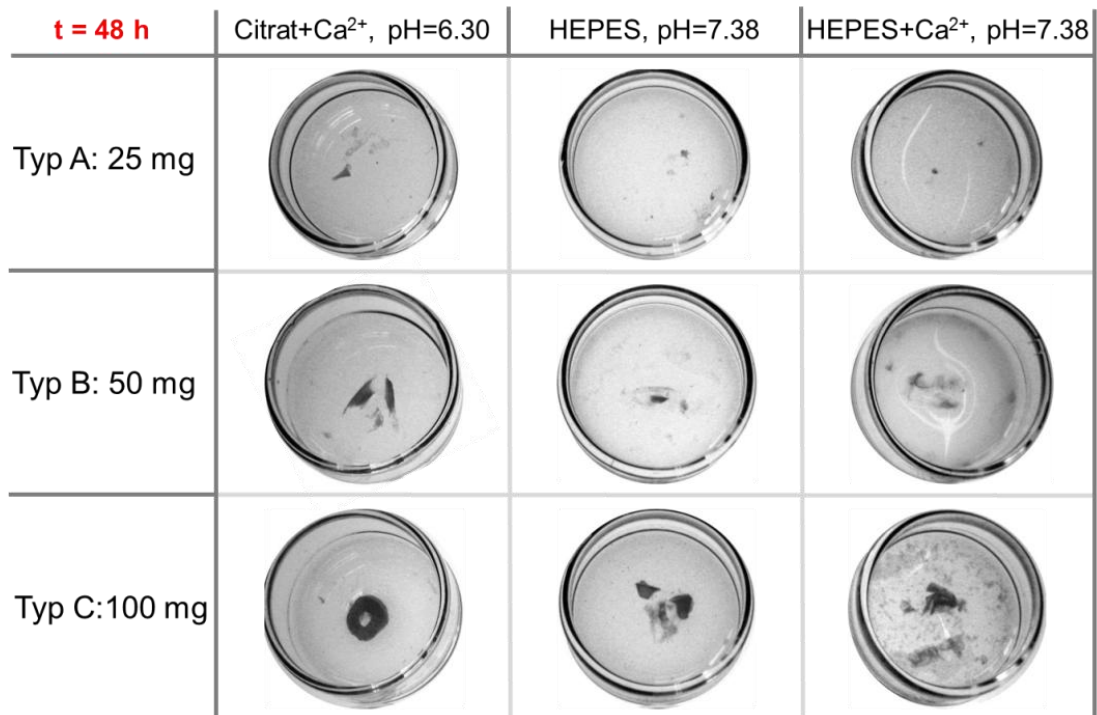


Abb.3.30: Dokumentation der Abbauassays von drei unterschiedlichen Rinderzahn-dentin-Probenkörpern (Typ A: 25 mg, Typ B: 50 mg, Typ C; 100 mg) mit *C. histolyticum* Typ I-Kollagenase ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in drei unterschiedlichen Puffer-Lsg. (Citrat+Ca²⁺, pH = 6.30; HEPES, pH = 7.38; HEPES+Ca²⁺, pH = 7.38) zu Beginn der Tests (oberer Block), nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C ohne Rühren (mittlerer Block) sowie nach analoger 48-stündiger Inkubation (unterer Block).

Die Probentypen A ($25 \pm 8 \text{ mg}$) waren nach 24 h in den beiden HEPES-Puffern nahezu vollständig zersetzt und auch die schwereren Probentypen B und C ($50 \pm 13 \text{ mg}$ bzw. $100 \pm 20 \text{ mg}$) waren hier (**2-te** und **3-te Spalte**) deutlich stärker abgebaut als die entsprechenden Rinderdentinfragmente im Ca²⁺-haltigen Citratpuffer (**1-ste Spalte**). Anhand eines Vergleiches der Zersetzungsgrade aller Probentypen nach 24/48 h wurde die Abbaugeschwindigkeit v der eingesetzten bakteriellen Kollagenase im Citratpuffer auf etwa $v_{24h} = 13 \pm 5 \text{ mg}$ bzw. $v_{48h} = 25 \pm 10 \text{ mg}$ grob abgeschätzt. Eine analoge Abschätzung bei den beiden physiologisch gepufferten HEPES-Systemen lieferte mit etwa $v_{24h} = 25 \pm 10 \text{ mg}$ bzw. $v_{48h} = 50 \pm 15 \text{ mg}$ ungefähr doppelt so hohe Abbaugeschwindigkeiten.

Zudem wurde, entgegen den Angaben in den angeführten Literaturangaben,²⁰⁵ kein signifikanter Aktivitätsunterschied zwischen dem Ca^{2+} -haltigen und dem Ca^{2+} -freien HEPES-Puffersystem (**2-te** und **3-tte Spalte**) festgestellt werden. Auch wurde im Verlauf des Abbauassays mit größeren Dentinprobenkörpern der Typen B/C (ab 50 mg) die Bildung einer zähen Masse von geleeartiger Konsistenz beobachtet. Diese erschwerte sowohl das definierte Wiederauffüllen der Petrischalen mit zuvor verdampftem Puffer als auch die eventuelle Reisolation der verbleibenden Dentinfragmente. Schließlich wurde hiervon auch die optische Erkennbarkeit der verbleibenden Probenreste im Rahmen der Verlaufskontrolle negativ beeinflusst.

Obwohl um die Hälfte langsamer, war der Abbau der Rinderdentin-Probenkörper im Ca^{2+} -haltigen Citratpuffer bei $\text{pH}=6.30$ (**1-ste Spalte**) deutlich besser zu beobachten; auch blieb die Puffer-Lsg. im Verlauf des Assays stets flüssig. Aus diesem Grund wurde dieses Puffersystem als optimal für nachfolgende Rinderdentin-Abbauassays eingestuft und dafür standardmäßig verwendet.

Bei der Variation der Rinderdentinproben (Typ A-C) wurde das kleinste und leichteste Probenfragment (Typ A, ca. 25 mg) in allen drei Puffersystemen zu schnell zersetzt. Das größte und schwerste Probenfragment (Typ C, ca. 100 mg) enthielt unter den eingestellten Untersuchungsbedingungen zu viel an Kollagenmaterial, so dass es selbst nach 48 h nicht vollständig zersetzt wurde. Damit war der Probentyp C für die Beobachtung der MMP-inhibierenden Effektivität über eine Reisolation der verbleibenden Dentinfragmente gut geeignet. Für eine bessere Visualisierung in nachfolgenden Abbaureihen wurde der Probentyp C dünner und kleiner ausgeführt, so dass die Probenkörper des Typs C' ein Gewicht von etwa 55 ± 12 mg aufwiesen.

Als optimaler Kompromiss zeigten die Probenkörper des Typs B das beste Abbauverhalten im geplanten Rhythmus der Probenbeobachtung (alle 24 h). Auch unterstützte ihre charakteristische, dreieckige Form die optische Beurteilung der Abbaugeschwindigkeit. Daher wurden die längs (vertikal zur Wuchsrichtung) aus den Rinderzähnen geschnittenen, demineralisierten Rinderdentinscheiben des **Typs B** standardmäßig für nachfolgende Rinderdentin-Abbauassays verwendet.

3.3.10 Evaluierung der MMP-inhibierenden Effektivität antimikrobieller Poly-2-oxazoline mit Ankergruppen in Abbaussays an demineralisierten Rinderdentin

Zur Evaluierung der eingesetzten antimikrobiellen Poly-2-oxazoline wurden diese auf ihre MMP-inhibierende Effektivität in einem hierfür entwickelten Kollagenabbauassay an dentalrelevanten Oberflächen (standardisierten Dentinprobenkörpern des Typs B, vgl. **Kap.3.3.9**) hin untersucht. Arbeitsvorlage waren auch hierzu initiale Untersuchungen auf Rinderzahndentin von C. J. WASCHINSKI.¹⁵⁸

Als verlässliches Testsubstrat wurde demineralisiertes Rinderzahndentin eingesetzt, das bereits zuvor für die qualitative und quantitative Bestimmung der inhibierenden Effektivität dentalrelevanter Matrixmetalloproteinasen (MMP-2, MMP-8 und MMP-9) erfolgreich genutzt wurde.²⁴⁹

Vollständig demineralisierte Rinderdentinprobenkörper (Typ B, 50 mg, vgl. **Abb.3.29**) wurden beidseitig mit insgesamt 20.0 μL (je 10.0 μL pro Seite) einer salzsauren (HCl , 2.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Lsg. des antimikrobiell wirksamen ($\text{MIC}_{S.mutans} = 19.5 \text{ ppm}$), mit AMA-terminierten Poly-2-methyloxazolins DDA-X-PMOX₃₇-AMA beschichtet (2.50 Gew.% $\equiv 0.26 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; **#19**, vgl. **Tab.3.12**). Damit betrug die Masse an wirksamen Polymer ca. 50 μg pro Probenkörper. Die polymerhaltige Inhibitor-Lsg. wurde 20 s lang auf jedem Dentinprobenkörper mittels eines Mikrobürstchens einmassiert und bis zur Trockene verblasen. Die so behandelten Kollagensubstrate wurden mit *C. histolyticum* Typ I-Kollagenase (1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in jeweils 2.0 mL Citratpuffer (0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ca^{2+} , pH = 6.30) 96 h lang bei 37°C inkubiert.

Dabei sollte die doppelbindungshaltige, distale Satellitengruppe AMA der heterogen-telechelen Poly-2-methyloxazoline in nachfolgenden Immobilisierungsversuchen die Funktion einer matrixspezifischen Ankergruppe übernehmen. Der geringfügig erhöhte Anteil des makromolekularen, PMOX-basierten MMP-Inhibitors (2.50 Gew.%) wurde zunächst so gewählt, dass auf dem Dentinsubstrat eine möglichst vollständige MMP-Inhibierung der bakteriellen Kollagenase gewährleistet wurde.

In **Abb.3.31** ist das Ergebnis dieses Kollagenabbauassays mit DDA-X-PMOX₃₇-AMA (**#19**) an demineralisierten Rinderdentin (dentalen Kollagen) dargestellt.

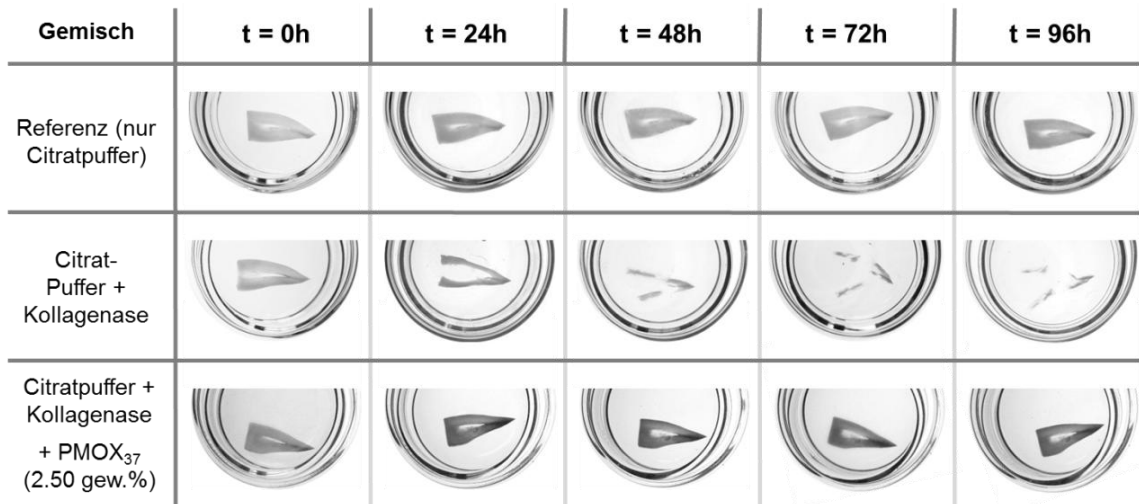


Abb.3.31: Dokumentation des Kollagenabbauassays an demineralisierten Rinderdentinscheiben (Typ B: 50 mg). Die salzsaure Lsg. des makromolekularen, poly-2-oxazolin-basierten MMP-Inhibitors DDA-X-PMOX₃₇-AMA (2.50 Gew.%, $M_{\text{NMR}} = 3,800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\text{PDI} = 1.20$, **#19**, in HCl, $2.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) wurde beidseitig des Rinderdentin-Probekörpers einmassiert (je $10.0 \mu\text{L}$ pro Seite, 20 s), verblasen und mit *C. histolyticum* Typ I-Kollagenase ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in Citratpuffer ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} + 5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$, $\text{pH} = 6.30$) 96 h lang bei 37°C inkubiert (untere Zeile). Als Vergleichsreihen dienten eine kollagenasefreie Dentinprobe in Citratpuffer (obere Zeile) sowie eine kollagenasehaltige, MMP-inhibitorfreie Dentinprobe in Citratpuffer (mittlere Zeile).

Wie in **Abb.3.31** erkennbar, vermochten geringe Mengen des makromolekularen, poly-2-oxazolin-basierten MMP-Inhibitors DDA-X-PMOX₃₇-AMA (**#19**, 2.50 Gew.%; vgl. **Tab.3.12**) in einer salzsauren Beschichtungslösung den Abbau des dentalen Rinderkollagens vollständig zu unterbinden (untere Zeile). Selbst nach 96-stündiger Inkubation bei physiologischer Temperatur (37°C) entsprach der Rinderdentin-Probekörper der mitinkubierten, kollagenasefreien und vollständig erhaltenen Referenzprobe (obere Zeile); wohingegen die gleichzeitige Inkubation von Rinderdentin ohne PMOX-Behandlung in einer kollagenasehaltigen Pufferlsg. zu dessen raschen Abbau führte (mittlere Zeile).

Die Auswaage des getrockneten, mit DDA-X-PMOX₃₇-AMA-beschichteten Dentinprobekörpers nach 96-stündiger Inkubation ergab einen Masseverlust von 3 mg, was jedoch innerhalb des vorhandenen Bestimmungsfehlers der aus den Abbauassays reisolierten, vollständig erhaltenen Referenz-Dentinproben entsprach.

Entsprechend der geringen, zur Behandlung der demineralisierten Dentinprobenkörper benötigten Konzentration von 2.50 Gew.%, ($c(\text{Lsg.}) = 6.58 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) an MMP-inhibierenden Polyoxazolin DDA-X-PMOX₃₇-AMA #19; ($M_{\text{NMR}} = 3,800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, vgl. **Tab.3.12**) würde die molare Menge des PMOX-basierten MMP-Inhibitors in 20.0 μL der zugesetzten Pufferlösung lediglich 0.132 μmol betragen. Die daraus berechnete Konzentration an DDA-X-PMOX₃₇-AMA in der gesamten Pufferlösung von $V_{\text{ges}} = 2.02 \text{ mL}$ ergibt sich zu $0.065 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Damit wäre die maximal erreichbare Polymerkonzentration in der gesamten Pufferlösung um den Faktor 12 (vgl. **Abb.3.27** sowie zugehörige Diskussion zu den **Spalten H** und **I**) geringer als die zur grenzwertig partiellen (**Abb. 3.27, Spalte I**: $0.80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) Hemmung notwendige Menge an polymeren MMP-Inhibitor in Lösung. Im Vergleich mit der zur vollständigen Hemmung notwendigen Polymerkonzentration in Lösung (**Abb. 3.27, Spalte H**: $1.60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) würde ein solcher Lösungs-zur-Oberflächenwirkungsfaktor 24 betragen. Daraus ließe sich schlussfolgern, dass die DDA-X-PMOX₃₇-AMA Konzentration in der Pufferlösung deutlich zu gering war, um die in **Abb.3.31** gezeigte, vollständige Hemmung der eingesetzten bakteriellen Kollagenase zu generieren. Die demonstrierte MMP-Hemmung würde somit ausschließlich durch nicht abwaschbares Polymer an der Rinderdentinoberfläche hervorgerufen werden.

Zur umfassenden Evaluierung der MMP-inhibierenden Effektivität von telechelen, antimikrobiellen Poly-2-methyloxazolin der DDA-X-PMOX-AMA-Klasse wurde abschließend ein quantitativer Abbauassay an humanem Dentinsubstrat ergänzt.

3.3.11 MMP-inhibierende Effektivität antimikrobieller AMA-Poly-2-oxazoline in quantitativen Peptidfreisetzungssassays an demineralisierten Humandentin

Die in diesem Teilkapitel diskutierten, quantitativen Peptidfreisetzungssassays wurden freundlicherweise durchgeführt von Herrn Prof. D. H. Pashley (D.M.D, Ph.D) und seinen Mitarbeitern am Medical College of Georgia, USA. Diese auf der Freisetzung von Kollagenbestandteilen (Aminosäuren) basierte Abbauassays wurden 30 d lang an demineralisierten, menschlichen Dentin als Substrat realisiert.^{255, 256} SBF-Puffer (engl. *simulated body fluid*) wurde dabei als „künstliche Körperflüssigkeit“ verwendet.

Die vollständige Demineralisation der standardisierten Humandentin-Probenkörper (6 x 2 x 1 mm) wurde mittels einer RÖNTGEN-basierten (XPS)-Methode kontrolliert. Im Zuge der Demineralisation wurden die dentalen MMPs freigelegt und aktiviert.^{257, 258}

Vergleichbar zu den bereits durchgeführten, qualitativen Kollagen-Abbauassays (vgl. **Kap.3.3.8**) wurden die Humandentin-Probenkörper 30 min lang in einer verd. Lsg. des telechelen DDA-X-PMOX₃₇-AMA (vgl. **Tab.3.12**) in SBF-Puffer gelagert.

Es wurden zwei Messreihen mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen des makromolekularen, PMOX-basierten MMP-Inhibitors (5.0 und 15.0 Gew.%) erstellt.

Die so behandelten Probenkörper wurden einzeln in geschlossenen Gefäßen (verschweißte Glasphiolen) für 30 Tage bei 37°C in reinem SBF-Puffer (je 1.0 mL pro Probe) unter Schütteln inkubiert. Gleichzeitig wurden auch unbehandelte, MMP-Inhibitor-freie Referenzproben analog inkubiert. Pro Messreihe wurden jeweils 10 Dentinprobenkörper untersucht (3 Messreihen), insgesamt also 30 Stück.

Mit Ablauf der 30 Tage wurden alle inkubierten Humandentin-Probenkörper reisoliert, getrocknet und ihre Restmasse bestimmt. Nach ihrer Auswaage wurden die verbleibenden Probenkörper unter salzsauren Bedingungen bei 120°C vollständig zu den resultierenden Aminosäuren hydrolysiert. Bei jedem Hydrolysat wurde der Anteil der kollagenspezifischen Aminosäure L-4-Hydroxyprolin nach der Methode von JAMALL *et al.*²⁵⁹ spektrometrisch (im UV/Vis, $\lambda = 558$ nm) quantifiziert. Dabei enthielt das menschliche Dentinkollagen, bezogen auf die Trockenmasse des demineralisierten Dentins vor der Inkubation, 9.60 Gew.% an L-4-Hydroxyprolin.²⁶⁰

Weil die Normalitätskriterien der gesammelten Messwerte verletzt wurden (keine standardisierte Kurtosis-/Verteilungsschiefe innerhalb akzeptabler Normalitätsparameter) und die erhaltenen Messpunkte zudem ungleichmäßig um den Mittelwert streuten (Heteroskedastizität), wurden die gewonnenen Daten mittels einer Varianzanalyse (ANOVA) und eines TURKEY-Alphafehler-Kumulationstests mit einem multiplen Alpha-Niveau von $\alpha = 0.05$, ausgewertet.

In **Tab.3.13** finden sich die Resultate der 30-tägigen Peptidfreisetzung mit DDA-X-PMOX₃₇-AMA als MMP-Inhibitor (5.0 und 15.0 Gew.%) an demineralisierten humanem Dentinkollagen-Probenkörpern in SBF-Puffer.

Der Masseverlust an humanem Dentalkollagen nach 30-tägiger Inkubation betrug in der unbehandelten Dentinkollagen-Referenzreihe **#c₀** 16.16 Gew.% und damit

signifikant mehr als der Masseverlust in den beiden mit DDA-X-PMOX₃₇-AMA als makromolekularen MMP-Inhibitor behandelten Probenreihen #c₅ und #c₁₅. In Vergleich mit der Referenzreihe #c₀ betrug damit der relative MMP-Inhibierungsgrad im Falle von 5.0 Gew.% DDA-X-PMOX₃₇-AMA 62.9 % (#c₅) sowie 70.5 % im Falle des dreifachen PMOX-Anteils (#c₁₅). Dieser Massenverlust ging einher mit einem enzymatischen Abbau des humanen Dentinkollagens und gleichzeitiger Freisetzung wasserlöslicher Aminosäuren wie L-Hydroxyprolin in den umgebenden SBF-Puffer.

Tab.3.13:^m Masseverlust und Freisetzung von L-Hydroxyprolin aus humanem Dentinkollagen in eine künstliche Körperflüssigkeit (SBF-Puffer) nach 30-tägiger Inkubation bei 37°C. Bestimmt an unbehandelten, demineralisierten Humandentin-Probenkörpern als Referenz (#c₀) in Vergleich zu behandelten Probenkörpern, die mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (5.0 und 15.0 Gew.%) an DDA-X-PMOX₃₇-AMA als makromolekularen MMP-Inhibitor behandelt wurden (c₅ und c₁₅).

#	Anteil MMP-Inhibitor ^a [Gew.%]	m-Verlust ^b [Gew.%]	Inhibierung ^c [%]	Hyp-Freisetzung ^d [µg·mg ⁻¹]	Inhibierung ^e [%]
C ₀	0.0 ^f	16.16 ± 2.54 ^g	0	10.43 ± 1.89 ^G	0
C ₅	5.0	6.00 ± 1.63 ^g	62.9	0.33 ± 0.12 ^G	96.8
C ₁₅	15.0	4.77 ± 1.70 ^h	70.5	0.22 ± 0.12 ^H	97.9

[a] Anteil am telechelen, antimikrobiellen Poly-2-methyloxazolin DDA-X-PMOX₃₇-AMA in der SBF-Pufferlsg., [b] Masseverlust bezogen auf die Massen der Dentinprobenkörper zu Beginn des Assays, [c] Relativer Grad der MMP-Inhibierung bezogen auf den Massenverlust der Referenz c₀., [d] Mittels UV/Vis-Spektroskopie berechnete Freisetzungsmenge an L-Hydroxyprolin, bezogen auf die Trockenmasse der Dentinprobenkörper zu Beginn des Assays, [e] Grad der MMP-Inhibierung berechnet aus der Hydroxyprolinfreisetzung, [f] Dentinprobenkörper in SBF-Puffer als Referenz, [g-h/G-H] Gruppen unterschiedlicher statistischer Signifikanz; untersucht wurden jeweils 10 Dentinprobenkörper pro Messreihe c₀, c₅ sowie c₁₅.

Der mittels UV/Vis bestimmte und in Bezug zur Urmasse der trockenen Probenkörper gesetzte Gehalt an L-Hydroxyprolin im SBF-Puffer betrug bei der Referenzreihe #c₀ 20.43 µg·mg⁻¹ und damit deutlich mehr als die 0.33 bzw. 0.22 µg·mg⁻¹ der mit DDA-X-PMOX₃₇-AMA behandelten Probenreihen #c₅ und #c₁₅. Der relative Inhibierungsgrad, berechnet aus dem L-Hydroxyprolin -Gehalt des SBF-Puffers nach 30-tägiger Inkubation, betrug 96.8 % nach Behandlung mit 5.0 Gew.% sowie 97.9 % nach Behandlung mit 15.0 Gew.% des telechelen, Poly-2-methyloxazolin-basierten und DDA-X/AMA-funktionalisierten MMP-Inhibitors.

^m Die quantitativen Peptidfreisetzungssassays wurden freundlicherweise durchgeführt von Herrn Prof. D. H. Pashley (D.M.D, Ph.D) und seinen Mitarbeitern am Medical College of Georgia, USA.

Unter Verwendung dieses quantitativen, 30-tägigen Peptidfreisetzungssassays an demineralisierten Humandentin konnte abschließend gezeigt werden, dass bereits eine 30-minütige Einwirkzeit mit einer 5.0 Gew.-%igen Lsg. des telechelen, mit der AMA-Ankergruppe funktionalisierten, antimikrobiellen Poly-2-oxazolins DDA-X-PMOX₃₇-AMA die nahezu vollständige Inhibierung von humanen MMPs ermöglichte.

Im nachfolgenden Kapitel wird daher auf die Immobilisierung sowie oberflächliche Exponierung dieser intrinsisch antimikrobiell-MMP-inhibierenden, telechelen Poly-2-methyloxazoline unter Verwendung ihrer distalen AMA-Ankergruppe, eingegangen.

3.4 Antimikrobielle und MMP-inhibierende, telechele Poly-2-oxazoline als kontaktaktive Wirkstoffe an Dentaladhäsivoberflächen

3.4.1 Vorstellung des Gesamtkonzepts einer „intrinsischen Trifunktionalität“

In einer aktuellen Studie wurde für niedermolekulare, mit Methacrylatgruppen funktionalisierte QUARTs eine hohe Effektivität gegenüber gelösten und gebundenen Matrixmetalloproteinasen (MMPs: Kollagenasen, Gelatinasen) nachgewiesen.²⁵⁸

Durch die Verwendung makromolekularer Kollagenaseinhibitoren auf QUART-Basis ließen sich die diskutierten Nachteile niedermolekularer Inhibitorsysteme vermeiden (vgl. **Kap.3.3.5**). Als solche bieten die bereits hergestellten, telechelen PROX-Systeme auch den Zugang zu einer Methacrylatgruppe (\equiv AMA, vgl. **Kap.3.1**) und damit zur Immobilisierung in doppelbindungs-basierten Dentaladhäsiven. Die nachfolgende **Abb. 3.32** verdeutlicht schematisch das angestrebte Gesamtkonzept.

Eine maximale Kompatibilität zu methacrylat(amid)-basierten Matrices gängiger, selbstätzender (SE) Einkomponenten-Dentaladhäsive⁷⁶ sollte erreicht werden durch die Funktionalisierung mit einer terminalen, methacrylamid-basierten Satelliten-gruppe AMA (vgl. **#19, Tab.3.12**).⁷³ Während der anschließenden, durch kurzwelliges Blaulicht initiierten ($\lambda > 380$ nm) radikalischen Polymerisation sollte in den bis-/(Meth)acrylamid-basierten Netzwerken eine Phasentrennung auf molekularer Ebene stattfinden, so dass die antimikrobiellen und MMP-inhibierenden DDA-X-Funktionen (QUARTs) an der Oberfläche exponiert werden.

Ausgehend von den in **Kap.3.3ff** präsentierten und diskutierten Resultate der zuverlässigen Inhibierung dentalrelevanter MMPs in Lösung durch bioaktive, telechele PROX-Systeme ließe sich das angestrebte Konzept der „intrinsischen Trifunktionalität“ realisieren: einer langfristigen antimikrobiellen Wirksamkeit inklusive einer kollagenase-inhibierenden Effektivität an Oberflächen unter Verwendung derselben, chemisch immobilisierbaren DDA-X-PROX_n-AMA-Makromerspezies.

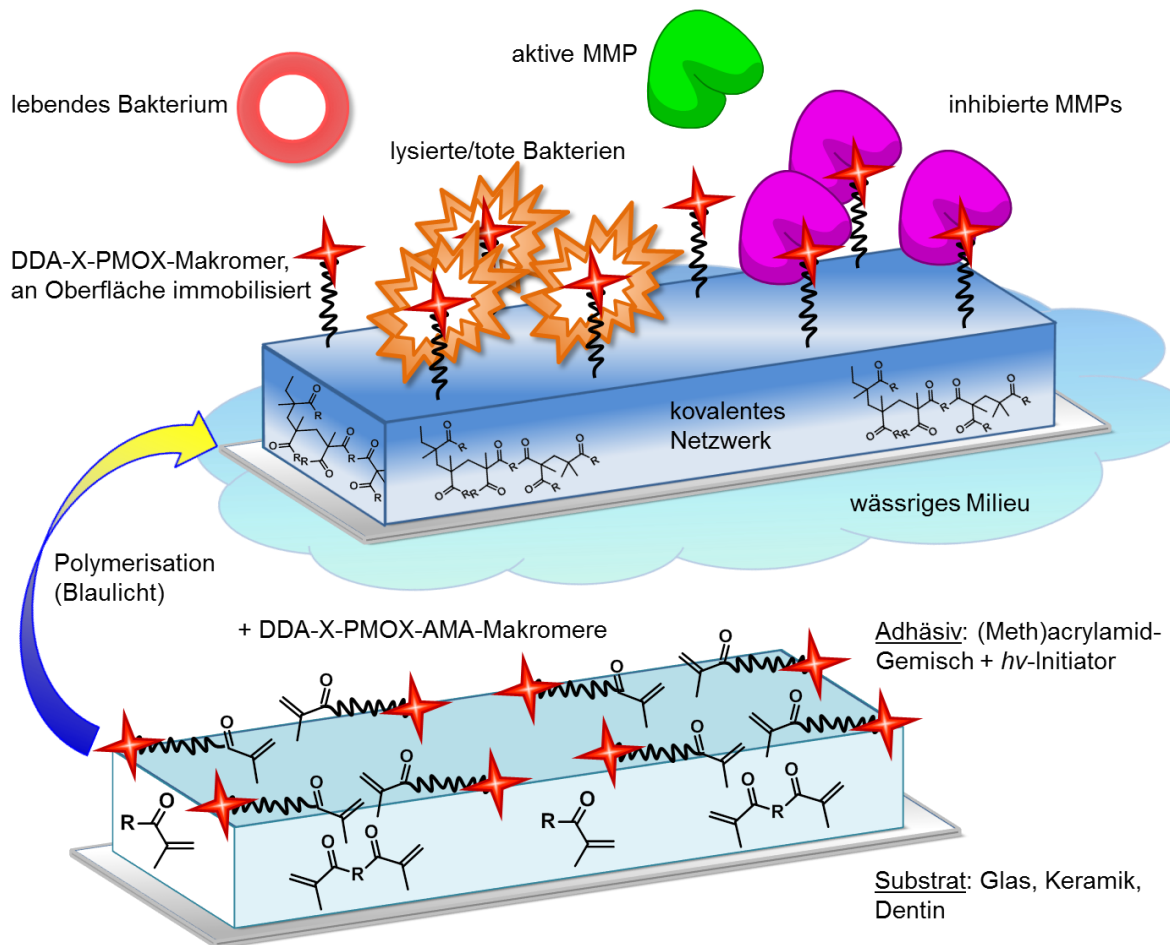


Abb.3.32: Schematische Darstellung des Gesamtkonzeptes von „intrinsisch trifunktionalen“ makromolekularen MMP-Inhibitoren der DDA-X-PROX-AMA-Klasse (rote Sterne \equiv DDA-X). Nach der Lichthärtung der Dentaladhäsivmatrix auf (bis/Meth)-acrylamid-Basis (blaue Quader) sollten die Makromere oberflächlich exponiert werden und Effektivität gegen lebende Bakterien (roter Ring, links oben) und gegen aktive MMPs (grüne Struktur, mitte-oben) aufweisen. Die kontaktaktive Wirksamkeit sollte zudem im wässrigen Milieu (bspw. Speichel) gewährleistet sein.

3.4.2 Evaluierung der Wirksamkeit der „intrinsisch trifunktionellen“ Poly-2-oxazoline in einem selbstätzendem Dentaladhäsiv auf Rinderdentinscheiben

Hierzu wurde das „intrinsisch trifunktionelle“ (antimikrobielle, MMP-inhibierende und mittels distaler Doppelbindungen immobilisierbare) Poly-2-methyloxazolin DDA-X-PMOX₃₇-AMA (**#19**, vgl. **Tab.3.12**) dem selbstätzendem (SE), auf (Meth)Acrylamiden basierenden und kommerziell erhältlichen Einkomponenten-Dentaladhäsiv AdheSE[®] One F (Ivoclar Vivadent) unter blaulicht-freien Bedingungen (Gelblicht) zugesetzt. Als Vorlage dienten hierbei Arbeiten von C. J. WASCHINSKI.¹⁵⁸ Darin wurde bereits die kontaktaktive-antimikrobielle Wirksamkeit eines DDA-X-PROX-Makromers für die einzelnen Komponenten eines lichtgehärteten, selbstätzenden Zweikomponenten-Dentaladhäsivs auf (Meth)Acrylat-Basis (SE Primer sowie SE Bond der Ivoclar Vivadent AG) gegen die Keime *S. aureus* und *S. mutans* erfolgreich nachgewiesen.

Da bereits nach einer geringen Zugabe von 5.00 Gew.% an **#19** eine nahezu vollständige, 97%-ige Inhibierung dentaler humaner MMPs in Lösung erreicht wurde (vgl. **Tab.3.13**), wurde derselbe Anteil (5.00 Gew.%) in einer ersten Harzformulierung (**#f_{5,0}**) mit AdheSE[®] One F bei-behalten und in einer zweiten Harzformulierung im selben SE-Dentaladhäsiv um die Hälfte auf 2.50 Gew.% (**#f_{2,5}**) reduziert.

Nach der Zugabe der jeweiligen Anteile an DDA-X-PMOX₃₇-AMA (5.00 und 2.50 Gew.%) wurden homogene, leicht gelbliche Formulierungen (**#f_{5,0}** und **#f_{2,5}**) erhalten. Wie im Falle des unmodifizierten SE-Dentaladhäsivs (**#f₀**), handelte es sich dabei um doppelbindungshaltige, mittels Blaulicht (LC; radikalisch) vollständig auspolymerisierbare Harzgemische mit einer geringen Viskosität.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die antimikrobielle Wirksamkeit der beiden PMOX-haltigen Harzformulierungen **#f_{5,0}** sowie **#f_{2,5}** gegen den pathogenen Standardkeim *S. aureus* sowie den dentalrelevanten Karieskeim *S. mutans* (beide GRAM-positiv) untersucht.

Als PMOX-freie Referenz wurde das unmodifizierte SE-Dentaladhäsiv (AdheSE[®] One F, **#f₀**) eingesetzt. Alle Untersuchungsreihen wurden in einer praxisnahen Adhäsivbeschichtung an standardisierten, nicht demineralisierten ganzen Rinderdentinscheiben (Typ B, vgl. **Abb.3.29**) durchgeführt.

Als niedermolekulare, QUART-basierte antimikrobielle und dental bewährte²⁶¹ Vergleichssubstanz wurde wasserlösliches Benzethoniumchlorid verwendet und mit einem Anteil von 0.25 Gew.% AdheSE One F (**#f_{BZ}**) zugesetzt (vgl. **Abb.3.33**).^{262, 263}

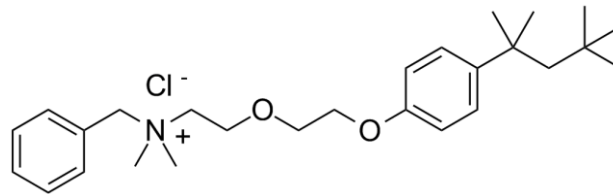


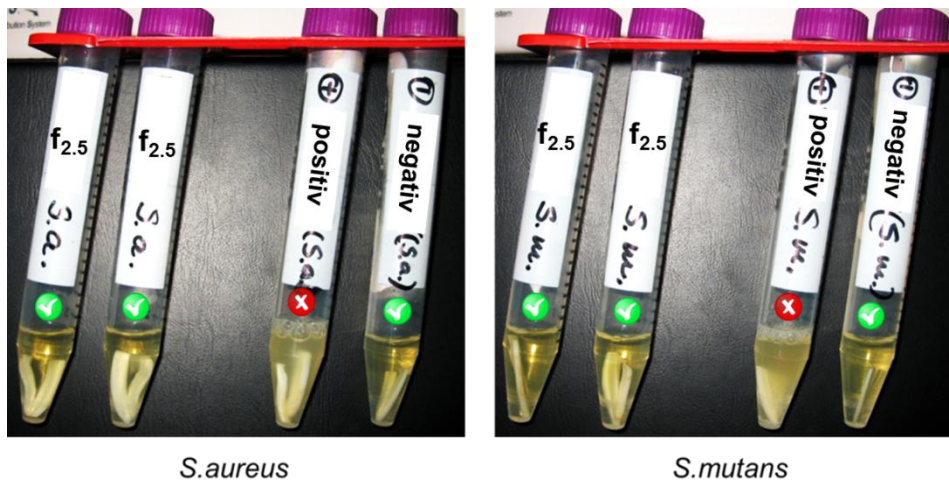
Abb.3.33: Schematische Darstellung der chemischen Strukturformel der QUART-basierten, niedermolekularen antimikrobiellen Verbindung Benzethoniumchlorid.

Die Rinderdentinscheiben wurden unter sterilen Bedingungen beidseitig mit der jeweiligen Bakteriensuspension (*S. aureus* oder *S. mutans*) angeimpft (je 10.0 µL pro Seite, 10¹⁰ Erreger pro mL, vgl. **Tab.5.4**). Die vier Harzformulierungen (**#f₀**, **#f_{2.5}**, **#f_{5.0}** und **#f_{BZ}**) wurden entsprechend den Gebrauchsinformation der Ivoclar Vivadent unter sterilen Bedingungen auf den bakteriell kontaminierten, verblasenen Dentinscheiben appliziert: (mindestens 20 s einmassiert/verblasen) und schließlich mittels Blaulicht (10 s) vollständig auspolymerisiert. Alle Versuche wurden doppelt-blind durchgeführt.

Die präparierten Dentinscheiben wurden einzeln für 6-8 h in Nährmedium (pH = 7.30 bei *S. aureus* bzw. pH = 6.80 bei *S. mutans*; je 2.0 mL pro Probe) bei 37°C inkubiert.

Die MIC-analogen Wirksamkeitsuntersuchungen wurden ausgewertet, sobald die mitinkubierte Positivkontrolle ein Bakterienwachstum (Trübung) zeigte. Die Gültigkeit jeder Untersuchung wurde gleichzeitig mit der Bakterienfreiheit einer Negativkontrolle festgelegt; diese durfte nach erfolgter Inkubation keine Trübung aufweisen.

In **Abb.3.34** ist das Untersuchungsergebnis dieser antimikrobiellen Evaluierung der SE-Dentinadhäsivbeschichtung auf Rinderdentinscheiben am Beispiel der PMOX-haltigen Harzformulierung **#f_{2.5}** (2.50 Gew.% an DDA-X-PMOX₃₇-AMA) dargestellt.



S.aureus

S.mutans

Abb.3.34: Resultat der Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit an mit *S. aureus* (linkes Bild) / *S. mutans* (rechtes Bild) kontaminierten, nicht demineralisierten Rinderdentinscheiben nach 8-stündiger Inkubation bei 37°C in Nährmedium (je 2.0 mL pro Dentinprobenkörper). Es wurde doppelt-blind mit der DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen Harzformulierung #f_{2.5} (2.50 Gew.%) im SE-Dentaladhäsiv AdheSE[®] One F beschichtet (20 s lang im Dentin einmassiert) und nach Herstellerangaben (Ivoclar Vivadent) mit einer Blaulichtlampe fotopolymerisiert (10 s). Pro Probeduplett wurde eine bakterienhaltige Positiv- (trüb) und bakterienfreie Negativkontrolle (klar) erstellt.

Sowohl bei den mit der Benzethoniumchlorid-haltigen Vergleichsharzformulierung #f_{BZ} (0.25 Gew.% an BZ) beschichteten kontaminierten Rinderdentinscheiben als auch bei den beiden PMOX-haltigen Harzformulierungen #f_{5.0} und #f_{2.5} (2.50 bzw. 5.00 Gew.% an DDA-X-PMOX₃₇-AMA) wurde keine bakterienbedingte Trübung beobachtet. Erstaunlicherweise vermochte auch die Beschichtung mit der PMOX-freien Referenz #f₀ (pures AdheSE[®] One F) das Wachstum der beiden Bakterienarten *S. aureus* / *S. mutans* auf dem Rinderdentin vollständig unterbinden. Nach Anwendung der vier Harzformulierungen #f₀, #f_{BZ}, #f_{5.0} und #f_{2.5} wurde bei keiner der damit beschichteten, lichtpolymerisierten und anschließend inkubierten Rinderdentinscheiben ein Bakterienwachstum im Nährmedium festgestellt. **Tab.3.14** fasst alle erhaltenen Resultate der antimikrobiellen Wirksamkeitsuntersuchungen im selbststützenden Dentaladhäsiv auf Rinderdentinscheiben zusammen.

Tab.3.14: Zusammenfassung der Resultate der Wirksamkeitsuntersuchungen an bakteriell kontaminierten Rinderdentinscheiben mit blaulichtpolymerisierten, wirkstoffhaltigen Harzformulierungen in Vergleich zur puren SE-Dentaladhäsiv-Referenz.

# ^a	Wirkstoff	Gehalt [Gew.%]	Wirksamkeit gegen Keim ^b	
			<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>
Ref ^c	-	-	ja	ja
f _{BZ}	Benzethoniumchlorid ^d	0.25	ja	ja
f _{5.0}	DDA-X-PMOX ₃₇ -AMA	5.00	ja	ja
f _{2.5}	DDA-X-PMOX ₃₇ -AMA	2.50	ja	ja

[a] Bezeichnung der Harzformulierung, [b] Festgestellt anhand einer Trübung der Nährlösung nach einer 8-stündiger Inkubation bei 37°C und Vergleich mit der jeweiligen Positiv- und Negativkontrolle der Messreihe, [c] Kommerziell erhältliches AdheSE[®] One F ohne Zusätze, [d] Kommerziell erhältliche, niedermolekulare antimikrobielle Vergleichssubstanz (QUART).

Offensichtlich konnte das eingesetzte, SE-Dentaladhäsiv nach erfolgter Blaulichtpolymerisation auf Rinderdentinscheiben unter den angewandten Messbedingungen (**Ref**, vgl. **Tab.3.14**) auch ohne den Zusatz nieder- und makromolekularer Biozide eine antimikrobielle Wirksamkeit gegen beide untersuchten Bakterienarten entfalten. Zurückzuführen war dieses Verhalten möglicherweise auf eine oder mehrere, darin enthaltenen, antimikrobiell wirksamen Komponenten, die nach der Polymerisation aus der Adhäsivschicht ins Nährmedium freigesetzt wurden. Mit einem solchen experimentellen Aufbau ließ sich die Effektivität der zugesetzten, intrinsisch trifunktionellen Additive auf Poly-2-methyloxazolinbasis nicht zweifelsfrei belegen. Für die eindeutige Bestimmung der Wirksamkeitsparameter von DDA-X-PMOX₃₇-AMA-Additiven nach deren Immobilisierung im SE-Dentaladhäsiv wurde ein hierfür optimierter, von WASCHINSKI *et al.* etablierter Langzeit-Waschtest (Elutionstest) an inerten Glasobjektträger-Oberflächen durchgeführt. Dieser wird im nachfolgenden Kapitel vorgestellt und diskutiert.

3.4.3 Wässrige Elutionstests an polymerisierten Dentaladhäsivoberflächen mit „intrinsisch trifunktionellen“ Poly-2-oxazolin als immobilisierten Additiven

Der Hauptzweck dieser Belastungstests war die Bestimmung der Langzeitkontaktaktiven,²⁶⁴ antimikrobiellen Wirksamkeit von PROX-modifizierten Harzformulierungen, die auf kommerziell erhältlichen SE-Dentaladhäsiven basieren.

Hierzu wurden Glasobjektträger mit einer alkoholisch-wässrigen Suspension eines doppelbindungstragenden Silans (3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat, 1.0 Gew.%) mit kovalenten Doppelbindungen funktionalisiert. Dieses Beschichtungsverfahren war essentiell für eine dauerhafte Anbindung der auspolymerisierten, SE-Dentaladhäsiv basierenden Harzformulierungen (vgl. **Tab.3.14**) an die Glasoberfläche.

Zur optimalen Erkennbarkeit des Elutionsverhaltens wurden alle Harzformulierungen in einem definierten, rhombusförmigen Testbereich auf den Glasobjektträger aufgetragen und mittels Blaulicht vollständig auspolymerisiert (vgl. **Abb.3.35**). Dabei wurden leicht gelbliche, jedoch transparente, vollständig an die Glasoberfläche anhaftende Polymerfilme mit einer maximalen Schichtdicke von etwa 2 mm erhalten.

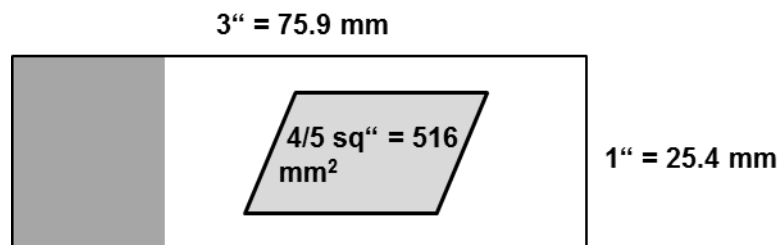


Abb.3.35: Maßstabsgetreue Darstellung des rhombusförmigen Bereichs (grau) auf dem doppelbindungsfunktionalisierten Glasobjektträger mit den Harzformulierungen $\#f_0$, $\#f_{BZ}$, $\#f_{5.0}$ und $\#f_{2.5}$ auf Basis eines kommerziellen Dentaladhäsivs (vgl. **Tab.3.16**).

Die mit dem auspolymerisierten Referenzharz ($\#f_0$) und den drei wirkstoffhaltigen SE-Dentaladhäsivharzen ($\#f_{BZ}$, $\#f_{5.0}$ und $\#f_{2.5}$) beschichteten Glasobjektträger wurden einzeln mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ übergossen (je 10 mL pro Probe) und bei 37°C unter Schütteln (0.5 Hz) gewaschen. Das $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ jeder Probe wurde täglich verworfen und durch Frisches ersetzt. Die Proben wurden zu Beginn der Elutionstests sowie zunächst tageweise nach einem, zwei, vier und sechs Tagen unter sterilen Bedingungen entnommen, verblasen und an der polymerbeschichteten Seite mit einer Bakterien-suspension von *S. mutans* in einer isotonischen Kochsalzlg. ($10^7 \text{ Keime} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH = 7.38) besprüht. Damit wurden alle Wirksamkeitsbestimmungen der Langzeit-Elutionstests an einem dentalrelevanten Keim des Mundraums durchgeführt, der nachweislich bakterielle Kollagenasen freisetzt und damit im erheblichen Umfang zur irreversiblen Schädigung der Dentinsubstanz beiträgt.²⁶⁵

Die (mit *S. mutans*) bakteriell kontaminierten Glasobjektträgeroberflächen wurden in Petrischalen überführt, mit vorgekühlten Nähragar blasenfrei überschichtet und bis zur Ausbildung sichtbarer Bakterienkolonien (über Nacht) bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die probenhaltigen Petrischalen mit einer wässrigen Lsg. von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC, 10 mmol·L⁻¹) übergossen und für weitere 3-4 h bei 37°C nachinkubiert. Dadurch wurden unter dem Agar lebende Bakterienkolonien von *S. mutans* dunkelrot eingefärbt. Die Auswertung der Proben erfolgte fotografisch im Durchlichtverfahren. Die doppelbindungsfunktionalisierten, unbeschichteten Glasoberflächen zeigten unter diesen Bedingungen keine antimikrobielle Wirksamkeit gegen *S. mutans* (vgl. **Abb.3.36**) und waren damit ein geeignete, indifferente Unterlage für die nachfolgenden Beschichtungsexperimente.

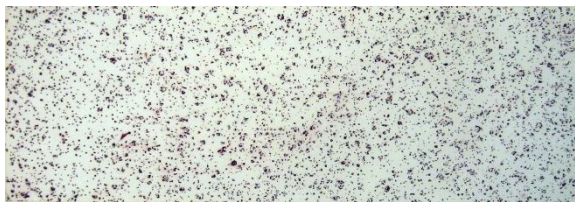


Abb.3.36: Dokumentation eines doppelbindungsfunktionalisierten Glasobjektträgers, der mit dem Karieserreger *S. mutans* kontaminiert, inkubiert (12 h bei 37°C), mit dem Farbstoff TTC angefärbt und im Durchlichtverfahren fotografiert wurde.

In **Abb.3.37** sind die Resultate des Elutionstests an der Referenzbeschichtung mit der Harzformulierung **#f₀** (reines SE-Dentaladhäsiv AdheSE[®] One F) im Testverlauf von 0 bis 4 Tagen chronologisch dargestellt.

Alle nachfolgenden Fotoaufnahmen wurden aus Gründen der besseren Darstellbarkeit auf den Farbwert des eingesetzten Farbstoffs TTC abgeglichen.

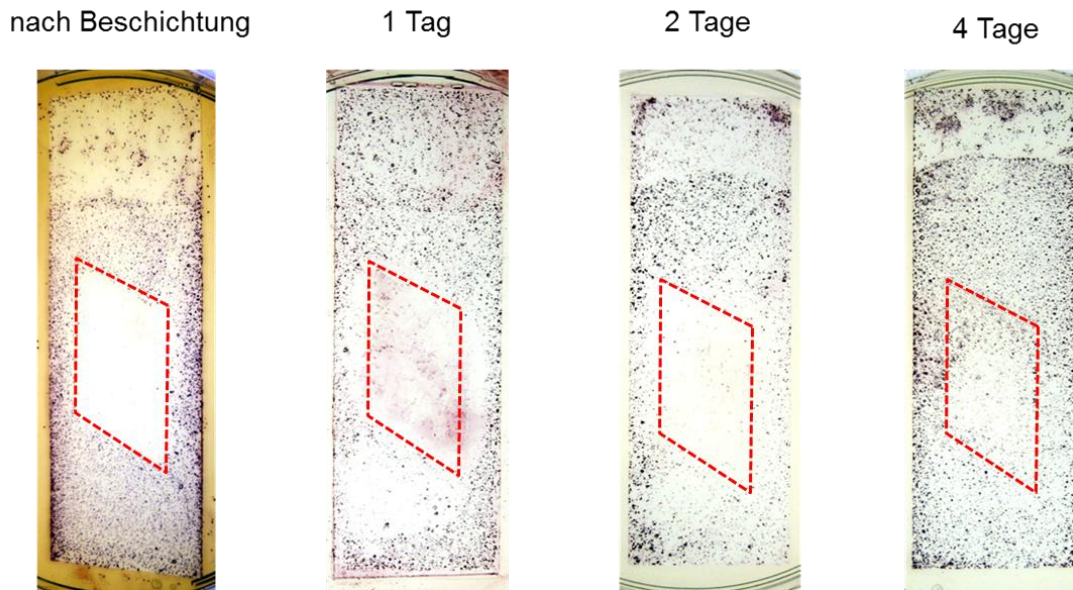


Abb.3.37: Dokumentation des chronologischen Untersuchungsverlaufs zwischen der frischen Beschichtung (links) und 4-tägiger wässriger Elution bei 37°C (rechts). Die standardisierten, doppelbindungsfunktionalisierten Glasobjektträger wurden mit dem Referenz SE-Dentaladhäsiv #f₀ ohne Wirkstoffzusatz beschichtet, mittels Blaulicht auspolymerisiert, jeweils nach 1, 2 und 4 Tagen mit dem Karieserreger *S. mutans* kontaminiert und inkubiert (12 h bei 37°C). Die lebenden Bakterienkolonien wurden mit dem Farbstoff TTC angefärbt und im Durchlichtverfahren fotografiert.

Die Dentaladhäsivoberfläche mit der Referenz-Harzformulierung #f₀ (reines SE-AdheSE[®] One F) war unmittelbar nach der Beschichtungs- und Polymerisationsprozedur (ohne wässrige Behandlung) voll wirksam gegen den Karieskeim *S. mutans* (vgl. **Abb.3.37**, links). Allerdings ließ diese im Verlauf der wässrigen Elution bei 37°C innerhalb der nächsten 4 Tage nach (rechts). Zudem wurde die Freisetzung niedermolekularer, antimikrobiell wirksamer Bestandteile (engl. *leeching*) beobachtet, was sich in unscharf begrenzten Wachstumsrändern entlang des rhombusförmigen Beschichtungsbereichs (vgl. **Abb.3.35**) manifestierte. Nach insgesamt 6-tägiger, wässriger Elution war die Oberfläche des auspolymerisierten Adhäsivfilms vollständig mit lebenden *S. mutans*-Kolonien überwuchert, so dass nach dieser Elutionsdauer die auspolymerisierte Referenzoberfläche der Harzformulierung #f₀ keinerlei Wirksamkeit mehr gegenüber *S. mutans* aufwies, siehe **Abb.3.38**.

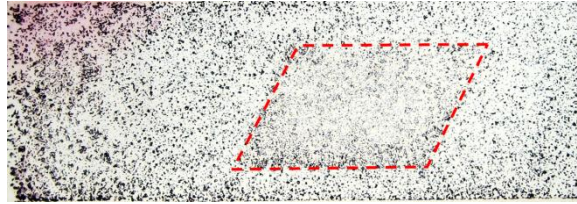


Abb.3.38: Dokumentation einer unwirksam gewordenen, auspolymerisierten Referenzoberfläche nach 6-tägiger wässriger Elution bei 37°C, Kontamination mit dem Karieskeim *S. mutans*, Inkubation (12 h bei 37°C) und TTC-Anfärbung.

In **Abb.3.39** gezeigt ist der Verlauf des 4-tägigen Elutionstests an den auspolymerisierten Oberflächenbeschichtungen hergestellt aus der Benzethoniumchlorid-haltigen (0.25 Gew.%) Harzformulierung #f_{BZ}.

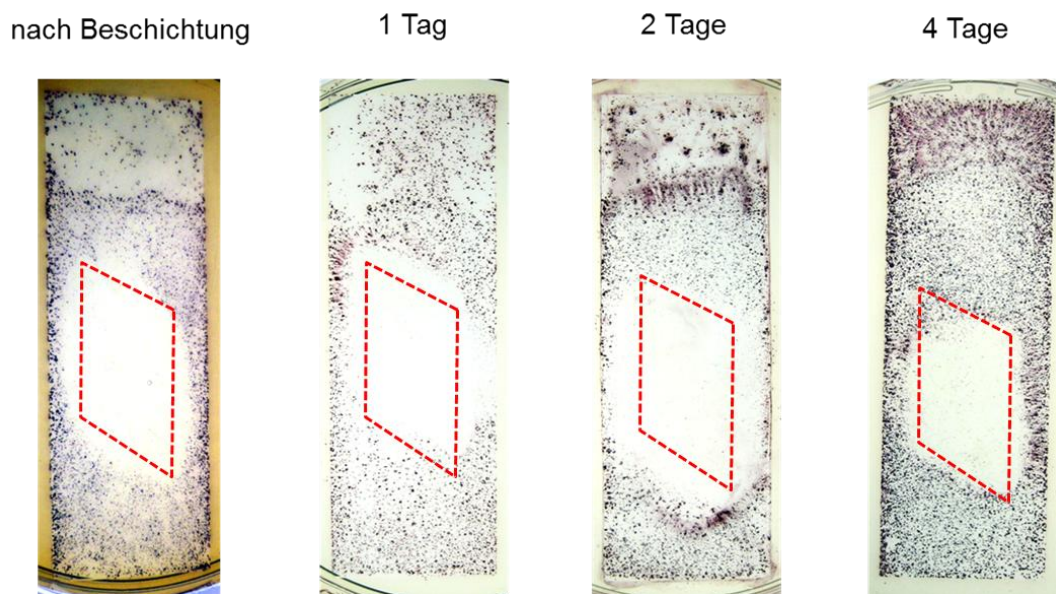


Abb.3.39: Dokumentation des chronologischen Untersuchungsverlaufs zwischen der frischen Beschichtung (links) und 4-tägiger wässriger Elution bei 37°C (rechts). Die standardisierten, doppelbindungsfunktionalisierten Glasobjektträger wurden mit dem Benzalkoniumchlorid-haltigen SE-Dentaladhäsiv #f_{BZ} (0.25 Gew.%) beschichtet, mittels Blaulicht auspolymerisiert, jeweils nach 1, 2 und 4 Tagen mit dem Karieserreger *S. mutans* kontaminiert und inkubiert (12 h bei 37°C). Die lebenden Bakterienkolonien wurden mit TTC angefärbt und im Durchlichtverfahren fotografiert.

Analog zum Referenz-Elutionstest an der wirkstofffreien SE-Dentaladhäsivbeschichtung #f₀ wurden auch nach Elution der auspolymerisierten Harzformulierung #f_{BZ} unscharf begrenzte, nicht dem rhombusförmigen Beschichtungsbereich folgende Wachstumsränder der angefärbten *S. mutans* Kolonien beobachtet. Dieses *leeching* von niedermolekularen, antimikrobiell wirksamen Bestandteilen war selbst nach 2-tägiger wässriger Elution bei 37°C noch deutlich ausgeprägt. Nach weiteren 2 Tagen Elution (insgesamt nach 4 Tagen) wurde immer noch eine ringförmige Freisetzung antimikrobieller, niedermolekularer Bestandteile beobachtet. Im Gegensatz zu der gleichlang eluierten, wirkstofffreien Harzformulierung #f₀ blieb der innere Bereich der Polymerbeschichtung (Bulk mit hoher Schichtdicke) noch antimikrobiell wirksam, während die Wirksamkeit an den Rändern der Beschichtung nachzulassen begann. In **Abb.3.40** und **Abb.3.41** sind die chronologischen Elutionsverläufe der DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen, aus den Harzformulierungen #f_{5.0} und #f_{2.5} hergestellten Dentaladhäsivoberflächen dargestellt.

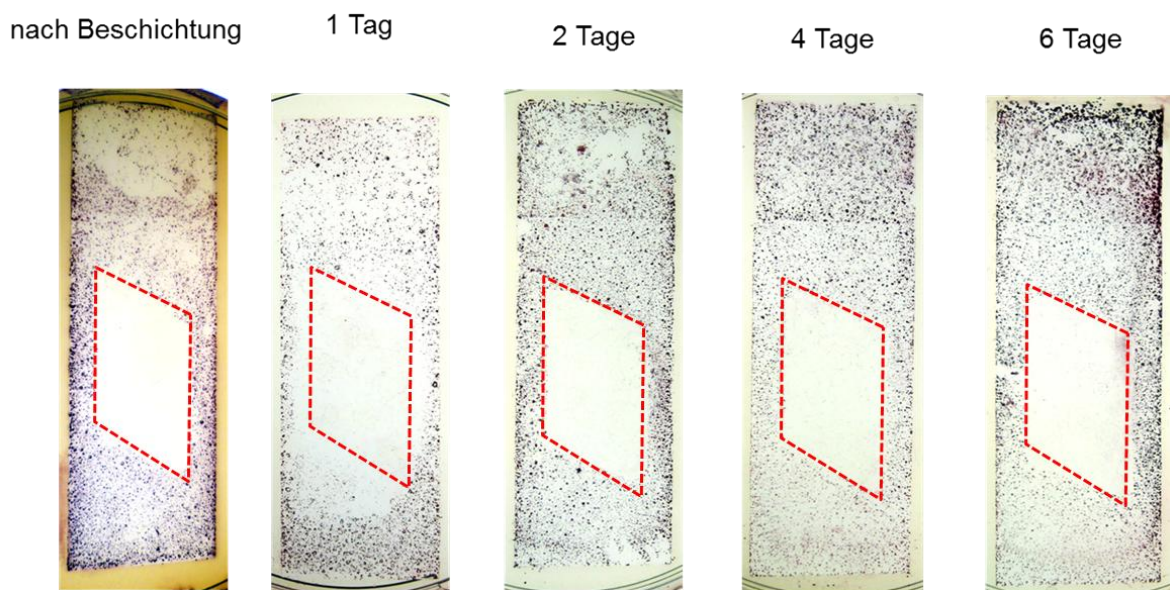


Abb.3.40: Dokumentation des chronologischen Untersuchungsverlaufs zwischen der frischen Beschichtung (links) und 6-tägiger wässriger Elution bei 37°C (rechts). Die standardisierten, doppelbindungsfunktionalisierten Glasobjektträger wurden mit dem DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen SE-Dentaladhäsiv #f_{5.0} (5.00 Gew.%) beschichtet, mittels Blaulicht auspolymerisiert, jeweils nach 1, 2, 4 und 6 Tagen mit dem Karieserreger *S. mutans* kontaminiert und inkubiert (12 h bei 37°C). Die lebenden Bakterienkolonien wurden mit TTC angefärbt und im Durchlichtverfahren fotografiert.

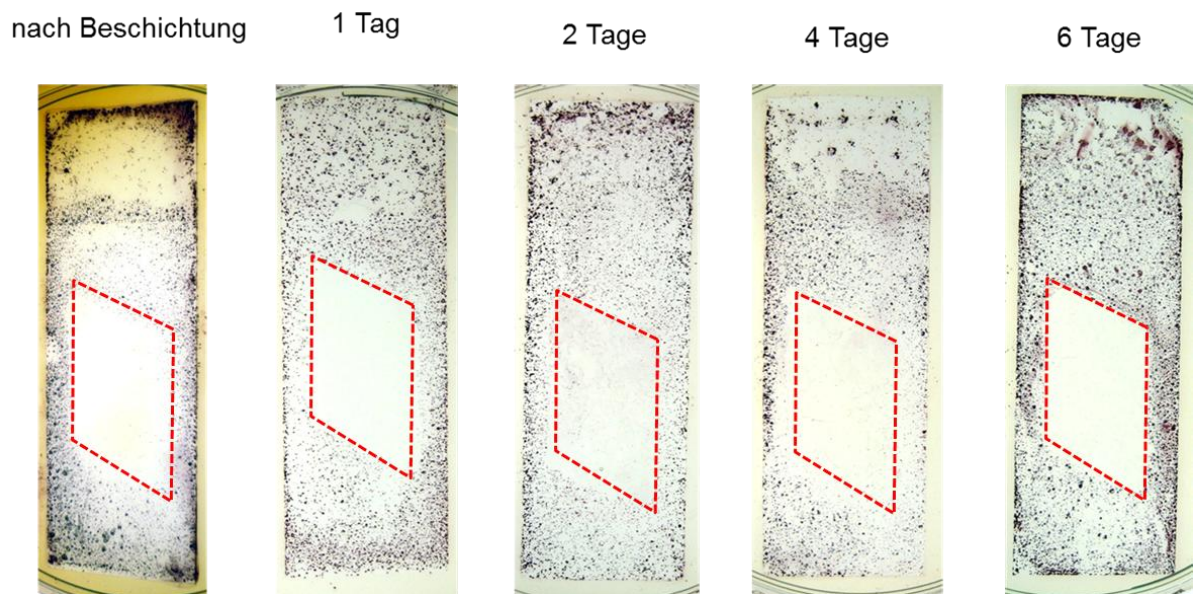


Abb.3.41: Dokumentation des chronologischen Untersuchungsverlaufs zwischen der frischen Beschichtung (links) und 6-tägiger wässriger Elution bei 37°C (rechts). Die standardisierten, doppelbindungsfunktionalisierten Glasobjektträger wurden mit dem DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen SE-Dentaladhäsiv #f_{2.5} (2.50 Gew.%) beschichtet, mittels Blaulicht auspolymerisiert, jeweils nach 1, 2, 4 und 6 Tagen mit dem Karieserreger *S. mutans* kontaminiert und inkubiert (12 h bei 37°C). Die lebenden Bakterienkolonien wurden mit TTC angefärbt und im Durchlichtverfahren fotografiert.

Wie bereits die beiden vorangehenden Oberflächenbeschichtungen der Referenz (#f₀) und der Benzalkoniumchlorid-haltigen Harzformulierung (#f_{BZ}), waren die DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen Adhäsivoberflächen unmittelbar nach der Beschichtung antimikrobiell wirksam gegen die aufgebrachtene *S. mutans*. Innerhalb der ersten 2 Elutionstagen wurde zudem eine geringe Randunschärfe und damit initiales *leeching* festgestellt. Bei den opaken Grauschleiern innerhalb des Beschichtungsbereiches der Proben nach 2 (#f_{5.0} / #f_{2.5}) bzw. 4 Tagen (#f_{5.0}) handelte es sich um keine Bakterienkolonien auf der Oberfläche der Polymerbeschichtung, sondern um eine unbeabsichtigte bakterielle Kontamination des Agars unterhalb der Glasobjektträger. Durch weiteres Waschen mit H₂O_{bidest.} wurden die Begrenzungen der rhombusförmigen Beschichtungsbereichs sehr exakt von dem bakteriellen Bewuchs der lebenden *S. mutans* Kolonien wiedergegeben. So wurde eine von ausgewaschenen Bioziden hervorgerufene, bewuchsfreie Inhibierungszone ausgeschlossen.

Diese lokal scharf begrenzte, kontaktaktive Effizienz der DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen, vollständig auspolymerisierten Adhäsivoberflächen #f_{2.5}, #f_{5.0} basierte daher sehr wahrscheinlich auf dem angestrebten Wirkmechanismus (vgl. **Kap.3.5.1**). Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden die Elutionstests zeitlich ausgeweitet; die dabei gewonnenen Erkenntnisse werden im nachfolgenden Kapitel präsentiert.

3.4.4 Wässrige Langzeit-Elutionstests an DDA-X-PMOX₃₇-AMA-ausgerüsteten Dentaladhäsivoberflächen zur Untersuchung der kontaktaktiven Wirksamkeit

Diese wurden mit den drei, nach 4 bzw. 6 Tagen noch antimikrobiell wirksamen Harzformulierungen #f_{BZ}, #f_{2.5} und #f_{5.0} fortgeführt. Bereits nach 2 weiteren Tagen wässriger Elution (insgesamt 6 Tagen) verloren die aus den Benzethoniumchlorid-haltigen Formulierung #f_{BZ} hergestellten Dentaladhäsivoberflächen ihre Wirksamkeit. Sie wurden daher nicht weiter eluiert/untersucht.

Die Zeitintervalle zur Beobachtung der verbleibenden, aus den Harzformulierungen #f_{2.5} sowie #f_{5.0} hergestellten Oberflächenbeschichtungen wurden auf 10 Tage verlängert; die Elution bei 37°C unter Schütteln (0.5 Hz) und täglichen Wechsel des Wassers einer jeden Probe wurde fortgesetzt. Nach 1 und 2 Monaten wässriger Elution war auf allen Proben nach einer bakteriellen Kontamination weder *leeching* noch ein bakterieller Bewuchs feststellbar. Die Untersuchungen wurden insgesamt für 101 Tage (3 Monate) fortgesetzt, danach zeigten beide Harzformulierungen #f_{2.5}, #f_{5.0} noch immer volle antimikrobielle Wirksamkeit gegen *S. mutans*.

Von C. J. WASCHINSKI wurden bereits 3.7 Gew.% eines antimikrobiellen Makromers der DDA-X-PMOX-Klasse in einem Modellnetzwerk aus Hydroxyethylacrylat (HEMA) und Glycerin-dimethacrylat (GDMA) erfolgreich immobilisiert. Nach Lichthärtung und 45-tägiger wässriger Elution zeigte dessen Oberfläche den Erhalt ihrer kontaktaktiv-antimikrobiellen Wirksamkeit gegenüber dem Keim *S. aureus*.⁷⁶ Folglich wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die wässrige Elutionsdauer des Polymernetzwerks auf (Meth)Acrylamid-Basis (AdheSE[®] One F) deutlich ausgedehnt.

Mittels dieser extensiven Belastungstests konnte die angestrebte kontaktaktive Effektivität der SE-Dentaladhäsivoberflächen unter Zugabe geringer Mengen (2.50 und 5.00 Gew.%) der telechelen, via Doppelbindungen immobilisierbaren DDA-X-PMOX₃₇-AMA-Additive belegt werden. In **Abb.3.42** finden sich die Fotoaufnahmen der aus der PMOX-modifizierten Harzformulierung #f_{2.5} hergestellten SE-Adhäsivoberflächen auf Glasobjektträgern nach 40-, 50- sowie 101-tägiger wässriger Elution.

Nach derzeitigen Kenntnisstand zeigte bislang keine mit einem immobilisierbaren, antimikrobiell wirksamen und MMP-inhibierenden, intrinsisch trifunktionellen Polymer (hier: telecheles PMOX) funktionalisierte Polymeroberfläche (hier: Einkomponenten SE-Dentaladhäsiv) eine derartig lange, kontaktaktive Effektivität im wässrigen Milieu.

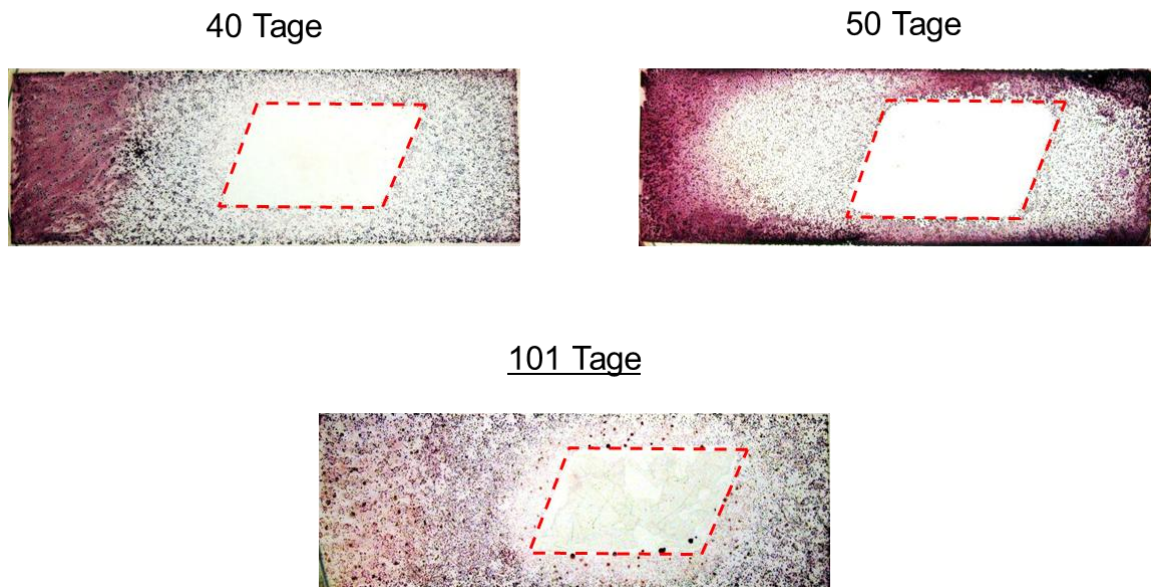


Abb.3.42: Dokumentation des chronologischen Untersuchungsverlaufs nach 40-tägiger (links oben), 50-tägiger (rechts oben) sowie 101-tägiger wässriger Elution bei 37°C (unten). Die doppelbindungsfunktionalisierten Glasobjektträger wurden mit dem DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen SE-Dentaladhäsiv #f_{2,5} (2.50 Gew.%) beschichtet, mittels Blaulicht auspolymerisiert, jeweils nach 40, 50 und 101 Tagen mit dem Karieserreger *S. mutans* kontaminiert und inkubiert (12 h bei 37°C). Die lebenden Bakterienkolonien wurden mit TTC angefärbt und im Durchlichtverfahren fotografiert.

Im Hinblick auf eine dentalrelevante Applikation solcher Langzeit-kontaktaktiv effektiven SE-Dentaladhäsivoberflächen wurden noch weitere, an drei konkreten Fragestellungen ausgerichtete Untersuchungsreihen ergänzt. Zunächst wurde die Resistenz der resultierenden, DDA-X-PMOX₃₇-AMA-funktionalisierten Oberflächen gegen hartnäckige bakterielle Biofilme evaluiert. Um den Anteil des DDA-X-PMOX₃₇-AMA-Additivs möglichst gering zu halten, wurde dessen optimale (minimale) Wirkkonzentration in der Harzformulierung bestimmt. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Marginalen Adaption auf Rinderdentin und die Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der PMOX-modifizierten SE-Dentaladhäsive durch Ermittlung der Haftwerte auf Zahnschmelz und Dentin.

3.4.5 Resistenz der kontaktaktiven, DDA-X-PMOX₃₇-AMA-ausgerüsteten Dentaladhäsivoberflächen gegen hartnäckige bakterielle Biofilme

Trat eine Kontamination mit einer großen Menge bereits kolonisierter Bakterien auf dentalrelevanten Oberflächen auf, so war ein solcher, bereits etablierter Biofilm (Verbund von Bakterienkolonien) nur schwer davon zu entfernen.^{266, 267}

Aus diesem Grunde wurde die Entfernbarkeit eines simuliert-hartnäckigen Biofilms und die danach verbleibende Restwirksamkeit der PMOX-modifizierten Adhäsivbeschichtungen nach dem Biofilmkontakt gesondert betrachtet.

Die PMOX-modifizierten Dentaladhäsivoberflächen, hergestellt (polymerisiert) aus der Harzformulierung #f_{2.5} (2.50 Gew.% an DDA-X-PMOX₃₇-AMA) wurden, analog zum Verfahren der Elutionstests, so lange intensiv eluiert, bis jegliches *leeching* ausblieb und nur noch eine kontaktaktive Wirksamkeit gegen *S. mutans* (kein oberflächlicher Bewuchs, Abbildung der Probenränder, vgl. **Abb.3.41**) beobachtet wurde. Hierfür wurden die Proben 3 Tage lang mit 3-mal-täglichen H₂O_{bidest.}-wechseln bei 37°C eluiert. Anschließend wurden die adhäsivbeschichteten Glasobjektträger unter eine vorher aninkubierte, geschlossenen Biofilmschicht lebender *S. mutans* gelegt und jeweils 48 h lang bei 37°C nachinkubiert. So kam es gezielt zu einer kompletten Überwucherung der Probe in der Petrischale.

Die Proben wurden nach 48 h entnommen und unter fließendem H₂O_{bidest.} 30 min lang abgespült. Dabei wurde der Biofilm leicht und vollständig, ohne mechanische Krafteinwirkung, entfernt. Die Proben wurden ein weiteres Mal mit frischen Biofilm aus *S. mutans* belegt und für weitere 48 h bei 37°C überwuchert. Dieses Verfahren wurde pro Probe insgesamt zwei mal durchgeführt.

Nach der zweiten Entfernung des Biofilms unter fließendem Wasser wurden die beschichteten Glasobjektträger, entsprechend dem beim Elutionstest angewandten Verfahren (vgl. **Kap.3.4.3**) mit einer definierten *S. mutans*-Suspension besprüht und ein letztes Mal inkubiert. Das Resultat dieser zweifachen Biofilm-Belastungsreihe mit einer finalen, dritten *S. mutans*-Sprühkontamination ist in **Abb.3.43** zu sehen.

2-malige Biofilm-Überwucherung mit *S. mutans*
+ finale *S. mutans*-Sprühkontamination/Bewuchs (2+1)

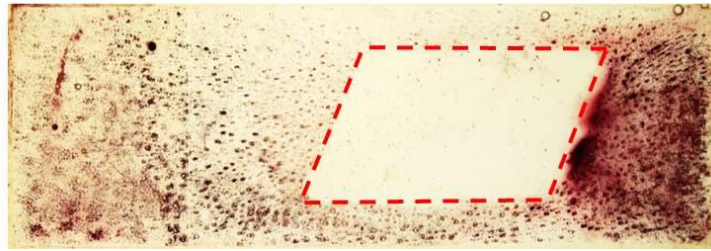


Abb.3.43: Dokumentation einer zwifach mit einem *S. mutans*-Biofilm beschichteten, jeweils 48 h lang bei 37°C nachinkubierten und wässrig abgespülten Probe. Der doppelbindungsfunktionalisierte Glasobjektträger wurde mit dem DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen SE-Dentaladhäsiv #f_{2.5} (2.50 Gew.%) beschichtet, mittels Blaulicht auspolymerisiert, nach 2-maligem Biofilmkontakt (s.o.) mit demselben Karieserreger *S. mutans* kontaminiert und ein drittes Mal inkubiert (12 h bei 37°C). Die lebenden Bakterienkolonien wurden mit TTC angefärbt und im Durchlichtverfahren fotografiert.

Selbst nach einer gezielten zweimaligen Überwucherung der DDA-X-PMOX₃₇-AMA-modifizierten Adhäsivbeschichtung (2.50 Gew.%) mit einem zuvor erzeugten, auf die Oberfläche aufgetragenen und jeweils 48 h lang nachinkubierten dicken Biofilm aus *S. mutans* entfaltete die DDA-X-PMOX-angereicherte Oberflächenbeschichtung nach einem wässrigen Abspülen der Proben wieder ihre volle kontaktaktive Effektivität.

3.4.6 Evaluation der dentalrelevanten Haft- und Adaptionparameter von Poly-2-oxazolin-haltigen SE-Dentaladhäsivformulierungen

Zur Bestimmung der Eignung von Poly-2-oxazolin-modifizierten SE-Dentaladhäsiven in dentalchemischen Applikationen wie beispielsweise der Beschichtung einer Zahnkavität vor dem Aufbringen eines Komposits (vgl. **Abb.3.26**), wurden die Zahnschmelz- und Dentinhaftwerte (SBS, engl. *shear bond strengths*) unterschiedlicher Harzformulierungen auf Rinderdentin bestimmt.

Als Referenz diente die PMOX-freie Harzformulierung #f₀ (reines AdheSE[®] One F). Dieser wurden in einem Anteil von 2.50 Gew.% vier unterschiedliche Poly-2-oxazolinderivate zugesetzt. Analog zu der in **Kap.3.3.7** vorgestellten Reihenfolge wurden zunächst die 2-R-Polyoxazolinsorte und die terminale Ankergruppe variiert.

Es wurden zwei Poly-2-methyl- (PMOX) und zwei Poly-2-ethyloxazoline (PEOX) gleicher Kettenlänge verwendet, die jeweils mit einer Hydroxyl- (OH) oder einer doppelbindungshaltigen, methacrylamid-basierten Gruppe (AMA) terminiert wurden.

Ein möglicher Einfluss der quartären Ammonium-alkylgruppe (QUART) des Initiators DDA-X wurde in dieser ersten Gruppe durch die Verwendung des Standardinitiators Methyltosylat (MeOTs, vgl. **Kap.1.3.6**) zunächst ausgeschlossen; dadurch enthielten die untersuchten Poly-2-oxazoline eine unwirksame Methylstartgruppe.

So wurden vier vollkommen homogene, gelbliche Harzformulierungen erhalten. In **Tab.3.15** werden diese Poly-2-oxazolin-modifizierten Harzformulierungen (je 2.50 Gew.%) inklusive der Struktur des jeweils enthaltenen PROX-Additivs vorgestellt.

Tab.3.15: Zusammensetzung der fünf PROX-haltigen Harzformulierungen ($\#f_M$, $\#f_{MT}$, $\#f_E$, $\#f_{ET}$ sowie $\#f_{2.5}$) in Vergleich zur SE-Dentaladhäsiv-Referenz ($\#f_0$).

$\#^a$	PROX-Additiv ^b	Gehalt [Gew.%]
f_0^c	-	-
f_M	CH ₃ -PMOX ₂₅ -OH	2.50
f_{MT}	CH ₃ -PMOX ₂₅ -AMA	2.50
f_E	CH ₃ -PEOX ₂₅ -OH	2.50
f_{ET}	CH ₃ -PEOX ₂₅ -AMA	2.50
$f_{2.5}$	DDA-X-PMOX ₃₇ -AMA	2.50

[a] Bezeichnung der Harzformulierung, [b] Chemische Struktur der eingesetzten Poly-2-oxazolin-Additive, [c] Kommerziell erhältliches AdheSE[®] One F.

Die Ermittlung der SBS-Werte wurde freundlicherweise durchgeführt von Dr. Heinze und M. Forjanic bei der Ivoclar Vivadent AG, Liechtenstein. Die Harzformulierungen wurden entsprechend den Gebrauchsinformation des Adhäsivherstellers auf präparierten Rinderzähnen angewandt. Zur Ermittlung der mechanischen Eigenschaften wurden Stempel eines Komposits (definierter Höhe und Durchmessers) mittels Blaulicht aufpolymerisiert (analog zur *notched-edge*-Methode, entsprechend DIN EN ISO 29022), die anschließend an einem kalibrierten Messgerät (Zwick) abgeschert wurden.

Zusätzlich wurden die SBS-Werte für ein DDA-X-initiiertes und AMA-terminiertes, intrinsisch trifunktionelles Poly-2-methyloxazolin ermittelt. Eingesetzt wurde die bereits vielseitig charakterisierte Harzformulierung #f_{2.5} (DDA-X-PMOX₃₇-AMA, 2.50 Gew.%, vgl. **Kap.3.4.2ff**). Die Resultate der Haftwerte aller Harzformulierungen werden in **Abb.3.44** anhand von Balkendiagrammen grafisch dargestellt.

Im Falle der Referenz betragen die gemessenen SBS-Werte auf bovinem Zahnschmelz 25.9 ± 5.8 MPa bzw. 32.5 ± 7.8 MPa (dunkle Balken, rechts). Bei keiner der fünf Poly-2-oxazolinhaltigen Harzformulierungen #f_M, #f_{MT}, #f_E, #f_{ET} sowie #f_{ET} (je 2.50 Gew.% an PROX) wurde auf Zahnschmelz oder Dentin eine signifikante Abnahme der SBS-Werte beobachtet.

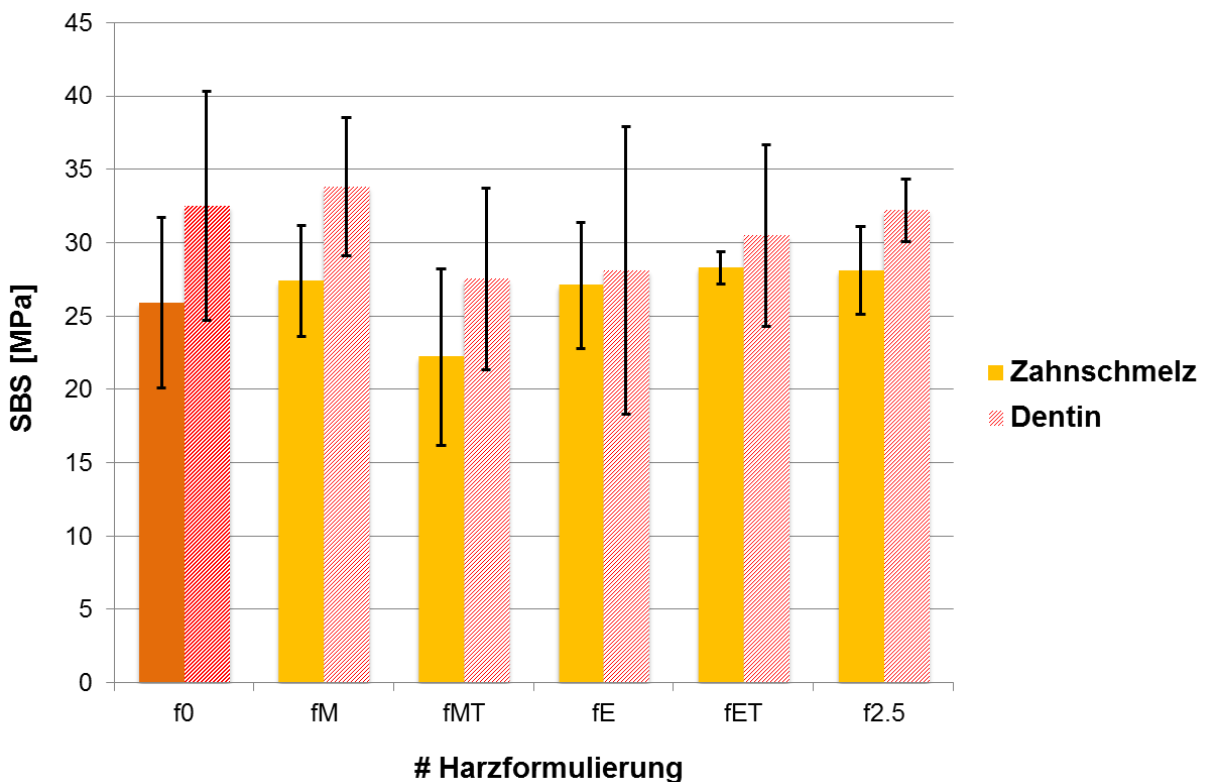


Abb.3.44:ⁿ Grafische Darstellung der für die Harzformulierungen #f_M, #f_{MT}, #f_E, #f_{ET} sowie #f_{2.5} ermittelten Haftwerte (SBS) auf bovinem Zahnschmelz (orange Balken, je links) und Dentin (rosa Balken, je rechts) im Vergleich zum PROX-freien Referenzharz (#f₀, dunkle Balken, links). Die Fehlerbalken entsprachen der berechneten Standardabweichung aller durchgeführten Messungen (N = 8).

ⁿ Die Ermittlung der SBS-Werte wurde durchgeführt von Dr. Heinze und M. Forjanic bei der Ivoclar Vivadent AG, Liechtenstein.

Damit wurde ein nachteiliger Einfluss der im Anteil von 2.50 Gew.% zugesetzten PROX-Additive auf das Haftverhalten der resultierenden, auspolymerisierten Harzformulierungen ausgeschlossen.

Weiterhin konnte weder im Vergleich den beiden unterschiedlichen Monomersorten ($\#f_M$, $\#f_{MT} \equiv \text{PMOX}$; $\#f_E$, $\#f_{ET} \equiv \text{PEOX}$), noch bei den endständigen funktionellen Gruppen ($(\#f_M, \#f_E \equiv \text{OH}; \#f_{MT}, \#f_{ET} \equiv \text{AMA})$) eine signifikante Beeinflussung der Gesamtformulierung zugeordnet werden. In Vergleich mit der PMOX-freien Referenz $\#f_0$, konnte nach der Zugabe des QUART-funktionalisierten Additivs DDA-X-PMOX₃₇-AMA im Falle der Harzformulierung $\#f_{2.5}$ ebenfalls keine signifikante Abnahme der SBS-Werte auf bovinem Zahnschmelz und Dentin beobachtet werden.

Die Matrix des eingesetzten SE-Dentaladhäsivs wurde offensichtlich nicht von den polymeren, PROX-basierten Additiven beeinflusst.

In einer abschließenden Evaluierung der dentalrelevanten Eigenschaften wurde die Qualität des Randabschnitte (zwischen SE-Dentaladhäsiv und Komposit) nach der Methode der Marginalen Adaption in Rinderdentin bestimmt. Die Marginale Adaptionen wurden freundlicherweise bestimmt von Dr. Heinze und M. Forjanic bei der Ivoclar Vivadent AG, Liechtenstein. Verwendet wurde hierfür die DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltige Harzformulierung $\#f_{2.5}$. Für einen relativen Vergleich der Randgüte wurde die Untersuchung ebenfalls mit der PMOX-freien Referenz $\#f_0$ durchgeführt. In **Abb.3.45** werden die erhaltenen Resultate dargestellt.

In Vergleich zu der PMOX-freien Referenz $\#f_0$ wurde nach Anwendung der DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen Harzformulierung $\#f_{2.5}$ (2.50 Gew.%) bei den zylindrischen Füllungen (der Tubuli, vgl. **Kap.3.1**) keine signifikante Abnahme der spaltfreien Profile festgestellt. Auch die Randmesswerte zeigten keine signifikante Abnahme.

Damit konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten, intrinsisch-bifunktionellen Additive der DDA-X-PMOX-AMA-Klasse für eine Anwendung in SE-Dentaladhäsiven (in 2.50 Gew.%) geeignet waren.

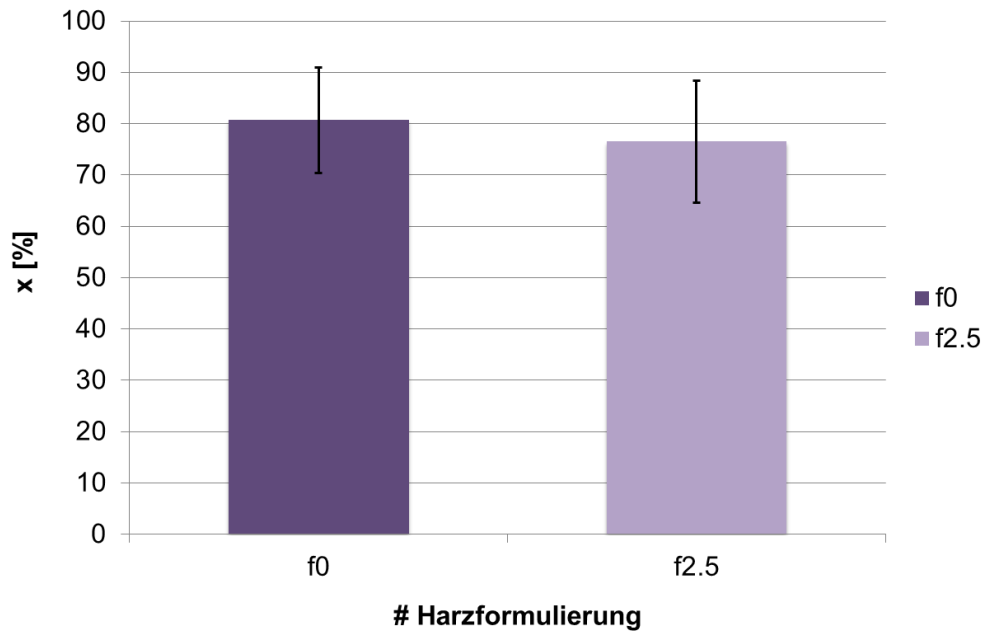


Abb.3.45:^o Grafische Darstellung der mittleren prozentualen Anteile an regelmäßigem Rand in Relation zum Gesamtrand auf bovinem Dentin. Untersucht wurde die DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltige Harzformulierung #f_{2.5} (2.50 Gew.%, heller Balken, rechts) im Vergleich zum PROX-freien Referenzharz (#f₀, dunkler Balken, links). Die Kenngröße x (in %) bezeichnet den mittleren Anteil an regelmäßigem Rand im Verhältnis zum Gesamtrand. Die Fehlerbalken entsprachen der berechneten Standardabweichung aller durchgeführten Messungen (N = 3).

3.4.7 Ermittlung der minimalen Wirkkonzentration an DDA-X-PMOX₃₇-AMA gegen *S. aureus* und *S. mutans* in der Harzformulierung

Um eine die Beeinflussung der (meth)acrylamid-basierten Harzformulierung des SE-Dentaladhäsivs weiter zu reduzieren, wurde in einem letzten Untersuchungsschritt der PMOX-Anteil im SE-Dentaladhäsiv, ausgehend von der vollwirksamen Harzformulierung #f_{2.5} (2.50 Gew.%, vgl. **Kap.3.4.2**), sukzessive in 0.5 Gew.%-Schritten bis auf 1.0 Gew.% verringert.

In **Tab.3.16** sind die drei untersuchten Harzformulierungen sowie die PMOX-freie Referenz #f₀ aufgeführt.

^o Die Marginale Adaptionen wurden bestimmt von Dr. Heinze und M. Forjanic bei der Ivoclar Vivadent AG, Liechtenstein.

Tab.3.16: Zusammensetzung der drei DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen Harzformulierungen (**#f_{2.0}**, **#f_{1.5}** sowie **#f_{1.0}**) in Vergleich zur SE-Dentaladhäsiv-Referenz (**#f₀**).

#^a	PMOX-Additiv^b	Gehalt [Gew.%]
f₀^c	-	-
f_{2.0}	DDA-X-PMOX ₃₇ -AMA	2.00
f_{1.5}	DDA-X-PMOX ₃₇ -AMA	1.50
f_{1.0}	DDA-X-PMOX ₃₇ -AMA	1.00

[a] Bezeichnung der Harzformulierung, [b] Chemische Struktur des eingesetzten Poly-2-methyloxazolin-Additivs, [c] Kommerziell erhältliches AdheSE[®] One F.

Die aus den drei Harzformulierungen **#f_{2.0}**, **#f_{1.5}** und **#f_{1.0}** (2.0-1.0 Gew.%) gewonnenen, mittels Blaulicht auf doppelbindungsfunktionalisierten Glasobjektträgern aufpolymerisierten Oberflächen wurden auf ihre kontaktaktive antimikrobielle Wirksamkeit gegen den Vergleichskeim *S. aureus* sowie den Karieskeim *S. mutans* getestet (vgl. **Kap.3.2ff**). In **Abb.3.46** werden die fotografische Dokumentation der erhaltenen Resultate nach einer 3-tägigen, intensiven wässrigen Elution (3x täglicher H₂O_{bidest.}-Wechsel) dargestellt und mit der PMOX-freien Referenz **#f₀** verglichen.

Im Falle von *S. aureus* (linke Spalte) wurde bereits bei der ersten Reduktion des PMOX-Anteiles auf 2.0 gew% mit der Harzformulierung **#f_{2.0}** nur noch eine, unvollständige kontaktaktiv-antimikrobielle Wirksamkeit festgestellt.

Im Falle von *S. mutans* (rechte Spalte) wurde bei einem PMOX-Anteil der Harzformulierung **#f_{2.0}** von 2.0 Gew.% gerade noch eine vollständige, kontaktaktiv-antimikrobielle Effektivität beobachtet. Die nachfolgenden, geringer PMOX-haltigen Proben (1.5-1.0 Gew.%) der Harzformulierungen **#f_{1.5}** und **#f_{1.0}** zeigten gegen denselben Keim nur noch eine partielle, unvollständige Wirksamkeit.

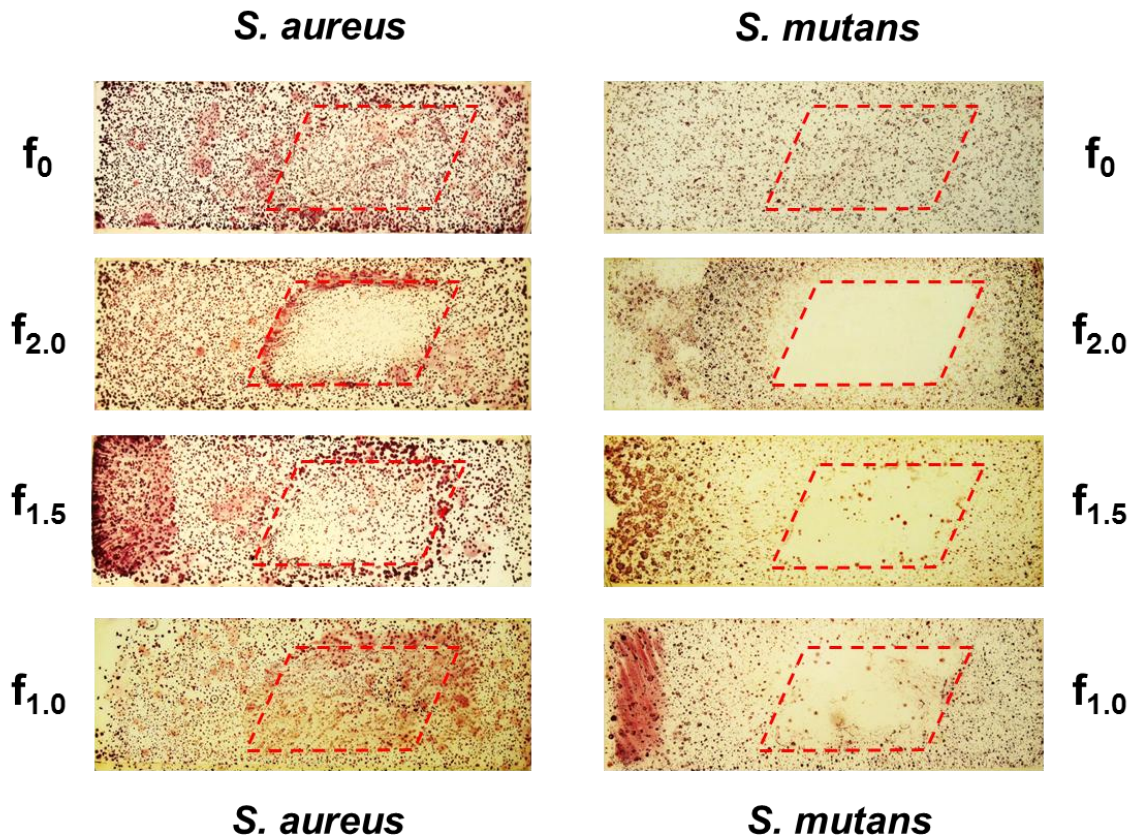


Abb.3.46: Dokumentation der kontaktaktiven-antimikrobiellen Wirksamkeit der drei Harzformulierungen **#f_{2.0}**, **#f_{1.5}** und **#f_{1.0}** mit einem sukzessive reduzierten Anteil an DDA-X-PMOX₃₇-AMA-Additiv (2.0 – 1.0 Gew.%) gegen den Vergleichskeim *S. aureus* (linke Spalte) und den Karieskeim *S. mutans* (rechte Spalte). Die doppelbindungsfunktionalisierten Glasobjektträger wurden mit der jeweiligen Harzformulierung beschichtet, mittels Blaulicht auspolymerisiert und 3 Tage lang intensiv bei 37°C eluiert (3x - täglich H₂O_{bidest.}-Wechsel). Anschließend wurde mit dem jeweiligen Keim kontaminiert und inkubiert (12 h bei 37°C). Die lebenden Bakterienkolonien wurden mit TTC angefärbt und im Durchlichtverfahren fotografiert.

Mit dieser finalen Untersuchungsreihe konnte gezeigt werden, dass ein reduzierter 2.0 Gew.%-iger Anteil an DDA-X-PMOX₃₇-AMA-Additiv in der Harzformulierung **#f_{2.0}** ausreichend war für eine zuverlässige, kontaktaktiv-antimikrobielle Wirksamkeit der auspolymerisierten Oberflächen gegen den dentalrelevanten Keim *S. mutans*.

3.5 Ankergruppenfunktionalisierte telechele Poly-2-oxazoline zur kovalenten Anbringung an Dental-relevanten Materialoberflächen

3.5.1 Konzept der selektiv-kollagenaffinen Ankergruppen an telechelen PMOX

Wie bereits angeführt (vgl. **Kap.3.3.1**), stellt eine dreidimensional verknüpfte Matrix aus Kollagenfasern das organische Grundgerüst (Bindegewebe) von Säugetierzähnen dar. Kollagen ist in seiner Primärstruktur aus peptidisch verknüpften Aminosäuren aufgebaut²⁶⁸⁻²⁷⁰; die Überstruktur bildet eine Tripelhelix²⁷¹.

Die Aminosäure mit dem höchsten Anteil in Kollagen ist Glycin (Gly, 20-35 Gew.%); interessanter sind jedoch die in geringeren Anteilen enthaltenen L-Lysin (Lys) sowie das Oxidationsprodukt 5-Hydroxylysin. Diese besitzen außer der α -Aminogruppe noch jeweils eine weitere, basische Aminofunktion in der ϵ -Position. Da diese aus der Hauptkette des Polypeptids herausragen (*n*-Butylspacer), stellen sie sterisch wenig gehinderte, primäre Nucleophile dar, die mit kompatiblen Ankergruppen mittels einer S_N2 -Reaktions kovalent modifiziert werden können.

Derartige aminogruppenselektive Protein-Polymer-Konjugate wurden bereits mit hydrophilen Polymeren wie Polyethylenglykol realisiert.²⁷²⁻²⁷⁴ Auch Protein-Polymer-Konjugate von Poly-2-oxazolinen mit kleineren Enzymen wie Trypsin²⁷⁵ oder dem Enzym Katalase²⁷⁶ sind bekannt.^{277, 278} Eine der effektivsten Ankergruppenklassen zur Modifikation von ϵ -NH₂-Gruppen an Proteinen stellten u.a. polymergebundene Anhydride wie das Maleinsäureanhydrid²⁷⁹ oder das Pyromellitsäure-Dianhydrid (PMS-DA)²⁸⁰ dar. Insbesondere das PMS-DA war hierfür besonders geeignet, das es als symmetrisches Tetracarbonsäure-Dianhydrid zwei reaktive Positionen aufwies.

Auch besitzen die irreversiblen Substitutionsreaktionen von cyclischen Anhydriden mit primären Aminen eine hohe Triebkraft, weil die resultierenden Imide zu den thermodynamisch stabilsten heterocyclischen Verbindungen zählen.^{281, 282}

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit PMS-DA als kollagenaffine Ankergruppe zur Funktionalisierung der telechelen PROX-Systeme gewählt. In einer polymeranalogen Umsetzung mit einem EDA-terminierten, antimikrobiellen und MMP-inhibierenden Makromonomer der Klasse DDA-X-PMOX_n-EDA (**#5-8**; vgl. **Tab.3.8**) sollte es einseitig zum ankergruppenmodifizierten System DDA-X-PMOX_n-PMS-DA reagieren. Die verfügbare Anhydridposition diene der irreversiblen Verankerung an exponierten ϵ -NH₂-Gruppen der dentalen Kollagenmatrix.

Mit derartigen aminoselektiven Ankergruppen ausgerüstete, telechele Poly-2-oxazoline ließen sich zudem an beliebige, mit freien Aminogruppen versehene Systeme (bspw. Enzyme) oder Oberflächen anbringen. **Abb. 3.47** veranschaulicht schematisch das angestrebte Konzept der PMS-DA-Ankergruppen an Poly-2-methyloxazolin.

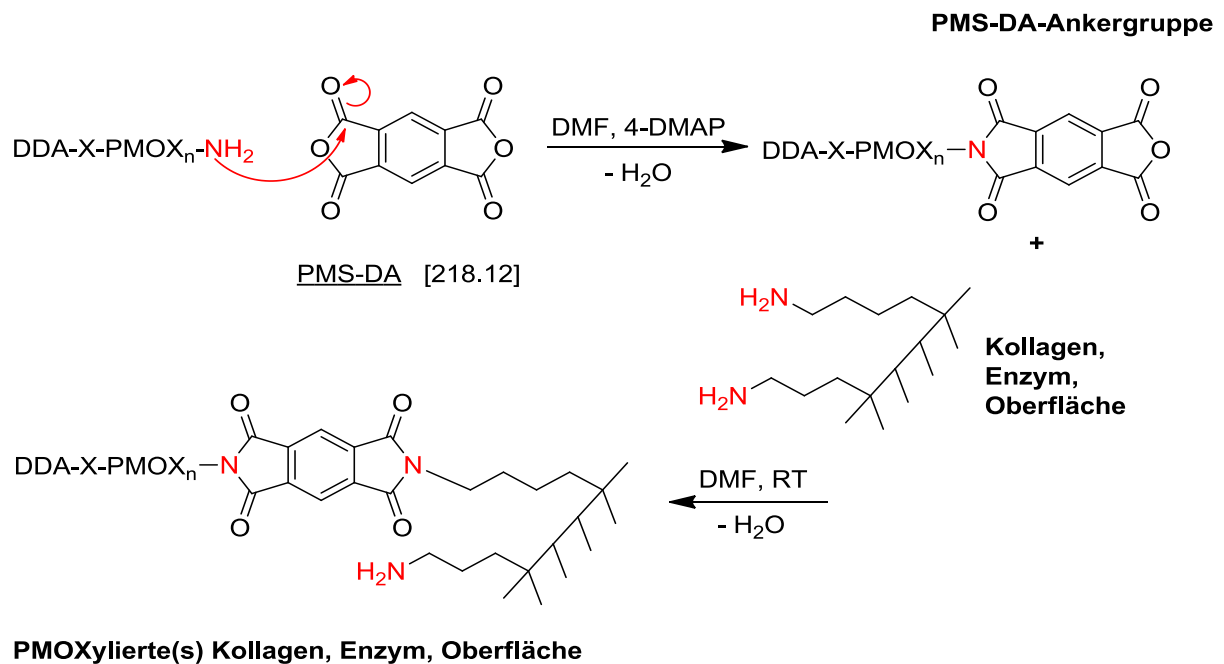


Abb.3.47: Schematische Darstellung einer polymeranalogen Umsetzung des telechelen, antimikrobiellen und MMP-inhibierenden DDA-X-PMOX-NH₂ (\equiv EDA) mit Pyromellitsäure-Dianhydrid (PMS-DA) in DMF zur Erzeugung einer terminalen Ankergruppe. Diese sollte zur selektiven Funktionalisierung (\equiv PMOXYlierung) an exponierten primären Aminosäuregruppen von dentalen Kollagen, einem Enzym (Polypeptid) oder einer aminierten Oberfläche dienen.

3.5.2 Optimierung und Kinetik der polymeranalogen Umsetzung mit PMS-DA

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von PMS-DA in den bislang verwendeten Lösungsmitteln (H₂O, MeOH, CHCl₃, Et₂O, THF) waren für die nachfolgende Umsetzung ausschließlich polare-aprotische Lsm. geeignet (DMF, NMP und DMSO). In Voruntersuchungen wurde zudem festgestellt, dass eine H₂O-Kontamination im Lsm. eine unerwünschte, vorzeitige Öffnung der Anhydridpositionen zu den entsprechenden *ortho*-Dicarbonsäuren verursacht.

Damit wurden 50 ppm als maximal akzeptabler H₂O-Gehalt festgelegt. Wegen der vergleichsweise einfachen Trocknungsprozedur wurde im Folgenden *N,N*-Dimethylformamid (DMF) zum Lsm. der Wahl bestimmt. Die Umsetzung wurde, zur Erleichterung des nucleophilen Angriffs der primären NH₂-Gruppe des telechelen Poly-2-methyloxazolins an der elektrophilen Kohlenstoffposition des PMS-DA (vgl. **Abb.3.47**), zunächst unter Zugabe katalytischer Mengen des STEGLICH-Katalysators 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) durchgeführt. In einem ersten Syntheseraster wurden insgesamt 18 Proben bei Temperaturen zwischen 60-80°C und einem 20.0-fachen Überschuss an PMS-DA, bezogen auf das Amin des Polymers, durchgeführt.

Anhand von Verlaufsproben wurde festgestellt, dass die polymeranaloge Umsetzung selbst bei 60°C innerhalb weniger Minuten abgeschlossen war. Daher wurden alle nachfolgenden Funktionalisierungen mit PMS-DA bei RT innerhalb von 5-15 min durchgeführt; sie führten zu thermisch deutlich weniger belasteten, definierten DDA-X-PMOX₃₅-PMS-IA-Produkten (**#20**, gewonnen aus **#5**, vgl. **Tab.3.4**)^p. Da eine Referenzreihe ohne 4-DMAP ebenfalls zu einer quantitativen Funktionalisierung führte, wurde auf eine Weiterverwendung des STEGLICH-Katalysators verzichtet.

Zur Charakterisierung des resultierenden, ankergruppenfunktionalisierten PMOX eignete sich ¹H-NMR Spektroskopie nur bedingt. Die beiden aromatischen Protonen des PMS-DA wurden unter Verwendung von DMSO-d₆ als Lsm. zuweilen um 8 ppm beobachtet, tauschten aber rasch mit ²D-Protonen aus, was nach einer längeren Lagerung im deuterierten Lsm. zu Signalverlust führte.

Als gut geeignete und zudem schnell durchführbare Analytik der PMS-IA-Funktionalisierung am Poly-2-oxazolin erwies sich die FOURIER-transformierte Infrarotspektroskopie (FT-IR). Darin waren die vier Carbonylbindungen (C=O) des PMS-DA-Eduktes mit einer intensiven, symmetrischen Valenzschwingung bei $\nu_s=1,770\text{ cm}^{-1}$ gut auszumachen. Nach erfolgter, einseitigen Imidisierung am DDA-X-PMOX_n-NH₂ verschob sich das Signal der CO-Valenzschwingungen, der geringeren Elektronegativität der Heteroatome wegen (O: 3.6 vs. N: 3.0; nach PAULING-Skala), um 70 cm^{-1} in den niedrigerenergetischen Bereich (nach rechts im FT-IR-Spektrum).

Abb.3.48 zeigt einen Vergleich der FT-IR-Spektren des telechelen DDA-X-PMOX₃₅-NH₂-Polymers (**#5**, vgl. **Tab.3.4**) vor (blau, unteres Spektrum) und nach der

^p In der polymeranalogen Umsetzung wurde ein gemischtes Pyromellitsäure-Imid-Anhydrid erhalten.

Funktionalisierung mit der PMS-IA-Ankergruppe (**#20**, rot, oberes Spektrum) mit Zuordnung der symmetrischen CO-Valenzschwingungen in der zugehörigen PMS-IA-funktionalisierten Polymerstruktur.

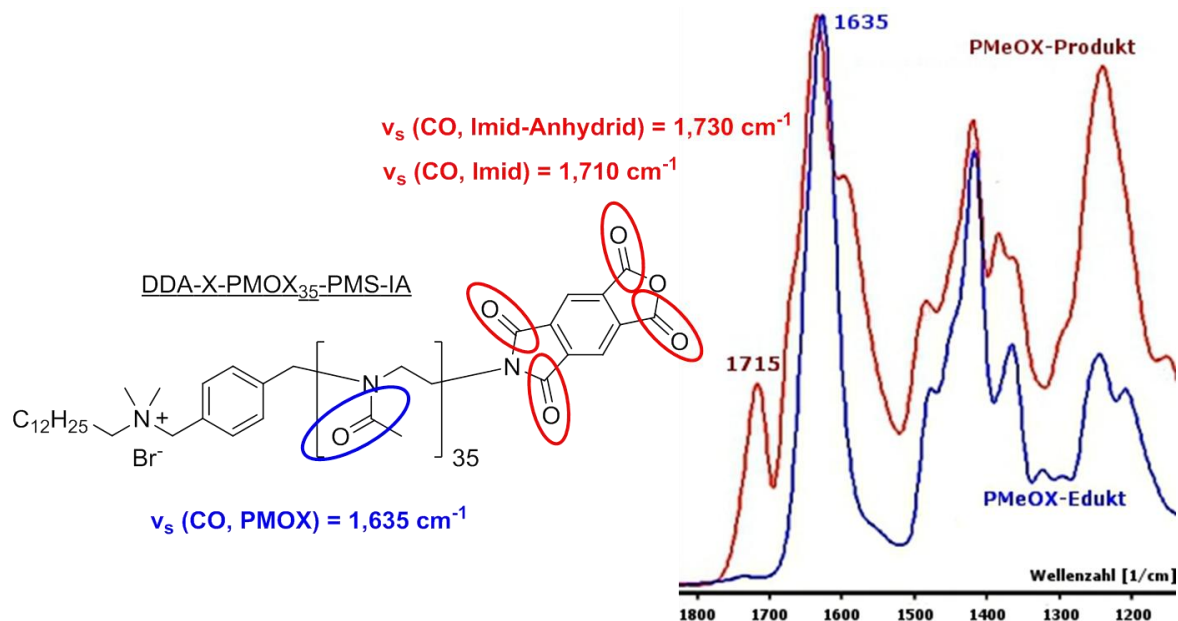


Abb.3.48: Vergleich der symmetrischen Carbonyl-Schwingungsbanden (v_s) im FT-IR des telechelen Poly-2-methyloxazolins vor (**#5**, vgl. **Tab.3.4**; blaues Spektrum, unten) und nach der polymeranalogen Umsetzung mit PMS-DA rotes Spektrum, oben). Die einseitige PMS-Anhydrid-Imid-Funktionalisierung des DDA-X-PMOX₃₅-NH₂-Systems **#20** resultierte in einer zusätzlichen CO-Schwingungsbande bei $1,715 \text{ cm}^{-1}$.

Bei dem nach der Funktionalisierung im FT-IR beobachteten Signal um $1,715 \text{ cm}^{-1}$ handelte es sich wahrscheinlich um eine Überlagerung der imid- und anhydridnahen, symmetrischen CO-Valenzschwingungsbanden. Eine $v_s(\text{CO})$ -Schwingungsbande des freien Anhydrids bei $1,770 \text{ cm}^{-1}$ (vgl. PMS-DA-Edukt) wurde bei keiner der umgesetzten und wässrig dialysierten Proben beobachtet. Damit war davon auszugehen, dass alle vier Positionen der PMS-IA-Ankergruppe nach der Kopplung gleichzeitig energetisch beeinflusst wurden.

Um die ebenfalls mögliche aber unerwünschte, beidseitige Kopplungsreaktion an der PMS-DA-Ankergruppe auszuschließen, wurde eine Kopplungsstudie durchgeführt.

Dabei wurde ein mit PMS-DA polymerisiertes, vollständig aufgereinigtes DDA-X-PMOX₃₅-PMS-IA-Produkt **#20** mit einer äquimolaren Menge eines NH₂-terminierten Poly-2-methyloxazolins (seines eigenen Eduktes) in DMF vermischt und bei RTemp zur Weiterreaktion gebracht. Aus dem Ansatz wurden nach einer Woche Proben entnommen und mittels GPC in DMF direkt vermessen. In **Abb.3.49** findet sich die Darstellung des Kopplungsexperiments und die zugehörigen GPC-Elugramme (rot, obere Spur). Die untere, blaue Spur wurde durch eine rechnergestützte Dekonvolution der Peakflächen unter Annahme symmetrischer Molekularmassenverteilungen (GAUSSIAN Fit) angepasst (berechnet aus den GPC-Elugrammen) und ermöglichte die Bestimmung der jeweiligen Flächenanteile.

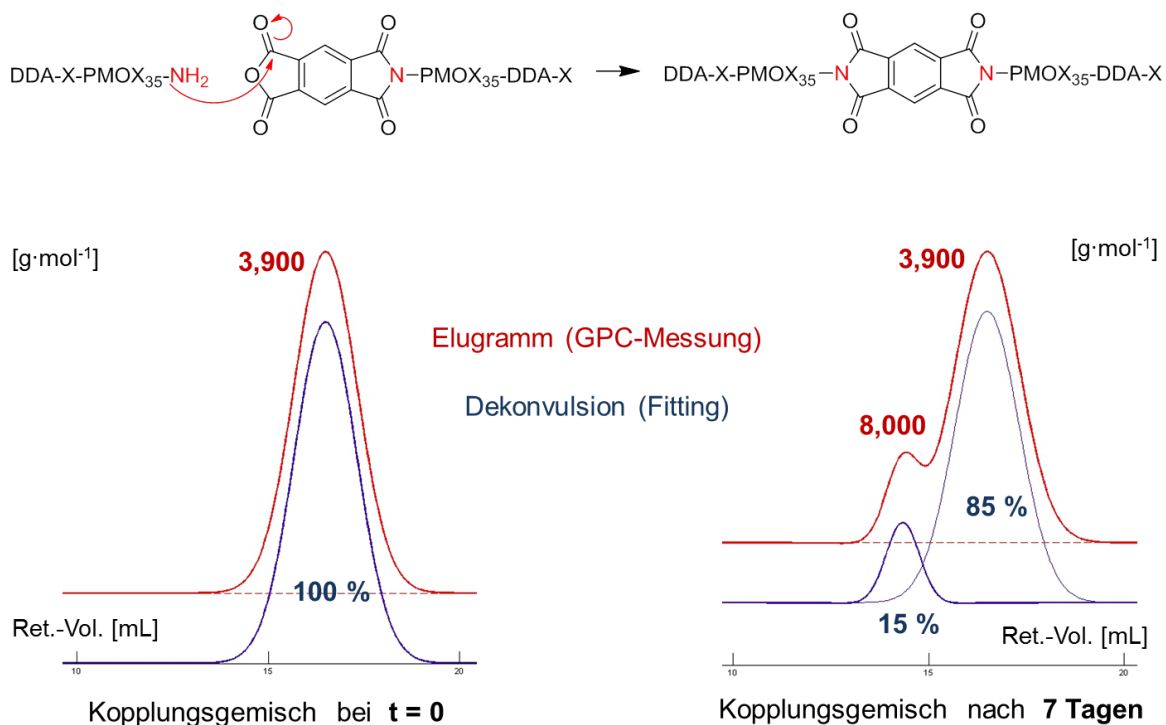


Abb.3.49: Schematische Darstellung der Kopplungsstudie, durchgeführt bei RT in DMF an einem äquimolaren Gemisch des ankergruppenfunktionalisierten Produkts DDA-X-PMOX₃₅-PMS-IA **#20** mit seinem eigenen Edukt DDA-X-PMOX₃₅-NH₂ (**#5**, vgl. **Tab.3.4**). Abgebildet sind die zugehörigen GPC-Elugramme (rot, obere Spur) sowie die rechnergestützten Dekonvolutionen (Peakfittings, blau; untere Spur) zu Beginn des Experiments (links) und nach einer 7-tägigen Umsatzdauer (rechts). Das Gemisch der beiden Polymere (Produkt / Edukt) zu Beginn der Kopplungsstudie zeigte in der DMF-GPC eine monomodale Molmassenverteilung mit einer zahlenmittleren Molmasse von $M_n = 3,900 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (vgl. **Abb.3.49**, links).

Nach 7 Tagen Umsatzdauer bei RT in DMF (vgl. **Abb.3.49**, rechts) wurde eine bimodale Molekulargewichtsverteilung beobachtet, wobei das neu hinzugekommene Signal im höhermolekularen, linken Bereich des GPC-Elugramm auftrat.

Nach einer Dekonvulsion der Elugramme wurde dem zusätzlichen Peak eine zahlmittlere Molmasse von $M_n = 8,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ zugeordnet, was in etwa der doppelten Molmasse des Produktes DDA-X-PMOX₃₅-PMS-IA **#20** entsprach. Der Anteil des zusätzlichen Peaks am Integral der Elugrammfläche betrug 15 %. Nach einer weiteren Woche, also insgesamt 14 Tagen Umsetzungsdauer wurde der mittels Signaldekonvulsion errechnete Flächenanteil bei $8,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ zu 40% bestimmt.

Eine Kopplungsreaktion zwischen der Ankergruppe des telechelen PMOX-Produkts und seinem eigenen NH₂-terminierten Edukt wurde erfolgreich provoziert und mittels GPC nachgewiesen. Trotz der hohen Reaktivität des PMS-DA handelte es sich dabei aber um eine kinetisch stark gehemmte Reaktion, bei der frühestens nach 24 Tagen ein vollständiger Umsatz zu erwarten wäre. Nachdem PMS-DA sehr schnell mit der primären Aminogruppe des Poly-2-methyloxazolins zu DDA-X-PMOX-PMS-IA **#20** abreagierte, wurden dessen translatorischen Freiheitsgrade am Polymer stark eingeschränkt. Polymertypisch wurde die Diffusion stark begrenzt, was im zeitlichen Mittel zu einer empfindlichen Herabsetzung der Wahrscheinlichkeit für wirksame Zusammenstöße von ankergruppenfunktionalisierten Polymerprodukt und dessen amineterminierten PMOX-Edukt führte.

Mit dieser Kopplungsstudie wurde gezeigt, dass die einseitige Umsetzung der telechelen PMOX-Systeme am PMS-DA zum Imid vor den beidseitigen, analogen Umsetzungen zum Diimid bevorzugt werden. Gleichzeitig konnte belegt werden, dass eine unerwünschte Kopplung binnen der für die Ankergruppenfunktionalisierung angesetzten Reaktionszeiten von wenigen min bis max. 1 h, unwahrscheinlich war.

3.5.3 Evaluierung der Langzeitwirksamkeit ankergruppenfunktionalisierter, telecheler Poly-2-methyloxazoline auf Rinderdentin

Nach der polymeranalogen Umsetzung mit PMS-DA zum ankergruppenmodifizierten, telechelen Poly-2-oxazolin wurde die antimikrobielle Wirksamkeit von DDA-X-

PMOX₃₅-PMS-IA **#20** gegen den Vergleichskeim *S. aureus* und den Karieskeim *S. mutans* mittels eines MIC-Tests in wässrigen Nährmedium bestimmt (vgl. **Kap.3.2.2**).

Der MIC-Wert des aminterminierten Eduktes **#5** gegen *S. aureus* betrug 9.8 ppm ($\equiv 2.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), der des ankergruppenfunktionalisierten Produktes **#20** gegen denselben Keim betrug 159 ppm ($\equiv 42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Der MIC-Wert des Eduktes **#5** gegen *S. mutans* wurde ebenfalls zu 9.8 ppm ($\equiv 2.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); der des Produktes **#20** zu 78 ppm ($\equiv 21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ermittelt. Damit war die antimikrobielle Wirksamkeit des Pyromellitsäure-Imid-Amid-funktionalisierten Poly-2-methyloxazolins **#20** zwar noch gegeben (> 256 ppm, vgl. Diskussion in **Kap.3.2.1**), jedoch signifikant geringer als die seines EDA-terminierten Eduktes **#5**.

Dieses Resultat sprach für einen (hier: nachteiligen) Satellitengruppeneffekt der terminalen PMS-IA-Gruppe am telechelen DDA-X-PMOX₃₅-Wirksystem. In **Tab.3.17** sind die Untersuchungsergebnisse der anti-mikrobiellen Evaluation in wässriger Lsg. (MIC-Tests) zusammengefasst.

Tab.3.17 Resultate der antimikrobiellen (MIC_{S.a.}, MIC_{S.m.}) Evaluierung der telechelen, mit dem antimikrobiellen DDA-X initiierten und mit den beiden Satellitengruppen EDA bzw. PMS-IA terminierten Poly-2-methyloxazoline **#5** (Edukt) und **#20** (Produkt).

#	Struktur	M _{NMR} ^a	M _{n,GPC} ^b	PDI ^c	MIC _{S. aureus} ^d		MIC _{S. mutans} ^d	
					[ppm]	[$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	[ppm]	[$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]
5	DDA-X-PMOX ₃₅ -EDA	3,400	3,600	1.15	9.8	2.9 ^e	9.8	2.9 ^e
20	DDA-X-PMOX ₃₅ -PMS-IA	n.d. ^f	3,800	1.21	159	41 ^g	78	20 ^g

[a] Der Polymerisationsgrad im NMR wurde berechnet aus dem Integralverhältnis des charakteristischen Initiatorsignals bei 0.84 ppm (t, 3H, -CH₃) vs. dem Mittelwert des PMOX-Rückgratsignals bei 3.3 ppm (b, n-4H, N(CH₂)₂) und 2.0 ppm (b, n-3H, NCOCH₃), [b] Zahlenmittleres Molekulargewicht, [c] Polydispersitätsindex, [d] Alle MIC- wurden zweimal pro Poly-2-oxazolinsystem bestimmt, die Standardabweichung zwischen den Messreihen betrug max. 15%, [e] Molare Konzentration wurde berechnet unter Verwendung des per ¹H-NMR ermittelten, mittleren Molekulargewichts, [f] Aufgrund austauschbarer aromatischer Protonen nicht eindeutig bestimmbar, [g] Berechnet unter Verwendung des zahlenmittleren Molekulargewichts, erhalten aus der GPC.

Analog zum in **Kap.3.3.5** beschriebenen Verfahren wurden standardisierte, nicht demineralisierte Rinderdentinscheiben (Typ B, 50 mg; vgl. **Abb.3.29**) mit einer salzsauren Lsm. (HCl, 2.0 mol·L⁻¹) des ankergruppenfunktionalisierten PMOX **#20** in zwei unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Der Gehalt an DDA-X-PMOX₃₅-PMS-IA in der Lsg. betrug 5.00 sowie 2.50 Gew.%, die Dentinprobenkörper wurden

mit *S. mutans* angeimpft und beidseitig mit je 20.0 μL der PMOX-Lsg. für je 20 s behandelt (mit einem Mikrobürstchen einmassiert).

Ein Teil der Dentinscheiben ($t = 0$) wurde kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ abgespült und 12 h lang bei 37°C in Nährmedium inkubiert. Weitere Dentinscheiben wurden 20 bzw. 40 min lang in PBS-Puffer bei RT unter Schütteln (1 Hz) gewaschen und anschließend im Nährmedium ($\text{pH} = 6.80$) inkubiert. Mit einem solchen Elutionsverfahren sollte die Haftung der PMS-IA-funktionalisierten, telechelen DDA-X-Poly-2-methyloxazoline am natürlichen Kollagen des Rinderdentins untersucht werden. Der Test wurde doppelblind ausgeführt; **Abb. 3.50** zeigt die dabei erhaltenen Resultate.

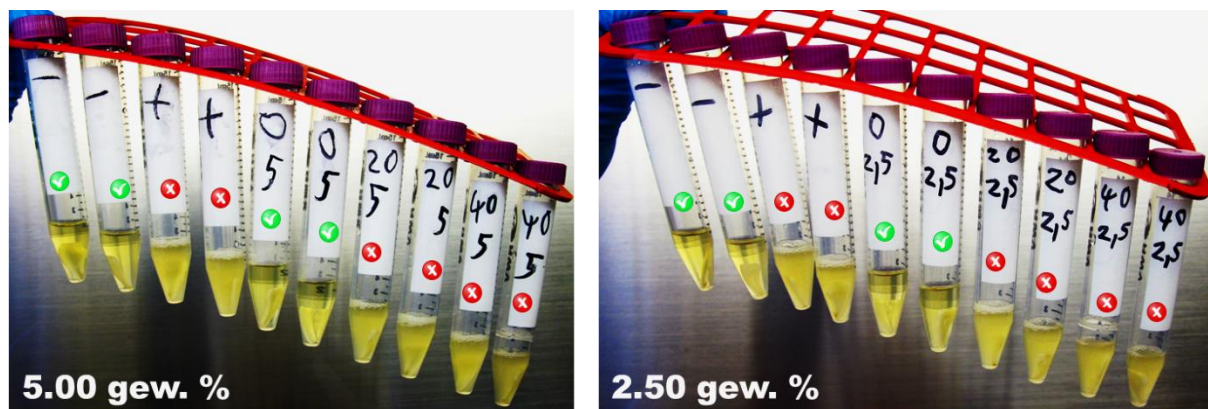


Abb.3.50: Fotografische Dokumentation der Elutionstests an DDA-X-PMOX₃₅-PMS-IA-beschichteten, mit *S. mutans* angeimpften Rinderdentinscheiben (Typ B, 50 mg). Die Konzentration des wirksamen Polymers #20 in der salzsauren Lsg. betrug 5.00 (links) bzw. 2.50 Gew.% (rechts). Die behandelten Dentinprobenkörper wurden unmittelbar nach der Beschichtung ($t = 0$) sowie nach einer 20- bzw. 40-minütigen Elution in PBS-Puffer bei RT in Nährmedium inkubiert ($\text{pH} = 6.80$, 12 h, 37°C). Die mit +/- bezeichneten Probenkörper waren die Negativ- sowie Positivkontrollen.

Obwohl die beschichteten und unmittelbar inkubierten Dentinscheiben in beiden Konzentrationen von 5.00 und 2.50 Gew.% an DDA-X-PMOX₃₅-PMS-IA #20 eine antimikrobielle Wirksamkeit gegen *S. mutans* zeigten, waren alle in PBS-Puffer (20 und 40 min bei RT) eluierten Probenkörper nicht mehr antimikrobiell wirksam.

Damit konnte zunächst keine Effektivität im Sinne einer dauerhaften Belegung des bovinen Kollagens erreicht werden. Eine Erklärung hierfür wäre, dass innerhalb der kurzen Beschichtungsdauer (je 20 s pro Seite) keine ausreichende, kovalente Haftung der mit Ankergruppen-funktionalisierten Poly-2-methyloxazoline an den exponierten NH_2 -Gruppen des Rinderdentinkollagens realisiert werden konnte.

Ein weiterer Erklärungsansatz wäre die zu geringe Belegungsdichte der exponierten Aminogruppen, was zu einer ungenügenden Anzahl an aktiven, PMOX-gebundenen DDA-X-Funktionen an der Dentinoberfläche führen würde. Beide Hypothesen wurden im Folgenden mittels einer quantitativen Untersuchungsmethode an NH_2 -Gruppen tragenden Modelloberflächen überprüft.

3.5.4 Quantitative Bestimmung der Reaktionsdauer sowie Belegungsdichte an wirksamen Gruppen auf Aminogruppen-modifizierten Glasoberflächen

Hierzu wurden zunächst die Oberflächen von Glasobjektträgern mit einer definierten Dichte an primären Aminogruppen hergestellt.²⁹ Dadurch wurde ein schnell quantifizierbares Modellsystem zur PMOXylierung von allen NH_2 -haltigen Systemen und Oberflächen wie dentalem Kollagen, Enzymen, Polypeptiden sowie den dentalrelevanten Glas- und Keramikoberflächen selbst, etabliert.

Die Belegung der Glasoberflächen mit exponierten, kovalent angebundenen NH_2 -Gruppen erfolgte mittels Silanisierung der zuvor mit Piraña-Lsg (CARO'scher Säure) angeätzten Glasobjektträger mit Trimethoxyaminopropylsilan (TMAPS). Die kurze Säureätzung (5 min, im US bei RT) diente einer chemischen Reinigung der Glasoberflächen. In **Abb.3.51** findet sich die schematische Darstellung der eingesetzten Methode zur Herstellung NH_2 -funktionalisierter „Aminogläser“.

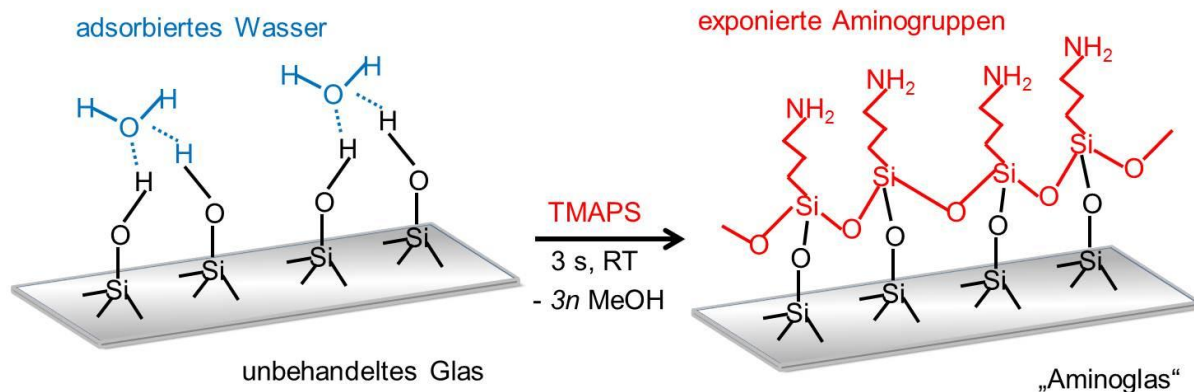


Abb.3.51: Schematische Darstellung der chemischen Modifikation / Silanisierung von Glasoberflächen mit Trimethoxyaminopropylsilan (TMAPS) zu „Aminoglas“.

Die homogene Beschichtung der Glasoberflächen mit TMAPS in H₂O gelang zunächst nicht. Erst mit der Entwicklung einer optimierten, alkoholisch-wässrigen Suspension (60:30 Vol./Vol. *iso*Propanol : Ethanol, H₂O_{bidest.} ad 100) von TMAPS (1.0 Gew.%), die unmittelbar vor Benutzung mit Kaliumhydroxid (KOH, 5 mmol·L⁻¹) aktiviert wurde, gelang die Darstellung homogener und geschlossener TMAPS-Schichten gleichbleibender Qualität.

Diese Aminogläser wurden zur quantitativen Bestimmung der NH₂-Gruppenkonzentration kurz in eine wasserfreie Lsg. von Pikrinsäure (TNP ≡ Trinitrophenol) in Dichlormethan (10 s, 0.05 mol·L⁻¹) getaucht und mit trockenem CH₂Cl₂ abgespült. Dabei wurde NH₂-selektiv ein hellgelber Charge-Transfer-Komplex zwischen den oberflächlichen primären Aminogruppen und der Pikrinsäure gebildet. Nicht-aminierter Gläser waren nicht anfärbbar. **Abb.3.52** zeigt ein optimal beschichtetes Aminoglas nach der Beschichtung mit der alkoholisch-wässrigen, KOH-aktivierten TMAPS-Suspension und einer Anfärbung mit trockener TNP-Lsg.



Abb.3.52: Fotografische Dokumentation eines homogen mit Aminogruppen funktionalisierten Glasobjektträgers nach der Anfärbung mit trockener Pikrinsäurelösung.

Mittels eines polaren, leicht basischen Lsm.-Gemisches (Methanol : Triethylamin, 1 : 1) wurde das TNP von den Glasoberflächen desorbiert und mittels UV/Vis-Spektroskopie ($\lambda_{\text{TNP}} = 358 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{TNP}} = 14,500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) die TNP-Konzentration in Lsg. bestimmt. Da jedes TNP-Molekül an jeweils eine primäre Aminogruppe auf der Glasoberfläche gekoppelt wurde, war die TNP-Konzentration der Lsg. proportional zur Aminogruppenkonzentration der Glasoberfläche. Die Größe der beschichteten Glasoberfläche wurde bei jeder Probe exakt vermessen und war bekannt. Als Negativreferenz dienten nicht-aminierter, jedoch TNP-behandelte Glasobjektträger. Die so bestimmte Aminogruppendichte betrug $102 \pm 8 \text{ NH}_2\text{-Gruppen pro nm}^2$. Da eine N-H-Bindungslänge etwa $1 \text{ \AA} \equiv 0.1 \text{ nm}$ beträgt, beansprucht eine einzelne NH_2 -Gruppe eine Kreisfläche von mindestens 0.03 nm^2 .

Unter der Annahme einer dichtesten Kreispackung ($\approx 84 \%$ Flächenerfüllung) ließen sich auf einer ideal glatten Oberfläche max. 28 Aminogruppen pro nm^2 unterbringen. Daraus wurde gefolgert, dass die mittels Silanisierung mit TMAPS hergestellten Aminogläser eine gewisse Oberflächenrauigkeit aufwiesen und damit keine Monolayer ausbildeten.

In einer ersten Untersuchungsreihe sollte die Geschwindigkeit der Reaktion von PMS-DA mit primären, oberflächlich exponierten NH_2 -Gruppen sowie der prozentuale Anteil der PMS-DA-funktionalisierten Aminogruppen an der Oberfläche bestimmt werden. Dazu wurden Aminogläser bei RT in eine Lsg. von niedermolekularem PMS-DA ($0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in DMF getaucht. Die Eintauchzeiten wurden zwischen 5 und 30 min variiert; die Glasobjektträger anschließend gründlich mit sauberem DMF nachgespült und mit Druckluft getrocknet. Nach erfolgter Umsetzung wurden die Gläser mit trockener TNP-Lsg. behandelt, das TNP extrahiert und am UV/Vis quantifiziert. So wurde die Restkonzentration der nicht zum Imid abreagierten NH_2 -Gruppen ermittelt.

Bereits nach einer 5 minütigen Reaktion mit PMS-DA in DMF (bei RT) betrug die Konzentration der verbleibenden, über den CT-Komplex mit TNP nachweisbaren NH_2 -Gruppen lediglich 6 ± 1 pro nm^2 ; nach 10, 15 und 30 min wurde ein ähnlich niedriger Wert ermittelt. Mit Hilfe dieses Resultates konnte die zunächst formulierte Hypothese der zu langsamen PMS-DA-Reaktion mit NH_2 -Gruppen an Oberflächen widerlegt werden (vgl. **Kap.3.5.2**).

Daraufhin wurde der Beschichtungs- und Funktionalisierungsprozess mit DDA-X-PMOX₃₅-PMS-IA an NH₂-tragenden Oberflächen revidiert.

In einer zweiten Untersuchungsreihe wurden die mit PMS-DA belegten Aminoglasoberflächen mit dem telechelen DDA-X-PMOX₃₅-EDA-Edukt **#5** (vgl. **Tab.3.17**) kontaktiert. So befanden sich die aminoselektiven Ankergruppen nicht am Polymer, sondern bereits an der Glasoberfläche. Diese pyromellitisierten Gläser sollten nun einen besseren sterischen Zugang für die aminierten Poly-2-oxazoline bieten.

DDA-X-PMOX₃₅-EDA **#5** wurde aus einer konzentrierten Lsg. in CHCl₃ (4 mol·L⁻¹) auf die aminierten und anschließend pyromellitisierten Glasoberflächen aufgebracht. Nach einer Beschichtungsdauer von 30 min bei RT wurden die Polymerlsg. verblasen und 30 min lang mit H₂O eluiert, um nicht kovalent an die Oberfläche angebundene DDA-X-PMOX₃₅-EDA-Reste vollständig zu entfernen.

Die potentiell DDA-X-PMOX₃₅-PMS-IA-funktionalisierten Glasobjektträger wurden mit einer *S. mutans*-Suspension in isotonischer NaCl-Lsg. (10⁷ Keime·mL⁻¹) besprüht und unter Agar inkubiert (8 h, 37°C; vgl. Verfahren analog zu **Kap.3.4.3**). Auch die Proben dieser zweiten Versuchsreihe zeigten nach der 30 minütigen, wässrigen Elution keine kontaktaktive antimikrobielle Wirksamkeit gegen *S. mutans*.

Offensichtlich war es auch in diesem inversen Beschichtungsverfahren nicht gelungen, eine ausreichende Anzahl wirksamer DDA-X-PMOX₃₅-Funktionen unter Einsatz der PMS-DA-Ankergruppe an den Glasoberflächen zu immobilisieren.

3.5.5 Darstellung Langzeitaktiver, DDA-PMOX-funktionalisierter Oberflächen unter Verwendung oberflächenreaktiver Terminierungsmittel

In einem dritten und letztem Verfahren wurde vollständig auf die Verwendung der PMS-DA-Ankergruppe verzichtet. Obwohl sich diese selektiv NH₂-affine Ankergruppe zur Darstellung organolöslicher Enzymkonjugate mit Poly-2-oxazolinen bereits bewährt hatte,⁹ wurde das Gesamtkonzept der kovalenten Anbringung von antimikrobiellen und MMP-inhibierenden, telechelen DDA-X-Poly-2-oxazolinen an dentalrelevanten Materialoberflächen auf seine Kernaspekte reduziert.

⁹ siehe: Konieczny, S.; Fik, C. P.; Aversch, N. J. H.; Tiller, J. C., „Organosoluble Enzyme Conjugates with Poly(oxazoline)s via Pyromellitic Acid Dianhydride“, *Journal of Biotechnology* **2012**, 159, (3), 195.

Es wurden ausschließlich Reaktionsschritte und Elemente berücksichtigt, die essentiell für die Effektivität der Systeme auf damit ausgerüsteten Oberflächen waren. Dabei wurde erkannt, dass eine NH_2 -funktionalisierte Modelloberfläche möglicherweise zur direkten Terminierung von lebenden, mittels CROP hergestellten Poly-2-oxazolinen geeignet war, solange diese unter den notwendigerweise inerten und wasserfreien Bedingungen der CROP-Synthesen bearbeitet werden konnte.

Da diese Voraussetzung von den NH_2 -funktionalisierten Glasoberflächen vollständig erfüllt wurde, konnten diese als „oberflächenreaktives Terminierungsmittel“ zur kovalenten Immobilisierung eines telechelnen DDA-X-Poly-2-methyloxazolins in einem innovativen *grafting-onto*-Verfahren eingesetzt werden.

Zur Bestimmung der Oberflächendichte an aktiven DDA-X-Gruppen wurde wiederum ein quantitatives, farbstoffbasiertes Verfahren eingesetzt. In **Abb.3.53** wird dieses Immobilisierungsverfahren unter Verwendung einer „Oberfläche als Terminierungsmittel“, vorgestellt.

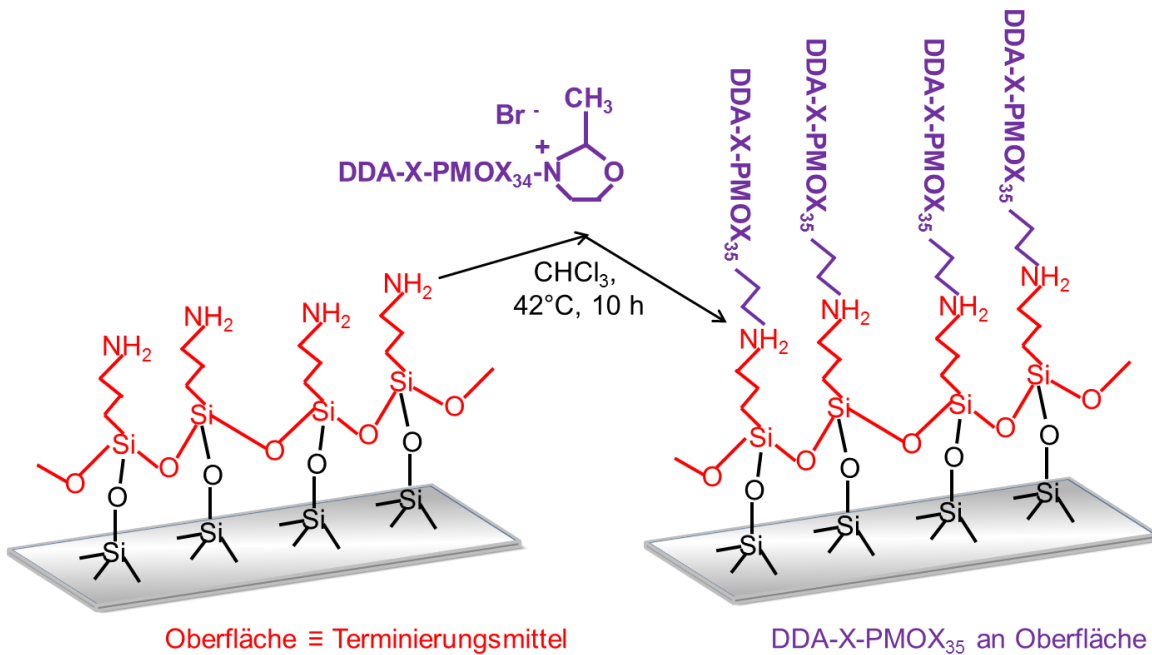


Abb.3.53: Schematische Darstellung der direkten *grafting-onto*-Terminierung von lebenden, telechelnen Poly-2-oxazolin an einer NH_2 -funktionalisierten Oberfläche.

Die Kontrolle des Immobilisierungsgrades erfolgte mittels einer Eintauchprozedur in wässriger Lsg. des Fluoreszin-Natriumsalzes ($0.03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1 min) bei RT. So wurden nur die quartären Ammoniumfunktionen (QUARTs) selektiv orange angefärbt.⁷⁶

Die Fluoreszein-Konzentration/Farbintensität auf der Oberfläche der Glasobjektträger war proportional zur aufgetragenen DDA-X-Gruppendichte. Um zu überprüfen, ob eine kovalente Immobilisierung von DDA-X-PMOX₃₄-OX⁺ erfolgte, wurden die Proben vor der Fluoreszinfärbung 24 lang unter Schütteln bei 37°C in H₂O_{bidest.} eluiert. Dabei wurden alle auf der Glasoberfläche anhaftenden Polymerreste entfernt.

In **Abb.3.54** ist das mit Fluoreszin-Natrium angefärbte Resultat der direkten *grafting-onto* Oberflächenterminierung von DDA-X-PMOX₃₄-OX⁺ (rechts) in Vergleich mit der analog angefärbten, indirekten PMS-DA-Immobilisierung (links) gezeigt.

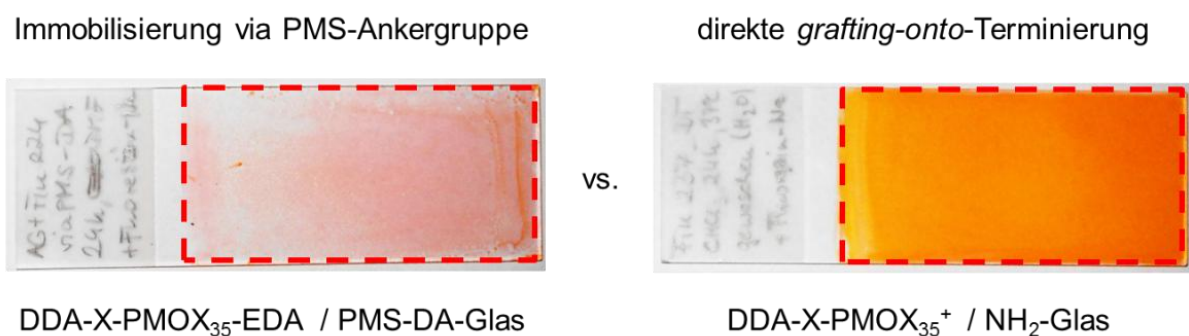


Abb.3.54: Fotografische Dokumentation von Aminogläsern, die mit zwei unterschiedlichen Methoden mit dem Polymer DDA-X-PMOX₃₅ funktionalisiert wurden nach einer 24-stündigen wässrigen Elution bei 37°C und der Anfärbung mit wässriger Fluoreszinslg. Die Immobilisierung erfolgte mit einem EDA-terminierten DDA-X-PMOX₃₅ an aminierten und pyromellitisierten Glas (links) bzw. durch direkte *grafting-onto* Terminierung eines lebenden DDA-X-PMOX₃₅⁺ auf aminierten Glasobjektträger (rechts). Die signifikant erhöhte Oberflächendichte an quartären DDA-X-Gruppen (QUARTs) ist bei der rechten Aufnahme an der höheren Farbintensität erkennbar.

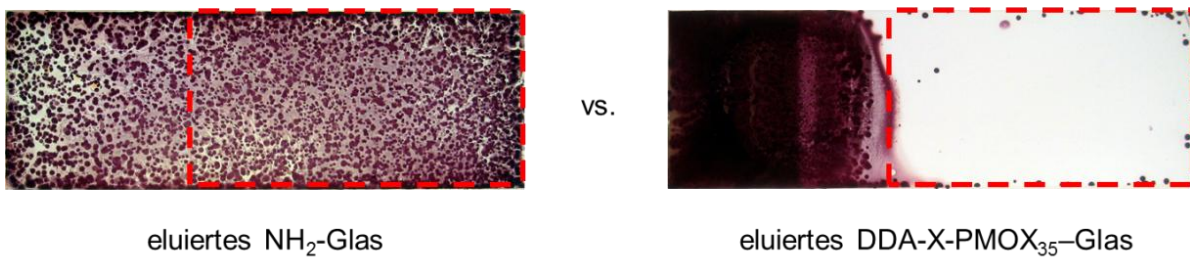
Durch diese Methode der direkten *grafting-onto*-Terminierung am Aminglas ließ sich, ohne die Verwendung einer PMS-DA-Ankergruppe, eine signifikant höhere Dichte an DDA-X-PMOX-Ketten kovalent an der Glasoberfläche immobilisieren.

Nach einer quantitativen Bestimmung der verbleibenden Aminogruppendichte mit trockener Pikrinsäure wurden 7 ± 2 NH₂-Restgruppen pro nm² gefunden, was einem

mittleren PMOXylierungsgrad von über 93 % entsprach. Mit den derartig hoch PROXylierten Modelloberflächen wurde abschließend ein Test auf deren Wirksamkeit nach einer 24-stündigen wässrigen Elution bei 37°C, durchgeführt.

Verwendet wurde hierzu der relativ unempfindliche Vergleichskeim *S. aureus*; Dessen Konzentration in der Bakteriensuspension wurde, in Vergleich zu den bislang durchgeführten Untersuchungen (vgl. **Kap.3.4.2ff**), nochmals um das 10-fache auf 10⁸ Keime pro mL erhöht. **Abb.3.55** zeigt das Ergebnis nach einer 12-stündigen Inkubation bei 37°C und TTC-Färbung im Vergleich mit einer analog kontaminierten, NH₂-funktionalisierten Glasoberfläche vor der PMOXylierung in CHCl₃.

S. aureus, 10⁸ Keime·mL⁻¹



eluiertes NH₂-Glas

eluiertes DDA-X-PMOX₃₅-Glas

Abb.3.55: Fotografische Dokumentation der kontaktaktiven antimikrobiellen Wirksamkeit gegen *S. aureus* nach einer 24-stündigen wässrigen Elution bei 37°C der kovalent PROXylierten (rechts) in Vergleich zur aminierten (links) Glasoberfläche.

Im Gegensatz zu der unwirksamen Aminoglasoberfläche (links) zeigte die PMOXylierte Oberfläche eine hervorragende kontaktaktive Wirksamkeit gegen *S. aureus* (rechts). Bei den vereinzelt Kolonien am Rand des Objektträgers handelte es sich um einen irrelevanten Bewuchs unter der Agarschicht; der nicht exakt horizontale Beschichtungsrand war ein Resultat des Terminierungsverfahrens durch Eintauchen in einem (mit Ar inertisierten, trockenem) Färbetrog.

Wie das Beschichtungs- und Elutionsergebnis in **Abb.3.55** zeigt, gelang hierbei die kovalente und daher abwaschbeständige Immobilisierung ausreichend hoher Oberflächenkonzentrationen an QUART-funktionalisierten, telechelen, antimikrobiellen sowie MMP-inhibierenden DDA-X-PMOX_n-Polymersystemen auf Aminoglas.

3.6 Biomimetische Oberflächentexturen zur bequemen Erhöhung der Gruppendichte exponierter chemischer Funktionen

3.6.1 Motivation und Vorstellung eines geeigneten Reproduktionstemplats natürlichen Ursprungs

Wie im vorangehenden **Kap.3.5** diskutiert, war die oberflächliche Immobilisierung einer ausreichend hohen Dichte an antimikrobiell wirksamen DDA-X-Funktionen der limitierende Faktor bei der Realisierung einer dauerhaft kontaktaktiv-antimikrobiellen Oberflächenausrüstung. Nur durch den folgerichtigen Verzicht auf die sterisch anspruchsvolle PMS-DA-Ankergruppe und eine vereinfachte, direkte *grafting-onto* Terminierung im zweiten Arbeitsschritt konnte eine hinreichend hohe Oberflächendichte an exponierten und aktiven QUART-Funktionen (vgl. **Abb.3.54**) und damit eine hohe Wirksamkeit gegen *S. mutans* realisiert werden (vgl. **Abb.3.55**).

Dennoch beschränkten sich die im **Kap.3.5** durchgeführten Beschichtungsprozesse der oberflächlichen Immobilisierung von bioaktiven Poly-2-oxazolinen auf glatte, unstrukturierte Oberflächen (wie geschnittenes und poliertes Glas). Dabei ließe sich die zur Verfügung stehende, aktive (Glas)oberfläche durch chemische (Ätzen) oder mechanische Nachbearbeitung (beispielsweise Sandstrahlen) etwa um den Faktor 2-4 und damit nur sehr eingeschränkt erhöhen.

In diesem letzten Kapitel der vorliegenden Arbeit soll jedoch ein Verfahren vorgestellt werden, mit dem sich eine aktive, zu beschichtende Oberfläche nicht nur geringfügig vergrößern, sondern deutlich über den Faktor 100 vergrößern lässt. Durch eine gezielte, „haarige“ Oberflächenstrukturierung mittels einer gleichmäßig verteilten Textur mit einem sehr hohem Aspektverhältnis (jenseits von 100:1 \equiv Filamente) und einer sehr hohen Oberflächendichte ließe sich eine erhebliche Erhöhung der resultierenden Gruppendichte bewerkstelligen.

Auf der Suche nach einem idealem Reproduktionstemplat wurde festgestellt, dass ein solches bereits seit langem im Labor genutzt wurde, ohne dass dessen Potential zur Strukturreplikation erkannt wurde. Es handelte sich um das häufig genutzte Rinderzahndentin, vielmehr um dessen angeschnittene Oberfläche, wie diese bei den standardisierten Rinderdentin-Probenkörpern des Typs B auftrat (vgl. **Abb.3.29**).

Bei diesem flächenmäßig größeren Templatmaterial (bis zu 0.5 cm^2) handelte es sich um ein hoch poröses, gleichmäßig perforiertes Biohybridmaterial natürlichen Ursprungs (vgl. **Kap.3.3.1**). Die angeschnittene Oberfläche des innenliegenden Dentins weist ca. 30,000-60,000 Poren pro mm^2 auf und besitzt damit einen enorm hohen Grad an innerer Porosität. Die parallel zueinander, durch das gesamte Dentinmaterial verlaufenden Kanälchen (*tubuli*) sind einige tausend Mikrometer lang und weisen einen gleichmäßigen Abstand von 5-10 μm auf. Daher wurden Rinderzahnscheiben mit einer Dicke von 1-2 mm und einer Oberfläche von bis zu 50 mm^2 als Template zur Reproduktion einer künstlichen Oberflächentextur ausgewählt.

3.6.2 Vergleich und Auswahl bekannter Verfahren zur Texturreproduktion

Bislang sind keine Verfahren bekannt, die die gewünschten „haarigen“ Oberflächentexturen unter Berücksichtigung der angestrebten, sehr hohen Bewuchsdichten von weniger als 10 μm Filament-Abstand und Aspektverhältnissen von mehr als 100:1 exakt reproduzieren können. Obwohl die benötigten, mikro- und nanoskaligen Fasern durch hochentwickelte Technologien wie dem Elektrosponnen bereits verfügbar sind, können diese nicht in den geforderten hohen Dichten (niedriger Filament-zu-Filament-Abstand) an der Oberfläche befestigt werden.²⁸³

Von den vielen bekannten Methoden der aktuellen Materialforschung zur 3D-Oberflächenstrukturierung²⁸⁴⁻²⁹² sind nur wenige in der Lage, sowohl mikro- und nanostrukturierte, als auch hierarchisch angeordnete und zudem flexible, haarige Oberflächentexturen zu generieren, die prinzipiell in der Lage wären, die vorgestellte trichomale Oberflächentextur nachzuahmen.

Die Arbeitsgruppen von WENDORFF, GREINER und WEHRSPORN präsentieren hierzu einen vielversprechenden Ansatz; dieser basiert auf einem neuartigen Verfahren zur Benetzung von porösen Aluminiumoxid- und Siliziumdioxid-Templaten.²⁹³ Ihre Methode ermöglicht die Herstellung von Nanoröhren aus unterschiedlichen Polymeren wie Polystyrol, Polytetrafluorethylen und Polymethylmethacrylat mit Gesamtlängen von bis zu 100 μm und Wanddicken zwischen 20 und 50 nm.

Obwohl mit diesem Verfahren sogar funktionalisierte Metall-Polymer-Komposite im mikro- /nanometer-Bereich erzeugt werden, können die gebildeten Strukturen nicht „end-on“ an einer Oberfläche befestigt werden, um daraus hervorzustehen.

Im Gegenzug können derartige, „end-on“ an der Oberfläche befestigte Strukturen durch den Beschuss von Si-Wafern mit dem Femtosekunden-Laser in einer Schwefelhexafluorid- (SF_6) oder Chlorgasatmosphäre erzeugt werden.

Dieses Verfahren zur Herstellung des sogenannten „schwarzen Siliziumdioxids“ mit einem hohen Aspektverhältnis wurde bereits im Jahre 1998 von MAZUR *et al.* vorgestellt.²⁹⁴ Mit diesem Verfahren lassen sich relativ große, regelmäßig mit „Mikrosäulen“ durchtexturierte Flächen in unterschiedlichen Säulenformen erzeugen.

Zudem besitzt eine solche Oberflächentextur die Eigenschaften eines Halbleiters, was die potentielle Verwendung in der Licht- und Sensortechnik eröffnet. Da es sich aber um ein sehr sprödes, anorganisches Material handelt, sind die erzeugten Säulenstrukturen weder flexibel noch ausreichend elastisch.

Eine weitere Methode zur Erzeugung „haariger“ Oberflächentexturen basiert auf dem „Nano-Zugverfahren“ (*engl.* nanodrawing), welches perforierte Polydimethylsiloxan und UV-lichthärtende Polyurethan-Harnstoff-Vinyl-Harz-Gussformen als synthetisch hergestellte Template einsetzt.²⁹⁵ Mittels kontrollierter Aufbringung von Kapillar- und Adhäsivkräften bei der Entfernung der Gussform, können die einzelnen „Haare“ bis zu einem ungewöhnlich hohen Aspektverhältnis von 250:1 verlängert werden. Bedingt durch die niedrige Perforationsdichte der Template weist das Replikat gleichermaßen eine relativ geringe Oberflächendichte an Filamenten (Haar-zu-Haar-Abstand > 50 μm) auf.

Die Arbeitsgruppe von SIGMUND *et al.* benutzt eine vorgestanzte Membran für ein innovatives Beschichtungsverfahren, das an *iso*Poly(propylen)-Substraten durchgeführt wird;²⁹⁶ das Aspektverhältnis der gewonnenen Filamente liegt jedoch weit unter 100:1. RUEHE *et al.* strebt die Reproduktion der Oberflächentextur eines Frauenmantel-Blattes an. Dabei wird ein zweistufiges Verfahren angewandt, in dem Polydimethylsiloxan zum Abguss der Originaltopologie (Negativform) und ein hydrophober Polyether für das Replikat benutzt werden.²⁹⁷

Obwohl diese praktische Methode Filamente mit einem Aspektverhältnis von 100:1 liefert, beträgt die geringste Entfernung zwischen den Strukturen 50 μm ; resultierend in einer sehr geringen Filamentdichte.

Ein zuletzt vorgestelltes, interessantes biomimetisches Verfahren zur Gewinnung von Templaten mit einer ungleich höheren Filamentdichte wird von GOODWYN *et al* vorgeschlagen. Dieser nutzt die hinteren Bauchflächen von Insekten wie bspw. dem Wasserläufer (*Aquarius paludum*) als natürliche Template zur Erzeugung von hierarchischen, mikro- und nanostrukturierten Oberflächentexturen.²⁹⁸ Obwohl die Replikas die haarigen Texturen des Insekts nahezu perfekt abbilden, sind die insgesamt erhaltenen Replikaoberflächen nicht größer als 0.1 mm².

Nach eingehender Analyse der obig vorgestellten Literatur wurde ein neues, maximal materialschonendes Reproduktionsverfahren zur Darstellung langer, aber flexibler Filamente zur Oberflächenstrukturierung entwickelt. Das eingesetzte Dentintemplat wurde nach seinem Einsatz im Rahmen eines mehrstufigen, materialschonenden Verfahrens vollständig entfernt.

3.6.3 Texturreproduktion und Entfernung des Dentintemplats

Im Gegensatz zu den im **Kap.1.2.2** vorgestellten Templaten auf Polydimethylsiloxan-Basis sollte das Rinderdentintemplat (negative Gussform) nicht mechanisch von der replizierten Textur (positiver Abguss) abgezogen, sondern in einem mehrstufigen Ätzprozess herausgelöst werden. Als Matrix zur Reproduktion der Dentinstruktur wurde ein Methacrylatsystem ausgewählt. Da dieses stets fotopolymerisierbar und transparent war, ließ sich die bei Zahnmaterialien seit langem bewährte, fotoinduzierte radikalische Polymerisation selbst in tiefen Dentinschichten zuverlässig durchführen (vgl. SE-Dentaladhäsive in **Kap.3.3ff** und **Kap.3.4ff**).

In einem Vorversuch wurde ein herkömmliches 2-Hydroxyethylmethacrylat/1,2-/1,3-Glyzerin-dimethacrylat (HEMA/GDMA)-Gemisch mit einem kommerziell erhältlichen Fotoinitiator (Irgacure 651[®]) in Ethanol verwendet, welches sich bereits bei anderen funktionellen Oberflächenbeschichtungen bewährt hat.⁷⁶

In **Abb.3.56** finden sich die Rasterelektronen-mikroskopische (REM)-Aufnahme einer Rinderdentinoberfläche (a) inklusive einer lokalen Vergrößerung (rechte Ecke) sowie (b) die schematische Darstellung der Beschichtungs- und Lichthärtungs-Prozedur.

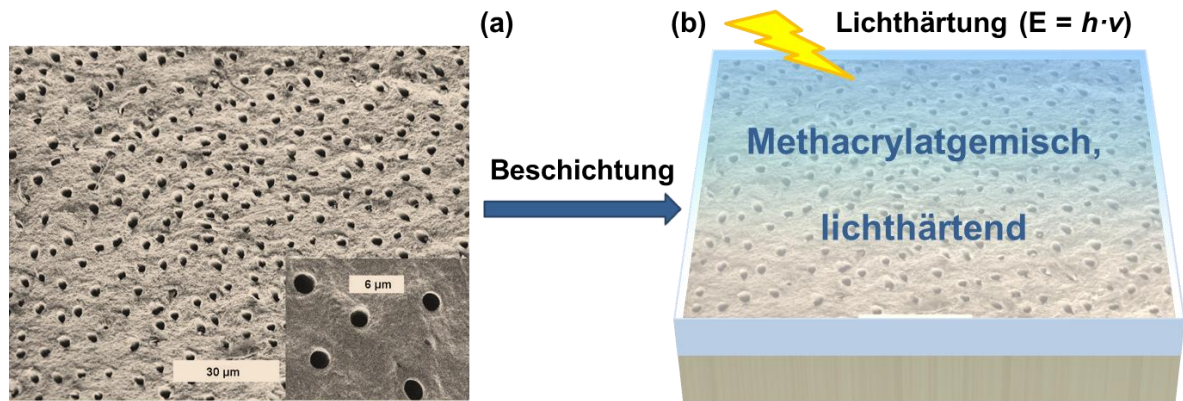


Abb.3.56: REM-Aufnahme einer aufgeschnittenen Rinderdentinoberfläche (a) inklusive einer lokalen Vergrößerung (rechts unten), (b) schematische Darstellung der Beschichtungs- und Lichthärtungs-Prozedur mit einem Methacrylatgemisch.

Zur Entfernung der anorganischen Komponente des Dentins (Hydroxylapatit), wurde zunächst eine Demineralisierung (Ätzung) mit verd. Salpetersäure (0.8 M) vorgenommen. Dabei kam es zum vollständigen Zerfall des Replikats. Offensichtlich war die verwendete HEMA/GDMA-Harzmatrix, trotz abgeschlossener Polymerisation, nicht hinreichend säurestabil.

Für die Herstellung deutlich stabilerer (Meth)acrylat-Netzwerke wurden die Komponenten der Replikationsmatrix hinsichtlich einer höheren Säureresistenz bei gleichzeitig verbesserten mechanischen Eigenschaften variiert. In **Abb.3.57** findet sich eine Übersicht der chemischen Strukturformeln aller zur Replikation der Rinderdentinoberfläche eingesetzten, lichthärtbaren Methacrylat-Monomere inklusive der im Text verwendeten Abkürzungen.

Bei den hierbei verwendeten Monomeren handelt es sich zudem um gängige, licht- oder selbsthärtende Komponenten von dentalchemischen Produkten²⁹⁹⁻³⁰¹ wie bspw. Adhäsiven³⁰² oder Kompositen.³⁰³ Somit konnte neben der zuverlässigen Härtung auf eine gute Verträglichkeit mit natürlichem Zahnmaterial zurückgegriffen werden. **Tab.3.18** stellt die zur harzbasierten Reproduktion des Rinderdentins eingesetzten Methacrylatmischungen und ihren Anteil an der Gesamtformulierung vor.

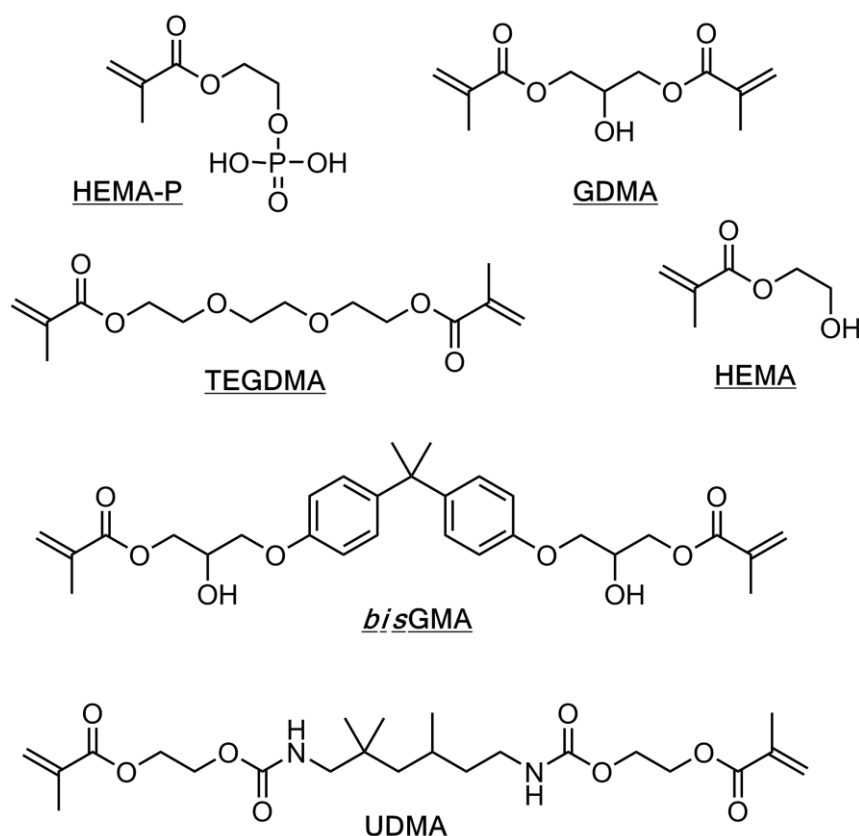


Abb.3.57: Übersicht über die chemischen Strukturen der eingesetzten, lichthärtenden Methacrylat-Monomere inklusive der hierfür verwendeten Abkürzungen.

Tab.3.18: Zusammensetzung der Methacrylat-Harzgemische (#1--4) in Ethanol (EtOH). Zugesetzt wurden Irgacure 651[®] als Fotoinitiator (2.5 Gew.%) sowie BHT als Doppelbindungsstabilisator (0.03 Gew.%).

Harz- gemisch #	Gehalt an Methacrylatmonomer [Gew.%]						EtOH [Gew.%]
	HEMA ^a	HEMA-P ^b	GDMA ^c	TEGDMA ^d	bisGMA ^e	UDMA ^f	
1	20	0	25	25	10	0	20
2	20	0	25	30	5	0	20
3	15	10	10	0	30	10	25
4	10	10	25	25	0	10	20

[a] Hydroxyethylmethacrylat, [b] Hydroxyethylmethacrylat-phosphat, [c] Glycerindimethacrylat, [d] Triethylenglykoldimethacrylat, [e] Bisphenol-A glyzidyldimethacrylat (BOWEN's Harz), [f] Urethandimethacrylat.

Alle Harzgemische wurden in dünnen Schichten auf den leicht vorgetrockneten Dentinoberflächen verteilt, verblasen und anschließend in einer UV-Fotopolymerisationskammer unter Temperaturkonstanz auspolymerisiert.

Nach erfolgter Polymerisation wurde das Dentintemplat in einer dreistufigen, chemisch-biologischen Entfernungszusatz ohne jegliche mechanische Beanspruchung vollständig abgelöst. Diese umfasste die bereits angeführte Ätzung mit verd. Salpetersäure, die Entfernung des Dentinkollagens mittels einer gepufferten, bakteriellen Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* Typ I³⁰⁴ (1.0 mg·mL⁻¹) sowie die Entfernung verbleibender, denaturierter Proteinreste mittels einer gesättigten, wässrigen Harnstofflg. Das erhaltene, methacrylatbasierte Replikat der Oberflächentextur wurde unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht.

3.6.4 Optimierung der Harzmatrix unter REM-Kontrolle

Die Anwendung des Harzgemisches **#1** (vgl. **Tab.3.18**) ergab keine zufriedenstellende, fellähnliche Texturreproduktion. Obwohl die Säurebehandlung diesmal zu keiner Zersetzung der polymerisierten Harzmatrix geführt hatte, wurden die zunächst gebildeten Filamente - wahrscheinlich aufgrund ihrer Sprödigkeit - rasch von der Oberfläche abgelöst. (vgl. **Abb.3.58**). Daher wurde im darauffolgenden Harzgemisch **#2** der Anteil des chemisch beständigen, aber spröden *bis*GMA (BOWEN's Harzes) von 10 Gew.% (**#1**) auf 5 Gew.% halbiert.

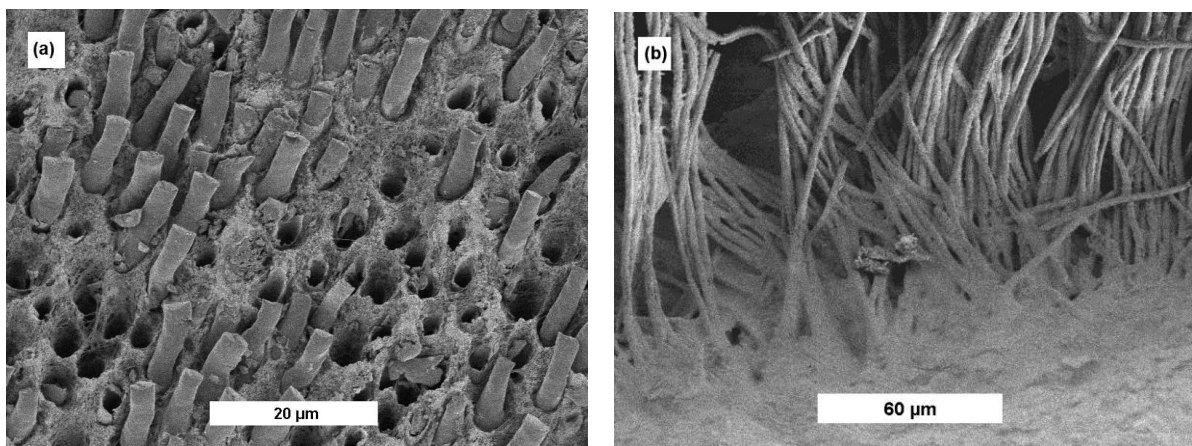


Abb.3.58: REM-Aufnahmen von (a) spröde abgebrochenen, im Dentin verbliebenen Harzfilamenten (aus Harzgemisch **#1**) und (b) einer replizierten Oberflächentextur nach Demineralisierung und partieller Kollagenentfernung (aus Harzgemisch **#2**).

Wie in **Abb.3.58b** erkennbar, wurden bei der Verwendung des verbesserten Harzgemisches **#2**, nach Demineralisierung und eintägiger Kollagenentfernung, aus der Oberfläche ragende Filamente mit einem hohen Aspektverhältnis gewonnen.

Leider haben sich, nach Wiederaufnahme der Kollagenasebehandlung für weitere 2d, die zunächst vorhandenen Filamente wiederum von der Harzoberfläche abgelöst. Weil die bislang eingesetzten Harzgemische nicht genügend Säurestabilität oder Elastizität aufwiesen, wurde bei den nachfolgend geplanten Harzformulierungen auf weitere Methacrylatmonomere zurückgegriffen. Das aliphatische Urethan-dimethacrylat (UDMA) wird ebenso wie das aromatische und hierbei auffällig spröde *bisGMA* in dentalen Formulierungen verwendet, wo es vorzugsweise zur Flexibilitätserhöhung des Polymernetzwerkes eingesetzt wird.³⁰⁵ Hydroxyethylmethacrylat-phosphat (HEMA-P) kann ebenfalls in dentalen Applikationen eingesetzt werden und erhöht durch seinen leicht aziden Charakter die Kompatibilität der Methacrylatformulierung mit dem wasserhaltigen Dentintemplat. Die Kombination des flexibilisierenden Monomers UDMA³⁰⁶ (10 Gew.%) mit dem spröden *bisGMA* (30 Gew.%) unter Zugabe von HEMA-P (10 Gew.%) im Harzgemisch **#3** resultierte, trotz leichter Erhöhung des Ethanolgehaltes (25 Gew.%), wiederum in keiner zufriedenstellenden Texturreproduktion. Obwohl im Harzgemisch **#3** zunächst auf die Verwendung des säureempfindlichen, aber flexiblen Triethylenglykoldimethacrylats (TEGDMA)³⁰⁷ verzichtet wurde, wurde es bei der Formulierung **#4** einbezogen (mit 25 Gew.%), dafür wurde auf *bisGMA* vollständig verzichtet und der vormalige Ethanolgehalt von 20 Gew.% gewählt. Innerhalb der bisherigen Harzgemische **#1-3** wurde außerdem der Gehalt aller Methacrylmonomere an der Gesamtformulierung zwischen 65-80 Gew.% variiert. Da mit der Formulierung **#2** (80 Gew.% an Monomeren) relativ gesehen die besten Ergebnisse erzielt, wurde bei der Formulierung **#4** derselbe Monomergehalt in Höhe von 80 Gew.% eingestellt.

Nach analoger Applikation des Harzgemisches **#4** auf präparierten Rinderdentin, der anschließenden Fotopolymerisation und der vollständigen Entfernung des Templates konnte erstmals ein nahezu perfekter, „fellartiger“ Positiv-Abguss der mikroporösen Dentinoberfläche realisiert werden (vgl. **Abb.3.59, links**).

Weiterhin wurden natürliche Pendants dieser künstlich reproduzierten, mikrostrukturierten und „haarigen“ Oberflächentextur in der Pflanzenwelt entdeckt. Diese pflanzlichen Beispiele für derartige „haarige“ (trichomale) Oberflächentexturen mit Aspektverhältnissen von 100:1 und mehr fanden sich auf den Blattoberflächen des Frauenmantels (*Alchemilla vulgaris*)²⁹⁷ und den Blattunterseiten des Zickzackstrauchs *Corokia cotoneaster* (Familie der *Argophyllaceae*; vgl. **Abb.3.59 rechts**).

Abb.3.59 stellt die beiden genannten Texturen (reproduziert: links / natürlichen Ursprungs: rechts) anhand von REM-Aufnahmen vergleichend gegenüber.

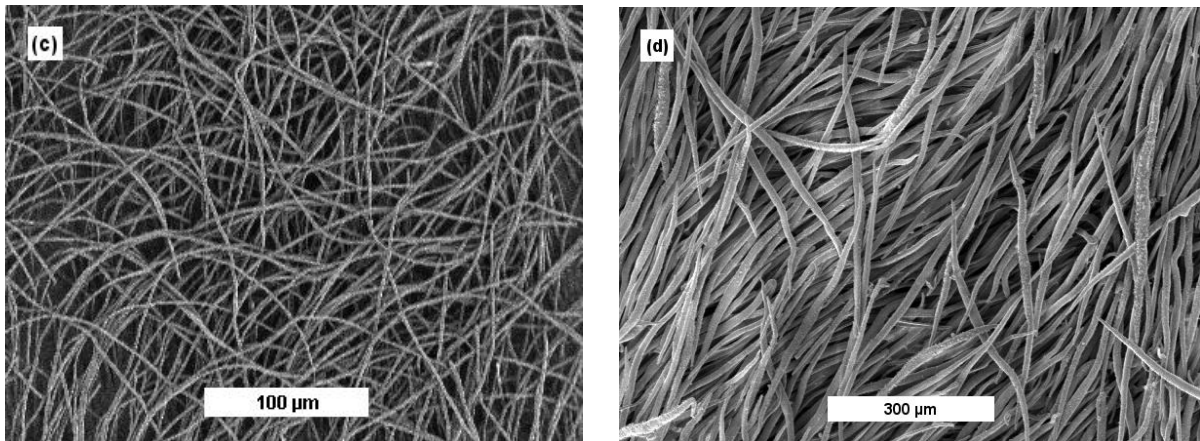


Abb.3.59: REM-Aufnahmen des (c) „haarigen“ Oberflächentextur-Replikats; erzeugt aus dem fotopolymerisierten Harzgemisch #4; Zustand nach der vollständigen, dreistufigen Entfernungszusatz des Rinderdentin-Templates und zum Vergleich (d) die trichomale, fellartige Mikrostruktur auf der Blattunterseite von *C. cotoneaster*.

Da die natürlichen Vorlagen der reproduzierten, haarigen (fellartigen) Oberflächentextur offenkundig einzigartige Eigenschaften aufwiesen, wird im nachfolgenden Unterkapitel ausführlicher darauf eingegangen. Hierbei war insbesondere zu untersuchen, ob die künstlich reproduzierten, zunächst wegen einer Erhöhung der Gruppendichte realisierten Replikas vergleichbare Effekte ermöglichen würden.

3.6.5 Wasserspeichernde Oberflächentexturen an Pflanzen

Die beschriebene Ausrüstung findet sich vorwiegend auf Pflanzenblättern oder deren Unterseiten. Die Oberflächen sind charakterisiert durch die enorme Flexibilität der im hohen Aspektverhältnis vorkommenden, dicht aufgetragenen Filamente (Trichome). Derartige hierarchisch aufgebaute, sowohl im mikro- als auch im nano-Bereich (bi)strukturierte Pflanzenblatttexturen besitzen die außergewöhnliche Fähigkeit zur relativ festen Immobilisierung von Luftbläschen und Wassertröpfchen.^{297, 308-310}

In **Abb.3.60** findet sich beispielsweise die Makroaufnahme einer geeigneten *C. cotoneaster* Blattunterseite, belegt mit Wassertröpfchen.

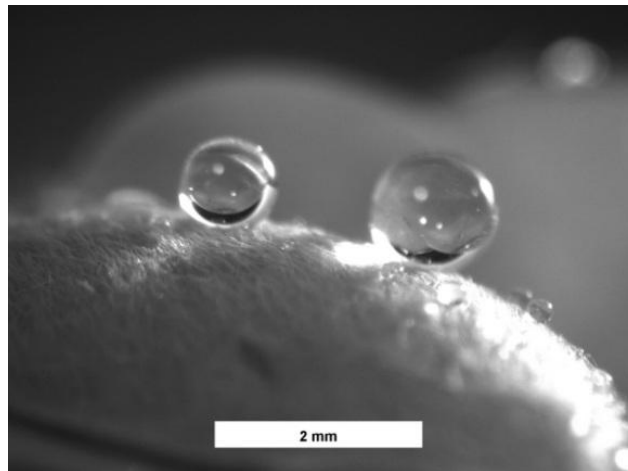


Abb.3.60: Makroaufnahme von immobilisierten Wassertropfchen auf einer Blattunterseite des Zickzackstrauchs (*C. cotoneaster*).

Offensichtlich dient eine solche Oberflächenausrüstung der Wasserspeicherung, der Ausnutzung von Verdunstung und dem Schutz vor frühzeitigem Austrocknen. Bei Wasserpflanzen können anhaftende Luftbläschen zur Erhöhung des Auftriebs oder zur Reduktion des Fließwiderstandes dienen.

Diese zeigen ein typisches CASSIE-BAXTER-Verhalten,^{309, 311} wobei Wassertropfchen auf Luftpolstern ruhen, die innerhalb der „fellartigen“ Textur ausgebildet werden. Im Unterschied zum WENZEL-Regime, einer Oberflächentopologie mit geringerem Aspektverhältnis der Strukturierung, kommt es hierbei zu keiner Benetzung der darunterliegenden Fläche (vgl. **Abb.3.61**).

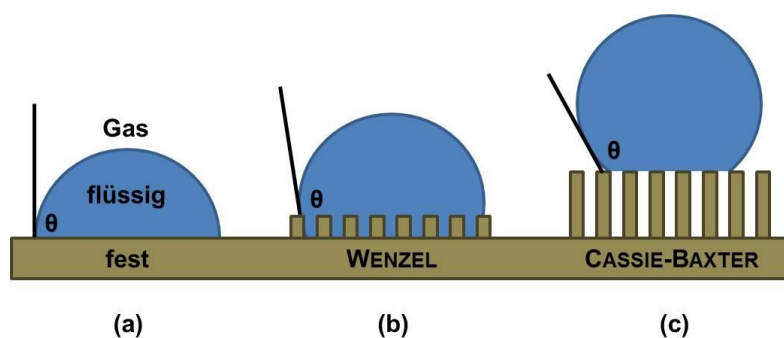


Abb.3.61: Schematische Darstellung möglicher Szenarien des Wasserkontaktes mit einer festen Oberfläche. (a) Vollständige Benetzung einer planen Oberfläche, (b) WENZEL-Verhalten mit Benetzung der Unterfläche, (c) CASSIE-BAXTER-Verhalten ohne Benetzung der Unterfläche; θ bezeichnet den resultierenden Kontaktwinkel.

Insbesondere die luftspeichernden Eigenschaften solcher Oberflächentexturen machen deren Nachbildung ökonomisch und ökologisch interessant für Anwendungen, bei denen ein verringerter Widerstand von Schwimmkörpern (bspw. Schiffen) in Wasser erzielt werden soll.³¹⁰ Künstlich hergestellte, nanostrukturierte Mikrofaserstrukturen sind, aufgrund der intrinsischen Kombination von fellartiger Haarelastizität und Oberflächenrauigkeit, auch sehr gut geeignet zur Darstellung eisfreier Polymeroberflächen.³¹²⁻³¹⁴ Schließlich könnten solche Oberflächentexturen zur selektiven Immobilisierung von Biomolekülen oder größeren Objekten wie Katalysatorpartikeln, Bakterien oder Erythrozyten, dienen.

3.6.6 Auswertung und Vergleich beider Oberflächentexturen im Mikro- und Nanobereich mittels REM-Aufnahmen

Die in der REM-Mikroansicht haarig erscheinenden, künstlich reproduzierten Harzfilamente waren zwischen 50 und 400 μm lang und wiesen Durchmesser von 2-3 μm auf (vgl. **Abb.3.59c**); was in hohen Aspektverhältnissen von bis zu 200:1 resultierte. Im Vergleich zu den natürlichen *C. cotoneaster* Trichomen mit einem Durchmesser von 8-10 μm (vgl. **Abb.3.59d**) waren die reproduzierten Harzfilamente mit dem Faktor 2.6-5 auch deutlich feiner.

Somit handelte sich um die erste erfolgreiche Herstellung einer künstlich reproduzierten, mikrofaserigen Oberflächentextur mit ausreichend elastischen und stabilen Mikrohaarstrukturen; die unter Verwendung eines mehrstufigen Nieder-temperatur-Abgussverfahrens an einem Dentintemplat durchgeführt wurde.

In **Abb.3.62** finden sich vergrößerte REM-Aufnahmen (**a**, **b**) eines einzelnen, synthetisch hergestellten Harzfilamentes im Vergleich zu (**b**, **c**) einem einzelnen, pflanzlichen Trichom von *C. cotoneaster*.

Zur Auswertung des hierbei erzielten, primär angestrebten Effekts der Oberflächenvergrößerung wurden die Harzfilamente vereinfachend als zylindrische Körper angenommen, deren Mantelfläche A_{zyl} wie folgt aus deren Umfang u , der Filamentlänge h und dem Filamentdurchmesser r berechnet wurde (vgl. **Gl.3.4**):

$$A_{\text{zyl}} = u \cdot h = 2\pi \cdot r \cdot h \quad (3.4)$$

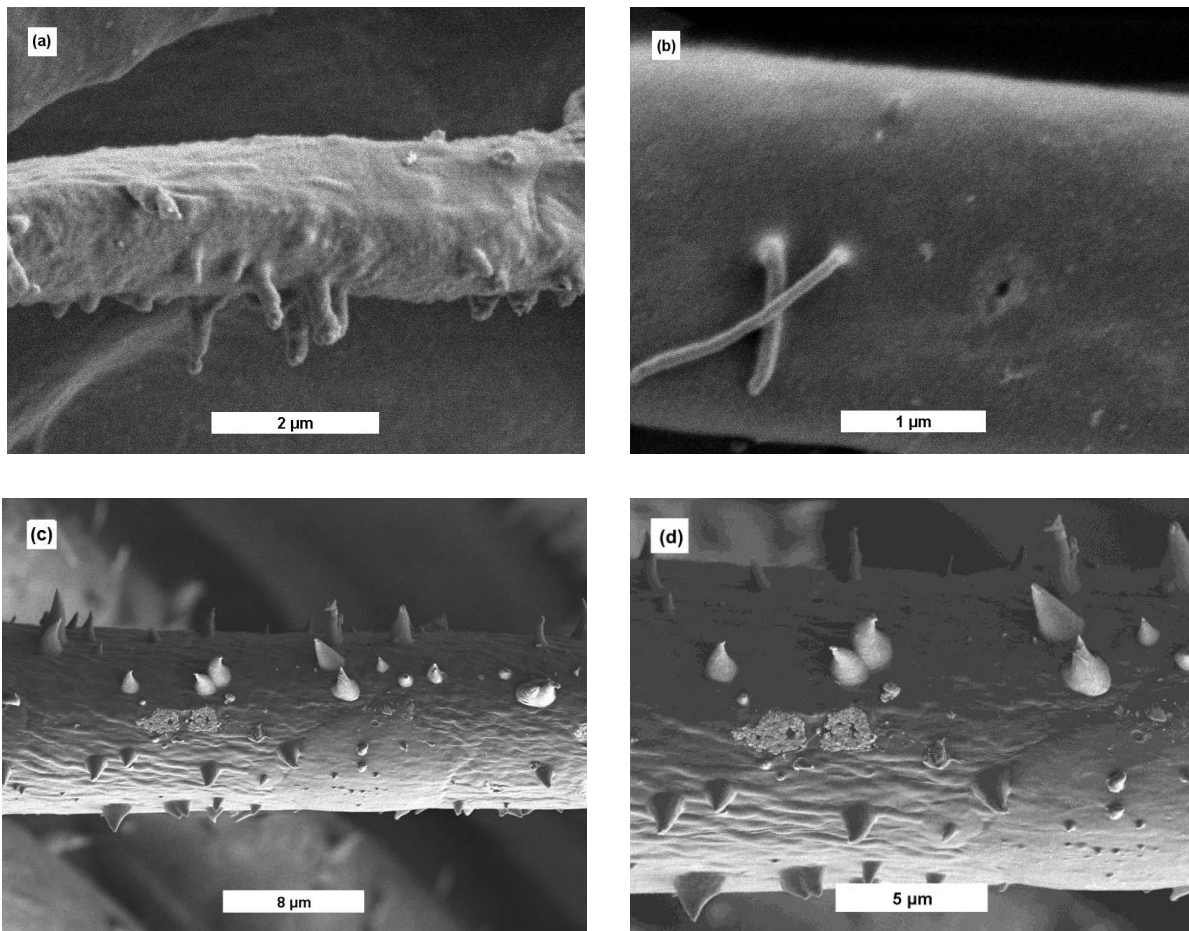


Abb.3.62: REM-Aufnahmen der Nanostrukturierung von (a, b) der künstlichen Harzfilamente in Vergleich zu (c, d) einem natürlichen, pflanzlichen *C. cotoneaster* Trichom in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen. In (a) sind die knospenartigen, in (b) die haarigen Nanounterstrukturen des künstlichen Harzreplikates dargestellt.

Berechnet mit einem gemittelten Filamentdurchmesser $r = 1.25 \mu\text{m}$ und einer mittleren Filamentlänge $h = 225 \mu\text{m}$ wurde pro Filament eine mittlere Mantelfläche $\ddot{A}_{\text{zyl}} = 1,767 \mu\text{m}^2$ berechnet. Unter Berücksichtigung der mittleren Porendichte des Dentins von 45,000 Poren pro mm^2 (vgl. **Kap.3.6.1**) wurde die aktive Oberfläche der Textur mittels gleichmäßig haariger Strukturierung um das 79-fache vergrößert, was eine vielversprechende Methode zur Darstellung effizienter, antimikrobiell wirksamer Oberflächen darstellte. Bei der Kalkulation blieb zudem der Anteil einer weiteren, nachfolgend beschriebenen Strukturierung im Nanometerbereich unberücksichtigt.

Beide Filamenttypen (die künstlich reproduzierten und die natürlichen Ursprungs) weisen eine Nanounterstruktur auf, die als knospen- oder dornartig beschrieben werden kann und aus der konvexen Trichomoberfläche herausragt. Im Falle des synthetischen Replikats handelt es sich vorwiegend (vgl. **Abb.3.62a**) um verdickte Ausstülpungen mit Längen von 200-800 nm und Durchmessern von 200 nm. Das resultierende Aspektverhältnis dieser „Knospen“ betrug 1-4, ihr Anteil an der Nanostrukturierung der synthetischen Harzfilamente betrug ca. 90%.

In etwa 10% der Fälle von oberflächlicher Nanostrukturierung wurden zudem außergewöhnlich feine „Nanohärchen“ mit Längen zwischen 1000 und 1800 nm und Durchmessern von 100-150 nm gefunden (vgl. **Abb.3.62b**).

Die Längsten und Dünnssten dieser Nanofilamente wiesen neben einer sehr hohen Elastizität (keine Brüche and den Nahtstellen zur Mikrofilamentoberfläche) ein für diesen Strukturbereich ungewöhnliches Aspektverhältnis von bis zu 18:1 auf. Aus dieser Beobachtung ließ sich schlussfolgern, dass die Dentin-Mikrokanälchen (*tubuli*) des Rinderdentins zusätzliche Nano-Kanälchen aufweisen müssen und selbst diese feinsten Nanostrukturen vom Harzgemisch **#4** optimal penetriert wurden.

Folglich war das dreistufige, (bio)chemische Verfahren zur Entfernung des Dentintemplats milde genug, um diese Nanostrukturen vollständig zu erhalten. Um zu untersuchen, ob die künstlich reproduzierte Filamentoberfläche dieselbe wasserspeichernde Charakteristik wie das pflanzliche Vorlage zeigt, wurden zur Ermittlung der Oberflächenenergien die H₂O-Kontaktwinkel an beiden Texturtypen ermittelt.

3.6.7 Nachbearbeitung der Textur für Nano-Rauigkeit und Hydrophobie

Der statische Kontaktwinkel von Wasser auf einer glatten, unstrukturierten Referenz-Harzoberfläche der Zusammensetzung **#4** (vgl. **Tab.3.18**) betrug $60 \pm 5^\circ$. Die nativen, mittels Rinderdentintemplat hergestellten hierarchisch strukturierten, fellartigen Oberflächentexturen der Harzmischung **#4** wiesen statische Kontaktwinkel zwischen 80° und 90° auf. Offensichtlich waren die vom aziden Reaktivverdünner HEMA-P (10 Gew.%) stammenden Phosphatgruppen zu hydrophil und setzten dadurch den deutlich zu hydrophoben Charakter der Polymethacryl-basierten Harzmatrix herab.

Da sich HEMA-P aber zur Darstellung einer elastischen und dentinkompatiblen Matrix als notwendig erwiesen hatte und keine hinreichend milde Methode zur Modifizierung von Phosphatgruppen bekannt war, wurde die Funktionalität der künstlichen Oberflächentextur auf einem anderen Wege verändert.

Eine Beschichtung mit nanoskaligen Partikeln würde die Oberflächendichte der Nanostrukturierung pro Filament weiter erhöhen wodurch auch die Nano-Rauigkeit der Gesamttextur zunehmen würde. Daher wurden in einem weiteren Nachbearbeitungsschritt Siliziumdioxid (SiO_2)-Nanopartikel mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 150 nm eingesetzt. Solche Strukturen bieten zudem den Vorteil der chemischen Modifizierbarkeit mit unterschiedlichen Alkoxysilanen. Die Nanopartikel wurden aus einer wässrigen Dispersion (5 Gew.%) auf den reproduzierten Oberflächentexturen appliziert. Die erfolgreiche SiO_2 -Beschichtung der Harzreplikat nach erfolgter Funktionalisierung wurde durch ein Siliziumsignal in der RÖNTGEN-Fotoelektronenspektroskopie (XPS) bestätigt.

Wie in **Abb.3.63a** an einem isolierten, künstlich reproduzierten Harzfilament zu sehen ist, waren die haarigen, zylinderförmigen Mikrostrukturen vollständig mit Nanopartikeln belegt. Wurde einer der wenigen Bereiche mit leicht verringerter Partikeldichte vergrößert dargestellt (vgl. **Abb.3.63b**), werden die sphärischen, auf der Filamentoberfläche immobilisierten SiO_2 -Nanopartikel erkennbar. Nach der Partikelbeschichtung erhöhte sich der statische Kontaktwinkel der „nano-aufgerauten“ Oberflächentextur mit Wasser geringfügig auf den Wert von $105 \pm 5^\circ$.

Für eine weitere Erhöhung des H_2O -Kontaktwinkels wurden die Oberflächentexturen in einem letzten Arbeitsschritt weiter hydrophobisiert. Unter Anwendung eines perfluorierten Trialkoxysilans aus einer ethanolischen Suspension erhöhte sich der statische Kontaktwinkel (H_2O) der harzbasierten, mit SiO_2 -Nanopartikeln belegten Oberfläche auf mehr als 160° . Als Kontaktwinkel-Hysterese wird der Unterschied zwischen dem Fortschritt- und Rückzugswinkel bezeichnet; diese betrug $15-17^\circ$.

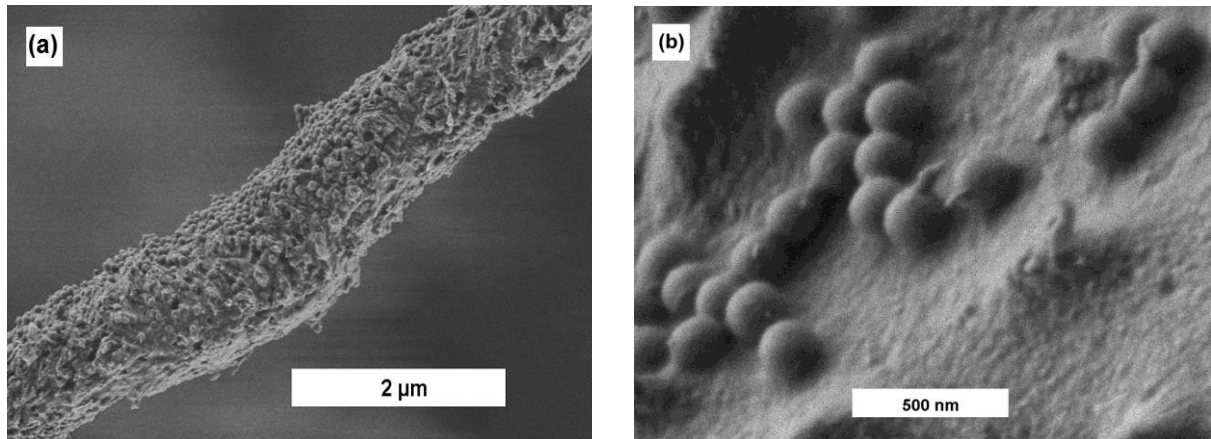


Abb.3.63: REM-Aufnahmen (a) eines isolierten, mit SiO₂-Nanopartikeln belegten Harzfilamentes; hergestellt aus dem methacrylat-basiertem Harzgemisch #4, (b) stark vergrößerter Ausschnitt einer Filamentoberfläche belegt mit sphärischen SiO₂-Nanopartikeln einheitlicher Größe von 150 nm.

3.6.8 Makroskopisches Verhalten der Oberflächentexturen gegenüber Wasser

Die reproduzierten Oberflächentexturen auf Polymethacryl-Basis (vgl. **Abb.3.64a**) gaben die pflanzliche Oberflächentextur der *C. cotoneaster*-Blattunterseite (vgl. **Abb.3.64b**) nicht nur hinsichtlich ihrer Oberflächenenergie, sondern auch hinsichtlich ihrer Gesamtgröße exakt wieder. Die gewünschte Fähigkeit der methacrylat-basierten, künstlich reproduzierten, haarigen Oberflächentextur zur Immobilisierung von Wassertropfen (vgl. **Abb.3.64c**) war zudem vergleichbar mit der analog strukturierten, natürlichen *C. cotoneaster*-Blattunterseite (vgl. **Abb.3.64a**). Trotz schräger Oberfläche rollten die vergleichbar großen Wassertropfen ($d = 1$ mm) an beiden Texturen nicht herunter. Somit wurde nicht nur die hierarchisch (mikro- und nano-) strukturierte, haarige Mikrofaserstruktur von *C. cotoneaster* perfekt reproduziert, sondern ebenfalls deren wasserspeichernden Eigenschaften.

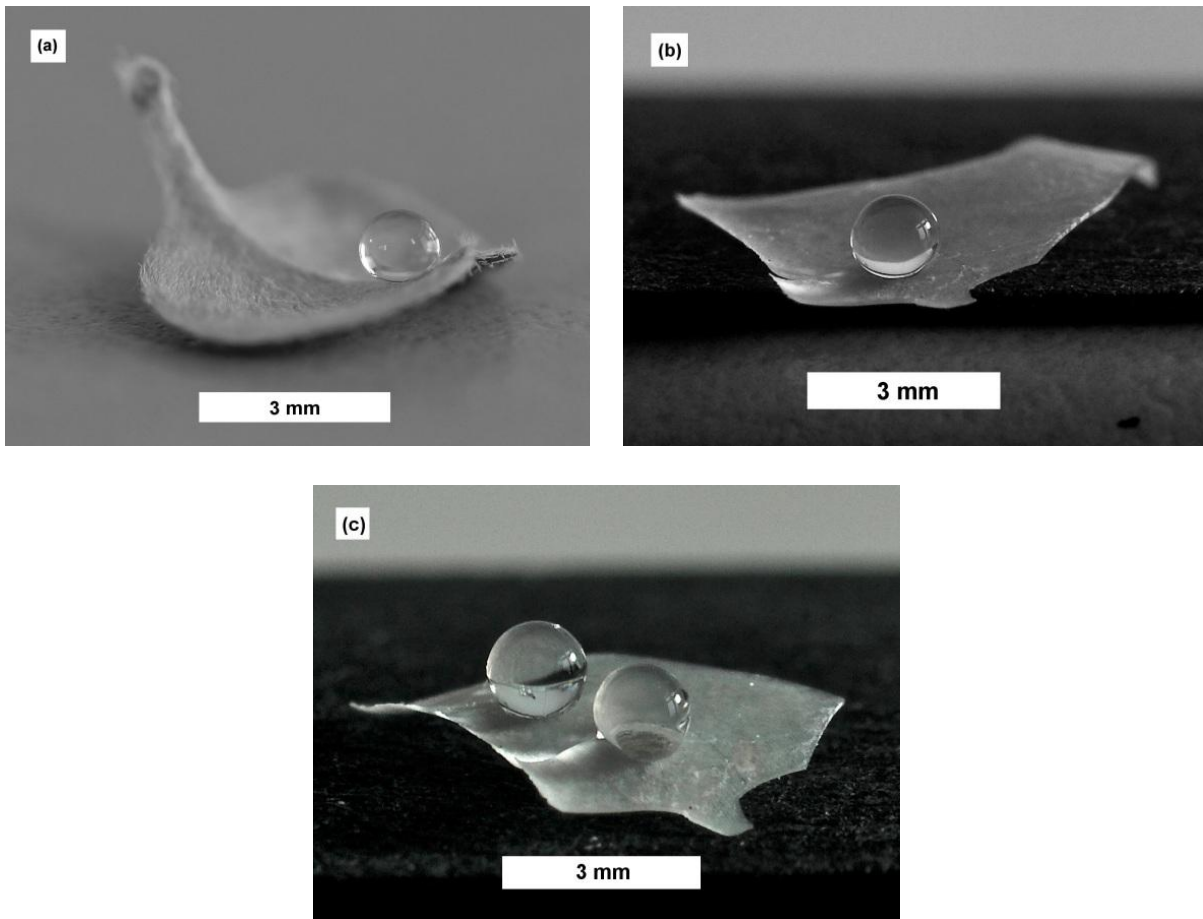


Abb.3.64: Makroaufnahmen (a) eines Wassertropfens auf einer schrägstehenden *C. cotoneaster* Blattunterseite, (b) ein H₂O-Tropfen auf einer künstlichen, hierarchisch (mikro- und nano-) strukturierten Oberflächentextur; hergestellt auf Basis lichthärtender Methacrylate des Harzgemischs #4. Als Templat wurde Rinderdentin verwendet, das in einem dreistufigen Prozess vollständig entfernt wurde. Das Harzreplikat wurde mit SiO₂-Nanopartikeln belegt und hydrophobisiert, (c) zeigt zwei immobilisierte H₂O-Tropfen auf einer konvex gebogenen Probe der ansonsten analog zu (b) aus dem Harzgemisch #4 hergestellten Oberflächentextur.

Initiale Untersuchungen mit der Immobilisierung bioaktiver, antimikrobieller Poly-2-oxazoline des Typs DDA-X-PMOX_n-AMA an den künstlich hergestellten, haarigen Oberflächentexturen stellten sich präparativ als relativ aufwendig heraus.

Obwohl das vorgestellte Verfahren zur Potenzierung der aktiven Oberfläche bei lichthärtenden Harzformulierungen ein gangbaren und vielversprechenden Zugang zu signifikant erhöhten Gruppendichten darstellt, bedarf es hierbei noch einer eingehenden Optimierung des Immobilisierungsprozesses der eingesetzten Polymere.

4 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Synthese bioaktiver beidseitig funktionalisierter (telecheler) Poly-2-R-1,3-Oxazoline (PROX) mit variablen Kettenlängen und Seitengruppen (R = Methyl, Ethyl, *iso*Propyl). Die bioaktive Wirksamkeit sollte generiert werden durch die Einführung eines bioziden, auf einem quartären Ammoniumalkyl (QUART) basierenden Initiators sowie funktionellen oder reaktiven Satellitengruppen/Ankergruppen. Damit sollte der Einfluss der Satellitengruppen auf die bioaktive Wirksamkeit der Polyoxazoline gegenüber Bakterien (*S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*) und Schweineblut-Erythrozyten untersucht werden. Zur Quantifizierung des enzyminhibierenden Potentials der Polyoxazoline und damit ausgerüsteter Materialoberflächen sollten bakterielle und humane Kollagenasen eingesetzt werden. Zudem sollten Methoden zur Erhöhung der Oberflächendichte an bioaktiven PROX-Gruppen realisiert werden.

4.1 Mikrowellengestützte Synthesen telecheler Polyoxazoline

Zu Beginn der Arbeiten wurde die Syntheseprozedur des antimikrobiellen Initiators 4-(Bromo-methyl)-*N*-dodecyl-*N,N*-dimethylbenzylammoniumbromid (DDA-X) durch die Anpassung der Reaktionsparameter in Chloroform optimiert und damit der Anteil am thermodynamisch bevorzugten Nebenprodukt (*bis*DDA-X) nach der Aufarbeitung auf unter 0.5 Gew.% reduziert. Eine thermogravimetrische Analyse belegte die thermische Belastbarkeit von DDA-X ($\leq 230^\circ\text{C}$). Nach einer Ermittlung der optimalen Reaktionstemperatur der mikrowellengestützten Kationisch Ringöffnenden Lebenden Polymerisation (CROP) in Chloroform für die Monomere 2-Methyl-, 2-Ethyl- und 2-*iso*Propyl-1,3-oxazolin mit DDA-X ($100\text{--}140^\circ\text{C}$) wurde die Geschwindigkeitskonstante k_p der Umsetzung zum Poly-2-methyl-1,3-oxazolin (PMOX) ermittelt zu $2.93 \pm 0.17 \times 10^{-3} \text{ [L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$. Unter Anwendung der Mikrowellen-Heiztechnik wurden DDA-X initiierte, telechele PMOX in Chargengrößen von bis zu 21 g hergestellt und charakterisiert; die Ausbeuten lagen bei 79–91 %. Die zahlenmittleren Molekulargewichte betragen $1,800\text{--}6,700 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; alle Polymersysteme wiesen enge, monomodale Molekulargewichtsverteilungen mit Polydispersitäten von 1.14–1.28 auf. Die Polyoxazoline wurden mit den Satellitengruppen Hydroxyl- (OH), Ethylen-1,2-diamin- (EDA), *N,N*-Dimethyl-dodecylammoniumbromid (DDA) und 3-(Methacryloylamino)-*N,N*-dimethylpropan-1-ammoniumbromid (AMA) distal funktionalisiert (vgl. **Abb.4.1**). Das Verhältnis der Initiierungs- zur Terminierungsfunktion war in allen Fällen $> 90\%$.

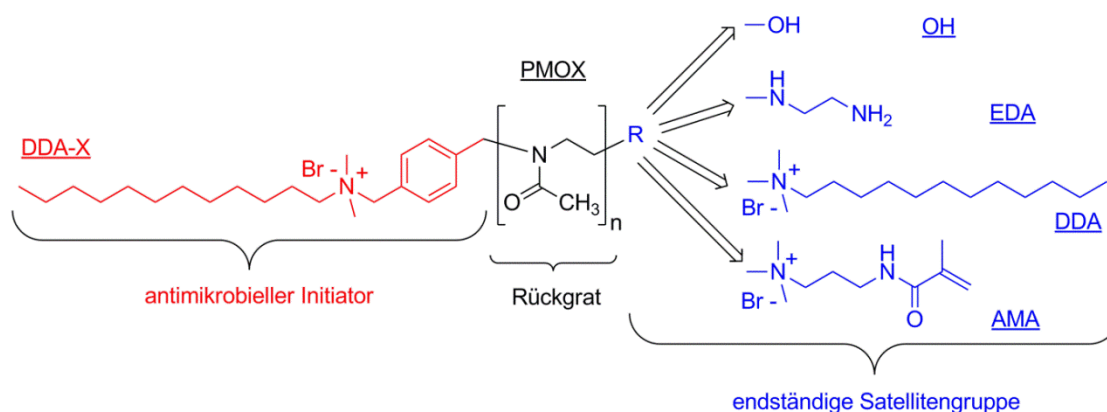


Abb.4.1: Telechele Polymethyloxazolin-Homopolymere (PMOX), gestartet mit dem antimikrobiellen Initiator DDA-X, rot und terminiert mit Satellitengruppen (OH = Hydroxyl, EDA = Ethylen-1,2-diamin, DDA = *N,N*-Dimethyldodecylammoniumbromid sowie AMA = 3-(Methacryloylamino)-*N,N*-dimethylpropan-1-ammoniumbromid, blau).

Unter Anwendung einer CROP-Eintopfsynthese wurden mit DDA-X initiierte und EDA terminierte Homo-/Copolymere aus 2-*iso*Propyl- (*i*PrOX) und 2-Methyl-1,3-oxazolin (MOX) hergestellt. Die Polydispersitäten der monomodal verteilten Produkte bei kurzer Reaktionsdauer (3.5 h) lagen um 1.23, mit einer Erhöhung der Synthesedauer (5.0 h) wurden bimodale Molmassenverteilungen beobachtet. Obwohl die Reaktionstemperatur zu Gunsten des reaktionsträgeren *i*PrOX von erhöht wurde (100°C → 140°C) und ein stöchiometrisches 50:50-Einbauverhältnis eingestellt war, wurde der Anteil von 33 % an *Pi*PrOX bei keinem der Polymere überschritten. Als Ursache wurde eine Differenz der zugehörigen Copolymerisationsparameter und die daraus resultierende Limitierung des *i*PrOX-Einbaus angenommen. Erkennbar war zudem eine temperaturabhängige Phasentrennung der Copolymere in CHCl₃ bei Raumtemperatur, weshalb eine obere kritische Entmischungstemperatur vermutet wurde. Als konzeptionelle Auskopplung der bisher vorgestellten PROX-Systeme wurde eine weitere Klasse telecheler Polyoxazoline mit reaktiven, doppelbindungshaltigen Ankergruppen an beiden Kettenenden hergestellt. Die „aus der Mitte heraus“ mit *para*-Dibromxylo (*p*DBX) initiierten Poly-2-ethyloxazolin-Homopolymere (PEOX) wurden beidseitig mit 3-(Methacryloylamino)-*N,N*-dimethylpropan-1-ammoniumbromid (AMA) versehen (vgl. **Abb.4.2**). So erhalten wurden definierte, bifunktionelle Polymere in hohen Ausbeuten (> 88 %) und Funktionalisierungsgraden (> 93 %); mit mittleren Molekulargewichten von 3,300–5,700 g·mol⁻¹, die in weiteren Arbeiten als makromolekulare Linker zur Herstellung amphiphiler Polymer-*co*-netzwerke dienen.

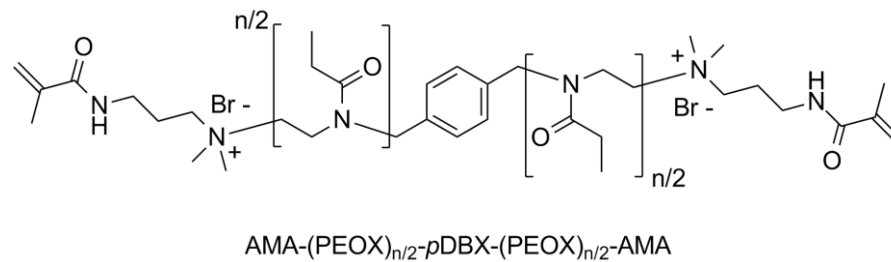


Abb.4.2: Schematische Darstellung der Gesamtstruktur „mittig“ initiiertes (mit pDBX), beidseitig mit AMA funktionalisierter Poly-2-ethyloxazolin-Netzwerklinker (PEOX).

4.2 Bioaktive Wirksamkeit der Polyoxazoline gegenüber lebenden Bakterien und Erythrozyten in wässriger Lösung

Zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit gegen die Keime *S. aureus* (GRAM-positiv) und *E. coli* (GRAM-negativ) wurden die niedermolekularen Initiatoren (pDBX, DDA-X) sowie die Terminierungsmittel (EDA, DDA, AMA) untersucht. Mit der Festlegung einer Wirksamkeitsgrenze von 256 ppm wurde nur für DDA-X eine antimikrobielle Wirksamkeit von 19.5 ppm ($40.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) gegen *S. aureus* und 39.1 ppm ($81.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) gegen *E. coli* bestimmt. Als Polymerreferenz wurde ein mit dem nicht-antimikrobiellen Initiator Methyltosylat gestartetes, EDA-terminiertes PMOX hergestellt, das keine antimikrobielle Wirksamkeit zeigte. So wurde für das PMOX-Rückgrat und die EDA-Satellitengruppe eine intrinsische Bioaktivität ausgeschlossen. Zur Bestimmung der hämolytischen Toxizität wurde ein Assay durchgeführt, der auf lebenden Schweineblut-Erythrozyten in isotonischer Lösung basierte. Der damit ermittelte Wert der medianen hämolytischen Konzentration (HC_{50}) wurde mit den MIC-Werten zur dimensionslosen Kennzahl der Selektivität (S) korreliert, die mit zunehmender Größe ein breiteres Wirksamkeitsfenster zwischen Prokaryoten (Bakterien) und Eukaryoten (Erythrozyten) festlegte. Die Evaluierung der telechelen, DDA-X initiierten PMOX mit variablen Satellitengruppen (OH, EDA, DDA und AMA) resultierte im Falle der Hydroxylterminale (OH) in antimikrobiell unwirksamen (MIC-*S. aureus*: 313-2,500 ppm; *E. coli*: 1,250-5,000 ppm), mäßig hämotoxischen (HC_{50} : 412-1,126 ppm) Systemen geringer Selektivität ≤ 1 . Unter Verwendung dieser polaren Satellitengruppe kam es offensichtlich zu einer ineffektiven Penetration/Perforation der bakteriellen Zellmembranen und damit zu einem kompletten Wirksamkeitsverlust.

Ein Einbau der Satellitengruppen EDA, DDA und AMA erhöhte die antimikrobiellen Wirksamkeit der resultierenden PMOX-Systeme signifikant, was auf eine effektive Penetration/Perforation bakterieller Zellmembranen schließen ließ (vgl. **Abb.4.3**).

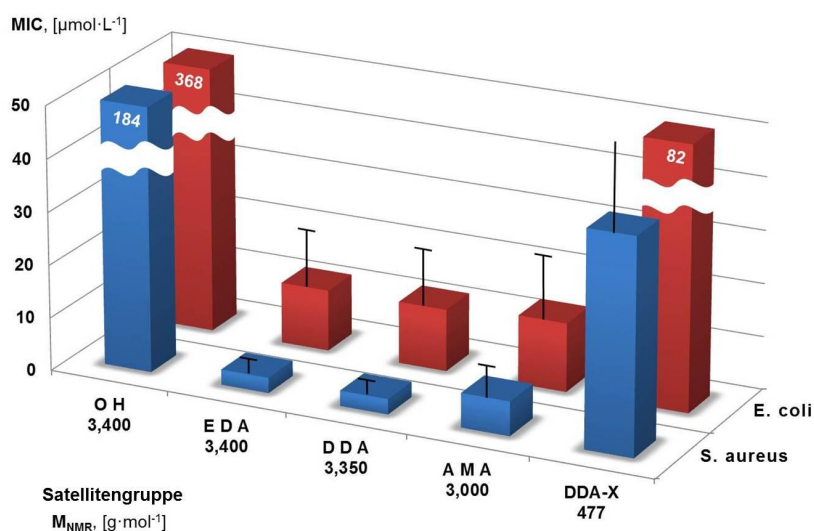


Abb.4.3: Graphische Darstellung der MIC-Werte der telechelen Polymethyloxazoline der Klasse DDA-X-PMOX-SAT mit variablen Satellitengruppen (SAT = OH, EDA, DDA und AMA) und vergleichbaren mittleren Molekulargewichten ermittelt gegen *S. aureus* und *E. coli* und verglichen mit dem antimikrobiell wirksamen Initiator DDA-X.

Die molaren MIC-Werte waren über einen Kettenlängenbereich von 23 bis 77 Monomereinheiten hinweg konstant (innerhalb des Bestimmungsfehlers), womit eine Abhängigkeit der bioaktiven Effektivität von der Molmasse widerlegt wurde. Im Falle des Initiators DDA-X und bei den telechelen PMOX-Systemen wurde ein Faktor-2-Unterschied zwischen dem GRAM-positiven und GRAM-negativen Keimen festgestellt. Mit dem ausgewählten DDA-X-PMOX-EDA durchgeführte Mikrodilutionstests an tierspezifischen Bakterienstämmen resultierten in MIC-Werten von 16 bis 256 ppm. Als membranaktive Verbindungen wiesen die antimikrobiell wirksamen PMOX Hämotoxizitäten $< 200 \mu mol \cdot L^{-1}$ auf. Die erregerspezifische Selektivitäten von 5-14 (*S. aureus*) bzw. 2-3 (*E. coli*), belegten den signifikanten Einfluss der distalen Satellitengruppen auf die bioaktive Effektivität der Gesamtmoleküle (vgl. **Abb.4.4**). Durch die Wirkmechanismen der Oberflächenadhäsion und der Membranpenetration und mittels eines einzigen bioaktiven Polyoxazolins wurde so die erregerspezifische Selektivität, im Vergleich zur niedermolekularen Referenz DDA-X, verdoppelt.

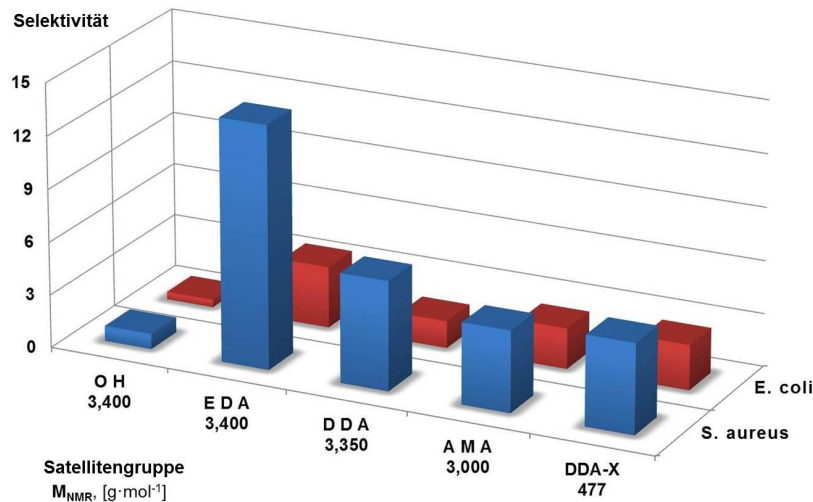


Abb.4.4: Graphische Darstellung der erregerspezifischen Selektivitäten S der telechelen Polymethyloxazoline der Klasse DDA-X-PMOX-SAT mit variablen Satellitengruppen (SAT = OH, EDA, DDA und AMA) und vergleichbaren mittleren Molekulargewichten in Vergleich zum antimikrobiellen Initiator DDA-X.

Die telechelen Homo- und Copolymere aus 2-*iso*Propyl- (*i*PrOX) und 2-Methyl-1,3-oxazolin (MOX) wiesen im Vergleich zu den PMOX-Systemen nur leidliche bis keine antimikrobielle Wirksamkeiten mit Werten von 156-625 ppm (62.4-189 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) auf. Als mögliche Ursache wurde die ungleich höhere Hydrophobizität der *i*PrOX-Ketten und das temperaturabhängige Entmischungsverhalten in Lösungsmitteln diskutiert.

4.3 Hemmung bakterieller und dentalrelevanter Matrixmetalloproteinasen durch bioaktive, telechele Polyoxazolin-Inhibitoren

Zur Bestimmung eines enzymhemmenden Effektes der telechelen, antimikrobiellen Polyoxazoline wurden diese mit tierischer Gelatine (denaturiertes Kollagen) gegen die bakterielle Kollagenase *Typ I* des Gasbranderreger *C. histolyticum* getestet. Ein solcher wurde bei der niedermolekularen Vergleichssubstanz *N*-Dodecyl-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid (DTAC) sowie bei allen DDA-X initiierten Polyoxazolen festgestellt. Wegen ihrer distalen, quartären *N,N*-Dimethyldodecylammoniumbromid-Funktion waren die DDA-terminierten PMOX-Systeme ebenfalls MMP-inhibierend. Die Einführung einer quartären Pyridiniumbromid-Funktion (PYR) führte zu keiner

Wirksamkeit. Eine ebenfalls mögliche, intrinsische kollagenasehemmende Effektivität des PMOX/PEOX-Polymerückgrats konnte ausgeschlossen werden (vgl. **Tab.4.1**).

Tab.4.1 MMP-inhibierende Effektivität ausgewählter telecheler Polyoxazoline der Klasse I-(PROX)_n-T in Abhängigkeit von den Strukturelementen des Initiators (I), der Monomerreste (R), der Kettenlänge (n) sowie der endständigen Satellitengruppe (T). Von einer MMP-Inhibierung der telecheler Polyoxazoline in Lösung („ja“) wurde bei minimalen Enzyminhibierungskonzentrationen von < 3.8 mmol·L⁻¹ ausgegangen.

#	Struktur	I ^a	R ^b	T ^c	MMP-inhibierend ^d
0h	DTAC	-	-	-	ja
14	Me-PMOX ₃₇ -OH	Me	M (CH ₃)	OH	nein
15	Me-PEOX ₂₄ -OH	Me	E (C ₂ H ₅)	OH	nein
16	Me-PEOX ₅₃ -PYR	Me	E (C ₂ H ₅)	PYR	nein
17	Me-PMOX ₂₂ -DDA	Me	M (CH ₃)	DDA	ja
18	DDA-X-PMOX ₁₇ -EDA	DDA-X	M (CH ₃)	EDA	ja
13	DDA-X-PMOX ₂₈ -AMA	DDA-X	M (CH ₃)	AMA	ja
19	DDA-X-PMOX ₃₇ -AMA	DDA-X	M (CH ₃)	AMA	ja

[a] Gruppe am PROX-Kettenanfang, eingeführt durch Initiierung, [b] Systematische Abkürzung und chemische Struktur der alkyischen Monomerreste, [c] Endständige Satellitengruppe, eingeführt durch Terminierung, [d] Beurteilung der MMP-inhibierenden Effektivität (via SDS-PAGE) gegenüber bakterieller *C. histolyticum* Typ I Kollagenase.

Bei einer Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit gegen den dentalrelevanten Karieskeim *S. mutans* waren alle DDA-X-initiierten Polyoxazoline mit MIC-Werten von 4.9-19.5 ppm und das DDA-terminierte PROX mit 39.1 ppm wirksam. Mittels eines quantitativen Abbauassays an rekombinanter, humaner Matrixmetalloproteinase (rhMMP-9) wurde exemplarisch ein AMA-funktionalisiertes PMOX auf seine Effizienz in wässrig gepufferter Lösung hin untersucht. Mit einer Anfangskonzentration von 0.5 Gew.% wurde ein Inhibierungsgrad von 15 % bestimmt; der maximal realisierbare Inibierungsgrad betrug 66% bei 20 Gew.% an PROX. Obwohl mehr als 2/3 der zugesetzten rhMMP-9 inhibiert wurden, handelte es sich hierbei um einen Assay ohne Bezug zum Dentalkollagen; daher wurde ein quantitativer Abbauassay an demineralisierten Rinderdentinscheiben unter Verwendung bakterieller *C. histolyticum* Typ I Kollagenase (1 mg·mL⁻¹) durchgeführt. In einem Ca²⁺-haltigen Citratpuffer (pH=6.3) wurden jeweils 20 µL einer 2.50 Gew.-%-igen Polymerlösung auf den Probenkörpern (50 mg) appliziert und diese mit einer

kollagenfreien und polymerfreien Referenzreihe bei 37°C inkubiert (vgl. **Abb.4.6**). Die vollständige MMP-Inhibierung auf demineralisierten Rinderdentin war, auf Grund der geringen Polymerkonzentration ($0.065 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), nicht auf eine Wirksamkeit des polymeren Inhibitors in der umgebenden Pufferlösung zurückzuführen. Daher war von einer MMP-Hemmung unmittelbar auf der Rinderdentinoberfläche auszugehen.

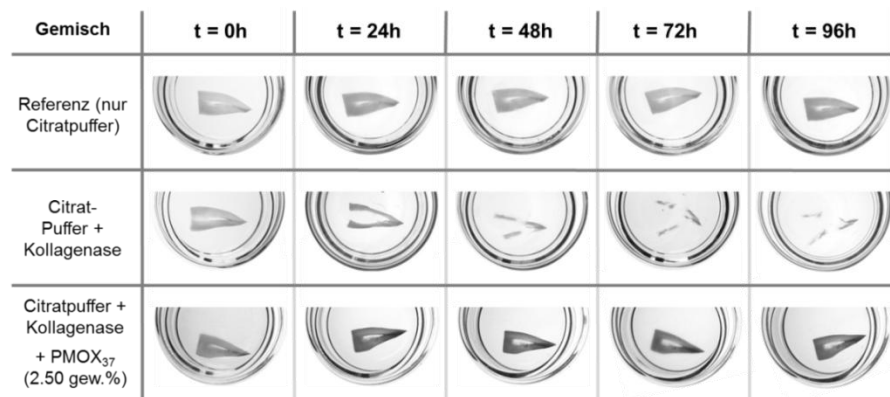


Abb.4.5: Dokumentation des Kollagenabbauassays an demineralisierten Rinderdentinscheiben mit Kollagenase- und Inhibitorfreien Referenzreihen (oben und mitte). Als makromolekularer MMP-Inhibitor wurde DDA-X-PMOX₃₇-AMA aufgebracht und mit *C. histolyticum* Typ I-Kollagenase in Citratpuffer bei 37°C inkubiert (unten).

Ein weiterer, von Herrn Prof. D. H. Pashley (Medical College of Georgia, USA) und seinen Mitarbeitern durchgeführter, quantitativer Peptidfreisetzungssassay an demineralisierten Humandentin bestimmte, außer dem Masseverlust des humanen Dentinkollagens, die Freisetzung von L-Hydroxyprolin in eine künstliche Körperflüssigkeit (SBF-Puffer, 37°C). Nach einer 30-tägigen Inkubation unter Verwendung von 5 Gew.% eines PMOX-basierten, DDA-X/AMA-funktionalisierten MMP-Inhibitors wurde damit eine nahezu vollständige Kollagenasehemmung von > 96 % berechnet.

4.4 Bioaktive Polyoxazolin-Additive in Langzeit-Kontaktaktiven und Biofilm-resistenten Oberflächen kommerzieller Dentaladhäsive

Im Rahmen eines Forschungsprojektes mit der Ivoclar Vivadent AG wurden die antimikrobiellen und MMP-inhibierenden Polyoxazoline der DDA-X-PMOX_n-AMA-Klasse als makromolekulare Additive im kommerziellen, blaulicht-härtenden Dentaladhäsiv AdheSE[®] One F eingesetzt und charakterisiert. Zunächst wurden

Rinderdentinscheiben mit *S. aureus* und *S. mutans* kontaminiert und mit den homogenen, DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen AdheSE[®] One F-Harzen behandelt.

Sowohl die mit einer antimikrobiellen Vergleichssubstanz behandelten, als auch die AdheSE[®] One F-Referenz sowie die polymerhaltigen Proben zeigten nach der Inkubation eine antimikrobielle Wirksamkeit, womit die unmittelbare Wirksamkeit der PMOX-Polymeradditive nicht zweifelsfrei belegbar war. Daher wurde die kontaktaktive Wirksamkeit von PMOX-modifizierten, Dentaladhäsiv-schichten auf doppelbindungs-funktionalisierten (silanisierten) Glasobjektträgern mittels eines modifizierten Elutionstests (nach WASCHINSKI *et al.*) bestimmt.

Die mittels Blaulicht aufpolymerisierten Adhäsivfilme wurden kontinuierlich wässrig eluiert, nach regelmäßiger Entnahme mit einer Bakteriensuspension von *S. mutans* (10^7 Keime·mL⁻¹) besprüht und unter Nähragar inkubiert. Die Anfärbung lebender Bakterienkolonien erlaubte eine visuelle Kontrolle der antimikrobiellen Effektivität. Die doppelbindungsfunktionalisierten Glasoberflächen zeigten von Anfang an keine antimikrobielle Wirksamkeit, die zunächst vorhandene Wirksamkeit der reinen AdheSE[®] One F Formulierung ließ spätestens nach einer 5-tägigen Elution nach. Die Benzethoniumchlorid-haltigen Adhäsivfilme zeigten während der ersten 4 d ebenfalls eine antimikrobielle Wirksamkeit, die durch ein ausgeprägtes Freisetungsverhalten (engl. *leeching*) mit unscharf begrenzten Bewuchsrändern (der Inhibierungszone) charakterisiert war und nach 6 d verschwand. Im Gegensatz dazu behielten die Adhäsivoberflächen, die aus den polymerhaltigen AdheSE[®] One F-Formulierung (2.5 Gew.% an DDA-X-PMOX₃₇-AMA) erzeugt wurden, selbst nach einer 101-tägigen Elution (37°C) ihre antimikrobielle Wirksamkeit im vollen Umfang bei (vgl. **Abb.4.6**).

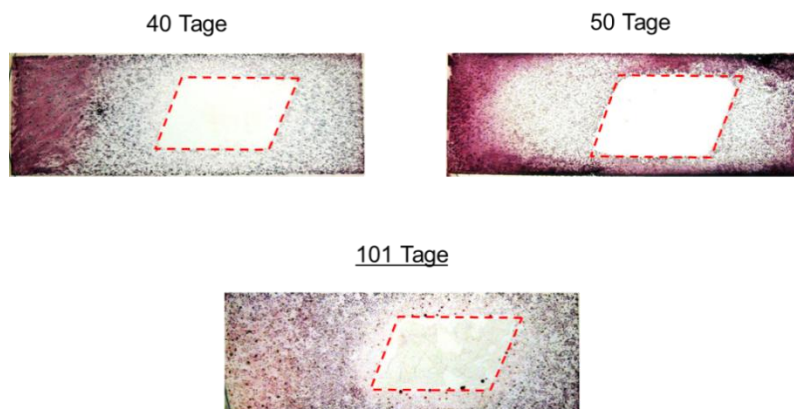


Abb.4.7: Chronologische Dokumentation der DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen (2.5 Gew.%), mittels Blaulicht aufpolymerisierten Dentaladhäsivfilme nach 101-tägiger wässriger Elution, Kontamination, Inkubation sowie Rotfärbung lebender *S. mutans*.

Damit wurde der angestrebte kontaktaktive/freisetzungsfreie Wirkmechanismus der kovalent immobilisierten und oberflächlich exponierten, bioaktiven PMOX-Additive belegt. Zusätzlich wurde die minimale, gegen *S. mutans* voll wirksame Konzentration an DDA-X-PMOX₃₇-AMA in AdheSE[®] One F zu 2 Gew.% ermittelt. Als Belastungstest wurden die vorher eluierten, Polymeradditiv-haltigen Adhäsivfilme mit einem hierauf aufgebracht Biofilm (*S. mutans*) überschichtet und jeweils 48 h lang nachinkubiert; diese Prozedur wurde 2x mit derselben Probe durchgeführt. Die Biofilme ließen sich jeweils leicht mit Wasser herunterspülen; die kontaktaktive Wirksamkeit wurde auch nach der dritten bakteriellen Sprühkontamination vollständig erhalten (vgl. **Abb.4.7**).

2-malige Biofilm-Überwucherung mit *S. mutans*
+ finale *S. mutans*-Sprühkontamination/Bewuchs (2+1)

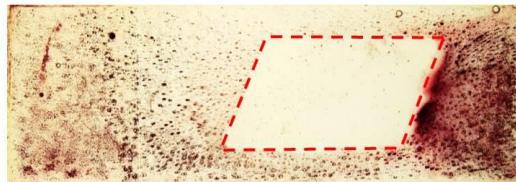


Abb.4.8: Dokumentation einer zweifach mit einem *S. mutans*-Biofilm beschichteten, jeweils nachinkubierten und wässrig abgespülten Oberfläche eines DDA-X-PMOX₃₇-AMA-haltigen (2.5 Gew.%) Dentaladhäsivfilms nach einer dritten und letzten *S. mutans* Kontamination, Inkubation und Anfärbung noch lebender Bakterienkolnien.

Eine nachteilige Beeinflussung der dentalrelevanten Haft- /Adaptionsparameter oder eine Beeinträchtigung der Randqualität nach Polyoxazolin-Zugabe zu AdheSE[®] One F konnte mittels der durch Dr. Heinze und M. Forjanic (Ivoclar Vivadent AG) durchgeführten Messungen ausgeschlossen werden: im Vergleich mit dem additivfreien Adhäsiv nach der Methode der Marginalen Adaption wurde keine signifikante Abnahme der spaltfreien Profile bei den zylindrischen Füllungen von behandelten Rinderdentin festgestellt.

Mit der Bestimmung dentalrelevanter Scherhaftwerte durch Dr. Heinze und M. Forjanic (Ivoclar Vivadent AG) auf Schmelz und Dentin von Rinderzähnen konnte auch gezeigt werden, dass es zu keiner nachteiligen Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften der Dentaladhäsivmatrix durch die Zugabe der Polymeradditive der DDA-X-PMOX₃₇-AMA-Klasse kam (vgl. **Abb.4.9**).

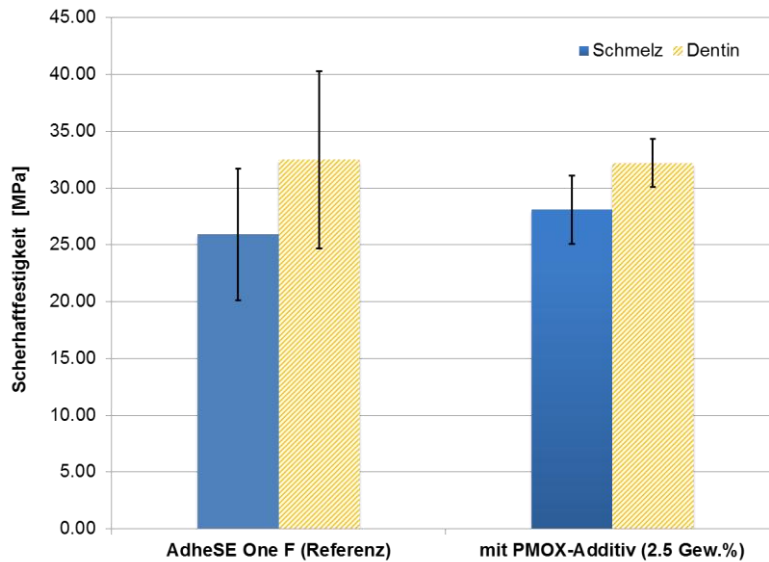


Abb.4.8: Grafische Darstellung der Scherhaftwerte eines Komposites auf Rinderzahnschmelz und Dentin; ermittelt mit der additivfreien AdheSE[®] One F-Referenz in Vergleich zu einem mit DDA-PMOX₃₇-AMA-Additiv modifizierten Harz (2.5 Gew.%).

4.5 Kovalent immobilisierte, bioaktive Polyoxazoline für eine abwaschresistente Wirksamkeit auf dentalrelevanten Oberflächen

Für eine ausbaufähige Anbindungsvariante wurden PROX mittels einer polymeranalogen Umsetzung mit endständigen, auf Pyromellitsäure-Dianhydrid (PMS-DA) basierenden Ankergruppen versehen, die irreversibel mit primären Aminogruppen an Kollagen, Enzymen oder aminierten Modelloberflächen abreagieren können.

Mittels einer Kopplungsstudie wurde nachgewiesen, dass die hypothetisch denkbare, beidseitige Kopplung von zwei NH₂-funktionalisierten Polyoxazolinketten an PMS-DA auf Grund der stark eingeschränkten Polymerdiffusion kinetisch gehemmt und daher innerhalb der Reaktionsdauer, unwahrscheinlich war. Eine Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit nach der Umsetzung lieferte MIC-Werte (*S. aureus* / *S. mutans*), die im Vergleich zum EDA-terminierten PMOX-System um Faktor-12 und damit signifikant herabgesetzt waren. Offensichtlich hatte die eingeführte, sterisch anspruchsvolle PMS-IA-Satellitengruppe einen nachteiligen Einfluss auf die Bioaktivität der damit funktionalisierten Polyoxazoline, weil sie deren Penetrations-/Perforationsfähigkeit von Bakterienmembranen in Lösung erheblich behinderte.

Mit einer Beschichtung von Dentinscheiben mit einer verdünnten Lösung des bioaktiven DDA-X-PMOX-PMS-IA (5 und 2.5 Gew.%) wurde initial eine antimikrobielle Wirksamkeit beobachtet, die nach einer wässrigen Elution bald verschwand (5 min).

Es wurden aminierte Glasoberflächen hergestellt, deren Aminogruppendichte über einen quantitativen Nachweis (wasserfreie Pikrinsäure) auf etwa 100 ± 10 primäre Aminogruppen pro nm^2 standardisiert wurde. Eine irreversible Belegung mit freiem PMS-DA gelang binnen 5 min zu über 95 %, eine Funktionalisierung solcher pyromellitisierten Oberflächen mit einem EDA-terminierten, bioaktiven Polyoxazolin gelang im Folgenden nicht. Unter Einhaltung streng inerter Bedingungen gelang es jedoch, „lebende“ bioaktive DDA-X-PMOX-Systeme unmittelbar und ohne Einsatz zusätzlicher PMS-DA-Ankergruppen an Aminoglasoberflächen zu terminieren. Neben einer hohen Abwaschresistenz zeigten diese, mit Hilfe einer direkten *grafting-onto* Oberflächenterminierung aufgebrauchten Polyoxazolinschichten, nach der Fluoreszinfärbung eine sehr hohe Dichte an quartären Ammoniumfunktionen (vgl. **Abb.4.9**).

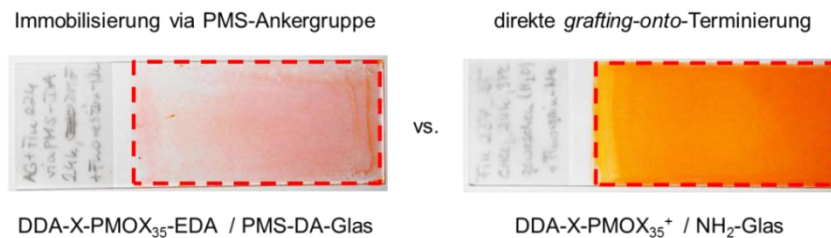


Abb.4.9: Methodisch unterschiedlich PMOXylierte Aminoglasoberflächen nach Fluoreszinfärbung und Elution. Links: Polyoxazolin-Immobilisierung über PMS-DA-Ankergruppe; rechts: direkte *grafting-onto* Terminierung von DDA-X-PMOX₃₅⁺.

Der mittels direkter *grafting-onto* Oberflächenterminierung realisierte und quantifizierte PMOXylierungsgrad der Glasoberflächen betrug etwa 93%; eine kontaktaktiv-antimikrobielle Wirksamkeit konnte ebenfalls nachgewiesen werden (vgl. **Abb.4.10**).

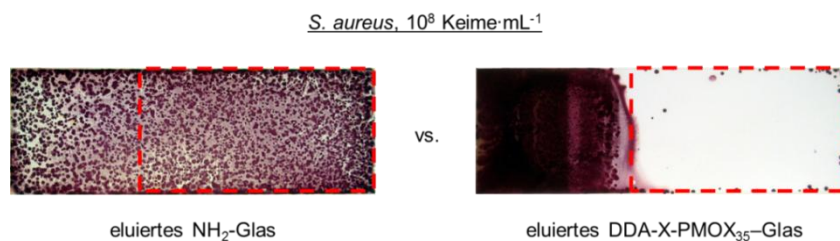


Abb.4.10: Fotodokumentation der kontaktaktiv-antimikrobiellen Wirksamkeit einer PMOXylierten Aminoglasoberfläche (rechts) in Vergleich zur unbehandelten Aminoglasoberfläche (links) nach Elution, Kontamination mit *S. aureus* sowie Inkubation.

4.6 Biomimetische Reproduktion natürlich vorkommender Texturen zur Vergrößerung der aktiven Oberfläche und Gruppendichte

Im letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Problematik der begrenzt realisierbaren Gruppendichte auf glatten, unstrukturierten Oberflächen aufgegriffen und führte zu einem ausbaufähigen Konzept der Oberflächenvergrößerung. Dieses wurde umgesetzt durch die Herstellung komplexer, „fellartiger“ Oberflächentexturen mit einer hohen Belegungsichte und einem sehr hohen Aspektverhältnis ($> 100:1$) von untrennbar mit der Oberfläche verbundenen, „haarigen“ Filamenten. Die Darstellung dieser im mm^2 -Maßstab gewinnbaren Texturen gelang nach einem mehrstufigen Reproduktionsverfahren an mikroperforierten Rinderdentintemplaten. Als Abgussmatrix wurden blaulichhärtende Methacryl(amid)harze verwendet, die auf frühen Entwicklungsstufen kommerziell erhältlicher Dentaladhäsivformulierungen basierten und eine gute Kompatibilität mit der eingesetzten Zahnschmelze boten.

Nach einer systematischen Optimierung der Harzformulierung wurde die Zieltextur erhalten und mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) charakterisiert. Zudem wurde eine analog aufgebaute, pflanzliche Oberflächentextur an den Blattunterseiten des Zickzackstrauchs (*Corokia cotoneaster*) vorgefunden (vgl. **Abb.4.12 rechts**) und mit der künstlich reproduzierten Textur verglichen (vgl. **Abb.4.12 links**).

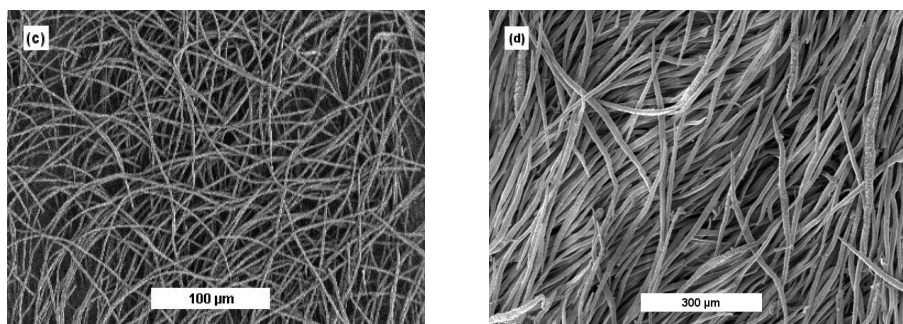


Abb.4.12: REM-Aufnahmen der künstlich reproduzierten, haarigen Oberflächentextur (links, c) im Vergleich zur natürlichen Vorlage an *C. cotoneaster* (rechts, d).

Bei einem mittleren Filamentdurchmesser von $1.25 \mu\text{m}$ und einer mittleren Länge von $225 \mu\text{m}$ betrug das mittlere Aspektverhältnis der erzeugten Harzfilamente $180:1$; womit eine Oberflächenvergrößerung um das 79-fache gelang.

Die Betrachtung der Haarstrukturen pflanzlichen Ursprungs (Trichome) offenbarte die Existenz nanoskaliger Ausstülpungen, die in Kombination mit der „fellartigen“ Makrostrukturierung verantwortlich für die wasserspeichernden Eigenschaften der stark hydrophoben *C. cotoneaster* Blattunterseiten waren. Mittels einer Beschichtung mit Siliziumdioxid-Nanopartikeln und einer Hydrophobisierung mit einem Perfluorsilan konnten auch die Nanostrukturierung und die entsprechende Hydrophobizität der natürlichen Vorlage mit einem Kontaktwinkel gegen Wasser von $> 160^\circ$ erreicht werden. Das bei *C. cotoneaster* beobachtete Bestreben zum „Festhalten“ einzelner Wassertropfen trotz angelegter hoher Neigungswinkel wurde somit auch mit den reproduzierten Oberflächentexturen erfolgreich realisiert (vgl. **Abb.4.12**).

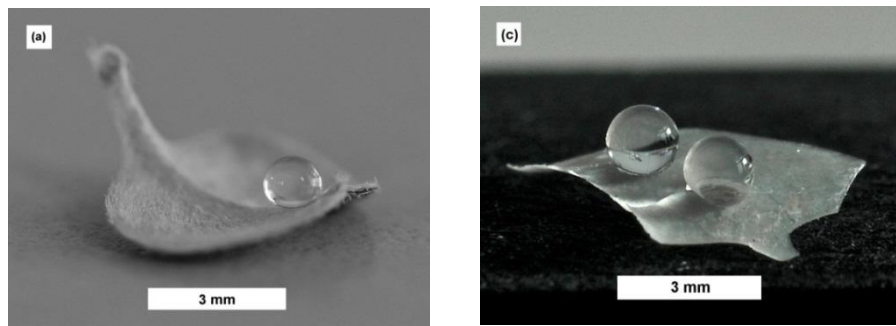


Abb.4.12: Makroaufnahmen immobilisierter Wassertropfen auf einem geneigten *C. cotoneaster* Blattunterseite (links) sowie der künstlichen Oberflächentextur (rechts).

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien

5.1.1 Gase und Flüssiggase

Argon 4.6 (Ar, $\geq 99.996\%$) der Fa. Linde, Schutzgas zur Inertisierung.

Stickstoff (N₂, $\geq 99.8\%$) der Fa. Linde, Schutzgas zur Inertisierung.

Synthetische Luft (O₂ : N₂; 80 : 20) der Fa. Linde, Spülgas zur TGA.

Flüssiger Stickstoff 2.8 ($\geq 99.8\%$) der Fa. Linde, zur Kühlung.

5.1.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Aceton ($\geq 99.5\%$) der Fa. AppliChem: wurde einmalig am RotV abdestilliert.

Agar der Fa. Sigma-Aldrich.

Ammoniumpersulfat der Fa. Sigma-Aldrich.

Benzethoniumchlorid (BZ) der Fa. AppliChem.

Bisphenol A glyzidyldimethacrylat (bisGMA) der Fa. Sigma-Aldrich.

Bromphenolblau der Fa. Sigma-Aldrich.

Calciumacetat-Monohydrat (Ca(OAc)₂·H₂O) der Fa. Sigma-Aldrich.

Calciumsulfat-Hemihydrat (CaSO₄·½H₂O) der Fa. Sigma-Aldrich.

Chloroform (*BioChemica*, CHCl₃, $\geq 99.8\%$) der Fa. AppliChem: wurde 15 min mit konz. Schwefelsäure (H₂SO₄) geschüttelt, am RotV abdestilliert und über aktiviertem basischem Aluminiumoxid getrocknet für einen H₂O-Restgehalt ≤ 1 ppm (kontrolliert mittels KARL-FISCHER-Titration).

Coomassie[®]-Brilliant-Blau Färbung R-250 der Fa. ICI/AkzoNobel.

Ebecryl 168[®] (HEMA-P, 2-Hydroxyethylmethacrylat-Phosphat) der Fa. Cytec Industries.

Fluoreszin-Natriumsalz der Fa. Sigma-Aldrich.

Irgacure 651[®] (Photoinitiator; 2,2-dimethoxy-1,2-diphenylethan-1-on) der Fa. Ciba Speciality Chemicals.

Dextrose der Fa. Sigma-Aldrich.

Dialyseschlauch, aus benzoylierter Cellulose (trocken), MWCO = 1,000 g·mol⁻¹ (1 kDa) der Fa. Sigma-Aldrich.

Dialyseschlauch, aus benzoylierter Cellulose (feucht), MWCO = 1,000 g·mol⁻¹, 2,000 g·mol⁻¹ (1 und 2 kDa) der Fa. Carl Roth.

Dibrom-*para*-xylol der Fa. Sigma-Aldrich: wurde zweimal aus Chloroform (CHCl_3) umkristallisiert und unter Ar aufbewahrt.

Dichlormethan (CH_2Cl_2 , ROTISOLV[®], $\geq 99.5\%$) der Fa. Carl Roth: wurde einmalig am RotV abdestilliert.

Diethylether (Et_2O , $\geq 99.8\%$) der Fa. VWR: wurde unter wiederholter Kontrolle des Hydroperoxid-Gehaltes (Farbteststäbchen) einmalig am RotV abdestilliert.

2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) der Fa. Sigma-Aldrich.

N-[3-(dimethylamino)-propyl]-methacrylamid (AMA) der Fa. Sigma-Aldrich: wurde mit Stabilisator (BHT, 0.05 Gew.%) versetzt und frisch im Vakuum destilliert.

N,N-Dimethyldodecylamin (DDA) der Fa. Sigma-Aldrich: wurde zweimal im Vakuum destilliert. Verwendet wurde die unter Ar abgefüllte Hauptfraktion.

N,N-Dimethylformamid (DMF, $\geq 99.5\%$) der Fa. Carl Roth: wurde am RotV mit Vorlauf (ca. 10 Vol.%) abdestilliert.

5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (CNPDS) der Fa. Sensolyte.

N-Dodecyl-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DTAC) der Fa. Fluka.

Email Preparator (Phosphorsäure-Ätzel, ca. 35Vol.%) der Fa. Ivoclar Vivadent.

Ethylendiamin (EDA) der Fa. Sigma-Aldrich: wurde im Vakuum unter Stickstoffkühlung der Vorlage abdestilliert. Alternativ wurde durch dreimaliges ausfrieren und auftauen (engl. *freeze-and-thaw*) aufgereinigt.

2-Ethyl-oxazolin (EOX) der Fa. Merck: wurde über Calciumhydrid (CaH_2) mit Vorlauf (ca. 10 Vol.%) abdestilliert. Verwendet wurde die unter Ar abgefüllte Hauptfraktion.

1,2- /1,3-Glyzerindimethacrylat (GDMA), Isomerengemisch der Fa. Sigma-Aldrich.

Glyzerinlsg. der Fa. Sigma-Aldrich.

2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) der Fa. Sigma-Aldrich: wurde unmittelbar vor Gebrauch abdestilliert. Verwendet wurde die unter Ar abgefüllte Hauptfraktion.

4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES) der Fa. Sigma-Aldrich.

Kalium (K) der Fa. Sigma-Aldrich.

Linde Typ 4Å Molekularsieb der Fa. Sigma-Aldrich.

Luviquat[®] FC 370 der Fa. BASF.

Methanol (ROTIPURAN[®], $\geq 99.8\%$) der Fa. Carl Roth: wurde am Rotationsverdampfer mit Vorlauf (ca. 5 Vol.%) abdestilliert.

2-Methyl-oxazolin (MOX) der Fa. Sigma-Aldrich: wurde unmittelbar vor Gebrauch 1h über Calciumhydrid (CaH_2) refluxiert, abdestilliert, mit Stabilisator (BHT, 0.05 Gew.%)

versetzt und ein zweites Mal mit Vorlauf abdestilliert. Verwendet wurde die unter Ar abgefüllte Hauptfraktion.

Methyl-*para*-toluolsulfonat (MeOTs) der Fa. Sigma-Aldrich.

Natrium (Na) der Fa. Sigma-Aldrich.

Natriumazid (NaN_3) der Fa. Sigma-Aldrich.

Natriumchlorid (NaCl) der Fa. Sigma-Aldrich.

Natriumcitrat-Dihydrat ($\text{Na}_3\text{Cit}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) der Fa. Sigma-Aldrich.

Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$) der Fa. Sigma-Aldrich.

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) der Fa. Sigma-Aldrich.

Natriumhydroxid (NaOH) der Fa. Sigma-Aldrich.

Natriumsulfat (NaSO_4) der Fa. Sigma-Aldrich.

2-Nitro-5-thiobenzoessäure (TNB) der Fa. Sensolyte.

1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltriethoxysilan der Fa. Sigma-Aldrich.

2-*iso*Propyl-oxazolin (*i*PrOX) zur Verfügung gestellt von R. Hoogenboom (Ghent, Belgien): wurde über Calciumhydrid (CaH_2) mit Vorlauf (ca. 10 Vol.%) abdestilliert. Verwendet wurde die unter Ar abgefüllte Hauptfraktion.

Pyromellitsäure Dianhydrid der Fa. Sigma-Aldrich.

Standard-I-Nährbouillon der Fa. Merck.

Tetrahydrofuran (THF, $\geq 99,5\%$) der Firma AppliChem: wurde unter wiederholter Kontrolle des Hydroperoxid-Gehaltes (Farbteststäbchen) zweimalig am RotV abdestilliert. Verwendet wurde die Hauptfraktion mit einem H_2O -Restgehalt ≤ 150 ppm (kontrolliert mittels KARL-FISCHER-Titration). Alternativ: refluxieren von vorgetrocknetem THF über einer flüssigen Na/K-Legierung (2:3, CAVE: Brandgefahr !) für mindestens 24h unter Ar für einen H_2O -Restgehalt ≤ 10 ppm.

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) der Fa. Sigma-Aldrich.

Toluol ($\geq 99,8\%$) der Fa. AppliChem: abdestilliert am Rotationsverdampfer

Triethylamin (NEt_3) der Fa. Sigma-Aldrich.

Triethylglykoldimethacrylat (TEGDMA) der Fa. Sigma-Aldrich: wurde im Vakuum abdestilliert. Verwendet wurde die unter Ar abgefüllte Hauptfraktion.

2,4,6-Trinitrophenol (TNP, Pikrinsäure) der Fa. Sigma-Aldrich: CAVE Explosionsgefahr, umsichtig arbeiten ! wurde auf einem Filterpapier vorgetrocknet und mittels viermaliger Abdestillation eines Toluol- H_2O -Azeotropes am RotV getrocknet (niemals vollständig trocknen !). Es wurde eine Stammlsg. in CH_2Cl_2 ($0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) hergestellt und stets unter Ar gehandhabt.

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC, Farbstoff zum Anfärben lebender Bakterien) der Fa. Sigma-Aldrich.

Trizma[®]-Base der Fa. Sigma-Aldrich.

Urethandimethacrylat (UDMA) der Fa. Sigma-Aldrich.

Wasserstoffperoxidlsg. (H₂O₂, 30% Vol./Vol.) der Fa. Sigma-Aldrich.

Zinkchlorid (ZnCl₂) der Fa. Sigma-Aldrich.

Zitronensäure-Monohydrat (CitOH·H₂O) der Fa. Sigma-Aldrich.

5.1.3 Bakterien

Alle eingesetzten Bakterien, mit Ausnahme der im Rahmen von Multikeim-Mikrodilutionstests bei der Bayer HealthCare verwendeten, tierspezifischen Keime, wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. **Tab. 5.1** fasst die relevanten Keimdaten zusammen.

Tab.5.1: Zusammenfassung aller relevanten Daten der eingesetzten Bakterien.

Biologische Bezeichnung	Klasse nach GRAM	Stamm #		Quelle	Risikogruppe ^c
		ATCC ^a	DSMZ ^b		
<i>Staphylococcus aureus</i>	positiv (+)	25923	1104	Wundisolat	2
<i>Streptococcus mutans</i>	positiv (+)	25175	20523	Kariesisolat	2
<i>Escherichia coli</i>	negativ (-)	25922	1103	Darmisolat	2

[a] American Type Culture Collection, [b] Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, [c] Risikoeinstufung nach den Technischen Richtlinien für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA).

5.1.4 Blut

Das frische und ungepökelte, zur Gewinnung von Erythrozytenkonzentraten eingesetzte Schweineblut stammte von der Fa. Niemann (Metzgerei), Dortmund. Es wurde stets unter kalten (4-8°C) und dunklen Bedingungen (Kühlschrank) gelagert und erst unmittelbar vor Gebrauch unter sterilen Bedingungen abgefüllt.

5.2 Geräte

5.2.1 FOURIER-transformierte Infrarotspektroskopie (ATR-FT-IR)

Die festen oder flüssigen Proben wurden an einem Bruker Alpha Spektrometer vermessen. Dieses beinhaltet ein Platinum ATR-Druckmodul, das die Aufnahme von Spektren an einem einzelrefraktiven Diamantfenster in abgeschwächter Totalreflexion (ATR) ermöglichte.

5.2.2 Gaschromatografie mit Massenspektroskopie (GC-MS)

Gaschromatogramme mit unmittelbar anschließender Massenspektroskopie wurden gemessen an einem Clarus SQ 8 der Fa. Perkin-Elmer ausgerüstet mit einem Clarifi™-Detektor sowie einer SMARTsource™-Ionenquelle. Die Messungen wurden mit Toluol als Lsm. in Konzentrationen um $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ durchgeführt.

5.2.3 Gelpermeationschromatografie (GPC)

Gelpermeationselugramme wurden aufgenommen an einem GPCMax der Fa. Malvern (Viscotek), ausgestattet mit einem Brechungsindexdetektor (RI); temperiert auf 55°C . Der Säulensatz bestand aus TSKgel® GMHHR-M Säulen der Fa. Tosoh ($5.0 \mu\text{m}$ Porengröße, 2x) sowie einer TSKgel® Vorsäule. Als Lsm. wurde mit Lithiumbromid (LiBr , $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) versetztes *N,N*-Dimethylformamid bei 60°C und einer Flussrate von $0.70 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ eingesetzt. Die Kalibriergeraden wurden erstellt mittels eines Polystyrol-Eichsets ($1,050 < M_p < 3,800,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) der Fa. Viscotek; die Probenkonzentrationen betragen $2.0\text{-}4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Das Resultat (Elugramm) einer GPC bildet eine Molmassenverteilung, aus der sich das zahlenmittlere M_n sowie das gewichtsmittlere Molekulargewicht M_w des untersuchten Polymers ermitteln lässt. In Gleichung (5.1 und 5.2) findet sich die mathematische Definition der wichtigen Kenngrößen:

$$M_n = (\sum_{i=1}^n N_i \cdot M_i) \cdot (\sum_{i=1}^n N_i)^{-1} \quad (5.1)$$

$$M_n = (\sum_{i=1}^n m_i \cdot M_i) \cdot (\sum_{i=1}^n m_i)^{-1} \quad (5.2)$$

Der Quotient aus M_w und M_n wird als Polydispersitätsindex (PDI) bezeichnet. Er gibt Aufschluss über die Breite der Molmassenverteilung der Polymerprobe.

$$\text{PDI} = M_w \cdot (M_n)^{-1} \geq 1 \quad (5.3)$$

5.2.4 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

^1H - und ^{13}C -Spektren in $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, DMSO-d_6 , $\text{D}_2\text{O-d}_2$ und MeOH-d_4 wurden aufgenommen an einem DRX-400 Spektrometer der Fa. Bruker; mit einer Resonanzfrequenz von 400.13 MHz (^1H) und 100.63 MHz (^{13}C) - ausgestattet mit einem 5 mm Probenkopf. Die Probenkonzentrationen betragen 60-100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

5.2.5 Mikrowellensynthesen (MW-Synthesen)

Alle Polymere wurden in Discover Synthesemikrowellen der Fa. CEM hergestellt. Es wurden Glasbinde zwischen 10 mL (Glasphiolen) sowie 50-250 mL (SCHOTT-Flaschen) Gesamtvolumen verwendet. Die maximale MW-Leistung betrug 300 W. Die Geräte waren ausgestattet mit einem vertikal fokussierten Infrarotsensor zur kontinuierlichen Temperaturüberwachung, einer Druckgaskühlung sowie einem Magnetührwerk. Die Reaktionsüberwachung erfolgte rechnergesteuert.

5.2.6 Fotopolymerisation (LC, engl. *light curing*)

Die Fotopolymerisationen der lichthärtenden Methacrylamid-Harzgemische an Dentintemplaten wurden über einem Eis- oder Wasserbad mit der luftgekühlten Polymerisationslampe Heraflash (300 W) der Fa. Heraeus durchgeführt.

Bei Fotopolymerisationen auf Glasobjektträgern sowie Untersuchungen an dentalen Adhäsiven wurde mit dem Breitbandspektrum-Polymerisationsgerät Bluephase (385-515 nm, 1,100 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-1}$) der Fa. Ivoclar Vivadent gearbeitet.

5.2.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

REM-Aufnahmen wurden durchgeführt an einem Hitachi S4500 Gerät im niedrig-kV Aufnahmemodus mit einer Beschleunigungsspannung von 1 kV.

5.2.8 Röntgen-Fotoelektronenspektroskopie (XPS)

EDX-Spektren wurden aufgenommen an einem Oxford Link Isis System mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV.

5.2.9 Thermogravimetrische Analyse (TGA)

Thermogravimetrische Untersuchungen wurden durchgeführt an einem STA 409- Thermogravimeter der Fa. Netzsch bei einer Heizrate von $10\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$ und einer Atmosphäre aus synthetischer Luft.

5.2.10 Ultraviolett-/visuelle Licht-Spektroskopie (UV/Vis)

UV/Vis-Spektren wurden aufgenommen an einem wassertemperierten (bei 25°C) Specord 210-Spektrometer der Fa. Analytik Jena im Bereich $190\text{-}1,100\text{ cm}^{-1}$. Es wurden für alle Messungen ausschließlich Quarzglasküvetten verwendet, da mit Küvetten aus Polystyrol oder Polymethylmethacrylat leider keine kongruenten Ergebnisse zu erzielen waren. Die Auswertung der Messungen erfolgte nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz (vgl. **Gl.5.4**):

$$E_\lambda = (A_\lambda)^{-1} = \ln [I \cdot (I_0)^{-1}] = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (5.4)$$

Darin war E_λ die einheitenlose Extinktion E bei einer Wellenlänge λ (in $\text{nm} \equiv 10^{-9}\text{ m}$), A_λ die zugehörige Absorption, I die detektierte-, I_0 die eingestrahlte Intensität, ε der stoffabhängige Extinktionskoeffizient (in $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), c die molare Stoffmengenkonzentration (in $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) sowie d die Dicke der Glasküvette (in cm).

5.2.11 Sonstige Materialien und Geräte

AdheSE[®] One F: selbstätzendes (SE)-Dentaladhäsiv der Fa. Ivoclar Vivadent.

Airbrush-Komplettset „Standard class“ der Fa. Revell.

Automatische, verstellbare Pipetten „Research“ der Fa. Eppendorf.

Brutschränke „IH50“ der Fa. Noctua.

„Collagenase Substrate Kit“ der Fa. Fluka.

Diamantenbesetzte Kupferblattsäge „Isomet“ der Fa. Buehler.

Duran[®] pressure plus Glasflaschen der Fa. Schott.

Email Preparator der Fa. Ivoclar Vivadent.

Glaselektrode zur pH-Wert-Messung der Fa. Schott.

Glasflaschen, druckfest der Fa. Schott.

Glasobjektträger (75.9 x 25.4 mm \equiv 3“ x 1“) „Superior“ der Fa. Marienfeld.

Heizplatten „RCT classic“ und KPG-Rührer der Fa. IKA.

Hochvakuumpumpen „RZ6“ der Fa. Vacuubrand.
Inkubationsschüttler „TH15“ der Fa. E. Bühler.
Karl-Fischer-Titrator „TitroLine KF“ der Fa. Schott.
Laborwagen „XS105“ der Fa. Mettler-Toledo.
Materialtestgerät „Zwick HC“ der Fa. Zwick.
MMP-Assay Kit der Fa. Sensolyte, AnaSpec Inc.
Netzgerät EV231 der Fa. Consort.
Parafilm® der Fa. Pechiney Plastic Packaging Inc.
Rinderzähne, ganz; zur Verfügung gestellt von Fa. Ivoclar Vivadent.
Rotationsverdampfer „Laborota 4001 efficient“ der Fa. Heidolph Instruments.
RotiMark Molekulargewichtsmarker (10-150 kDa) der Fa. Carl Roth
Schleifpapier unterschiedlicher Körnung der Fa. Buehler.
Sicherheitswerkbank der „Hepex™“-Reihe der Fa. Nuaire.
SDS-PAGE P8PS Mini Gel System der Fa. Owl.
Taumelschüttler Polymax 1040 der Fa. Heidolph Instruments.
Tetric EvoCeram® A3: Dentalkomposit der Fa. Ivoclar Vivadent AG.
Thermomixer der Fa. Eppendorf.
Trockenschränke der Fa. Heraeus Instruments.
Ultraschallbäder „91631“ der Fa. Bioblock Scientific.
Vortex „3“ der Fa. IKA.
Zentrifuge „Z300“ der Fa. Hermle.

5.3 Herstellungsvorschriften

5.3.1 Puffer und Lösungen

APS-Lsg. (Ammoniumpersulfat-Lsg. für die SDS-PAGE): Ammoniumpersulfat (APS, 4.00 g) wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (10.0 mL) gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Citratpuffer: Zitronensäure-Monohydrat ($\text{CitOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 100 mmol, 21.01 g) und Calciumacetat-Monohydrat ($\text{Ca}(\text{OAc})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, 5 mmol, 0.88 g) wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (1.00 L) gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde der pH-Wert mit einer steril-filtrierten ($0.2\ \mu\text{m}$ Filter) Natriumhydroxid-Lsg. ($1.0\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) auf $\text{pH} = 6.30$ eingestellt.

CPD-Puffer (Citrat-Phosphat-Dextrose): Natriumzitrat-Dihydrat ($\text{Na}_3\text{Cit}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 90 mmol, 26.47 g), Zitronensäure-Monohydrat ($\text{CitOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 16 mmol, 3.36 g) sowie Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 16 mmol, 2.50 g) wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (1.00 L) gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde unter sterilen Bedingungen Dextrose (142 mmol, 25.58 g) zugegeben und der pH-Wert der Lsg. mit einer steril-filtrierten (0.2 μm Filter) Natriumhydroxid-Lsg. ($1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) auf den physiologischen Blut-pH-Wert von 7.38 eingestellt.

Modifizierter HEPES-Puffer:^f Natriumchlorid (NaCl , 140 mmol, 8.18 g), Kaliumchlorid (KCl , 2.7 mmol, 201 mg) sowie 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES, 3.8 mmol, 906 mg) wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (1.00 L) gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde unter sterilen Bedingungen der pH-Wert der Lsg. mittels einer steril-filtrierten (0.2 μm -Filter) Natriumhydroxid-Lsg. ($1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) auf $\text{pH} = 7.38$ eingestellt. Dieser Puffer wurde sowohl ohne, als auch mit Zusatz von Ca^{2+} -Ionen durch Calciumacetat-Monohydrat ($\text{Ca}(\text{OAc})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, 5 mmol, 0.88 g), eingesetzt.

Kochsalzlg. (isotonisch): Natriumchlorid (NaCl , 150 mmol, 8.77 g) wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (1.00 L) gelöst und sterilisiert (autoklaviert).

Lower-Tris-Puffer für SDS-PAGE (4x): Trizma[®]-Base (60.55 g), , Natriumdodecylsulfat (SDS, 4.0 g) wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 1,000 mL aufgefüllt und der pH-Wert mit einer steril-filtrierten (0.2 μm Filter) NaOH -Lsg. auf 6.80 eingestellt. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank (4°C).

PBS-Puffer (engl. *phosphate buffered saline*): Natriumchlorid (NaCl , 150 mmol, 8.77 g) und Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 10 mmol, 1.56 g) wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (1.00 L) gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde unter sterilen Bedingungen der pH-Wert der Lsg. mittels einer steril-filtrierten (0.2 μm Filter) Natriumhydroxid-Lsg. ($1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) auf $\text{pH} = 6.80$ eingestellt.

^f Aus messtechnischen Gründen ohne die sonst üblichen $5.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ethylendiamintetraacetat (EDTA), da dieses selbst als starker MMP-Inhibitor wirksam wäre.

SBF-Puffer (engl. *simulated body fluid*): Natriumchlorid (NaCl, 150 mmol, 8.77 g), Calciumchlorid (CaCl₂, 2.5 mmol, 0.28 g), 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure-Natriumsalz (Na-HEPES, 10 mmol, 2.60 g), Zinkchlorid (ZnCl₂, 50 µmol·L, 7 mg) und Natriumazid (NaN₃, 3.0 mmol, 195 mg) wurden in H₂O_{bidest.} (1.00 L) gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde unter sterilen Bedingungen der pH-Wert der Lsg. mittels einer steril-filtrierten (0.2 µm Filter) Natriumhydroxid-Lsg. (1.0 mol·L⁻¹) auf pH = 7.30 eingestellt.

SDS-PAGE-Laufpuffer (10x): Trizma[®]-Base (30.2 g), Glycin (Gly, 144.2 g), Natriumdodecylsulfat (SDS, 10.0 g) wurden mit H₂O_{bidest.} auf 1,000 mL aufgefüllt. Der Laufpuffer wurde vor dem Gebrauch mit H₂O_{bidest.} (1 : 10 Vol./Vol.) verd.; die Lagerung erfolgte im Kühlschrank (4°C).

SDS-PAGE-Probenauftragspuffer: Wässrige Tris-HCl-Lsg. (1.0 mol·L⁻¹, 1.0 mL, pH = 6.80), wässrige SDS-Lsg. (20 Gew.%, 2.0 mL), wässrige Glycerinlsg. (87 Gew.%, 2.3 mL) und Bromphenolblau (20.0 mg) wurden mit H₂O_{bidest.} auf 8.00 mL aufgefüllt. Die fertige Lsg. wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Upper-Tris-Puffer für SDS-PAGE (4x): Trizma[®]-Base (181.7 g), Natriumdodecylsulfat (SDS, 4.0 g) wurden mit H₂O_{bidest.} auf 1,000 mL aufgefüllt und der pH-Wert der Lsg. mit einer steril-filtrierten (0.2 µm Filter) NaOH-Lsg. auf 8.80 eingestellt. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank (4°C).

5.3.2 Herstellung von Nährlösungen

Das Standard-I-Nährbouillonpulver (25.0 g) wurde in H₂O_{bidest.} (1.00 L) gelöst und autoklaviert (15 min bei 121°C). Der pH-Wert (spezifiziert pH = 7.5 ± 0.2 bei 25°C) der gelblich-braunen, klaren Lsg. wurde kontrolliert und, in Abhängigkeit von der verwendeten Bakterienart, mittels einer steril-filtrierten (0.2 µm Filter) Natriumhydroxid-Lsg. (1.0 mol·L⁻¹) auf pH = 7.38 (*S. aureus*, *E. coli*) oder pH = 6.80 (*S. mutans*) eingestellt.

5.3.3 Herstellung und Verwendung von Nähragar

Das Standard-I-Nährbouillonpulver (25.0 g) wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (1.00 L) gelöst, Agar zugesetzt (1.50 g \equiv 1.5 Gew.%), die resultierende Lsg. auf SCHOTT-Flaschen (300 mL) verteilt, autoklaviert (20 min bei 121°C) und bis zur Benutzung im Kühlschrank (4-8°C) aufbewahrt, wo sie gelierte. Vor Gebrauch wurden die sogenannten „Fruchtzwerge“ langsam (über 10-15 min) in einer Mikrowelle (bei 150 W) erwärmt und so verflüssigt. Dabei wurden die Flaschen alle 2-3 min herausgenommen und geschüttelt, um Temperaturspitzen und die daraus resultierende braune Verfärbung zu unterbinden. Vor der Anwendung auf lebenden Bakterien wurde das Nähragar im Wasserbad auf unter 42°C temperiert. Pro PETRischalen-Füllung wurden ca. 30 mL flüssiges Nähragar benötigt.

5.3.4 Herstellung von Erythrozytenkonzentraten

Kleine Portionen vom frischen, ungepökelten Schweineblut (20 mL) wurden aus dem Kühlschrank (4-8°C) entnommen und 20 min lang bei 4,000 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ in einer Zentrifuge (8-12°C) abgesetzt (beschleunigte Blutsenkung). Der klare, gelblich-rote Plasmaüberstand wurde verworfen, das lebende Erythrozytensediment wurde mit kühltschrankkalter, isotonischer Kochsalzlsg. (10 mL) aufgefüllt, vorsichtig resuspendiert und nochmals zentrifugiert (4,000 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$); der erhaltene Überstand wurde verworfen. Diese Waschprozedur wurde so lange wiederholt (8-10 mal), bis der Überstand niedrigviskos-wässrig und frei von jeglicher Farbgebung war. Das finale Erythrozytensediment wurde in kühltschrankkaltem CPD-Puffer (10 mL) resuspendiert, auf RT gebracht und sofort verwendet. Alternativ konnten die so hergestellten Erythrozytenkonzentrate für max. 3 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden; die benötigten Mengen sollten aber nur sehr langsam aufgewärmt werden.

5.3.5 Herstellung von Dentintemplaten aus Rinderzähnen

Ganze Rinderzähne wurden mittels einer Präzisionsdrahtsäge in drei definierte Probenkörper zerteilt: horizontal zur Zahnwuchsrichtung herausgeschälte Dentinstücke ohne Schmelzanteil (Typ A; längs, 1.0 ± 0.1 mm, 25 ± 8 mg^s), in horizontal zur Zahnwuchsrichtung geschnittene, dünne Scheiben mit Schmelzrand

^s Die Gewichtsspezifikationen wurden an bereits demineralisierten Dentintemplaten ermittelt.

(Typ B; längs, 1.5 ± 0.2 mm, 50 ± 13 mg) sowie in vertikal zur Zahnwuchsrichtung geschnittene, dicke Vollscheiben mit Schmelzrand (Typ C; quer, 3.0 ± 0.5 mm, 100 ± 20 mg) (vgl. **Abb.3.30**).

Um eine hitzeinduzierte Denaturierung des Dentins (Kollagen) zu unterbinden, wurde die gesamte Apparatur mit Wasser gekühlt (vgl. **Abb.5.1**). Zur Unterbindung jeglicher bakterieller Kontamination wurden die frisch gesägten Dentintemplate unter sterilen Bedingungen in wässrigen Ethanol (5 Vol.%) im Kühlschrank ($4-8^{\circ}\text{C}$) aufbewahrt. Jede Dentinscheibe wurde unmittelbar vor Gebrauch mit reichlich sterilen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mindestens 30 min lang abgespült und mit ölfreier Druckluft verblasen.



Abb.5.1: Wassergekühlte 0.3 mm-Drahtsäge zum Schnitt von Rinderdentinscheiben.

5.3.6 Herstellung von Piraña-Lösung (CARO'sche Säure)

Konzentrierte Schwefelsäure ($\text{H}_2\text{SO}_{4,\text{cc}}$, 90 mL) wurde langsam entlang eines Glasstaabs unter Kühlung eines Wasserbads ($4-8^{\circ}\text{C}$) in eine konzentrierte wässrige Lsg. von Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 30%, 30 mL) gegeben und vermischt. Die Lsg. wurde vor der Verwendung auf 25°C abgekühlt. CAVE: Kein Arbeiten mit metallhaltigen Gegenständen (Spatel etc.), es besteht Explosionsgefahr!

5.3.7 Darstellung der Polymethacrylat-Harzmischungen

Die Monomere Glycerindimethacrylat (GDMA), Bisphenol A glyzidyldimethacrylat (*bis*GMA, BOWEN's Harz), Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA), Urethan-dimethacrylat (UDMA), Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Hydroxyethyl-methacrylat-phosphat (HEMA-P) wurden in unterschiedlicher Zusammensetzung

(vgl. **Tab.5.2**) unter Lichtausschluss (alternativ unter Gelblicht) manuell vermischt und in lichtgeschützten Gebinden für 10 min im US homogenisiert. In konstanten Anteilen wurden 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT, 0.03 Gew.%) als Doppelbindungsstabilisator und Irgacure 651[®] als Fotoinitiator (2.5 gew. %) zugesetzt. Nach Zugabe von Ethanol (20-25 Gew.%) wurde nochmals manuell vermischt und weitere 10 min im US homogenisiert. Die Harzmischungen wurden als gelbliche, mittelviskose Lsg. erhalten. Bis zum Gebrauch wurden diese unter dunklen, trockenen Bedingungen im Kühlschrank (4-8°C) aufbewahrt.

Tab.5.2: (entspricht **Tab. 3.18**) Zusammensetzung der Methacrylat-Harzmischungen (#1--4) in Ethanol (EtOH). Zugesetzt wurden Irgacure 651[®] als Fotoinitiator (2.5 Gew.%) sowie BHT als Doppelbindungsstabilisator (0.03 Gew.%).

Harz- gemisch #	Gehalt an Methacrylatmonomer [Gew.%]						EtOH [Gew.%]
	HEMA ^a	HEMA-P ^b	GDMA ^c	TEGDMA ^d	bisGMA ^e	UDMA ^f	
1	20	0	25	25	10	0	20
2	20	0	25	30	5	0	20
3	15	10	10	0	30	10	25
4	10	10	25	25	0	10	20

[a] Hydroxyethylmethacrylat, [b] Hydroxyethylmethacrylat-phosphat, [c] Glycerindimethacrylat, [d] Triäthylenglykoldimethacrylat, [e] Bisphenol-A glyzidyldimethacrylat (BOWEN's Harz), [f] Urethandimethacrylat.

5.3.8 Beschichtung des Rinderdentin-Templats mit den Polymethacrylat-Harzmischungen und Fotopolymerisation

Die Polymethacrylat-Harzmischungen wurden bei RT in dünnen Schichten unter Verwendung eines Mikrobürstchens in das mit ölfreier, trockener Druckluft leicht vorgetrocknete Rinderdentin-Templat (Zahnscheibe) einmassiert (20-40 s) und leicht verblasen (10-20 s). Die Lichthärtung erfolgte unmittelbar nach der Beschichtung in einer eis- und luftgekühlten (zur Temperaturkonstanz) UV-Fotopolymerisationskammer (Heraflash) der Fa. Heraeus mit Polymerisationsdauern von 30-180 s.

5.3.9 Entfernung des Rinderdentin-Templats

Das Templat aus Rinderdentin wurde nach erfolgter Fotopolymerisation mittels folgender, dreistufiger Prozedur (i-iii) vollständig entfernt: (i) Ätzung mit verd.

Salpetersäure (0.8 M) für 2-6 h bei RT, (ii) Behandlung mit einer gepufferten, bakteriellen Kollagenase-Lsg. des obligat anaeroben Gasbranderregers (*Clostridium histolyticum Typ I*, 10 mg·mL⁻¹) in Citratpuffer (0.1 M, pH=6.3) bei 37°C binnen 3-4 Tagen und (iii) einmaliges Waschen mit einer gesättigten, wässrigen Harnstoff-Lsg. bei RT. Jegliches Schütteln der probenhaltigen Lsg. und unnötige Proben Transporte wurden strikt vermieden.

5.3.10 Nanopartikelbeschichtung und Silanisierung der Oberflächentexturen

Die eingesetzten SiO₂-Nanopartikel wurden nach der Vorschrift von STÖBER *et al.*³¹⁵ mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 150 nm und einer Polydispersität von 1.05 hergestellt. Sie wurden in Form einer wässrigen Dispersion (5 Gew.%) für 10 min mit den auspolymerisierten, künstlichen Oberflächentexturen kontaktiert und an der Luft bei RT getrocknet. Eine geringe Menge des flüssigen 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltriethoxysilans (100 µL) wurde in verd. Ethanol (10:90, v/v, 400 µL) im US (10-60 s) suspendiert und unmittelbar vor Gebrauch, mit einer katalytischen Menge einer wässrigen Kaliumhydroxid-Lsg. (0.1 M, 5 µL) aktiviert.

Die resultierende Suspension wurde kurz und bei RT mit der künstlichen Oberflächentextur kontaktiert (30-60 s) und anschließend sehr vorsichtig mit einem sanften Luftstrom verblasen.

Die so behandelten Proben wurden bei 37°C über Nacht getrocknet.

5.3.11 Herstellung von Gelen für die SDS-PAGE

Das Trenngel wurde bis 1.0 cm unterhalb des Endes der Probenkammer gegossen. Anschließend wurde mit Isopropanol (iPrOH) überschichtet, um eine stabile Trennlinie zu erhalten. Nach einer Polymerisationszeit von ~ 45 min wurde das iPrOH entfernt und mit H₂O_{bidest.} gespült. In den getrockneten Plattenzwischenraum wurde anschließend das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Die Zusammensetzung der hergestellten Gele findet sich in **Tab.5.3**.

Tab.5.3: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel; hergestellt für SDS-PAGEs. Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von jeweils zwei Gelen.

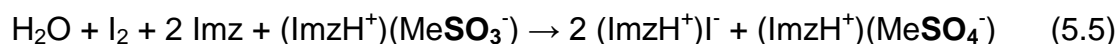
Komponente	Gehalt [mL]	
	Trenngel-10 %	Sammelgel-4 %
Lower Tris-Puffer, 4x	3.0	-
Upper Tris-Puffer, 4x	-	0.75
H ₂ O _{bidest.}	6.0	1.8
Acrylamid / bisAcrylamid, 40 %	3.0	0.45
APS-Lsg.	0.030	0.015
TEMED-Lsg.	0.015	0.006

Die zu färbenden Gele wurden über Nacht in einer Lsg. aus 40 % Ethanol, 10 % konz. Essigsäure und 290 mg·L⁻¹ Coomassie® Brilliant Blau R-250 fixiert und gefärbt. Zum Entfärben des Hintergrundes wurde eine Lsg. aus 25 % Ethanol und 8 % konz. Essigsäure verwendet.³¹⁶

5.4 Methoden

5.4.1 Bestimmung des Wassergehalts von Lsm. mittels KARL-FISCHER-Titration

Dieses Titrationsverfahren basiert auf der Reduktion von elementarem Iod (I₂) zu Triiodid (I₃⁻) in einer methanolischen Lsg. von Schwefeldioxid (SO₂) in Gegenwart und unter Verbrauch von Wasser. In der coulometrischen Variante wird I₂ durch anodische Oxidation regeneriert. Die Reaktion ist auf einen sauren Methylsulfitester (MeSO₃⁻) als RedOx-Zwischenstufe sowie eine nicht-nukleophile Base wie bspw. Imidazol (C₃H₄N₂; Imz) als unreaktives Kation (ImzH⁺) angewiesen. Im Verlauf der Reaktion wird das Sulfit des sauren Esters zu Sulfat oxidiert (vgl. **Gl. 5.5**).



Die Wasserbestimmung nach Karl-Fischer funktioniert nicht mit Ketonen oder Ketylen (bspw. Aceton), da diese über ihre Enolform unter Monoaddition von I₂ abreagieren.

5.4.2 Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit in wässrigen Medium (MIC-Tests)

Hierzu wurde die keimspezifische minimale Inhibierungskonzentration (MIC, engl. minimal inhibitory concentration) von wasserlöslichen oder gut wasser-suspendierbaren, niedermolekularen und polymeren Substanzen bestimmt. Zunächst wurden unter sterilen Bedingungen Stammlsg. der eingesetzten Bakterien aus einem Stammellet (erhalten von DSMZ) im Standard-Nährbouillon (50 mL) bei pH = 7.38 (*S. aureus*, *E. coli*), bzw. bei pH = 6.80 (*S. mutans*) angesetzt. Nach 12-stündiger Inkubation bei 37°C betrug die Erregerkonzentration der nun trüben Bakteriensuspension ca. 10^{10} Keime·L⁻¹. Eine Probe der potentiell antimikrobiellen Substanz (20.0 mg) wurde in sterilem Nährmedium (4.00 mL) in FALCON-Tubes (10 mL) gelöst / via US gründlich suspendiert (mindestens 3 min). Aus dieser „Probe 0“ wurde eine Verdünnungsreihe in Nährmedium mit jeweils halbiertes Konzentration in der nächsten Probe hergestellt, so dass alle Proben der Reihe wiederum in 4.00 mL Nährmedium vorlagen. In **Tab.5.4** sind die so erzeugten Konzentrationen und zugehörige Probennummern zusammengefasst.

Tab.5.4: Probennummern und zugehörige Konzentrationen (in mg·mL⁻¹ und ppm) der im Rahmen der durchgeführten MIC-Tests verwendeten Verdünnungsreihe von wasserlöslichen oder wässrig suspendierbaren Testsubstanzen in Nährmedium.

Probe #	Konzentration		Probe #	Konzentration	
	[mg·mL ⁻¹]	[ppm] ^a		[mg·mL ⁻¹]	[ppm] ^a
0	5.00000	5000.00	6	0.07813	78.13
1	2.50000	2500.00	7	0.03906	39.06
2	1.25000	1250.00	8	0.01953	19.53
3	0.62500	625.00	9	0.00977	9.77
4	0.31250	312.50	10	0.00488	4.88
5	0.15625	156.25	11	0.00244	2.44

[a] 1.0 [mg·mL⁻¹] entspricht 1.0 ppm, 0.0001 % oder auch 0.001 ‰.

Jede Probe der Verdünnungsreihe wurde mit der Bakterienstammlsg. (20.0 µL) angeimpft und für 12 h bei 37°C im Schüttelinkubator (ca. 1 Hz Schüttelfrequenz) belassen. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit substanz- und bakterienfreien Puffer (1-2 Negativproben pro Messreihe) sowie eine positive Bewuchskontrolle mit

bakterienhaltigen, aber substanzfreien Proben (1-2 Positivproben pro Messreihe) durchgeführt. Diese wurden simultan mit der substanzhaltigen Verdünnungsreihe inkubiert. Der MIC-Test wurde ausgewertet, sobald die Positivkontrollen einen bakteriellen Bewuchs (Trübung durch gebildete Bakterienkolonien) zeigten.

Die Gültigkeit der Testreihe war gegeben, wenn die Negativkontrollen nach erfolgter Inkubation keinerlei bakteriellen Bewuchs (keine Trübung) aufwiesen. In Vergleich mit der Positivprobe wurde die Minimale Inhibierungskonzentration (MIC) definiert als diejenige Konzentration, bei der 99.9 % der Erreger am Wachstum gehindert werden. Die Bestimmung der MIC-Konzentration erfolgte mittels Absorptionsmessung im UV/Vis bei einer Wellenlänge von 600 nm: A_{600} ; dabei war das Absorptionsverhältnis ($A_{\text{Probe}} \cdot A_{\text{Ref}}^{-1}$) zwischen Probe und Positivreferenz größer 100.

5.4.3 Bestimmung der medianen hämolytischen Konzentration in wässrigen Medium (HC₅₀-Tests)

Hierzu wurden die niedermolekularen Referenzsubstanzen sowie die telechelen Polyoxazoline mit einer Konzentration von $10.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (entsprechend 10,000 ppm) in CPD-Puffer (800 μL) gelöst und eine Verdünnungsreihe in EPPENDORF-Cups (2.0 mL) erstellt, indem die Konzentration der nachfolgenden Probe jeweils um die Hälfte reduziert wurde (vgl. **Tab.5.4**). Als Negativreferenz diente reiner CPD-Puffer ohne jegliche Substanzzugabe, als Positivkontrolle diente CPD-Puffer, der zusätzlich mit dem niedermolekularen, quartären Ammoniumalkyl *N*-Dodecyl-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid (DTAC) in derselben Konzentration ($10.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) versetzt wurde. Die Verdünnungsreihe inklusive der Positiv-/Negativkontrollen wurden mit einer geringen Menge des Erythrozytenkonzentrats (200 μL) versetzt und für 1 h bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden alle Proben bei RT kurz zentrifugiert ($13,500 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min). Der braune, rötlich gefärbte bis farblose Überstand wurde bis zum Unterschreiten einer UV/Vis-Extinktion von 1 bei 541 nm und 25°C mit CPD-Puffer weiterverdünnt (1:20-1:40), das sedimentierte Resterythrozyten-Pellet wurde verworfen. Der Hämolysegrad in der jeweiligen Probe war direkt proportional zur Hämoglobinkonzentration in Lsg. und damit zur gemessenen Absorption bei 541 nm, A_{541} . Die Stoffkonzentration, bei der 50 Gew.% der zugesetzten Erythrozyten zerstört wurden (HC₅₀) wurde mittels einer linearen

Fitfunktion der einzelnen Absorptionswerte aus der Verdünnungsreihe ermittelt, die um den Absorptionswert der Negativkontrolle korrigiert wurden.

5.4.5 Durchführung der Mikrodilutionstests an tierspezifischen Bakterientypen

Das zu untersuchende, antimikrobielle Poly-2-oxazolin wurde in sterilem, destilliertem Wasser gelöst (10 Gew.%) und damit eine Verdünnungsreihe in MÜLLER-HINTON Nährbouillon hergestellt; die Testkonzentrationen betragen hierbei $256 \cdot 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die Polymerproben wurden mit multiplen tierspezifischen Bakterienstämmen in einer Erregerkonzentration von 10^9 Keimen $\cdot \text{mL}^{-1}$ angeimpft und bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Minimalen Hemmkonzentrationen (MIC) nach 24h (MIC_{24}) mittels einer UV/Vis-Trübungsgrad-Bestimmung (\equiv Konzentration an Bakterienkolonien) ermittelt; alle Werte wurden mittels Doppelbestimmung verifiziert.

5.4.6 Ermittlung der dentalrelevanten Haftwerte auf Dentin und Schmelz

Die Poly-2-oxazolinadditive wurden in geringen Anteilen (2.50 Gew.%) AdheSE[®] One F zugesetzt (unter Gelblecht) und mindestens 15 min im US homogenisiert. Als niedermolekulare, QUART-Vergleichsverbindung wurde *N,N*-Dimethyldodecylamin in AdheSE[®] One F verwendet (DDA, analog mit 2.50 Gew.%). Die Adhäsive wurden gemäß den Verarbeitungshinweisen der Ivoclar Vivadent AG auf exponierten bovinem/humanem Dentin und Schmelz appliziert: aufgetragen, 20 s lang mit einem Mikrobürstchen verrieben, mit einem starken Druckluftstrahl verblasen, bis sich die Adhäsivoberfläche nicht mehr bewegte (ca. 10-15 s) und mit einer Blaulichtlampe (10s, $P > 500 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-1}$) auspolymerisiert. Das Dentalkomposit Tetric EvoCeram[®] A3 wurde als senkrecht auf der Adhäsivoberfläche stehender Stempel in zwei Lagen aufgetragen und mittels Blaulicht auspolymerisiert (20-40 s). Die Haftwerte auf Dentin und Schmelz wurden durch Abscherung an einem Zwick HC bestimmt.

5.4.7 Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Bestimmung der enzyminhibierenden Effektivität beim Abbau von Gelatine

Die reduzierende Natriumdodecylsulfat (SDS) Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde durchgeführt nach der Vorschrift von LAEMMLI.²⁴² Das antimikrobielle, QUART *N*-Dodecyl-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid (DTAC, $65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)²³⁸ sowie Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz-Dihydrat ($\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$, $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) wurden als niedermolekulare Vergleichs-Enzyminhibitoren eingesetzt. Das OH-terminierte,

methylsilylat-initiierte Poly-2-methyloxazolin (#1, Me-PMOX₃₇-OH, $M_n = 3200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_w = 3,750 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, PDI=1.16) wurde als makromolekulare, nicht-QUART-funktionalisierte Referenz verwendet. Für die Bestimmung der Inhibitionseffektivität wurde eine Lsg. des potentiellen Inhibitors (100 μL , in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$) mit einer Lsg. bakterieller Typ I Kollagenase aus *C. histolyticum* (Gasbranderreger, 150 μL , 2.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.016 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, berechnet mit $M_{\text{Kollagenase}} = 125 \text{ kDa}$) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ versetzt.

Jedes der Reaktivgemische (der 1-sten Stufe) wurde in einem temperierten Thermomixer vorinkubiert (30 min, 37 °C, 1,400 rpm). Anschließend wurde eine geringe Menge Gelatinelsg. (1.0 mL, 2.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, in 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Citratpuffer, pH=6.30) zugesetzt und die Mischung (der 2-ten Stufe) nochmals inkubiert (5 min, 37°C, 1,400 rpm). Es wurde jeweils eine Probe entnommen (17.0 μL), mit 2x-Beladepuffer vermischt (17 μL), kurz aufgeheizt (96 °C, 10 min) und mit CLELAND's Reagenz³¹⁷ Dithiothreitol (DTT, 1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 3.4 μL) versetzt. Die so erhaltenen Reaktionsmischungen (der 3-ten Stufe) wurden auf ein 10 %-iges *tris*(Hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)-Glycingel aufgetragen, als Marker wurde Roti-Mark 10-150 kDa (6 μL) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde durchgeführt an einem P8PS Mini Gel System und einem EV231 Netzgerät. Der Lauf im Sammelgel wurde mit einer konstanten Spannung (60 V) durchgeführt. Nach dem Erreichen des Trenngels (Laufende bei Austreten der Bande aus dem Gel) durch die Bromphenolblau-Bande wurde die Spannung erhöht (160V).

Für die Coomassie[®]-Färbung wurden die gelaufenen Gele über Nacht in einer essigsauen Coomassie-Brilliant-Blau R-250-Lsg. (290 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, in 40:10 Vol./Vol., Ethanol : Eisessig; $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ad 100) geschwenkt. Entfärbt wurde in einem weniger sauren Milieu (25:8 Vol./Vol., Ethanol : Eisessig; $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ad 100), bis eine vollständig farblose Spüllösung erhalten wurde.³¹⁶

5.4.8 Kollagenabbau-Tests an Probenkörpern aus Rinderzahn-Dentin

Mittels einer wassergekühlten Diamantdrahtsäge wurden drei unterschiedliche, standardisierte Dentin-Probenkörpertypen hergestellt (*Typ A-C*, vgl. **Abb.3.18**). Die Probenkörper wurden mit verd. Salpetersäure vollständig demineralisiert (5.0 Vol.%, 6-12 h), mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gründlich abgespült und im steril autoklavierten Citratpuffer ad pH = 6.30 neutralisiert. Zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen wurden die Probenkörper im sterilen Citratpuffer im Kühlschrank (4-8°C) aufbewahrt und binnen

eines Tages aufgebraucht. Die nachfolgenden Bearbeitungsschritte wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Unmittelbar vor der Verwendung wurde jeder Probenkörper mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gründlich abgespült und mit ölfreier Druckluft bis zur Trockene verblasen (ca. 20-30 s). Ein standardisiertes Volumen der inhibitorhaltigen Pufferlsg. wurde, je nach Größe des Probenkörpers, beidseitig aufgetragen (Eppendorf-Pipette), mittels eines Mikrobürstchens kreisförmig leicht verrieben (20 s) und bis zur Trockene verblasen (ca. 20 s) (vgl. **Tab.5.5**).

Tab.5.5: Standardmäßig aufgetragene Inhibitorlösungsvolumina in Citratpuffer in Abhängigkeit vom eingesetzten Dentinprobenotyp (*Typ A-C*).

Typ	Dicke [mm]	Gewicht [mg]	Volumen	
			pro Seite	insgesamt
			[μL]	
A	1.0 ± 0.1	25 ± 8	5	10
B	1.5 ± 0.2	50 ± 12	10	20
C	3.0 ± 0.5	100 ± 20	20	40

Als negative Referenz wurde Citratpuffer ohne Zugabe jeglicher Enzyminhibitoren verwendet und in einer analogen Prozedur in die Dentinprobenkörper eingebracht. Alle Probenreihen (positiv + negativ) wurden gleichzeitig mit einer bakteriellen *Clostridium histolyticum Typ I* Kollagenaselsg. in Citratpuffer ($V = 2.0 \text{ mL} \cdot \text{Probe}^{-1}$, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{pH} = 6.30$) überschichtet und 48 h lang (einzelne Testreihen bis zu 168 h lang) bei 37°C ohne Schütteln in abgedeckten Glaspetrischalen inkubiert. Der Fortschritt des Kollagenabbaus wurde alle 24 h unter Einsatz von Durchlicht fotografisch dokumentiert, zudem wurde der Pufferpegel überprüft und verdampfte Pufferlsg. mittels Eppendorf-Pipette auf 2.0 mL pro Probe wieder aufgefüllt.

5.4.9 Marginale Adaption in Rinderdentin

Die jeweilige Harzformulierung auf Basis eines SE-Dentaladhäsives (AdheSE[®] One F) wurde in einer künstlich erzeugten Kavität eines Rinderzahns aktiv einmassiert (20 s, mit Mikrobürstchen) und mit Blaulicht auspolymerisiert (10 s, $650 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$). Es wurde ein Komposit (Tetric EvoCeram[®] A3) in zwei Schichten aufgebracht und mit Blaulicht (20 + 40 s, $650 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) auspolymerisiert.

5.4.10 Oberflächenbeschichtungen mit Dentaladhäsiven an Glasobjektträgern

Glasobjektträger wurden mit trockenem Aceton ($\text{H}_2\text{O} < 100 \text{ ppm}$) entfettet und mit ölfreier Druckluft getrocknet. Die Gläser wurden kurz eingetaucht (5 s) in eine alkoholisch-wässrige Suspension (60:30 Vol./Vol. *iso*Propanol : Ethanol, $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ad 100) von 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat ($1.0 \text{ Gew.}\%$, $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.99 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), die unmittelbar vor Benutzung mit Kaliumhydroxid (KOH , $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) aktiviert wurde. Die Objektträger wurden an einem trockenem Filterpapier abgestreift und in einen mit Ar gefüllten Färbetrog aus Glas überführt. Die Doppelbindungsfunktionalisierung der Glasoberflächen durch ein 30 min „ausbacken“ bei 37°C finalisiert. Der nachfolgend beschriebene Mischvorgang muss unter Ar und Gelblicht (oder Blaulichtfilter) ausgeführt werden: das telechele, AMA-funktionalisierte Poly-2-methyloxazolin DDA-X-PMOX₃₇-AMA (**#13**) wurde in zwei Gewichtsanteilen (2.50 und 5.00 Gew.%) dem kommerziellen erhältlichen selbstätzendem (SE)-Dentaladhäsiv AdheSE[®] One F zugesetzt und im US und 15 min lang bei RT homogenisiert. Die klare, gelbliche Formulierung wurde in einem definierten, rhombusförmigen Testbereich ($A = 516 \text{ mm}^2$) der doppelbindungsfunktionalisierten Glasobjektträger aufgetragen und mittels Blaulicht ($10\text{-}20 \text{ s}$, $650\text{mW}\cdot\text{cm}^{-1}$, $\lambda > 380 \text{ nm}$) auspolymerisiert (vgl. **Abb.5.2**). Als Vergleichssystem wurde AdheSE One F[®] eingesetzt und analog auspolymerisiert. Erhalten wurden leicht gelbliche jedoch transparente, vollständig an die Glasoberfläche anhaftende Dentaladhäsivfilme.

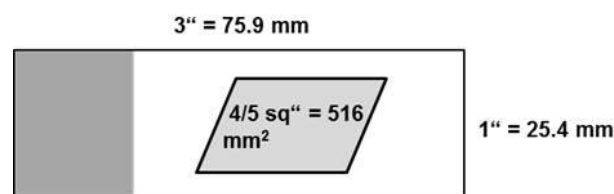


Abb.5.2 Darstellung des rhombusförmigen Testbereichs (grau, $A = 516 \text{ mm}^2$) auf dem doppelbindungsfunktionalisierten Glasobjektträger ($75.9 \times 25.4 \text{ mm}$). Die weiteren Größenangaben beziehen sich auf Zoll ($1'' = 25.4 \text{ mm}$).

5.4.11 Peptidfreisetzungssassay an menschlichen Dentalkollagen

Die Dentinproben wurden aus extrahierten menschlichen Weisheitszähnen hergestellt; der Zahnschmelz und das oberflächliche Dentin (ca. 2 mm) wurden mittels einer H_2O -gekühlten, diamantenbesetzten Kupferblattsäge allseitig entfernt.

Analog zum Dentinprobenotyp B wurden 1.0 mm dicke Zahnscheiben produziert, aus denen standardisierte, rechteckige Dentinfragmente (6.0 x 2.0 x 1.0 mm) hergestellt wurden (2-3 Fragmente pro Zahnscheibe). Diese wurden bei 25°C in einer Rührtrommel 18 h lang mit wässriger Phosphorsäure (10 Gew.%, pH = 1.0) demineralisiert. Vollständige Demineralisierung wurde über die Abnahme der Röntgenopazität in Vergleich zu einem Aluminiumkeil mit unterschiedlichen Stufendicken nachgewiesen. Gleichzeitig fiel die Dichte der Dentinfragmente von 2.1 auf 1.2 mg· μL^{-1} ab. Die vollständig demineralisierten Dentinfragmente wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gründlich abgespült und im Exsikkator über „wasserfreiem“ Calciumsulfat ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (für ca. 24 h). Die Dentinfragmente wurden mittels Präzisionswaage ausgewogen und 1 h lang in SBF-Pufferlsg. rehydriert. Die für die Untersuchung des polymeren Inhibitors eingesetzten Dentinfragmente wurden in zwei Konzentrationen an DDA-X-PMOX₃₇-AMA (#19, 5.0 und 15.0 Gew.%) in SBF-Pufferlsg. (V = 1.0 mL) bei 37°C vorinkubiert, entnommen und an einem SBF-getränkten Filterpapier abgestreift.

Die so behandelten Positivproben sowie unbehandelte Referenzfragmente wurden einzeln in sterile SBF-Pufferlsg. gegeben (1.0 mL); anschließend wurden alle Proben in versiegelten Gefäßen (Glasröhrchen) in einem Wasserbad bei 37°C für 30 Tage unter Schütteln (1 Hz) inkubiert. Nach 30 Tagen wurden die Glasröhrchen geöffnet, die Dentinfragmente entnommen, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gründlich abgespült und wiederum über wasserfreiem Calciumsulfat bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (für ca. 24 h); und schließlich die Restmasse der Dentinfragmente mittels Feinwaage bestimmt.

Die im Glasröhrchen verbliebenen SBF-Pufferlsg. wurden mit gleichen Mengen wässriger Salzsäure versetzt (HCl , 12.0 mol·L⁻¹), in Glasampullen versiegelt und 18 h lang bei 120°C zu den jeweiligen Aminosäuren hydrolysiert. Anschließend wurden die Glasampullen aufgebrochen und in einem mit wasserfreiem Calciumsulfat und Natriumhydroxid (NaOH) gefüllten Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz aufbewahrt. Dabei wurden sowohl Wasserdampf wie auch HCl-Gas absorbiert. Der Gehalt der α -Aminosäure L-4-Hydroxyprolin²⁶⁰ jedes einzelnen Hydrolysats wurde via UV/Vis-Spektroskopie bei $\lambda = 558 \text{ nm}$ quantifiziert.²⁵⁹

5.4.12 Quantitative Bestimmung der Aminogruppenkonzentration

Der Grad der Aminogruppenfunktionalisierung bei EDA-terminierten Poly-2-oxazolin (5-8) wurde bestimmt mittels eines quantitativen Assays unter Verwendung eines gelben Charge-Transfer-Komplexes mit 2,4,6-Trinitrophenol (TNP, Pikrinsäure). Hierfür wurde zuvor getrocknete Pikrinsäure (CAVE: Explosionsgefahr) in Dichlormethan gelöst (CH_2Cl_2 , 100 mL, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Das zu untersuchende EDA-terminierte, DDA-X-initiierte Poly-2-oxazolin (0.300 g) wurde in 5 mL der leicht gelblichen TNP-Lsg. in CH_2Cl_2 gelöst und sogleich in zuvor destillierten, trockenen Diethylether (Et_2O , 100 mL) ausgefällt. Das ebenfalls gelb gefärbte TNP-haltige PROX wurde sechsmal aus trockenem CHCl_3 in Et_2O umgefällt.

Nach dem letzten Umfällschritt wurde das Polymer bei 25°C mit einem Methanol/Triethylamin-Gemisch ($\text{MeOH} : \text{NEt}_3$, 1 : 1, Vol./Vol., 10.00 mL) extrahiert. Ein hydroxylterminiertes PROX wurde als negative Referenz verwendet und entsprechend behandelt. Die extrahierten, gelben MeOH/NEt_3 -Lsg. wurden unter UV/Vis-Kontrolle so lange verd., bis die gemessene Extinktion bei 25°C und der Wellenlänge von $\lambda_{\text{TNP}} = 358 \text{ nm}$ kleiner als 1 war (ca. 1:25-1:50).

Die Extinktion war proportional zur Aminogruppen- und zur TNP-Konzentration; der zur Kalkulation der Aminogruppenkonzentration benötigte Extinktionskoeffizient von TNP beträgt $\epsilon = 14,500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, die Dicke der Glasküvetten war $d = 1.00 \text{ cm}$.

5.4.13 Darstellung NH_2 -funktionalisierter Glasoberflächen, Aminogläser

Glasobjektträger wurden mit trockenem Aceton ($\text{H}_2\text{O} < 100 \text{ ppm}$) entfettet und mit ölfreier Druckluft getrocknet. Die Gläser wurden sehr kurz eingetaucht (3 s) in eine alkoholisch-wässrige Suspension (60:30 Vol./Vol. *iso*Propanol : Ethanol, $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest. ad 100}}$) von Trimethoxyaminopropylsilan (TMAPS, 1.0 Gew.%, $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.99 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), die unmittelbar vor Benutzung mit Kaliumhydroxid (KOH , $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) aktiviert wurde. Die Objektträger wurden an einem trockenem Filterpapier abgestreift und in einen mit Ar gefüllten Färbetrog aus Glas überführt. Der Nachweis der Aminogruppen erfolgte mit trockener Pikrinsäure in CH_2Cl_2 .

5.4.14 Quantitativer Inhibierungsassay an rekombinanten, humanen rhMMP-9

Mittels eines generischen MMP-Assay-Kits wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung steigender Konzentrationen des AMA-terminierten, DDA-X initiierten Poly-2-methyloxazolins (#6; DDA-X-PMOX₂₈-AMA, $M_n=2,700 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_w=3,200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, PDI=1.19) in Vergleich zur Inhibition einer wasserlöslichen, rekombinanten humanen (rh)MMP-9 Gelatinase ermittelt. Der Nachweis erfolgte durch die Spaltung eines Thiopeptidsubstates (R-S-S-R) unter Freisetzung einer Sulfhydrylgruppe (R-SH). Diese reagierte mit 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (CNPDS) unter Bildung eines gelben Produktes (2-Nitro-5-thiobenzoessäure, TNB). Die Extinktion von TNB wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie ($\lambda = 412 \text{ nm}$) an einer 96-Probenplatte ermittelt.

Die rhMMP-9 wurde unmittelbar vor der Durchführung des Inhibierungsassays mit Trypsin aktiviert ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 37°C , 2 h); anschließend (nach 2 h) wurde das Trypsin mittels eines aus Sojabohnen gewonnenen, spezifischen Trypsin-Inhibitors (Bestandteil des generischen MMP-9-Inhibierungskits) inaktiviert. Jede der 96 Probenpositionen enthielt aktive rhMMP-9-Gelatinase ($10 \mu\text{L}$, 19.6 ng pro Position) und eine Lsg. des potentiell MMP-inhibierenden Polymers DDA-X-PMOX₂₈-AMA (#6, $40 \mu\text{L}$). Die Mischung wurde zur Vermeidung einer vorzeitigen „Aktivitätsspitze“ vorinkubiert (20 min) und anschließend mit der fertigen Thiopeptidlsg. (CNPDS, $50 \mu\text{L}$, $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, bereits im Kit enthalten und im spezifischen Puffer vorgelöst) aufgefüllt. Die Reaktivmischung wurde kurz verrührt (30 s) und die Extinktion alle 10 min (insgesamt 60 min lang) per UV/Vis aufgezeichnet. Eine MMP-Inhibitor-freie Negativreferenz wurde jeweils mitvermessen und die resultierenden Extinktionswerte von den Werten der Positivproben subtrahiert. Zusätzlich wurden Vergleichskurven von Standardsubstanzen einer bekannten Aktivität mitaufgezeichnet. Alle rhMMP-9-Assays wurden jeweils in 5-facher Ausführung durchgeführt.

Die erhaltenen Messwerte wurden einer softwaregestützten, statistischen Evaluation (bspw. mittels StatGraphics® Centurion) unterzogen. Da die Datensätze die Normalitätskriterien erfüllten (standardisierte Kurtosis- und Verteilungsschiefe innerhalb akzeptabler Normalitätsparameter), wurde der prozentuale Grad der MMP-Inhibition - hervorgerufen durch DDA-X-PMOX₂₈-AMA - ermittelt mit Hilfe einer einmaligen Varianzanalyse (ANOVA) und eines anschließenden, TURKEY-Alphafehler-Kumulationstests mit einem multiplen Alpha-Niveau von $\alpha = 0.05$.

5.4.15 Untersuchung der antimikrobiellen Langzeit-Wirksamkeit von Dentaladhäsivoberflächen (Langzeit-Elutionstests)

Die DDA-X-PMOX₂₈-AMA-haltigen, auspolymerisierten Dentaladhäsivoberflächen (AdheSE One F[®]) auf Glasobjektträgern sowie die polymerfreien Referenzkontrollen aus AdheSE One F[®] wurden einzeln in Petrischalen mit H₂O_{bidest.} (V = 10.0 mL) überschichtet und unter Rühren (0,5 Hz) bei 37°C gewaschen. Das Wasser jeder Probe wurde täglich gewechselt. Jeweils nach 1, 2, 4, 6, 10, 20, 40, 50 und 101 Tagen wurden die beschichteten Glasobjektträger unter sterilen Bedingungen entnommen und mit ölfreier Druckluft verblasen/getrocknet. Es wurde eine Bakteriensuspension von kariogenen *S. mutans* in Nährmedium (pH = 7.38) mit einer Erregerkonzentration von ungefähr 10¹⁰ Keimen·L⁻¹ (ermittelt via UV/vis-Spektroskopie) hergestellt. Eine Probe dieser Suspension (40.0 mL) wurde vorsichtig zentrifugiert (10 min, RZB = 239 x-g), der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in temperierten, sterilen PBS-Puffer (25°C, 10.0 mL, pH = 7.38) resuspendiert. Daraus wurden 1.00 mL an Suspension entnommen und in 9.00 mL PBS-Puffer resuspendiert (1-ste Verdünnung).

Wiederum wurden 1.00 mL der 1-sten Verdünnung entnommen und mit 9.00 mL PBS-Puffer versetzt (2-te Verdünnung). Nach einer Resuspension wurde eine nahezu transparente Suspension erhalten. Eine Probe (1.00 mL) hiervon wurde entnommen, einmalig über Glaswolle filtriert und mit 9.00 mL steriler, isotonischer NaCl-Lsg. versetzt für eine finale, optisch klare Bakteriensuspension (3-tte und letzte Verdünnung), die ungefähr 10⁷ *S. mutans*-Keime·mL⁻¹ enthielt.

Die adhäsivbeschichteten, druckluftgetrockneten Glasobjektträger wurden unter sterilen Bedingungen einseitig (an der beschichteten Seite) mit dieser *S. mutans*-Suspension gleichmäßig besprüht (Abstand ca. 10 cm, gefächerter Strahl, möglichst kleine Aerosolpartikel; p ≈ 2 bar), in Petrischalen überführt und umgehend mit einem vorgekühlten Nähragar (max. 42°C, 40 mL) blasenfrei überschichtet.

Die so hergestellten, glasobjektträgerhaltigen Agarplatten wurden mindestens 10 min abgekühlt, mit Parafilm[®] versiegelt und für 6-8 h bei 37°C und mindestens 60 % rel. Luftfeuchte inkubiert. Anschließend wurden die probenhaltigen Petrischalen mit einer verd. wässrigen Lsg. von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC, 10 mmol·L⁻¹, 3.35 g·L⁻¹) überschichtet und 2 h lang bei 37°C nachinkubiert. Dadurch wurden die unter dem Agar befindlichen, lebenden Bakterienkolonien (von *S. mutans*) rot eingefärbt. Die Probenauswertung erfolgte fotografisch im Durchlichtverfahren.

5.5 Synthesen

5.5.1 4-(Bromomethyl)-*N*,*N*-dimethylbenzylammoniumbromid (DDA-X)

Ausrüstung:

1,000 mL Dreihalskolben, LIEBIG-Rückflusskühler, KPG-Rührer, 50 mL Tropftrichter, temperiertes Wasserbad; Rotationsverdampfer.

Durchführung:

Destilliertes *N,N*-Dimethyldodecylamin (**0c**, DDA; 10.67 g, 13.56 mL, 50.0 mmol) wurde in trockenem CHCl_3 vorgelöst (20.0 mL) und zu einer stark gerührten Suspension von umkristallisierten α,α' -Dibrom-*para*-xylo (**0a**, *p*DBX; 13.20 g, 50.0 mmol) in CHCl_3 (40.0 mL) über 4 h bei 42°C zugetropft. Nach vollständiger Zugabe von DDA wurde die Mischung für weitere 30 min gerührt. Der Ansatz wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 1/3 des Ursprungsvolumens eingeeengt und für mindestens 6h bei 0-4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Nicht abreagiertes *p*DBX-Edukt (< 5 gew. %) fiel dabei in Form von weißen Nadeln aus und wurde abfiltriert. Dieser Entfernungsprozess wurde so oft durchgeführt (mindestens 3 mal), bis kein *p*DBX-Edukt mehr erhalten wurde.

Das verbleibende CHCl_3 wurde am Rotationsverdampfer vollständig entfernt und die verbleibende, zähe Rohmasse unter starkem Rühren in trockenem Tetrahydrofuran (THF, 400 mL; < 30 ppm H_2O) aufgenommen. Das Nebenprodukt fiel nach mindestens 5 min Wartezeit als weißer, pulveriger Feststoff aus, wurde abzentrifugiert und verworfen. Die überstehende, klare THF-Lsg. enthielt das Hauptprodukt; sie wurde am Rotationsverdampfer bis zur Druckkonstanz eingeeengt. Verbleibende Lsm.-Reste wurden 12h lang am Feinvakuum (< 10^{-2} mbar) entfernt. Erhalten wurden 18.80 g (79 %) einer leicht gelblichen, hochviskosen (honigartigen) klaren Flüssigkeit, welche mittels $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR und GC-MS charakterisiert wurde.

Analytik:

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.63 (d, 2H, $\text{BrCH}_2\text{C}(\text{CH}_{\text{ar}})_2(\underline{\text{CH}}_{\text{ar}})_2\text{C}$), 7.38 (d, 2H, $\text{BrCH}_2\text{C}(\underline{\text{CH}}_{\text{ar}})_2(\text{CH}_{\text{ar}})_2\text{C}$), 5.11 (s, 2H, $\text{C}(\text{CH}_{\text{ar}})_2(\text{CH}_{\text{ar}})_2\text{C}\underline{\text{CH}}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 4.42 (s, 2H, $\text{Br}\underline{\text{CH}}_2\text{C}(\text{CH}_{\text{ar}})_2(\text{CH}_{\text{ar}})_2\text{C}$), 3.49 (t, 2H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\text{C}_9\text{H}_{18}\text{-CH}_3$), 3.23 (s, 6H,

$N^+(CH_3)_2-CH_2CH_2C_9H_{18}CH_3$), 1.73 (m, 2H, $N^+(CH_3)_2CH_2CH_2C_9H_{18}CH_3$), 1.21 (m, 18H, $N^+(CH_3)_2-CH_2CH_2C_9H_{18}CH_3$), 0.82 (t, 3H, $N^+(CH_3)_2CH_2-CH_2C_9H_{18}CH_3$).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 140.2 ($BrCH_2C_{ar}(CH)_2(CH)_2C_{ar}$), 133.6 ($C_{ar}(CH)_2-(CH)_2C_{ar}CH_2N^+(CH_3)_2$), 129.5 ($BrCH_2C_{ar}(CH)_2(CH)_2C_{ar}$), 127.4 ($C_{ar}(CH)_2(CH)_2C_{ar}CH_2-N^+(CH_3)_2$), 67.4 ($C_{ar}CH_2N^+(CH_3)_2CH_2$), 66.5 ($C_{ar}CH_2N^+(CH_3)_2CH_2$), 63.7 ($N^+(CH_3)_2CH_2CH_2-C_8H_{16}CH_2CH_3$), 49.4 ($N^+(CH_3)_2$), 32.0-26.1 ($N^+(CH_3)_2CH_2CH_2C_8H_{16}CH_2CH_3$), 22.5 ($N^+(CH_3)_2CH_2CH_2C_8H_{16}CH_2CH_3$), 14.9 ($N^+(CH_3)_2CH_2CH_2C_8H_{16}CH_2CH_3$).

GC-MS (Toluol), m/z = 264.3 (9%, $CCH_{ar}C_{ar}CH_2N^+(CH_3)_2C_{12}H_{25}^+$), 185.1 (97%, $^{81}Br-CH_2-Ar-CH_2^+$), 183.0 (98%, $^{79}Br-CH_2-Ar-CH_2^+$), 104.1 (100%, $CH_2-Ar-CH_2^+$), 77.0 (14%, $Ar-H^+$), 58.1 (18%, $CH_2N^+(CH_3)_2^+$), 51.0 (15%, $CCH_{ar}C_{ar}CH_2^+$).

5.5.2 Polymerisationen einseitig gestarteter, telecheler Polyoxazoline

Ausrüstung:

Dickwandige, druckfeste SCHOTT-Glasflaschen in den Größen 50-250 mL, Synthesemikrowellen Discover der Fa. CEM, flaschenspezifische Adapter.

CAVE:

Alle Arbeiten müssen zwingend unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss (trockenes Ar oder N_2 -Schutzgas): SCHLENK-Inertbedingungen durchgeführt werden. Alle Geräte sind vor Gebrauch mit Schutzgas zu spülen. Initiatoreinwaage unter Ar. Flüssigkeitstransfer nur mittels Ar-gespülter Spritzen oder Transferkanülen.

Durchführung:

Die jeweils benötigte Konzentration des antimikrobiellen Initiators [DDA-X] wurde berechnet unter Annahme des gewünschten Polymerisationsgrades DP_{set} und der Anfangskonzentration an Monomer $[M_0]$ nach der Formel: $[DDA-X] = [M_0] \cdot DP_{set}^{-1}$. Die resultierende Menge an DDA-X (0.21-0.84 g, 0.44-1.76 mmol) wurde in trockenem $CHCl_3$ (12.0 mL pro 3.0 g Monomer; <1 ppm H_2O) bei Raumtemperatur in der SCHOTT-Glasflasche vorgelöst. Zuletzt wurde das jeweilige PROX-Monomer zugegeben (2-Methyloxazolin=MOX, 2-Ethyloxazolin=EOX, 2-isoPropyloxazolin =

iPrOX), (MOX: 3.00 g, 3.00 mL, 35.25 mmol), die Flasche mit Ar gespült und druckfest verschlossen. Alle Polymerisationen wurden mikrowellengestützt in CEM Discover Synthesemikrowellen durchgeführt, die Reaktionstemperatur wurde mittels eines vertikal fokussierten Infrarotsensors kontinuierlich überwacht.

Die gut verschlossenen Glasgebinde wurden unter Rühren (eingebautes Magnetrührwerk) bei maximaler Leistung ohne Druckluftkühlung auf die Soll-Polymerisationstemperatur der jeweiligen Polyoxazolin-Klasse aufgeheizt (PMOX = 100°C, PEOX = 110°C, P*i*PrOX = 140°C). Bei Erreichen der Soll-Temperatur wurde die MW-Leistung (rechnergesteuert) zur Aufrechterhaltung der Polymerisationstemperatur angepasst. Zur Vermeidung von Temperaturspitzen wurden die Reaktionsgebinde innerhalb der folgenden 2-3 min durch Druckluftstöße gegengekühlt. Die entsprechenden Reaktionszeiten variierten, je nach PROX-Sorte und eingestellten Polymerisationsgrad DP_{set} im Bereich von 2 bis 16 h.

5.5.3 Terminierung und Aufreinigung telecheler Polyoxazoline

Durchführung:

Ein 20-facher molarer Überschuss (bezogen auf die Initiatormenge) des jeweiligen Terminierungsmittels wurde unter inerten Bedingungen (Schutzgasatmosphäre) dem lebenden Polymeransatz beigelegt. Das Gebinde wurde mit Ar nachgespült, fest verschlossen und 48 h lang bei 42°C unter Rühren terminiert; als Heizquelle wurde hierzu ein konventionelles Ölbad verwendet. Die Einführung von Hydroxygruppen am lebenden Kettenende (wie bspw. bei den Polyoxazolin #1-4) wurde durch Zugabe einer gesättigten, wässrigen Kaliumcarbonat-Lsg. und anschließendes Rühren der Reaktionsmischung für 12 h bei 25°C erreicht. Bei allen Polyoxazolinansätzen, die mit N-[3-(dimethylamino)-propyl]-methacrylamid (#0d, AMA) terminiert wurden, wurde der Doppelbindungsstabilisator 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluol (BHT, 0.05 Gew.%, bezogen auf die AMA-Einwaage) zugesetzt.

Nach Ablauf der angegebenen Terminierungszeit wurden die polymerhaltigen Reaktionsmischungen in reichlich Diethylether (Et₂O, ca. 400-4.000 mL) ausgefällt. Das ausgefallene Rohpolymer wurde durch Sedimentation oder Zentrifugation abgetrennt, in CHCl₃ gelöst und wiederum in Et₂O ausgefällt. Diese Umfällprozedur wurde jeweils sechsmal pro Polymer durchgeführt. Anschließend wurden die

telechelen Polyoxazoline mindestens vier Tage lang gegen Methanol dialysiert. Dazu wurden benzoylierte Cellulosemembranen mit einer Porengröße (MWCO) von 1,000 bzw. 2,000 kDa eingesetzt. Diese wurden unmittelbar vor ihrem Einsatz zunächst in Wasser angequollen und durch die kontinuierliche Zugabe von Methanol (zutropfen von MeOH binnen 4 h) auf dieses Dialysemittel konditioniert. Nach der vollständigen Entfernung des Lsm. (MeOH) wurden die reinen Polyoxazoline in Ausbeuten zwischen 79 und 92 % erhalten. Nachfolgend aufgeführt sind die ^1H -/ ^{13}C -NMR-Rückgratsignale der drei unterschiedlichen, im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten Polyoxazoline PMOX, PEOX und PiPrOX.

Poly-2-methyloxazolin, PMOX: ^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 3.65-3.00 (b, n -4H, $\text{N}(\underline{\text{CH}_2})_2$), 2.15-1.85 (b, n -3H, NCOCH_3).

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 170.7-169.6 (NCOCH_3), 47.0-42.3 ($\text{N}(\underline{\text{CH}_2})_2$), 21.5-20.7 (NCOCH_3).

Poly-2-ethyloxazolin PEOX: ^1H -NMR (CDCl_3) = 3.85-3.10 (b, n -4H, $\text{N}(\underline{\text{CH}_2})_2$), 2.65-2.00 (b, n -2H, $\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$), 1.35-0.80 (b, n -3H, $\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$).

^{13}C -NMR (CDCl_3) = 174.8-173.8 ($\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$), 47.0-44.8 ($\text{N}(\underline{\text{CH}_2})_2$), 26.6-25.7 ($\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$), 9.8-9.1 ($\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$).

Polyisopropyloxazolin, PiPrOX: ^1H -NMR (CDCl_3) = 3.70-3.10 (b, n -4H, $\text{N}(\underline{\text{CH}_2})_2$), 3.05-2.35 (b, n -1H, $\text{NCOCH}(\underline{\text{CH}_3})_2$), 1.40-0.70 (b, n -6H, $\text{NCOCH}(\underline{\text{CH}_3})_2$).

Weitere, durch den antimikrobiellen Initiator (**#0e**, DDA-X) sowie durch die Terminierungsmittel (**#0c**, DDA; **#0d**, AMA; PYR) hervorgerufene NMR-Signale sind unterstehend aufgeführt. Hydroxylterminierte PROX-Systeme (**#1–4**) zeigten bei einer NMR-Messung in DMSO-d_6 ein breites Singulett im Bereich um 4.0 ppm.

PROX, gestartet mit dem Referenzinitiator MeOTs: ^1H -NMR (CDCl_3) = 3.00 (m, 3H, CH_3PROX). Produkte enthielten Spuren von OTs $^-$ an folgenden Positionen: 7.61 (d [AA'], 2H, $\text{CH}_3\text{C}_{\text{ar}}(\text{CH}_2)_2(\underline{\text{CH}_2})_2\text{C}_{\text{ar}}\text{SO}_2\text{O}^-$), 7.13 (d [BB'], 2H, $\text{CH}_3\text{C}_{\text{ar}}(\underline{\text{CH}_2})_2(\text{CH}_2)_2\text{C}_{\text{ar}}\text{SO}_2\text{O}^-$), 2.31 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}_{\text{ar}}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{C}_{\text{ar}}\text{SO}_2\text{O}^-$).

^{13}C -NMR (CDCl_3) = 31.2 (CH_3PROX). Produkte enthielten Spuren von OTs^- an folgenden Positionen (mit einem geringen Signal/Rauschen-Verhältnis): 136.2 ($\text{CH}_3\text{C}_{\text{ar}}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{C}_{\text{ar}}\text{SO}_2\text{O}^-$), 134.8 ($\text{CH}_3\text{C}_{\text{ar}}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{C}_{\text{ar}}\text{SO}_2\text{O}^-$), 127.3 ($\text{CH}_3\text{C}_{\text{ar}}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{C}_{\text{ar}}\text{SO}_2\text{O}^-$), 126.8 ($\text{CH}_3\text{C}_{\text{ar}}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{C}_{\text{ar}}\text{SO}_2\text{O}^-$).

PROX, gestartet mit dem antimikrobiellen Initiator DDA-X: (#1–13) ^1H -NMR (CDCl_3) = 7.51 (m, 2H, $\text{C}(\text{CH}_{\text{ar}})_2(\text{CH}_{\text{ar}})_2\text{CCH}_2\text{-PROX}$), 7.34 (m, 2H, $\text{C}(\text{CH}_{\text{ar}})_2(\text{CH}_{\text{ar}})_2\text{CCH}_2\text{-PROX}$), 4.56 (b, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-PROX}$), 1.77 (m, 2H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_9\text{H}_{18}\text{CH}_3$), 1.24 (b, 18H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{C}_9\text{H}_{18}\text{CH}_3$), 0.84 (t, 3H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_9\text{H}_{18}\text{CH}_3$).

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 141.8 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{CH}_2\text{-PROX}$), 137.8 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}_{\text{ar}}$), 128.1 ($\text{C}_{\text{ar}}(\text{CH})_2(\text{CH})_2\text{C}_{\text{ar}}\text{CH}_2\text{-PROX}$), 125.5 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}_{\text{ar}}(\text{CH})_2(\text{CH})_2\text{C}_{\text{ar}}$), 61.9 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{-Ar}$), 54.9 ($\text{Ar-CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$), 50.3 ($\text{Ar-CH}_2\text{-PROX}$), 45.9 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 35.6 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{-C}_{10}\text{H}_{20}\text{CH}_3$), 22.0-20.3 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{CH}_3$), 16.2 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{CH}_3$).

PROX, terminiert mit PYR: ^1H -NMR (CDCl_3) = 9.55 (m, 2H, $\text{N}^+(\text{CH})_2(\text{CH})_2\text{CH}$), 8.35 (m, 1H, $\text{N}^+(\text{CH})_2(\text{CH})_2\text{CH}$), 7.95 (m, 2H, $\text{N}^+(\text{CH})_2(\text{CH})_2\text{CH}$), 5.00 (m, 2H, $\text{PROX-CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$).

^{13}C -NMR (CDCl_3) = 144.0 ($\text{N}^+(\text{CH})_2(\text{CH})_2\text{CH}$), 135.2 ($\text{N}^+(\text{CH})_2(\text{CH})_2\text{CH}$), 129.2 ($\text{N}^+(\text{CH})_2(\text{CH})_2\text{CH}$), 57.2 ($\text{PROXCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$).

PROX (#9–12), terminiert mit DDA (#0b): ^1H -NMR (CDCl_3) = 3.28 (m, 6H, $\text{PMOX-CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 3.21 (m, 2H, $\text{PMOX-CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 3.15 (m, 2H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_8\text{H}_{18}\text{CH}_3$), 1.78 (m, 2H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_8\text{H}_{18}\text{CH}_3$), 1.26 (m, 18H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{C}_8\text{H}_{18}\text{CH}_3$), 0.85 (t, 3H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_8\text{H}_{18}\text{CH}_3$).

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 68.0 ($\text{PMOX-CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 63.1 ($\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_8\text{H}_{18}\text{CH}_3$), 48.7 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 26.9 ($\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_8\text{H}_{18}\text{CH}_3$), ~29 ($\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_8\text{H}_{18}\text{CH}_3$), 14.1 ($\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_8\text{H}_{18}\text{CH}_3$).

PMOX (#13), terminiert mit AMA (#0d): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) = 7.59 (m, 1H, NHCO), 5.73 (m, 1H, $\text{H}_{\text{A(cis)}}\text{H}_{\text{B(trans)}}\text{CCCH}_3$), 5.38 (m, 1H, $\text{H}_{\text{A(cis)}}\text{H}_{\text{B(trans)}}\text{CCCH}_3$), 3.81 (m, 4H, $\text{PMOX-CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$), 3.18 (m, 6H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 1.92 (m, 3H, NHCOCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4): δ (ppm) = 169.0 (NHCO), 139.0 ($\text{COCH}_3\text{CH}_{\text{AB}}$), 120.4 ($\text{COCH}_3\text{-CH}_{\text{AB}}$), 60.2 ($\text{PMOX-CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 53.1 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$), 52.4 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$).

5.5.4 Polymerisationen, Terminierung und Aufreinigung mittig gestarteter, bifunktionaler Polyoxazolin-Linker

Ausrüstung:

Dickwandige, druckfeste SCHOTT-Glasflaschen der Größe 250 mL, Synthesemikrowellen Discover der Fa. CEM, flaschenspezifischer Adapter.

CAVE:

Alle Arbeiten müssen zwingend unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss (trockenes Ar oder N_2 -Schutzgas): SCHLENK-Inertbedingungen durchgeführt werden. Alle Geräte sind vor Gebrauch mit Schutzgas zu spülen. Initiatoreinwaage unter Ar. Flüssigkeitstransfer nur mittels Ar-gespülter Spritzen oder Transferkanülen.

Durchführung:

Zur Synthese von PEOX-Linkern der Gesamtlänge $\text{DP}_{\text{set}} = 30$ Monomereinheiten (15 Monomereinheiten pro Seite; eingestelltes Molekulargewicht ohne Endgruppen $M_{\text{set}} = 3,238 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) wurde der bifunktionelle Initiator *para*-1,4-Dibromxylool (*p*DBX, 0.89 g, 3.36 mmol) in Chloroform (CHCl_3 , 42 mL) gelöst und das Monomer 2-Ethyl-1,3-oxazolin (EOX, 10.00 g, 10.18 mL, 100.9 mmol) bei Raumtemperatur (RT) zugesetzt. Die mikrowellengestützten Polymerisationen wurden 12 h lang bei 90°C unter ständiger Kontrolle der Reaktionstemperatur durchgeführt. Bei längeren PEOX-Linkern ($\text{DP}_{\text{set}} = 50$) wurde die Umsetzungsdauer bei gleicher Temperatur auf 24 h erhöht. Nach dem Abkühlen wurde bei RT das Terminierungsmittel *N*-[3-(dimethylamino)-propyl]-methacrylamid (AMA, 11.42 g, 67.2 mmol) im 20-fachen molaren Überschuss, bezogen auf die Menge des Initiators *p*DBX, zugegeben.

Die Reaktionsmischungen wurden mit dem Doppelbindungsstabilisator 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT, 0.05 Gew.% bezogen auf die AMA-Menge, 6 mg) versetzt und die AMA-Terminierung 24 h lang bei 42°C unter Rühren durchgeführt. Jedes polymere Rohprodukt wurde 6-mal aus CHCl₃ in Et₂O umgefällt und anschließend 4 Tage lang gegen Methanol dialysiert (MeOH, MWCO der Membran: 1,000 kDa). Nach erfolgter Dialyse wurde das MeOH am Rotationsverdampfer sowie im Feinvakuum vollständig entfernt. Die Poly-2-ethyloxazolin-Linker der Klasse AMA-PEOX_n-*p*DBX-PEOX_n-AMA wurden in Ausbeuten von 90% der Theorie erhalten und mittels ¹H-NMR sowie GPC charakterisiert; nachfolgend aufgeführt sind die zugehörigen NMR-Signale.

PEOX, gestartet mit dem bifunktionellen Initiator *p*DBX, beidseitig terminiert mit AMA: (#17-19) ¹H-NMR (CDCl₃) = 7.51 (m, 1H, NHCO), 7.09 (b, 4H, CH₂C(CH₂)₂(CH₂)₂CCH₂), 5.79 (m, 1H, H_{A(cis)}H_{B(trans)}CCCH₃), 5.26 (m, 1H, H_{A(cis)}H_{B(trans)}CCCH₃), 4.47 (b, 4H, CH₂C(CH₂)₂(CH₂)₂CCH₂), 3.88 (m, 4H, PEOX-CH₂CH₂N⁺(CH₃)₂CH₂), 3.75-3.00 (b, *n*·4H, *poly*-N(CH₂)₂ und 28H, PEOX-CH₂CH₂N⁺(CH₃)₂CH₂CH₂CH₂NHCO), 2.76 (b, 4H, N⁺(CH₃)₂CH₂CH₂CH₂NHCO), 2.52-1.95 (b, *n*·2H, *poly*-NCOCH₂CH₃), 1.88 (s, 6H, H_{A(cis)}H_{B(trans)}CCCH₃), 1.30-0.70 (b, *n*·3H, *poly*-NCOCH₂CH₃).

Literaturverzeichnis

1. Tatem, A. J.; Rogers, D. J.; Hay, S. I., Global transport networks and infectious disease spread. *Advances in Parasitology*, Vol 62 **2006**, 62, 293-343.
2. Klein, E.; Smith, D. L.; Laxminarayan, R., Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. *Emerging Infectious Diseases* **2007**, 13, (12), 1840-1846.
3. Klevens, R. M.; Edwards, J. R.; Richards, C. L.; Horan, T. C.; Gaynes, R. P.; Pollock, D. A.; Cardo, D. M., Estimating health care-associated infections and deaths in US hospitals, 2002. *Public Health Reports* **2007**, 122, (2), 160-166.
4. Klevens, R. M.; Morrison, M. A.; Nadle, J.; Petit, S.; Gershman, K.; Ray, S.; Harrison, L. H.; Lynfield, R.; Dumyati, G.; Townes, J. M.; Craig, A. S.; Zell, E. R.; Fosheim, G. E.; McDougal, L. K.; Carey, R. B.; Fridkin, S. K., Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Jama-Journal of the American Medical Association* **2007**, 298, (15), 1763-1771.
5. Lode, H. M., Clinical impact of antibiotic-resistant Gram-positive pathogens. *Clinical Microbiology and Infection* **2009**, 15, (3), 212-217.
6. DeLeo, F. R.; Otto, M.; Kreiswirth, B. N.; Chambers, H. F., Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **2010**, 375, (9725), 1557-1568.
7. Viazis, S.; Diez-Gonzalez, F., Enterohemorrhagic *Escherichia Coli*: The Twentieth Century's Emerging Foodborne Pathogen: A Review. *Advances in Agronomy*, Vol 111 **2011**, 111, 1-50.
8. Mellmann, A.; Harmsen, D.; Cummings, C. A.; Zentz, E. B.; Leopold, S. R.; Rico, A.; Prior, K.; Szczepanowski, R.; Ji, Y. M.; Zhang, W. L.; McLaughlin, S. F.; Henkhaus, J. K.; Leopold, B.; Bielaszewska, M.; Prager, R.; Brzoska, P. M.; Moore, R. L.; Guenther, S.; Rothberg, J. M.; Karch, H., Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. *PLoS One* **2011**, 6, (7).
9. Cloete, T. E., Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2003**, 51, (4), 277-282.
10. McDonnell, G.; Russell, A. D., Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, 12, (1), 147-+.
11. Baquero, F.; Martinez, J. L.; Canton, R., Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, 19, (3), 260-265.

12. Hoiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O., Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, 35, (4), 322-332.
13. Martinez, J. L.; Fajardo, A.; Garmendia, L.; Hernandez, A.; Linares, J. F.; Martinez-Solano, L.; Sanchez, M. B., A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, 33, (1), 44-65.
14. Davies, J.; Davies, D., Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2010**, 74, (3), 417-+.
15. Chambers, H. F.; Deleo, F. R., Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, (9), 629-641.
16. Kenawy, E. R.; Worley, S. D.; Broughton, R., The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (5), 1359-1384.
17. Klibanov, A. M., Permanently microbicidal materials coatings. *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, (24), 2479-2482.
18. Worley, S. D.; Liang, J.; Wu, R.; Wang, J. W.; Barnes, K.; Cho, U.; Lee, J.; Broughton, R. M.; Huang, T. S., N-halamine biocidal coatings. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 34, (2), 157-163.
19. Timofeeva, L.; Kleshcheva, N., Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 89, (3), 475-492.
20. Worley, S. D.; Kocer, H. B.; Broughton, R. M.; Huang, T. S., A novel N-halamine acrylamide monomer and its copolymers for antimicrobial coatings. *React. Funct. Polym.* **2011**, 71, (5), 561-568.
21. Glinel, K.; Blin, T. B., T.; Purohit, V.; Leprince, J.; Jouenne, T., Bactericidal Microparticles Decorated by an Antimicrobial Peptide for the Easy Disinfection of Sensitive Aqueous Solutions. *Biomacromolecules* **2011**, 12, (4), 1259-1264.
22. Bieser, A. M.; Thomann, Y.; Tiller*, J. C., Contact-Active Antimicrobial and Potentially Self-Polishing Coatings Based on Cellulose. *Macromol. Biosci.* **2011**.
23. Jonas, A. M.; Laloyaux, X.; Fautre, E.; Blin, T.; Purohit, V.; Leprince, J.; Jouenne, T.; Glinel, K., Temperature-Responsive Polymer Brushes Switching from Bactericidal to Cell-Repellent. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2010**, 22, (44), 5024-+.
24. Worley, S. D.; Kou, L.; Liang, J.; Ren, X.; Kocer, H. B.; Tzou, Y. M.; Huang, T. S., Synthesis of a Water-Soluble Siloxane Copolymer and Its Application for Antimicrobial Coatings. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, 48, (14), 6521-6526.

25. Tew, G. N.; Madkour, A. E.; Dabkowski, J. A.; Nusslein, K., Fast Disinfecting Antimicrobial Surfaces. *Langmuir* **2009**, 25, (2), 1060-1067.
26. Glinel, K.; Jonas, A. M.; Jouenne, T.; Leprince, J.; Galas, L.; Huck, W. T. S., Antibacterial and Antifouling Polymer Brushes Incorporating Antimicrobial Peptide. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, (1), 71-77.
27. Messersmith, P. B.; Statz, A. R.; Park, J. P.; Chongsiriwatana, N. P.; Barron, A. E., Surface-immobilised antimicrobial peptoids. *Biofouling* **2008**, 24, (6), 439-448.
28. Tashiro, T., Antibacterial and Bacterium Adsorbing Macromolecules. *Macromol. Mater. Eng.* **2001**, 286, (2), 63-87.
29. Tiller, J. C.; Liao, C. J.; Lewis, K.; Klibanov, A. M., Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, (11), 5981-5985.
30. Fuchs, A. D.; Tiller, J. C.; Waschinski, C. J., Antimicrobial blockcopolymer emulsifier for contact-active polymer suspensions and surfaces. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2005**, 230, U4274-U4275.
31. Kugler, R.; Bouloussa, O.; Rondelez, F., Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. *Microbiology-Sgm* **2005**, 151, 1341-1348.
32. Milovic, N. M.; Wang, J.; Lewis, K.; Klibanov, A. M., Immobilized N-alkylated polyethylenimine avidly kills bacteria by rupturing cell membranes with no resistance developed. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, 90, (6), 715-722.
33. Fuchs, A. D.; Tiller, J. C., Contact-active antimicrobial coatings derived from aqueous suspensions. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, (40), 6759-6762.
34. Tiller, J. C.; Fuchs, A. D.; Bieser, A. M.; Waschinski, C. C., Beating the bugs. *European Coatings Journal* **2006**, 12, 28-32.
35. Murata, H.; Koepsel, R. R.; Matyjaszewski, K.; Russell, A. J., Permanent, non-leaching antibacterial surfaces - 2: How high density cationic surfaces kill bacterial cells. *Biomaterials* **2007**, 28, 4870-4879.
36. Cheng, G.; Xite, H.; Zhang, Z.; Chen, S. F.; Jiang, S. Y., A Switchable Biocompatible Polymer Surface with Self-Sterilizing and Nonfouling Capabilities. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, 47, (46), 8831-8834.
37. Huang, J. Y.; Koepsel, R. R.; Murata, H.; Wu, W.; Lee, S. B.; Kowalewski, T.; Russell, A. J.; Matyjaszewski, K., Nonleaching antibacterial glass surfaces via

- "Grafting Onto": The effect of the number of quaternary ammonium groups on biocidal activity. *Langmuir* **2008**, 24, (13), 6785-6795.
38. Lienkamp, K.; Madkour, A. E.; Musante, A.; Nelson, C. F.; Nusslein, K.; Tew, G. N., Antimicrobial polymers prepared by ROMP with unprecedented selectivity: A molecular construction kit approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, (30), 9836-9843.
39. Matyjaszewski, K.; Huang, J. Y.; Koepsel, R. R.; Murata, H.; Wu, W.; Lee, S. B.; Kowalewski, T.; Russell, A. J., Nonleaching antibacterial glass surfaces via "Grafting Onto": The effect of the number of quaternary ammonium groups on biocidal activity. *Langmuir* **2008**, 24, (13), 6785-6795.
40. Kramer, A.; Bernig, T.; Kampf, G., Clinical double-blind trial on the dermal tolerance and user acceptability of six alcohol-based hand disinfectants for hygienic hand disinfection. *Journal of Hospital Infection* **2002**, 51, (2), 114-120.
41. Kampf, G.; Rudolf, M.; Labadie, J. C.; Barrett, S. P., Spectrum of antimicrobial activity and user acceptability of the hand disinfectant agent Sterillium (R) Gel. *Journal of Hospital Infection* **2002**, 52, (2), 141-147.
42. Maki, D. G.; Ringer, M.; Alvarado, C. J., Prospective Randomized Trial of Povidone-Iodine, Alcohol, and Chlorhexidine for Prevention of Infection Associated with Central Venous and Arterial Catheters. *Lancet* **1991**, 338, (8763), 339-343.
43. Kiyoyama, T.; Tokuda, Y.; Shiiki, S.; Hachiman, T.; Shimasaki, T.; Endo, K., Isopropyl Alcohol Compared with Isopropyl Alcohol plus Povidone-Iodine as Skin Preparation for Prevention of Blood Culture Contamination. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, 47, (1), 54-58.
44. Debreceni, G.; Meggyesi, R.; Mestyan, G., Efficacy of spray disinfection with a 2-propanol and benzalkonium chloride containing solution before epidural catheter insertion - a prospective, randomized, clinical trial. *British Journal of Anaesthesia* **2007**, 98, (1), 131-135.
45. Lim, K. S.; Kam, P. C. A., Chlorhexidine - pharmacology and clinical applications. *Anaesthesia and Intensive Care* **2008**, 36, (4), 502-512.
46. Reichel, M.; Heisig, P.; Kohlmann, T.; Kampf, G., Alcohols for Skin Antisepsis at Clinically Relevant Skin Sites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, (11), 4778-4782.
47. DeQueiroz, G. A.; Day, D. F., Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing

- Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *Journal of Applied Microbiology* **2007**, 103, (4), 794-802.
48. Li, W. R.; Xie, X. B.; Shi, Q. S.; Zeng, H. Y.; Ou-Yang, Y. S.; Chen, Y. B., Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 85, (4), 1115-1122.
49. Marambio-Jones, C.; Hoek, E. M. V., A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research* **2010**, 12, (5), 1531-1551.
50. Fiss, E. M.; Rule, K. L.; Vikesland, P. J., Formation of chloroform and other chlorinated byproducts by chlorination of triclosan-containing antibacterial products. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, (7), 2387-2394.
51. Russell, A. D., Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **2002**, 92, 121s-135s.
52. Siedenbiedel, F.; Tiller, J. C., Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers* **2012**, 4, (1), 46-71.
53. Andresen, J. A.; Muir, D.; Ueno, D.; Darling, C.; Theobald, N.; Bester, K., Emerging pollutants in the north sea in comparison to Lake Ontario, Canada, data. *Environ. Toxicol. Chem.* **2007**, 26, (6), 1081-1089.
54. Hruska, K.; Franek, M., Sulfonamides in the environment: a review and a case report. *Veterinarni Medicina* **2012**, 57, (1), 1-35.
55. Butler, M. S.; Cooper, M. A., Screening Strategies to Identify New Antibiotics. *Curr. Drug Targets* **2012**, 13, (3), 373-387.
56. Buffet-Bataillon, S.; Branger, B.; Cormier, M.; Bonnaure-Mallet, M.; Jolivet-Gougeon, A., Effect of higher minimum inhibitory concentrations of quaternary ammonium compounds in clinical *E. coli* isolates on antibiotic susceptibilities and clinical outcomes. *Journal of Hospital Infection* **2011**, 79, (2), 141-146.
57. Buffet-Bataillon, S.; Tattevin, P.; Bonnaure-Mallet, M.; Jolivet-Gougeon, A., Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds-a critical review. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2012**, 39, (5), 381-389.
58. Degrado, W. F.; Tew, G. N.; Scott, R. W.; Klein, M. L., De Novo Design of Antimicrobial Polymers, Foldamers, and Small Molecules: From Discovery to Practical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, (1), 30-39.
59. Munoz-Bonilla, A.; Fernandez-Garcia, M., Polymeric materials with antimicrobial activity. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, 37, (2), 281-339.

60. Kawabata, N., Capture of Microorganisms and Viruses by Pyridinium-Type Polymers and Application to Biotechnology and Water-Purification. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, 17, (1), 1-34.
61. Coneski, P. N.; Rao, K. S.; Schoenfisch, M. H., Degradable Nitric Oxide-Releasing Biomaterials via Post-Polymerization Functionalization of Cross-Linked Polyesters. *Biomacromolecules* **2010**, 11, (11), 3208-3215.
62. Banerjee, I.; Pangule, R. C.; Kane, R. S., Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2011**, 23, (6), 690-718.
63. Ji, E.; Corbitt, T. S.; Parthasarathy, A.; Schanzes, K. S.; Whitten, D. G., Light and Dark-Activated Biocidal Activity of Conjugated Polyelectrolytes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, 3, (8), 2820-2829.
64. Kanazawa, A.; Ikeda, T.; Endo, T., Antibacterial Activity of Polymeric Sulfonium Salts. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **1993**, 31, (11), 2873-2876.
65. Kanazawa, A.; Ikeda, T.; Endo, T., Novel Polycationic Biocides - Synthesis and Antibacterial Activity of Polymeric Phosphonium Salts. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **1993**, 31, (2), 335-343.
66. Tew, G. N.; Liu, D.; Chen, B.; Doerksen, R. J.; Kaplan, J.; Carroll, P. J.; Klein, M. L.; DeGrado, W. F., De novo design of biomimetic antimicrobial polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, (8), 5110-5114.
67. Tew, G. N.; Lienkamp, K.; Madkour, A. E.; Kumar, K. N.; Nusslein, K., Antimicrobial Polymers Prepared by Ring-Opening Metathesis Polymerization: Manipulating Antimicrobial Properties by Organic Counterion and Charge Density Variation. *Chemistry-a European Journal* **2009**, 15, (43), 11715-11722.
68. Chongsiriwatana, N. P.; Patch, J. A.; Czyzewski, A. M.; Dohm, M. T.; Ivankin, A.; Gidalevitz, D.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E., Peptoids that mimic the structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, (8), 2794-2799.
69. Zasloff, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, 415, (6870), 389-395.
70. Nicolas, P.; Mor, A., Peptides as Weapons against Microorganisms in the Chemical Defense System of Vertebrates. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, 49, 277-304.

71. Kuroda, K.; Palermo, E. F., Structural determinants of antimicrobial activity in polymers which mimic host defense peptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, (5), 1605-1615.
72. Kuroda, K.; Caputo, G. A.; DeGrado, W. F., The Role of Hydrophobicity in the Antimicrobial and Hemolytic Activities of Polymethacrylate Derivatives. *Chemistry-a European Journal* **2009**, *15*, (5), 1123-1133.
73. Waschinski, C. J.; Tiller, J. C., Poly(oxazoline)s with telechelic antimicrobial functions. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, (1), 235-243.
74. Waschinski, C. J.; Herdes, V.; Schueler, F.; Tiller, J. C., Influence of satellite groups on telechelic antimicrobial functions of polyoxazolines. *Macromol. Biosci.* **2004**, *5*, (2), 149-156.
75. Waschinski, C. J.; Barnert, S.; Theobald, A.; Schubert, R.; Kleinschmidt, F.; Hoffmann, A.; Saalwachter, K.; Tiller, J. C., Insights in the antibacterial action of poly(methyloxazoline)s with a biocidal end group and varying satellite groups. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, (7), 1764-1771.
76. Waschinski, C. J.; Zimmermann, J.; Salz, U.; Hutzler, R.; Sadowski, G.; Tiller, J. C., Design of contact-active antimicrobial acrylate-based materials using biocidal macromers. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2008**, *20*, (1), 104-+.
77. Horie, K.; Baron, M.; Fox, R. B.; He, J.; Hess, M.; Kahovec, J.; Kitayama, T.; Kubisa, P.; Marechal, E.; Mormann, W.; Stepto, R. F. T.; Tabak, D.; Vohlidal, J.; Wilks, E. S.; Work, W. J.; Allegra, G.; Baron, M.; Fradet, A.; Hatada, K.; He, J.; Hess, M.; Horie, K.; Jenkins, A. D.; Jin, J. I.; Jones, R. G.; Kahovec, J.; Kitayama, T.; Kratochvil, P.; Kubisa, P.; Marcechal, E.; Meisel, I.; Metanomski, W. V.; Moad, G.; Mormann, W.; Penczek, S.; Rebelo, L. P.; Rinaudo, M.; Schopov, I.; Schubert, M.; Shibaev, V. P.; Slomkowskj, S.; Stepto, R. F. T.; Tabak, D.; Vohlidal, J.; Wilks, E. S.; Work, W. J.; Dorfner, K.; Frechet, M. J.; Harris, W. I.; Hodge, P.; Nishikubo, T.; Ober, C. K.; Reichmanis, E.; Sherrington, D. C.; Tomoi, M.; Wohrle, D., Definitions of terms relating to reactions of polymers and to functional polymeric materials - (IUPAC Recommendations 2003). *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, (4), 889-906.
78. Brogden, K. A., Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, (3), 238-250.
79. Boman, H. G., Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine* **2003**, *254*, (3), 197-215.

80. Hancock, R. E. W.; Lehrer, R., Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, (2), 82-88.
81. Tew, G. N.; Gabriel, G. J.; Maegerlein, J. A.; Nelson, C. E.; Dabkowski, J. M.; Eren, T.; Nusslein, K., Comparison of Facially Amphiphilic versus Segregated Monomers in the Design of Antibacterial Copolymers. *Chemistry-a European Journal* **2009**, 15, (2), 433-439.
82. Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E., Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, (2), 426-436.
83. Seehuber, A.; Schmidt, D.; Dahint, R., Poly(acrylic acid)-Poly(ethylene glycol) Layers on Positively Charged Surface Coatings: Molecular Structure, Protein Resistance, and Application to Single Protein Deposition. *Langmuir* **2012**, 28, (23), 8700-8710.
84. Briand, E.; Humblot, V.; Pradier, C. M.; Kasemo, B.; Svedhem, S., An OEGylated thiol monolayer for the tethering of liposomes and the study of liposome interactions. *Talanta* **2010**, 81, (4-5), 1153-1161.
85. Weinhart, M.; Grunwald, I.; Wyszogrodzka, M.; Gaetjen, L.; Hartwig, A.; Haag, R., Linear Poly(methyl glycerol) and Linear Polyglycerol as Potent Protein and Cell Resistant Alternatives to Poly(ethylene glycol). *Chemistry-an Asian Journal* **2010**, 5, (9), 1992-2000.
86. Lawson, M. C.; Shoemaker, R.; Hoth, K. B.; Bowman, C. N.; Anseth, K. S., Polymerizable Vancomycin Derivatives for Bactericidal Biomaterial Surface Modification: Structure-Function Evaluation. *Biomacromolecules* **2009**, 10, (8), 2221-2234.
87. Weberskirch, R.; Nuyken, O., Synthesis and characterization of water-soluble block copolymers with an end-tagged naphthalene probe. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry* **1999**, A36, (5-6), 843-857.
88. Haldar, D.; Freeman, K.; Work, T. S., Biogenesis of Mitochondria. *Nature* **1966**, 211, (5044), 9-8.
89. Martin, W.; Hoffmeister, M.; Rotte, C.; Henze, K., An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol. Chem.* **2001**, 382, (11), 1521-1539.

90. Martin, W.; Russell, M. J., On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **2003**, 358, (1429), 59-83.
91. Poole, A. M.; Phillips, M. J.; Penny, D., Prokaryote and eukaryote evolvability. *Biosystems* **2003**, 69, (2-3), 163-185.
92. Whitman, W. B.; Coleman, D. C.; Wiebe, W. J., Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, (12), 6578-6583.
93. Koch, A. L., What size should a bacterium be? A question of scale. *Annu. Rev. Microbiol.* **1996**, 50, 317-348.
94. Nealson, K. H., Sediment bacteria: Who's there, what are they doing, and what's new? *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **1997**, 25, 403-434.
95. Vellai, T.; Takacs, K.; Vida, G., A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **1998**, 46, (5), 499-507.
96. Skerman, V. B. D.; McGowan, V.; Sneath, P. H. A., Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Bacteriology* **1980**, 30, (1), 225-420.
97. Bartholomew, J. W.; Roberts, M. A.; Evans, E. E., Dye Exchange in Bacterial Cells, and the Theory of Staining. *Stain Technology* **1950**, 25, (4), 181-186.
98. Kellenberger, E.; Ryter, A., Cell Wall and Cytoplasmic Membrane of Escherichia-Coli. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **1958**, 4, (3), 323-&.
99. Weidel, W.; Frank, H.; Martin, H. H., The Rigid Layer of the Cell Wall of Escherichia-Coli Strain-B. *J. Gen. Microbiol.* **1960**, 22, (1), 158-&.
100. Bergh, A. K.; McArthur, C. S.; Webb, S. J., Bacterial Lipids + Gram Staining Reaction. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **1964**, 42, (8), 1141-&.
101. Cummins, C. S.; Harris, H., The Relationships between Certain Members of the Staphylococcus-Micrococcus Group as Shown by Their Cell Wall Composition. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* **1956**, 6, (3), 111-119.
102. Rogers, H. J.; Perkins, H. R., Cell-Wall Mucopeptides of Staphylococcus-Aureus and Micrococcus-Lysodeikticus. *Nature* **1959**, 184, (4685), 520-524.
103. Strominger, J. L.; Park, J. T.; Thompson, R. E., Composition of the Cell Wall of Staphylococcus-Aureus - Its Relation to the Mechanism of Action of Penicillin. *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, (12), 3263-3268.

104. Braun, V., Molecular Organization of Rigid Layer and Cell-Wall of Escherichia-Coli. *J. Infect. Dis.* **1973**, 128, (Jul), S9-S16.
105. Beveridge, T. J.; Graham, L. L., Surface-Layers of Bacteria. *Microbiological Reviews* **1991**, 55, (4), 684-705.
106. Dmitriev, B. A.; Holst, O.; Rietschel, E. T.; Ehlers, S., Tertiary structure of Staphylococcus aureus cell wall murein. *J. Bacteriol.* **2004**, 186, (21), 7141-7148.
107. Giesbrecht, P.; Kersten, T.; Maidhof, H.; Wecke, J., Staphylococcal cell wall: Morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **1998**, 62, (4), 1371-+.
108. Lindberg, B., Components of Bacterial Polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, 48, 279-318.
109. Wolin, M. J.; Archibald, A.; Baddiley, J., Changes in Wall Teichoic Acid Resulting from Mutations of Staphylococcus Aureus. *Nature* **1966**, 209, (5022), 484-&.
110. Roemer, T.; Davies, J.; Giaever, G.; Nislow, C., Bugs, drugs and chemical genomics. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, (1), 46-56.
111. Aoi, K.; Okada, M., Polymerization of oxazolines. *Prog. Polym. Sci.* **1996**, 21, (1), 151-208.
112. Kagiya, T.; Matsuda, T., Polymerization of 2-Oxazolines .1. Cationic Polymerization of 2-Phenyl-2-Oxazoline Initiated by Various Oxazolinium Salts of Monomer with Bronsted Acids. *Journal of Macromolecular Science-Chemistry* **1971**, A 5, (8), 1265-&.
113. Saegusa, T.; Yamada, A.; Taoda, H.; Kobayashi, S., Linear Poly(N-alkylethylenimine)s. *Macromolecules* **1978**, 11, (2), 435-436.
114. Dworak, A., The role of cationic and covalent active centers in the polymerization of 2-methyl-2-oxazoline initiated with benzyl bromide. *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, 199, (9), 1843-1849.
115. Liu, Q.; Konas, M.; Riffle, J. S., Investigations of 2-Ethyl-2-Oxazoline Polymerizations in Chlorobenzene. *Macromolecules* **1993**, 26, (21), 5572-5576.
116. Fijten, M. W. M.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S., Initiator effect on the cationic ring-opening copolymerization of 2-ethyl-2-oxazoline and 2-phenyl-2-oxazoline. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2008**, 46, (14), 4804-4816.

117. Weberskirch, R.; Preuschen, J.; Spiess, H. W.; Nuyken, O., Design and synthesis of a two compartment micellar system based on the self-association behavior of poly(N-acyl ethyleneimine) end-capped with a fluorocarbon and a hydrocarbon chain. *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, 201, (10), 995-1007.
118. Kobayashi, S.; Uyama, H.; Narita, Y.; Ishiyama, J. I., Novel Multifunctional Initiators for Polymerization of 2-Oxazolines. *Macromolecules* **1992**, 25, (12), 3232-3236.
119. Lu, G. Q.; Wu, D. C.; Fu, R. W., Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylaminoethyl methacrylate. *React. Funct. Polym.* **2007**, 67, (4), 355-366.
120. Witte, H.; Seeliger, W., Cyclische Imidsäureester aus Nitrilen und Aminoalkoholen. *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 6, 996-1009.
121. Schubert, U. S.; Kempe, K.; Lobert, M.; Hoogenboom, R., Synthesis and Characterization of a Series of Diverse Poly(2-oxazoline)s. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2009**, 47, (15), 3829-3838.
122. Minakata, S.; Morino, Y.; Oderaotoshi, Y.; Komatsu, M., Practical and convenient synthesis of N-heterocycles: Stereoselective cyclization of N-alkenylamides with t-BuOI under neutral conditions. *Org. Lett.* **2006**, 8, (15), 3335-3337.
123. Fan, L.; Adams, A. M.; Polisar, J. G.; Ganem, B., Studies on the Chemistry and Reactivity of alpha-Substituted Ketones in Isonitrile-Based Multicomponent Reactions. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, (24), 9720-9726.
124. Fukuhara, T.; Hasegawa, C.; Hara, S., A facile synthesis of oxazolines, thiazolines, and imidazolines using alpha,alpha-difluoroalkylamines. *Synthesis-Stuttgart* **2007**, (10), 1528-1534.
125. Sayama, S., A convenient synthesis of oxazolines and imidazolines from aromatic aldehydes with pyridinium hydrobromide perbromide in water. *Synlett* **2006**, (10), 1479-1484.
126. Schwekendiek, K.; Glorius, F., Efficient oxidative synthesis of 2-oxazolines. *Synthesis-Stuttgart* **2006**, (18), 2996-3002.
127. Takahashi, S.; Togo, H., An Efficient Oxidative Conversion of Aldehydes into 2-Substituted 2-Oxazolines Using 1,3-Diiodo-5,5-dimethylhydantoin. *Synthesis-Stuttgart* **2009**, (14), 2329-2332.

128. Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J., The Use of Microwave-Ovens for Rapid Organic-Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, (3), 279-282.
129. Giguere, R. J.; Bray, T. L.; Duncan, S. M.; Majetich, G., Application of Commercial Microwave-Ovens to Organic-Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, (41), 4945-4948.
130. Schanche, J. S., Microwave synthesis solutions from Personal Chemistry. *Mol. Diversity* **2003**, 7, (2-4), 293-300.
131. Hayes, B. L., Recent advances in microwave-assisted synthesis. *Aldrichim. Acta* **2004**, 37, (2), 66-77.
132. Bieser, A. M.; Thomann, Y.; Tiller, J. C., Contact-Active Antimicrobial and Potentially Self-Polishing Coatings Based on Cellulose. *Macromol. Biosci.* **2011**, 11, (1), 111-121.
133. Bieser, A. M.; Tiller, J. C., Mechanistic Considerations on Contact-Active Antimicrobial Surfaces with Controlled Functional Group Densities. *Macromol. Biosci.* **2011**, 11, (4), 526-534.
134. Kappe, C. O., Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, 43, (46), 6250-6284.
135. Kremsner, J. M.; Stadler, A.; Kappe, C. O., The scale-up of microwave-assisted organic synthesis. *Microwave Methods in Organic Synthesis* **2006**, 266, 233-278.
136. Hoogenboom, R.; Leenen, M. A. M.; Wiesbrock, F.; Schubert, W. S., Microwave accelerated polymerization of 2-phenyl-2-oxazoline: Microwave or temperature effects? *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, 26, (22), 1773-1778.
137. Wiesbrock, F.; Hoogenboom, R.; Abeln, C. H.; Schubert, U. S., Single-mode microwave ovens as new reaction devices: Accelerating the living polymerization of 2-ethyl-2-oxazoline. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, 25, (22), 1895-1899.
138. Sinnwell, S.; Ritter, H., Microwave accelerated polymerization of 2-phenyl-2-oxazoline. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, 26, (3), 160-163.
139. Wiesbrock, F.; Hoogenboom, R.; Leenen, M. A. M.; Meier, M. A. R.; Schubert, U. S., Investigation of the living cationic ring-opening polymerization of 2-methyl-, 2-ethyl-, 2-nonyl-, and 2-phenyl-2-oxazoline in a single-mode microwave reactor. *Macromolecules* **2005**, 38, (12), 5025-5034.

140. Lobert, M.; Kohn, U.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S., Synthesis and microwave assisted polymerization of fluorinated 2-phenyl-2-oxazolines: the fastest 2-oxazoline monomer to date. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2008**, (12), 1458-1460.
141. Bassiri, T. G.; Levy, A.; Litt, M., Polymerization of Cyclic Imino Ethers .1. Oxazolines. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Letters* **1967**, 5, (9pb), 871-&.
142. Levy, A.; Litt, M., Polymerization of Cyclic Imino Ethers .2. Oxazines. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Letters* **1967**, 5, (9pb), 881-&.
143. Litt, M.; Levy, A.; Herz, J., Polymerization of Cyclic Imino Ethers .10. Kinetics, Chain Transfer, and Repolymerization. *Journal of Macromolecular Science-Chemistry* **1975**, A 9, (5), 703-727.
144. Naka, K.; Yamashita, R.; Nakamura, T.; Ohki, A.; Maeda, S.; Aoi, K.; Takasu, A.; Okada, M., Chitin-graft-poly(2-methyl-2-oxazoline) enhanced solubility and activity of catalase in organic solvent. *Int. J. Biol. Macromol.* **1998**, 23, (4), 259-262.
145. Tsutsumiuchi, K.; Aoi, K.; Okada, M., Synthesis of Polyoxazoline-(Glyco)peptide Block Copolymers by Ring-Opening Polymerization of (Sugar-Substituted) α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides with Polyoxazoline Macroinitiators. *Macromolecules* **1997**, 30, (14), 4013-4017.
146. Einzmann, M.; Binder, W. H., Novel functional initiators for oxazoline polymerization. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2001**, 39, (16), 2821-2831.
147. Lambermont-Thijs, H. M. L.; Hoogenboom, R.; Fustin, C. A.; Bomal-D'Haese, C.; Gohy, J. F.; Schubert, U. S., Solubility Behavior of Amphiphilic Block and Random Copolymers Based on 2-Ethyl-2-oxazoline and 2-Nonyl-2-oxazoline in Binary Water-Ethanol Mixtures. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2009**, 47, (2), 515-522.
148. Diehl, C.; Dambowsky, I.; Hoogenboom, R.; Schlaad, H., Self-Assembly of Poly(2-alkyl-2-oxazoline)s by Crystallization in Ethanol-Water Mixtures Below the Upper Critical Solution Temperature. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, 32, (21), 1753-1758.
149. Obeid, R.; Park, J. Y.; Advincula, R. C.; Winnik, F. M., Temperature-dependent interfacial properties of hydrophobically end-modified poly(2-isopropyl-2-

oxazoline)s assemblies at the air/water interface and on solid substrates. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, 340, (2), 142-152.

150. Park, J. S.; Kataoka, K., Precise control of lower critical solution temperature of thermosensitive poly(2-isopropyl-2-oxazoline) via gradient copolymerization with 2-ethyl-2-oxazoline as a hydrophilic comonomer. *Macromolecules* **2006**, 39, (19), 6622-6630.

151. Liu, D. H.; DeGrado, W. F., De novo design, synthesis, and characterization of antimicrobial beta-peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, (31), 7553-7559.

152. Robinow, C. F.; Murray, R. G. E., The Differentiation of Cell Wall, Cytoplasmic Membrane and Cytoplasm of Gram Positive Bacteria by Selective Staining. *Exp. Cell Res.* **1953**, 4, (2), 390-407.

153. Brown, R. C.; Hopps, H. C., Staining of Bacteria in Tissue Sections - Reliable Gram Stain Method. *American Journal of Clinical Pathology* **1973**, 60, (2), 234-240.

154. Mitchell, P.; Moyle, J., Occurrence of a Phosphoric Ester in Certain Bacteria - Its Relation to Gram Staining and Penicillin Sensitivity. *Nature* **1950**, 166, (4214), 218-220.

155. Scherrer, R., Gram Staining Reaction, Gram Types and Cell-Walls of Bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **1984**, 9, (5), 242-245.

156. Al-Badri, Z. M.; Som, A.; Lyon, S.; Nelson, C. F.; Nusslein, K.; Tew, G. N., Investigating the Effect of Increasing Charge Density on the Hemolytic Activity of Synthetic Antimicrobial Polymers. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (10), 2805-2810.

157. Kuroda, K.; Sovadinova, I.; Palermo, E. F.; Huang, R.; Thoma, L. M., Mechanism of Polymer-Induced Hemolysis: Nanosized Pore Formation and Osmotic Lysis. *Biomacromolecules* **2011**, 12, (1), 260-268.

158. Waschinski, C. J., Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg/Br., *Dissertation* **2007**.

159. Tew, G. N.; Lienkamp, K.; Madkour, A. E.; Musante, A.; Nelson, C. F.; Nusslein, K., Antimicrobial polymers prepared by ROMP with unprecedented selectivity: A molecular construction kit approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, (30), 9836-9843.

160. Lienkamp, K., New Polymers for drug-resistant Bacteria. *Nachrichten Aus Der Chemie* **2011**, 59, (7-8), 719-723.

161. Glaser, P.; Presecan, E.; Delepierre, M.; Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Barzu, O.; Gilles, A. M., Zinc, a Novel Structural Element Found in the Family of Bacterial Adenylate Kinases. *Biochemistry* **1992**, 31, (12), 3038-3043.

162. Harayama, S.; Kok, M.; Neidle, E. L., Functional and Evolutionary Relationships among Diverse Oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, 46, 565-601.
163. Welfle, K.; Misselwitz, R.; Welfle, H.; Politz, O.; Borriss, R., Influence of Ca²⁺ on Conformation and Stability of 3 Bacterial Hybrid Glucanases. *Eur. J. Biochem.* **1995**, 229, (3), 726-735.
164. Suttisansanee, U.; Lau, K.; Lagishetty, S.; Rao, K. N.; Swaminathan, S.; Sauder, J. M.; Burley, S. K.; Honek, J. F., Structural Variation in Bacterial Glyoxalase I Enzymes INVESTIGATION OF THE METALLOENZYME GLYOXALASE I FROM CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, (44), 38367-38374.
165. Raimunda, D.; Gonzalez-Guerrero, M.; Leeber, B. W.; Arguello, J. M., The transport mechanism of bacterial Cu(+)-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function. *BioMetals* **2011**, 24, (3), 467-475.
166. Magalon, A.; Fedor, J. G.; Walburger, A.; Weiner, J. H., Molybdenum enzymes in bacteria and their maturation. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255, (9-10), 1159-1178.
167. Onishi, H. R.; Pelak, B. A.; Gerckens, L. S.; Silver, L. L.; Kahan, F. M.; Chen, M. H.; Patchett, A. A.; Galloway, S. M.; Hyland, S. A.; Anderson, M. S.; Raetz, C. R. H., Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis. *Science* **1996**, 274, (5289), 980-982.
168. Omburo, G. A.; Kuo, J. M.; Mullins, L. S.; Raushel, F. M., Characterization of the Zinc-Binding Site of Bacterial Phosphotriesterase. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, (19), 13278-13283.
169. Morton, L. H. G.; Greenway, D. L. A.; Gaylarde, C. C.; Surman, S. B., Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation* **1998**, 41, (3-4), 247-259.
170. Donlan, R. M.; Costerton, J. W., Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **2002**, 15, (2), 167-+.
171. Gotz, F., Staphylococcus and biofilms. *Mol. Microbiol.* **2002**, 43, (6), 1367-1378.
172. Takahashi, N.; Nyvad, B., The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives. *J. Dent. Res.* **2011**, 90, (3), 294-303.
173. Chaussain-Miller, C.; Fioretti, F.; Goldberg, M.; Menashi, S., The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J. Dent. Res.* **2006**, 85, (1), 22-32.

174. Pashley, D. H.; Tay, F. R.; Yiu, C.; Hashimoto, M.; Breschi, L.; Carvalho, R. M.; Ito, S., Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J. Dent. Res.* **2004**, 83, (3), 216-221.
175. Tjaderhane, L.; Larjava, H.; Sorsa, T.; Uitto, V. J.; Larmas, M.; Salo, T., The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J. Dent. Res.* **1998**, 77, (8), 1622-1629.
176. Frerman, F. E.; White, D. C., Membrane Lipid Changes during Formation of a Functional Electron Transport System in Staphylococcus Aureus. *J. Bacteriol.* **1967**, 94, (6), 1868-&.
177. White, D. C.; Frerman, F. E., Extraction Characterization and Cellular Localization of Lipids of Staphylococcus Aureus. *J. Bacteriol.* **1967**, 94, (6), 1854-&.
178. White, D. C.; Frerman, F. E., Fatty Acid Composition of Complex Lipids of Staphylococcus Aureus during Formation of Membrane-Bound Electron Transport System. *J. Bacteriol.* **1968**, 95, (6), 2198-&.
179. Joyce, G. H.; Hammond, R. K.; White, D. C., Changes in Membrane Lipid Composition in Exponentially Growing Staphylococcus-Aureus during Shift from 37 to 25 C. *J. Bacteriol.* **1970**, 104, (1), 323-&.
180. Langner, M.; Kubica, K., The electrostatics of lipid surfaces. *Chem. Phys. Lipids* **1999**, 101, (1), 3-35.
181. Sen, A.; Sambhy, V.; Peterson, B. R., Antibacterial and hemolytic activities of pyridinium polymers as a function of the spatial relationship between the positive charge and the pendant alkyl tail. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, 47, (7), 1250-1254.
182. Bloksma, M. M.; Paulus, R. M.; van Kuringen, H. P. C.; van der Woerd, F.; Lambermont-Thijs, H. M. L.; Schubert, U. S.; Hoogenboom, R., Thermoresponsive Poly(2-oxazine)s. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, 33, (1), 92-96.
183. Weber, C.; Becer, C. R.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S., Lower Critical Solution Temperature Behavior of Comb and Graft Shaped Poly[oligo(2-ethyl-2-oxazoline)methacrylate]s. *Macromolecules* **2009**, 42, (8), 2965-2971.
184. Yoshida, E.; Uno, S.; Nodasaka, Y.; Kaga, M.; Hirano, S., Relationship between water status in dentin and interfacial morphology in all-in-one adhesives. *Dental Materials* **2007**, 23, (5), 556-560.

185. Spencer, P.; Wang, Y., Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, 62, (3), 447-456.
186. Ye, Q.; Park, J. G.; Topp, E.; Wang, Y.; Misra, A.; Spencer, P., In vitro performance of nano-heterogeneous dentin adhesive. *J. Dent. Res.* **2008**, 87, (9), 829-833.
187. Kostoryz, E. L.; Dharmala, K.; Ye, Q.; Wang, Y.; Huber, J.; Park, J. G.; Snider, G.; Katz, J. L.; Spencer, P., Enzymatic Biodegradation of HEMA/BisGMA Adhesives Formulated With Different Water Content. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **2009**, 88B, (2), 394-401.
188. Park, J. G.; Ye, Q.; Topp, E. M.; Lee, C. H.; Kostoryz, E. L.; Misra, A.; Spencer, P., Dynamic Mechanical Analysis and Esterase Degradation of Dentin Adhesives Containing a Branched Methacrylate. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **2009**, 91B, (1), 61-70.
189. Carrilho, M. R. O.; Carvalho, R. M.; Tay, F. R.; Yiu, C.; Pashley, D. H., Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *American Journal of Dentistry* **2005**, 18, (6), 315-319.
190. De Munck, J.; Van Meerbeek, B.; Satoshi, I.; Vargas, M.; Yoshida, Y.; Armstrong, S.; Lambrechts, P.; Vanherle, G., Microtensile bond strengths of one- and two-step self-etch adhesives to bur-cut enamel and dentin. *American Journal of Dentistry* **2003**, 16, (6), 414-420.
191. Armstrong, S. R.; Vargas, M. A.; Fang, Q.; Laffoon, J. E., Microtensile bond strength of a total-etch 3-step, total-etch 2-step, self-etch 2-step, and a self-etch 1-step dentin bonding system through 15-month water storage. *Journal of Adhesive Dentistry* **2003**, 5, (1), 47-56.
192. Armstrong, S. R.; Vargas, M. A.; Chung, I.; Pashley, D. H.; Campbell, J. A.; Laffoon, J. E.; Qian, F., Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. *Operative Dentistry* **2004**, 29, (6), 705-712.
193. De Munck, J.; Van Meerbeek, B.; Yoshida, Y.; Inoue, S.; Vargas, M.; Suzuki, K.; Lambrechts, P.; Vanherle, G., Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J. Dent. Res.* **2003**, 82, (2), 136-140.

194. Foxton, R. M.; Melo, L.; Stone, D. G.; Pilecki, P.; Sherriff, M.; Watson, T. F., Long-term Durability of One-step Adhesive-composite Systems to Enamel and Dentin. *Operative Dentistry* **2008**, 33, (6), 651-657.
195. Sadek, F. T.; Castellan, C. S.; Braga, R. R.; Mai, S.; Tjaderhane, L.; Pashley, D. H.; Tay, F. R., One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dental Materials* **2010**, 26, (4), 380-386.
196. Yiu, C. K. Y.; King, N. M.; Pashley, D. H.; Suh, B. I.; Carvalho, R. M.; Carrilho, M. R. O.; Tay, F. R., Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. *Biomaterials* **2004**, 25, (26), 5789-5796.
197. De Munck, J.; Van Landuyt, K.; Peumans, M.; Poitevin, A.; Lambrechts, P.; Braem, M.; Van Meerbeek, B., A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: Methods and results. *J. Dent. Res.* **2005**, 84, (2), 118-132.
198. Hashimoto, M.; Fujita, S.; Kaga, M.; Yawaka, Y., In vitro durability of one-bottle resin adhesives bonded to dentin. *Dental Materials Journal* **2007**, 26, (5), 677-686.
199. Tay, F. R.; Hashimoto, M.; Pashley, D. H.; Peters, M. C.; Lail, S. C. N.; Yiu, C. K. Y.; Cheong, C., Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. *J. Dent. Res.* **2003**, 82, (7), 537-541.
200. Spencer, P.; Wang, Y.; Bohaty, B., Interfacial chemistry of moisture-aged class II composite restorations. *Journal of Biomedical Materials Research Part B- Applied Biomaterials* **2006**, 77B, (2), 234-240.
201. Van Houte, J., Role of micro-organisms in caries etiology. *J. Dent. Res.* **1994**, 73, 672-681.
202. Nagase, H.; Visse, R.; Murphy, G., Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **2006**, 69, (3), 562-573.
203. Everts, V.; Delaisse, J. M.; Korper, W.; Niehof, A.; Vaes, G.; Beertsen, W., Degradation of Collagen in the Bone-Resorbing Compartment Underlying the Osteoclast Involves Both Cysteine-Proteinases and Matrix Metalloproteinases. *J. Cell. Physiol.* **1992**, 150, (2), 221-231.
204. Visse, R.; Nagase, H., Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases - Structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **2003**, 92, (8), 827-839.
205. Tezvergil-Mutluay, A.; Agee, K. A.; Hoshika, T.; Carrilho, M.; Breschi, L.; Tjaderhane, L.; Nishitani, Y.; Carvalho, R. M.; Looney, S.; Tay, F. R.; Pashley, D. H.,

- The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *Dental Materials* **2010**, 26, (11), 1059-1067.
206. Martin-De las Heras, S.; Valenzuela, A.; Overall, C. M., The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch. Oral Biol.* **2000**, 45, (9), 757-765.
207. Tjaderhane, L.; Palosaari, H.; Sulkala, M.; Wahlgren, J.; Larmas, M.; Bartlett, J. D.; Sorsa, T.; Salo, T., Caries induces the expression of MMP-20 mRNA in human teeth. *J. Dent. Res.* **2000**, 79, 344-344.
208. Tjaderhane, L.; Palosaari, H.; Wahlgren, J.; Larmas, M.; Sorsa, T.; Salo, T., Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res* **2001**, 15, 55-58.
209. Vanwart, H. E.; Birkedal-hansen, H., The Cysteine Switch - a Principle of Regulation of Metalloproteinase Activity with Potential Applicability to the Entire Matrix Metalloproteinase Gene Family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, 87, (14), 5578-5582.
210. Tersariol, I. L.; Geraldini, S.; Minciotti, C. L.; Nascimento, F. D.; Paakkonen, V.; Martins, M. T.; Carrilho, M. R.; Pashley, D. H.; Tay, F. R.; Salo, T.; Tjaderhane, L., Cysteine Cathepsins in Human Dentin-Pulp Complex. *Journal of Endodontics* **2010**, 36, (3), 475-481.
211. Palosaari, H.; Pennington, C. J.; Larmas, M.; Edwards, D. R.; Tjaderhane, L.; Salo, T., Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *European Journal of Oral Sciences* **2003**, 111, (2), 117-127.
212. Nishitani, Y.; Yoshiyama, M.; Wadgaonkar, B.; Breschi, L.; Mannello, F.; Mazzoni, A.; Carvalho, R. M.; Tjaderhane, L.; Tay, F. R.; Pashley, D. H., Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *European Journal of Oral Sciences* **2006**, 114, (2), 160-166.
213. Tay, F. R.; Pashley, D. H.; Loushine, R. J.; Weller, R. N.; Monticelli, F.; Osorio, R., Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *Journal of Endodontics* **2006**, 32, (9), 862-868.
214. Moszner, N.; Salz, U.; Zimmermann, J., Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: A systematic review. *Dental Materials* **2005**, 21, (10), 895-910.

215. Van Landuyt, K. L.; Snauwaert, J.; De Munck, J.; Peurnans, M.; Yoshida, Y.; Poitevin, A.; Coutinho, E.; Suzuki, K.; Lambrechtsa, P.; Van Meerbeek, B., Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* **2007**, 28, (26), 3757-3785.
216. De Munck, J.; Mine, A.; Van den Steen, P. E.; Van Landuyt, K. L.; Poitevin, A.; Opdenakker, G.; Van Meerbeek, B., Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *European Journal of Oral Sciences* **2010**, 118, (5), 494-501.
217. Mazzoni, A.; Pashley, D. H.; Nishitani, Y.; Breschi, L.; Marinello, F.; Tjaderhane, L.; Toledano, M.; Pashley, E. L.; Tay, F. R., Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* **2006**, 27, (25), 4470-4476.
218. Mazzoni, A.; Mannello, F.; Tay, F. R.; Tonti, G. A. M.; Papa, S.; Mazzotti, G.; Di Lenarda, R.; Pashley, D. H.; Breschi, L., Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and-9 forms in human sound dentin. *J. Dent. Res.* **2007**, 86, (5), 436-440.
219. Kawasaki, K.; Featherstone, J. D. B., Effects of collagenase on root demineralization. *J. Dent. Res.* **1997**, 76, (1), 588-595.
220. De Munck, J.; Van den Steen, P. E.; Mine, A.; Van Landuyt, K. L.; Poitevin, A.; Opdenakker, G.; Van Meerbeek, B., Inhibition of Enzymatic Degradation of Adhesive-Dentin Interfaces. *J. Dent. Res.* **2009**, 88, (12), 1101-1106.
221. Lehmann, N.; Debret, R.; Romeas, A.; Magloire, H.; Degrange, M.; Bleicher, F.; Sommer, P.; Seux, D., Self-etching Increases Matrix Metalloproteinase Expression in the Dentin-Pulp Complex. *J. Dent. Res.* **2009**, 88, (1), 77-82.
222. Gendron, R.; Grenier, D.; Sorsa, T.; Mayrand, D., Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **1999**, 6, (3), 437-439.
223. Breschi, L.; Mazzoni, A.; Nato, F.; Carrilho, M.; Visintini, E.; Tjaderhane, L.; Ruggeri, A.; Tay, F. R.; Dorigo, E. D.; Pashley, D. H., Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year in vitro study. *Dental Materials* **2010**, 26, (4), 320-325.
224. Carrilho, M. R.; Carvalho, R. M.; Sousa, E. N.; Nicolau, J.; Breschi, L.; Mazzoni, A.; Tjaderhane, L.; Tay, F. R.; Agee, K.; Pashley, D. H., Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dental Materials* **2010**, 26, (8), 779-785.

225. Carrilho, M. R. O.; Carvalho, R. M.; de Goes, M. F.; di Hipolito, V.; Geraldeli, S.; Tay, F. R.; Pashley, D. H.; Tjaderhane, L., Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J. Dent. Res.* **2007**, 86, (1), 90-94.
226. Carrilho, M. R. O.; Geraldeli, S.; Tay, F.; de Goes, M. F.; Carvalho, R. M.; Tjaderhane, L.; Reis, A. F.; Hebling, J.; Mazzoni, A.; Breschi, L.; Pashley, D., In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J. Dent. Res.* **2007**, 86, (6), 529-533.
227. Hebling, J.; Pashley, D. H.; Tjaderhane, L.; Tay, F. R., Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J. Dent. Res.* **2005**, 84, (8), 741-746.
228. Zhou, J. F.; Tan, J. G.; Yang, X.; Xu, X. M.; Li, D. L.; Chen, L., MMP-Inhibitory Effect of Chlorhexidine Applied in a Self-etching Adhesive. *Journal of Adhesive Dentistry* **2011**, 13, (2), 111-115.
229. Breschi, L.; Martin, P.; Mazzoni, A.; Nato, F.; Carrilho, M.; Tjaderhane, L.; Visintini, E.; Cadenaro, M.; Tay, F. R.; Dorigo, E. D. S.; Pashley, D. H., Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dental Materials* **2010**, 26, (6), 571-578.
230. Autio-Gold, J., The Role of Chlorhexidine in Caries Prevention. *Operative Dentistry* **2008**, 33, (6), 710-716.
231. Ciarlone, A. E.; Gangarosa, L. P.; Fong, B. C., Detection of Para-Chloroaniline in Chlorhexidine Solutions Using Thin-Layer Chromatography. *J. Dent. Res.* **1976**, 55, (5), 918-918.
232. Tanaka, T.; Ishii, M.; Nakano, S.; Mori, Y.; Yano, Y.; Iijima, T.; Takeda, K.; Kido, Y., Microbial degradation of disinfectants: Two new aromatic degradation products of chlorhexidine, chlorhexidine aromatic degradation product (CHADP)-4 and CHADP6, produced by *Pseudomonas* sp strain no. A-3. *Journal of Health Science* **2006**, 52, (1), 58-62.
233. Peterson, D. E., Oral Toxicity of Chemotherapeutic-Agents. *Seminars in Oncology* **1992**, 19, (5), 478-491.
234. Faria, G.; Cardoso, C. R. B.; Larson, R. E.; Silva, J. S.; Rossi, M. A., Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, 234, (2), 256-265.

235. Lee, T. H.; Hu, C. C.; Lee, S. S.; Chou, M. Y.; Chang, Y. C., Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *International Endodontic Journal* **2010**, 43, (5), 430-435.
236. Lai, P.; Coulson, C.; Pothier, D. D.; Rutka, J., Chlorhexidine Ototwdcity in Ear Surgery, Part 1: Review of the Literature. *Journal of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* **2011**, 40, (6), 437-440.
237. Bull, J. P.; Serreqi, A. N.; Chen, T.; Breuil, C., Development of an immunoassay for a Quaternary ammonium compound, benzyldimethyldodecylammonium chloride. *Water Res.* **1998**, 32, (12), 3621-3630.
238. Fik, C. P.; Krumm, C.; Muennig, C.; Baur, T. I.; Salz, U.; Bock, T.; Tiller, J. C., Impact of Functional Satellite Groups on the Antimicrobial Activity and Hemocompatibility of Telechelic Poly(2-methyloxazoline)s. *Biomacromolecules* **2011**, DOI 10.1021/bm201403e.
239. Okada, Y.; Morodomi, T.; Enghild, J. J.; Suzuki, K.; Yasui, A.; Nakanishi, I.; Salvesen, G.; Nagase, H., Matrix Metalloproteinase-2 from Human Rheumatoid Synovial Fibroblasts - Purification and Activation of the Precursor and Enzymatic-Properties. *Eur. J. Biochem.* **1990**, 194, (3), 721-730.
240. Krane, S. M.; Byrne, M. H.; Lemaitre, V.; Henriet, P.; Jeffrey, J. J.; Witter, J. P.; Liu, X.; Wu, H.; Jaenisch, R.; Eeckhout, Y., Different collagenase gene products have different roles in degradation of type I collagen. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, (45), 28509-28515.
241. Bond, M. D.; Vanwart, H. E., Characterization of the Individual Collagenases from *Clostridium-Histolyticum*. *Biochemistry* **1984**, 23, (13), 3085-3091.
242. Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **1970**, 227, (5259), 680-&.
243. Philominathan, S. T. L.; Matsushita, O.; Gensure, R.; Sakon, J., Ca(2+)-induced linker transformation leads to a compact and rigid collagen-binding domain of *Clostridium histolyticum* collagenase. *FEBS J.* **2009**, 276, (13), 3589-3601.
244. Thompson, J. M.; Agee, K.; Sidow, S. J.; McNally, K.; Lindsey, K.; Borke, J.; Elsalanty, M.; Tay, F. R.; Pashley, D. H., Inhibition of Endogenous Dentin Matrix Metalloproteinases by Ethylenediaminetetraacetic Acid. *Journal of Endodontics* **2012**, 38, (1), 62-65.
245. Prado, M.; Gusman, H.; Gomes, B. P. F. A.; Simao, R. A., Scanning Electron Microscopic Investigation of the Effectiveness of Phosphoric Acid in Smear Layer

Removal When Compared with EDTA and Citric Acid. *Journal of Endodontics* **2011**, 37, (2), 255-258.

246. Santos, J.; Carrilho, M.; Tervahartiala, T.; Sorsa, T.; Breschi, L.; Mazzoni, A.; Pashley, D.; Tay, F.; Ferraz, C.; Tjaderhane, L., Determination of Matrix Metalloproteinases in Human Radicular Dentin. *Journal of Endodontics* **2009**, 35, (5), 686-689.

247. Wahlgren, J.; Salo, T.; Teronen, O.; Luoto, H.; Sorsa, T.; Tjaderhane, L., Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudate. *International Endodontic Journal* **2002**, 35, (11), 897-904.

248. Sulkala, M.; Tervahartiala, T.; Sorsa, T.; Larmas, M.; Salo, T.; Tjaderhane, L., Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch. Oral Biol.* **2007**, 52, (2), 121-127.

249. Kato, M. T.; Hannas, A. R.; Leite, A. L.; Bolanho, A.; Zarella, B. L.; Santos, J.; Carrilho, M.; Tjaderhane, L.; Buzalaf, M. A. R., Activity of Matrix Metalloproteinases in Bovine versus Human Dentine. *Caries Research* **2011**, 45, (5), 429-434.

250. Harper, E., Collagenases. *Annual Review of Biochemistry* **1980**, 49, 1063-1078.

251. Grant, N. H.; Alburn, H. E., Studies on the Collagenases of *Clostridium-Histolyticum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, 82, (2), 245-255.

252. Harrington, D. J., Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infect. Immun.* **1996**, 64, (6), 1885-1891.

253. Borkakoti, N., Structural studies of matrix metalloproteinases. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* **2000**, 78, (5), 261-268.

254. Grassmann, W.; Nordwig, A., Quantitativer Kolorimetrischer Test Auf Kollagenase. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* **1960**, 322, (3-6), 267-272.

255. Tezvergil-Mutluay, A.; Agee, K. A.; Hoshika, T.; Tay, F. R.; Pashley, D. H., The inhibitory effect of polyvinylphosphonic acid on functional matrix metalloproteinase activities in human demineralized dentin. *Acta Biomaterialia* **2010**, 6, (10), 4136-4142.

256. Tezvergil-Mutluay, A.; Mutluay, M. M.; Gu, L. S.; Zhang, K.; Agee, K. A.; Carvalho, R. M.; Manso, A.; Carrilho, M.; Tay, F. R.; Breschi, L.; Suh, B. I.; Pashley,

- D. H., The anti-MMP activity of benzalkonium chloride. *Journal of Dentistry* **2011**, 39, (1), 57-64.
257. Carrilho, M. R.; Tay, F. R.; Donnelly, A. M.; Agee, K. A.; Tjaederhane, L.; Mazzoni, A.; Breschi, L.; Foulger, S.; Pashley, D. H., Host-Derived Loss of Dentin Matrix Stiffness Associated With Solubilization of Collagen. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **2009**, 90B, (1), 373-380.
258. Tezvergil-Mutluay, A.; Agee, K. A.; Uchiyama, T.; Imazato, S.; Mutluay, M. M.; Cadenaro, M.; Breschi, L.; Nishitani, Y.; Tay, F. R.; Pashley, D. H., The Inhibitory Effects of Quaternary Ammonium Methacrylates on Soluble and Matrix-bound MMPs. *J. Dent. Res.* **2011**, 90, (4), 535-540.
259. Jamall, I. S.; Finelli, V. N.; Hee, S. S. Q., A Simple Method to Determine Nanogram Levels of 4-Hydroxyproline in Biological Tissues. *Anal. Biochem.* **1981**, 112, (1), 70-75.
260. Woessner, J. F., Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of This Imino Acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **1961**, 93, (2), 440-&.
261. Volpe, A. R.; Kupczak, L. J.; Brant, J. H.; King, W. J.; Kestenba.Rc; Schlisse.Hj, Antimicrobial Control of Bacterial Plaque and Calculus and Effects of These Agents on Oral Flora. *J. Dent. Res.* **1969**, 48, (5p1s), 832-&.
262. Lang, E.; Jilani, K.; Zelenak, C.; Pasham, V.; Bobbala, D.; Qadri, S. M.; Lang, F., Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by Benzethonium. *Cell. Physiol. Biochem.* **2011**, 28, (2), 347-354.
263. Ackart, W. B.; Camp, R. L.; Wheelwright, W. L.; Byck, J. S., Antimicrobial Polymers. *Journal of Biomedical Materials Research* **1975**, 9, (1), 55-68.
264. Park, D.; Wang, J.; Klibanov, A. M., One-step, painting-like coating procedures to make surfaces highly and permanently bactericidal. *Biotechnol. Prog.* **2006**, 22, (2), 584-589.
265. Jackson, R. J.; Lim, D. V.; Dao, M. L., Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. *Curr. Microbiol.* **1997**, 34, (1), 49-54.
266. Li, F.; Chai, Z. G.; Sun, M. N.; Wang, F.; Ma, S.; Zhang, L.; Fang, M.; Chen, J. H., Anti-biofilm Effect of Dental Adhesive with Cationic Monomer. *J. Dent. Res.* **2009**, 88, (4), 372-376.

267. Wilson, G. S.; Raftos, D. A.; Nair, S. V., Antimicrobial activity of surface attached marine bacteria in biofilms. *Microbiological Research* **2011**, 166, (6), 437-448.
268. Piez, K. A., Primary Structure of Collagen. *Israel Journal of Medical Sciences* **1974**, 10, (11), 1465-1465.
269. Takahara, K.; Sato, Y.; Okazawa, K.; Okamoto, N.; Noda, A.; Yaoi, Y.; Kato, I., Complete Primary Structure of Human Collagen Alpha-1(V) Chain. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266, (20), 13124-13129.
270. Fietzek, P. P.; Allmann, H.; Dewes, H.; Glanville, R.; Lang, H.; Bentz, H., Primary Structure of Collagen. *Federation Proceedings* **1977**, 36, (3), 837-837.
271. Piez, K. A.; Trus, B. L., Collagen, Primary and Higher Level Structure. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1979**, (Sep), 46-46.
272. Delgado, C.; Francis, G. E.; Fisher, D., The Uses and Properties of Peg-Linked Proteins. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **1992**, 9, (3-4), 249-304.
273. Hooftman, G.; Herman, S.; Schacht, E., Poly(ethylene glycol)s with reactive endgroups .2. Practical consideration for the preparation of protein-PEG conjugates. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1996**, 11, (2), 135-159.
274. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, 54, (4), 459-476.
275. Mero, A.; Pasut, G.; Via, L. D.; Fijten, M. W. M.; Schubert, U. S.; Hoogenboom, R.; Veronese, F. M., Synthesis and characterization of poly(2-ethyl 2-oxazoline)-conjugates with proteins and drugs: Suitable alternatives to PEG-conjugates? *J. Controlled Release* **2008**, 125, (2), 87-95.
276. Miyamoto, M.; Naka, K.; Shiozaki, M.; Chujo, Y.; Saegusa, T., Preparation and Enzymatic-Activity of Poly[(N-Acylimino)Ethylene]-Modified Catalase. *Macromolecules* **1990**, 23, (13), 3201-3205.
277. Viegas, T. X.; Bentley, M. D.; Harris, J. M.; Fang, Z. F.; Yoon, K.; Dizman, B.; Weimer, R.; Mero, A.; Pasut, G.; Veronese, F. M., Polyoxazoline: Chemistry, Properties, and Applications in Drug Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, (5), 976-986.
278. Tong, J.; Luxenhofer, R.; Yi, X. A.; Jordan, R.; Kabanov, A. V., Protein Modification with Amphiphilic Block Copoly(2-oxazoline)s as a New Platform for Enhanced Cellular Delivery. *Mol. Pharm.* **2010**, 7, (4), 984-992.

279. Yoshimoto, T.; Ritani, A.; Ohwada, K.; Takahashi, K.; Kodera, Y.; Matsushima, A.; Saito, Y.; Inada, Y., Polyethylene-Glycol Derivative-Modified Cholesterol Oxidase Soluble and Active in Benzene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, 148, (2), 876-882.
280. Mozhaev, V. V.; Siksnis, V. A.; Meliknubarov, N. S.; Galkantaite, N. Z.; Denis, G. J.; Butkus, E. P.; Zaslavsky, B. Y.; Mestechkina, N. M.; Martinek, K., Protein Stabilization Via Hydrophilization - Covalent Modification of Trypsin and Alpha-Chymotrypsin. *Eur. J. Biochem.* **1988**, 173, (1), 147-154.
281. Edlund, U.; Albertsson, A. C., Polyesters based on diacid monomers. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, 55, (4), 585-609.
282. Uhrich, K. E.; Gupta, A.; Thomas, T. T.; Laurencin, C. T.; Langer, R., Synthesis and Characterization of Degradable Poly(Anhydride-Co-Imides). *Macromolecules* **1995**, 28, (7), 2184-2193.
283. Greiner, A.; Wendorff, J. H., Functional Self-Assembled Nanofibers by Electrospinning. *Self-Assembled Nanomaterials I: Nanofibers* **2008**, 219, 107-171.
284. Levkin, P. A.; Svec, F.; Frechet, J. M. J., Porous Polymer Coatings: a Versatile Approach to Superhydrophobic Surfaces. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, (12), 1993-1998.
285. Zhao, B.; Brittain, W. J., Polymer brushes: surface-immobilized macromolecules. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, 25, (5), 677-710.
286. Schmelmer, U.; Jordan, R.; Geyer, W.; Eck, W.; Golzhauser, A.; Grunze, M.; Ulman, A., Surface-initiated polymerization on self-assembled monolayers: Amplification of patterns on the micrometer and nanometer scale. *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, 42, (5), 559-+.
287. Amin, I.; Steenackers, M.; Zhang, N.; Beyer, A.; Zhang, X. H.; Pirzer, T.; Hugel, T.; Jordan, R.; Golzhauser, A., Polymer Carpets. *Small* **2010**, 6, (15), 1623-1630.
288. Geissler, M.; Bernard, A.; Bietsch, A.; Schmid, H.; Michel, B.; Delamarche, E., Microcontact-printing chemical patterns with flat stamps. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, (26), 6303-6304.
289. Schmid, H.; Michel, B., Siloxane polymers for high-resolution, high-accuracy soft lithography. *Macromolecules* **2000**, 33, (8), 3042-3049.
290. del Campo, A.; Greiner, C.; Arzt, E., Contact shape controls adhesion of bioinspired fibrillar surfaces. *Langmuir* **2007**, 23, (20), 10235-10243.

291. Roca-Cusachs, P.; Rico, F.; Martinez, E.; Toset, J.; Farre, R.; Navajas, D., Stability of microfabricated high aspect ratio structures in poly(dimethylsiloxane). *Langmuir* **2005**, 21, (12), 5542-5548.
292. Luttge, R.; Berenschot, E. J. W.; de Boer, M. J.; Altpeter, D. M.; Vrouwe, E. X.; van den Berg, A.; Elwenspoek, M., Integrated lithographic molding for microneedle-based devices. *Journal of Microelectromechanical Systems* **2007**, 16, (4), 872-884.
293. Steinhart, M.; Wendorff, J. H.; Greiner, A.; Wehrspohn, R. B.; Nielsch, K.; Schilling, J.; Choi, J.; Gosele, U., Polymer nanotubes by wetting of ordered porous templates. *Science* **2002**, 296, (5575), 1997-1997.
294. Her, T. H.; Finlay, R. J.; Wu, C.; Deliwala, S.; Mazur, E., Microstructuring of silicon with femtosecond laser pulses. *Appl. Phys. Lett.* **1998**, 73, (12), 1673-1675.
295. Jeong, H. E.; Lee, S. H.; Kim, P.; Suh, K. Y., High aspect-ratio polymer nanostructures by tailored capillarity and adhesive force. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, 313, 359-364
- 704.
296. Hsu, S. H.; Sigmund, W. M., Artificial Hairy Surfaces with a Nearly Perfect Hydrophobic Response. *Langmuir* **2010**, 26, (3), 1504-1506.
297. Mock, U.; Forster, R.; Menz, W.; Ruhe, J., Towards ultrahydrophobic surfaces: a biomimetic approach. *Journal of Physics-Condensed Matter* **2005**, 17, (9), S639-S648.
298. Goodwyn, P. P.; De Souza, E.; Fujisaki, K.; Gorb, S., Moulding technique demonstrates the contribution of surface geometry to the super-hydrophobic properties of the surface of a water strider. *Acta Biomaterialia* **2008**, 4, (3), 766-770.
299. Chen, L.; Yu, Q. S.; Wang, Y.; Li, H., BisGMA/TEGDMA dental composite containing high aspect-ratio hydroxyapatite nanofibers. *Dental Materials* **2011**, 27, (11), 1187-1195.
300. Goncalves, F.; Kawano, Y.; Pfeifer, C.; Stansbury, J. W.; Braga, R. R., Influence of BisGMA, TEGDMA, and BisEMA contents on viscosity, conversion, and flexural strength of experimental resins and composites. *European Journal of Oral Sciences* **2009**, 117, (4), 442-446.
301. Andrzejewska, E., Photopolymerization kinetics of multifunctional monomers. *Prog. Polym. Sci.* **2001**, 26, (4), 605-665.
302. Moszner, N.; Salz, U., New developments of polymeric dental composites. *Prog. Polym. Sci.* **2001**, 26, (4), 535-576.

303. Fong, H., Electrospun nylon 6 nanofiber reinforced BIS-GMA/TEGDMA dental restorative composite resins. *Polymer* **2004**, 45, (7), 2427-2432.
304. Vencill, C. F.; Rasnick, D.; Crumley, K. V.; Nishino, N.; Powers, J. C., Clostridium-Histolyticum Collagenase - Development of New Thio Ester, Fluorogenic, and Depsipeptide Substrates and New Inhibitors. *Biochemistry* **1985**, 24, (13), 3149-3157.
305. Barszczewska-Rybarek, I. M., Structure-property relationships in dimethacrylate networks based on Bis-GMA, UDMA and TEGDMA. *Dental Materials* **2009**, 25, (9), 1082-1089.
306. Michelsen, V. B.; Kopperud, H. B. M.; Lygre, G. B.; Bjorkman, L.; Jensen, E.; Kleven, I. S.; Svahn, J.; Lygre, H., Detection and quantification of monomers in unstimulated whole saliva after treatment with resin-based composite fillings in vivo. *European Journal of Oral Sciences* **2012**, 120, (1), 89-95.
307. Dickens, S. H.; Stansbury, J. W.; Choi, K. M.; Floyd, C. J. E., Photopolymerization kinetics of methacrylate dental resins. *Macromolecules* **2003**, 36, (16), 6043-6053.
308. Koch, K.; Schulte, A. J.; Fischer, A.; Gorb, S. N.; Barthlott, W., A fast, precise and low-cost replication technique for nano- and high-aspect-ratio structures of biological and artificial surfaces. *Bioinspiration & Biomimetics* **2008**, 3, (4), -.
309. Koch, K.; Bhushan, B.; Barthlott, W., Multifunctional surface structures of plants: An inspiration for biomimetics. *Progress in Materials Science* **2009**, 54, (2), 137-178.
310. Barthlott, W.; Schimmel, T.; Wiersch, S.; Koch, K.; Brede, M.; Barczewski, M.; Walheim, S.; Weis, A.; Kaltenmaier, A.; Leder, A.; Bohn, H. F., The Salvinia Paradox: Superhydrophobic Surfaces with Hydrophilic Pins for Air Retention Under Water. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2010**, 22, (21), 2325-2328.
311. Quere, D., Non-sticking drops. *Reports on Progress in Physics* **2005**, 68, (11), 2495-2532.
312. Cao, L. L.; Jones, A. K.; Sikka, V. K.; Wu, J. Z.; Gao, D., Anti-Icing Superhydrophobic Coatings. *Langmuir* **2009**, 25, (21), 12444-12448.
313. Sarkar, D. K.; Farzaneh, M., Superhydrophobic Coatings with Reduced Ice Adhesion. *J. Adhes. Sci. Technol.* **2009**, 23, (9), 1215-1237.
314. Guo, Z. G.; Liu, W. M.; Su, B. L., Superhydrophobic surfaces: From natural to biomimetic to functional. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, 353, (2), 335-355.

315. Stober, W.; Fink, A.; Bohn, E., Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, 26, (1), 62-69.
316. Fazekas, S. D. S.; Webster, R. G.; Datyner, A., 2 New Staining Procedures for Quantitative Estimation of Proteins on Electrophoretic Strips. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, 71, (2), 377-&.
317. Cleland, W. W., Dithiothreitol New Protective Reagent for Sh Groups. *Biochemistry* **1964**, 3, (4), 480-&.

Abstract

The objective was the preparation of bioactive, telechelic poly-2-R-1,3-oxazolines (PROX) with variable side groups (R = Methyl, Ethyl, *iso*Propyl) and chain lengths. For the syntheses, the living cationic ring opening polymerization (CROP) in combination with microwave-heating was used. The bioactive efficacy was generated through the introduction of a biocidal initiator based on a quaternary ammonium compound (QUART). The chain ends were terminated with functional and reactive satellite-/anchor groups. After characterization with $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR und SEC, the influence of the satellite groups on the antimicrobial efficacy of the resulting polyoxazolines was examined. Thereby, minimal inhibitory concentrations (MIC) against the GRAM-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and the GRAM-positive *Escherichia coli* were detected. The distribution of the antimicrobial efficacy against further, biomedically relevant bacterial strains was investigated. Mean hemolytic concentrations (HC_{50}) against living porcine blood erthrozytes were determined. Because of the desired use in dental applications, the enzyme-inhibiting effect of the bioactive polyoxazolines was determined against bacterial collagenases and human matrix metalloproteinases (MMPs) in solution. By use of collagen degradation and peptide-release assays on demineralized human and bovine dentin, the time-activity-parameters of the MMP-inhibition were quantified. Polyoxazolines with double-bond containing anchor groups were utilized as polymeric additives for the modification of a commercial dental adhesive. After blue-light curing on model surfaces, long-term efficient antimicrobial coatings were obtained that were resistant to washing and biofilms of *Streptococcus mutans*. Hereby, adverse effects on relevant dental mechanical properties were excluded. Using a polymer-analogous reaction, polyoxazolines were functionalized with aminoselective anchor groups and tethered to surfaces. In order to further increase the surface density of groups, a direct *grafting-onto* termination of „living“ polyoxazolinium chains was conducted. Furthermore, a significant enlargement of the active surface area was achieved using a biomimetic reproduction technique. Finally, even the unique properties of the template were realized on the artificial surface replica.

Kurzzusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Synthese bioaktiver, beidseitig funktionalisierter (telecheler) Poly-2-R-1,3-Oxazoline (PROX) mit variablen Kettenlängen und wählbaren Seitengruppen (R = Methyl, Ethyl, *iso*Propyl). Methodisch wurde die Kationisch Ringöffnende Lebende Polymerisation (CROP) unter Einsatz der Mikrowellenheiztechnik genutzt. Die bioaktive Wirksamkeit wurde generiert durch die Einführung eines bioziden, auf einem quartären Ammoniumalkyl (QUART) basierenden Polymerisationsinitiators. Mittels Terminierung wurden die Kettenenden mit funktionellen oder reaktiven Satellitengruppen/Ankergruppen versehen. Nach Charakterisierung der Produkte mittels ^1H -/ ^{13}C -NMR und GPC wurde der Einfluss der Satellitengruppen auf die antimikrobielle Wirksamkeit der resultierenden Polyoxazoline untersucht. Dabei wurden die minimalen Inhibierungskonzentrationen (MIC) gegenüber den GRAM-positiven Bakterien *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) sowie den GRAM-positiven *Escherichia coli* (*E. coli*) untersucht. Ergänzend wurde die Streuung der antimikrobiellen Effizienz an weiteren ausgewählten, biomedizinisch relevanten Bakterienstämmen bestimmt. Es folgte die Ermittlung der mittleren hämolytischen Konzentrationen (HC_{50}) gegenüber lebenden Schweineblut-Erythrozyten. Der angestrebten Anwendung in dental-relevanten Applikationen wegen wurde das enzyminhibierende Potential der telechelen, bioaktiven Polyoxazoline gegenüber bakteriellen Kollagenasen sowie rekombinanten humanen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) in Lösung ermittelt. Mittels Kollagenabbau- und Peptidfreisetzungssassays an demineralisierten Human- und Rinderdentintemplaten wurden der zeitliche Verlauf und das erzielbare Ausmaß der Inhibierung dentalrelevanter MMPs quantifiziert. Mit doppelbindungshaltigen Ankergruppen funktionalisierte Polyoxazoline wurden weiterhin als polymere Additive zur bioaktiven Modifikation eines kommerziellen Dentaladhäsivs genutzt. Mittels Blaulicht wurde dieses auf Modelloberflächen aufpolymerisiert, womit langzeit-antimikrobiell wirksame, wasch- und biofilm-beständige Materialbeschichtungen erzielt wurden. Dabei wurde eine nachteilige Abnahme dentalrelevanter mechanischer Haftparameter ausgeschlossen. Zur Erhöhung der Oberflächendichte an bioaktiven Gruppen wurden die Polyoxazoline mittels einer polymeranalogen Umsetzung mit aminogruppenselektiven Ankergruppen versehen und an Modelloberflächen immobilisiert. Zum Vergleich wurde eine direkte *grafting-onto* Terminierung „lebender“ bioaktiver Polyoxazoline durchgeführt; diese war der ankergruppen-basierten Immobilisierungsmethode hinsichtlich der realisierten Gruppendichte überlegen. Im letzten Teil wurde unter Anwendung eines biomimetischen Reproduktionsverfahrens eine signifikante Oberflächenvergrößerung erzielt. An der künstlich replizierten, modifizierten Obeflächentextur konnten die einzigartigen Oberflächeneigenschaften der pflanzlichen Vorlage ebenfalls realisiert werden.

Lebenslauf

Daten zur Person:

Name: Christoph Peter Fik
Geburtsdatum-/Ort: 26.01.1979 in Tichau/Oberschlesien
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1989 – 1990 Friedrich-Grundschule; Lahr/Schw.
1991 – 2000 Max-Planck-Gymnasium; Lahr/Schw.
21.06.2000 Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

07.2000 – 05.2001 Kardiochirurgie des Herzzentrums Lahr-Baden

Studium:

08.2001 – 05.2007 Chemie-Diplom, Albert-Ludwigs-Universität; Freiburg/Br.
07.05.2007 Abschluss: Dipl.-Chem., Schwerpunkt: Makromolekulare Chemie, Albert-Ludwigs-Universität; Freiburg/Br.
Diplomarbeit: Prof. Dr. R. Mühlhaupt, Prof. Dr. J. C. Tiller
Titel: „Darstellung antimikrobieller Blockcopolymerer auf Basis von Polystyrol und Polyoxazolin“

Promotion:

06.2007 – 08.2007 Prof. Dr. J. C. Tiller, H. STAUDINGER Institut für Makromolekulare Chemie und Freiburger Materialforschungszentrum (FMF); Freiburg/Br.
09.2007 – 12.2011 Prof. Dr. J. C. Tiller, Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften (BMP), Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen (BCI); TU Dortmund
Titel: „Bioaktive, telechele Polyoxazoline mit funktionellen Satellitengruppen für neuartige antimikrobielle und Kollagenase-hemmende Materialien“