

DISS. ETH NO. 28226

**Fighting Antimicrobial Resistant (AMR) Bacteria:
from bacteriophage-based specific capture to controlled killing**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Fei PAN

M.Sc., Ludwig-Maximilians-Universität München and Techni-
sche Universität München

born on 21.03.1990

citizen of People's Republic of China

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Katharina Maniura, examiner

Dr. Qun Ren, co-examiner

Prof. Dr. Inge K. Herrmann, co-examiner

Prof. Dr. Simone Schürle-Finke, co-examiner

2022

Abstract

Bacterial infections, particularly those caused by antimicrobial resistant (AMR) bacteria, prevalently endanger human health as bacteria can survive antibiotic treatment. AMR, one leading health issue globally, is responsible every year for around 33000 deaths and consumes 1.1 billion Euros of the health care systems in EU/EEA countries. Therefore, the development of antibiotic substitutes, as well as rapid and efficient detection of AMR bacteria, are needed to reduce unnecessary or excessive antibiotic usage.

The most conventional method for AMR detections is antimicrobial susceptibility testing (AST) to determine the minimal inhibitory concentration (MIC). However, the usual time to expect results from AST analysis is 24-72 hours. Up to now, the identification of AMR bacteria is still time and labor-intensive, even with advanced techniques, *e.g.*, polymerase chain reaction (PCR) and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Although PCR is the predominant method employed in hospitals to identify AMR bacteria, it requires skilled professionals. In addition, MALDI-TOF MS requires strict sample preparation and is expensive for a routine diagnosis of antimicrobial resistant bacteria. Other physical methods, *e.g.*, infrared absorption microscopy, atomic force microscopy (AFM), microfluidic devices, and electrophoresis chip, are also suggested for bacterial resistance analysis, but they require difficult data interpretation, complicated sample preparation, or high monetary investment. Besides physical detection, β -lactamase as a biomarker of bacterial resistance is often utilized through chemical mechanisms to derive biosensors of low sensitivity (detectable bacterial concentration_{min}: $\sim 10^7$ CFU·mL⁻¹). However, most of these biosensors or detection methods cannot differentiate bacterial species. Additionally, effective treatment is needed, especially on-demand treatment after identifying AMR bacteria.

To fight against AMR bacteria, it is necessary, on the one hand, to obtain an effective biosensor with high sensitivity and specificity and, on the other hand, to design controlled systems for on-demand treatment. This dissertation is dedicated to developing a biosensor based on bacteriophage, which can specifically bind bacteria, and in parallel, design controlled treatment based on different antibacterial mechanisms (*e.g.*, contact/release killing of bacteria or release killing combined with repelling to bacteria).

In order to achieve these goals, two aspects of my research can be classified, the first is to develop bacteriophage-based biosensors as bacteriophages have specificity toward bacteria, and the second is to develop controlled treatment systems to prevent AMR emergence. In both cases, it is a prerequisite to understanding how **bacteria-material interaction is influenced by materials properties (i)**. With insights from **(i)**, the substrate can be selected for further modification by bacteriophage-derived peptides in order to gain a specific and rapid detection of resistant bacteria (**bacteriophage-based biosensors (ii)**). The parameters provided by **(i)** also help make a wise selection of substrates for **controlled treatment systems (iii)**; hence the loaded antimicrobials can be released on-demand and optimally kill bacteria.

To better understand **bacterial interactions with materials (i)**, this dissertation focuses on investigating how the physicochemistry of a material surface impacts static and dynamic bacterial adhesion on a surface and how bacterial membrane structures influence the bactericidal activity towards surfaces generating reactive oxygen species (ROS).

The static bacterial adhesion was studied through the utilization of polydimethylsiloxane (PDMS) as a substrate. To ensure identical surface physicochemistry and maintain similar mechanical properties, a 2 nm highly cross-linked PDMS-like polymer layer was coated on PDMS surfaces of various stiffness. The coated PDMS surfaces manifested a comparable adhesion force for all surfaces, whereas the uncoated ones displayed increasing surface adhesion force with the decrease of surface Young's modulus. The Gram-negative strains *Escherichia coli*, their fimbriae mutants, and *Pseudomonas aeruginosa*, alongside the Gram-positive strain *Staphylococcus epidermidis*, were studied towards their adhesion on these surfaces. Each tested strain demonstrated similar numbers of adhered bacteria on the coated PDMS surfaces of various Young's modulus. However, the number of adhered bacteria on the uncoated surfaces increased several-fold versus the surface Young's modulus decrease. The likewise adhesion observation was also obtained for the negatively charged abiotic polystyrene beads of comparable size to bacteria. These findings convincingly suggested that the surface physicochemistry of a PDMS substrate other than the mechanical property significantly impacts static bacterial adhesion.

In addition, the dynamic bacterial adhesion on a surface was further studied by employing PDMS, as a model material. To this end, a microfluid system was applied to generate a bacterial flow on a surface. Hence, the impact of surface physicochemistry on bacterial attachment and detachment can be investigated in a dynamic scenario through empirical and simulation studies. The extended Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek model was employed as the simulation method to perform a theoretical analysis of bacterial adhesion during bacterial attachment and detachment. Empirically, PDMS surfaces of various Young's modulus manifested similar numbers of attached bacteria, which was explained by the comparable levels of energy barrier simulated between bacteria and the different PDMS surfaces. Different numbers of residual bacteria after detachment were nevertheless quantified, where the PDMS surface physicochemistry regulated the detachment process in line with the simulation study. Furthermore, the bacterial detachment experiment confirmed this suggested understanding by studying PDMS samples, where non-crosslinked PDMS polymer chains were extracted. The obtained comprehension based on the empirical and theoretical studies can lead to a prediction of residual adhesion of a bacterial flow on a surface.

To study bacterial interactions with surfaces, Gram-negative *P. aeruginosa* and Gram-positive *S. aureus*, the most prevalent pathogens, were mostly used as model strains of two different membrane structures. Thereby, these two bacterial strains were utilized to explore how bacterial membrane structures influence the bactericidal activity towards surfaces generating ROS, which are highly reactive chemicals derived from oxygen. ROS can be generated upon UV-irradiation from two types of Ti surfaces, respectively stored in dry condition or 0.9 % NaCl solution. After UV-irradiation at an ambient condition, the tested surfaces displayed similar bactericidal activity, although the surfaces stored in 0.9 % NaCl solution produced a slightly higher ROS. However, *P. aeruginosa* and *S. aureus* manifested different responses to the Ti surfaces after UV-irradiation, considering the interaction time: the number of viable *P. aeruginosa* showed a reduction up to 90 % after 30 min interaction, in contrast to the untreated ones, but the reduction sank to 69 % - 81 % after 240 min. However, the UV-irradiation of the Ti surfaces did not result in a similar impact to *S. aureus*. The viable *S. aureus* did not show a reduction after interaction with the surface for 30 min but displayed more than 99 % reduction after interaction for 240 min. These findings provided an answer regarding the interaction of bacteria with surfaces generating ROS: the different structures of the Gram-negative and -

positive bacteria can influence the dynamics of ROS penetration towards bacteria, yielding different inactivation kinetics of bacterial pathogens.

After studying the influence of materials' properties on bacterial adhesion, specific interactions between bacteria and material were further investigated for specific capture of bacterial pathogens to develop a sensor. *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli* were used as model pathogens for sepsis, urinary tract infections (UTIs), and contaminated drinking water, respectively. Thereby three **bacteriophage-based biosensors (ii)** were designed as guided by the findings concerning **bacterial interactions with materials (i)**.

Sepsis is a critical situation for a patient, potentially threatening the patient's life, and its mortality remains high regardless of advancing technologies. Patient management could be more challenging once sepsis emerges with antimicrobial resistance, particularly for newborns in developing countries. Prompt diagnosis and identification of the pathogenic bacteria are highly required to make an efficient decision on the handling and treatment of a sepsis patient, which nowadays moreover urges for a fast determination of antimicrobial resistance of the defined pathogen. *S. aureus* infections are additionally the frequent cause of sepsis; hence it is exceptionally urgent to ensure rapid isolation and efficient identification of antimicrobial resistance concerning *S. aureus*. Here, the developed functionalized magnetic nanoclusters (MNCs) can quickly separate bacterial pathogens and efficiently and specifically enrich *S. aureus*. Thereafter, a fast determination of antimicrobial resistance, assisted by a prominent luminescent probe, can be performed towards the concentrated *S. aureus*. These novel MNCs manifested a promising theranostic perspective to combat sepsis.

Urinary tract infections (UTIs) are among the most prevailing microbial diseases, causing substantial healthcare burdens and endangering human well-being. UTIs can become worse when generated by *P. aeruginosa*, especially the antimicrobial-resistant ones. Therefore, a fast diagnosis and identification of antimicrobial-resistant *P. aeruginosa* can lead to an efficient medication and an effective treatment of UTIs. To this end, I designed a platform for a fast purification and effective detection of *P. aeruginosa* to fight UTIs linked with the notorious *P. aeruginosa*. A peptide (QRKLAAKLT), specifically binding to *P. aeruginosa*, was coated onto PEGylated MNCs and allowed a rapid capture and enrichment of *P. aeruginosa* from artificial human urine. Fast identification of antimicrobial resistance of the collected *P. aeruginosa* was subsequently achieved within 30 min by applying a novel luminescent probe to record the bacterial growth in the presence of antibiotics. These modified magnetic nanoclusters display an excellent diagnostic potential to fight UTIs related to *P. aeruginosa*, which can also be applied to other *P. aeruginosa* infections.

Drinking water contamination, often generated by bacteria, leads to substantial diarrheal deaths every year, particularly in developing regions. Human urine as a common source for fertilizer, if poorly regulated, can cause contamination of the drinking water. The prevailing bacteria in the urine are *E. coli*, leading to critical waterborne/foodborne diseases. Given the spreading of the multi-drug resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli*, a fast sensing method for resistance is anticipated. In this work, a method was developed for rapid detection of *E. coli* and meanwhile able to remove general bacterial pathogens from human urine. As reported, a specific peptide GRHIFWRRGGGHKVAPR, having a strong affinity to *E. coli*, was applied to functionalize the PEGylated magnetic nanoclusters, yielding a specific capture and enrichment of *E. coli* from the infected artificial urine. Subsequently, a novel lu-

minescent probe was employed to quickly identify the antimicrobial resistance from the collected *E. coli* within 30 min. These modified magnetic nanoclusters manifest a prominent prospect to fast identify the multi-drug resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* from urine and contribute to treating drinking water contamination.

Optimization of antimicrobial application is another strategy to fight AMR. Thereby controlled drug delivery systems are highly desired. To this end, three **controlled treatment systems (iii)** were developed to confer controlled drug release, respectively, regulated by wet- T_g , pH, and sol-gel transition, inspired by an insightful comprehension of bacterial interaction with materials in (i). Optimized usage of antibiotics and antimicrobial agents is anticipated for wound treatment, conferring a regulated drug release. In this regard, the glass transition temperature (T_g) of a polymer or polymer blend stands out as a sensitive stimulus to enable a controlled drug release at the physiological condition. A fine-tuned T_g can permit a controlled drug release at the physiological temperature of 37 °C, through varying the blending ratio of Eudragit® RS 100 and poly(methyl methacrylate). Octenidine, an antimicrobial agent usually applied for wound treatment, was loaded into the designed polymer blends through an electrospinning fabrication to yield an optimized scenario. Thereby, the fine-tuned thermal switch of the fabricated nanofibrous membranes can be switched “on” at 37 °C and “off” at room temperature (25 °C), manifesting a controlled release of the loaded octenidine. Octenidine can be released in at least 8.5 times higher amount (25 mg·L⁻¹) at the switch “on” compared to at the switch “off” after 24 hours, through modulation by the wet T_g (34.8 - 36.5 °C). The “on”/“off” switch for regulated drug release was shown to function at least five times. Moreover, the developed nanofibrous membranes manifested a distinctive antibacterial efficacy, yielding a 3-lg reduction of the viable cells for both Gram-negative and -positive bacteria at 37 °C, at the thermal switch “on”. The groundwork was demonstrated for a treatment concept, where no external stimulus is necessary to trigger a release of the loaded antimicrobials at physiological conditions and displaying a promising strategy to avoid the overuse of antibiotics.

An increased pH arises with the emergence of chronic wounds, which are a burden for a patient and challenge the clinical treatment. In this regard, pH-sensitive silica nanoparticles (SiNPs) were designed to enable a targeted drug release at an alkaline scenario, often appearing on chronic wounds. Thereby, a usual disinfectant and antiseptic Chlorhexidine (CHX) was loaded into SiNPs as a model drug. The loaded CHX manifested a 3 - 4 fold higher release from SiNPs matrix at pH 8.0 and 8.5 than at pH 6.5, 7.0, and 7.4. Moreover, SiNPs loaded with CHX (CHX-SiNPs) displayed a distinctive antibacterial efficacy at pH 8.0 and 8.5 toward Gram-negative and -positive bacteria. In contrast, cytotoxicity was not observed according to cell viability analysis. Furthermore, CHX-SiNPs were formulated into alginate hydrogels for easy application. Artificial wounds through exploiting *ex vivo* human skin were additionally applied to evaluate the antibacterial efficacy of CHX-SiNPs. CHX-SiNPs treatment on infected wounds displayed a 4-lg reduced amount of viable bacterial cells compared to the non-treated ones; meanwhile, CHX-SiNPs formulated through alginate yielded a 3-lg less amount on the treated infected wounds than the non-treated ones. Our findings demonstrated that CHX-SiNPs could efficiently release the loaded CHX through a pH trigger, enabling a prominent antibacterial efficacy. CHX-SiNPs hence displayed a promising clinic application for the treatment of chronic wounds through the optimized dosage of antimicrobials.

Sol-gel transition can lead to a change in the physical properties of a material. Thereby poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm), a conventional thermo-responsive polymer, and poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC), a typical antifouling polymer, thus displays

potential to yield a copolymer to achieve thermo-responsiveness through sol-gel transition and antifouling dual functions. Hence, the proposed material could be utilized for a smart wound dressing conferring controlled drug release to optimize the utilization of antibiotics and antimicrobials. To this end, the designed copolymer hydrogel was loaded with octenidine (OCT), an often-utilized antimicrobial agent for wound treatment, to enable antifouling and regulated drug release. The hydrogel of an anticipated thermal switch displayed 25-fold higher octenidine release at 37 °C ($10.77 \pm 0.88 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ at the switch "on", infected wound temperature) than at 30 °C ($0.41 \pm 0.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ at the switch "off", normal skin temperature) for a release of 120 minutes. Additionally, the hydrogel manifested a prominent antifouling property towards protein, mammalian cells, and bacteria, analyzed through employing a bioAFM, which permits an adhesion study at the single-molecule and single-cell/-bacterium level. The developed hydrogel loaded with OCT displayed a distinctive antibacterial efficacy on artificially infected wounds, leading to a 3-lg lower amount of viable bacterial cells at 37 °C than at 30 °C. This study led to a discovery of a dual functional hydrogel, achieved by a combination of antifouling and cytocompatible PMPC with triggered drug release from PNIPAAm upon bacterial colonization and biofilm formation. Hence, the development of the copolymer hydrogel provides insightful material to prevent and treat wound infection. The concept of the dual-functional materials also upholds the prospect concerning other clinical cases caused by biofilm-associated infections, such as urinary catheters, stents, and dental implants.

This dissertation entails on a comprehensive study regarding static and dynamic bacterial interaction with PDMS surfaces during the early stage of biofilm formation, alongside answering how bacterial membrane structures impacted bactericidal efficacy on a ROS-generating surface. Furthermore, three platforms based on MNCs functionalized by three different peptides were established respectively aimed at sepsis, UTIs, and contaminated drinking water. For every goal, the respective functionalized MNCs can remove various bacterial pathogens from the infected media and lead to an isolation of targeted bacteria for fast AMR detection, displaying a diagnostic perspective. Moreover, to optimize the application of antimicrobials and avoid the emergence of AMR, three systems were developed to release the loaded drugs controllably. Therefore, this dissertation manifests comprehensive efforts against AMR by involving the basic study of bacterial interactions with materials, diagnostic systems targeting different species of bacteria, and controlled treatments of bacterial infections. In addition, this dissertation not only provides answers to several scientific questions but also displays its translation potentials to realistically overcome the specified problems.

Zusammenfassung

Bakterielle Infektionen, insbesondere die, die durch antimikrobiell resistente (AMR) Bakterien verursacht werden, gefährden häufig die menschliche Gesundheit, da derartige Bakterien eine Antibiotikabehandlung überleben können. AMR, ein grosses, weltweites Gesundheitsproblem, ist jedes Jahr für etwa 33.000 Todesfälle verantwortlich und kostet die Gesundheitssysteme in den EU-/EWR-Ländern 1.1 Milliarden Euro. Daher sind die Entwicklung von Antibiotika-Ersatzstoffen sowie der schnelle und effiziente Nachweis von AMR-Bakterien erforderlich, um einen unnötigen oder übermässigen Einsatz von Antibiotika zu vermeiden.

Die gebräuchlichste Methode zum Nachweis von AMR ist der antimikrobielle Empfindlichkeitstest (AST) zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK). Die übliche Zeit, um Ergebnisse aus der AST-Analyse zu erwarten, beträgt jedoch 24-72 Stunden. Bis heute ist die Identifizierung von AMR-Bakterien noch zeit- und arbeitsintensiv, auch mit fortgeschrittenen Techniken, wie beispielsweise der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der matrixunterstützten Laserdesorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF). Obwohl PCR die vorherrschende Methode ist, die in Krankenhäusern zur Identifizierung von AMR-Bakterien verwendet wird, erfordert sie qualifizierte Fachkräfte. Darüber hinaus erfordert MALDI-TOF MS eine strenge Probenvorbereitung und ist für eine Routinediagnose antimikrobiell resistenter Bakterien teuer. Parallel dazu werden auch andere physikalische Methoden, wie zum Beispiel Infrarot-Absorptionsmikroskopie, Rasterkraftmikroskopie (AFM), mikrofluidische Geräte und Elektrophorese-Chips für die Bakterienresistenzanalyse vorgeschlagen, aber sie haben den Nachteil einer schwierigen Dateninterpretation, komplizierten Probenvorbereitung oder hohen Geldinvestition. Neben physikalischen Nachweisen wird β -Lactamase als Biomarker bakterieller Resistenz oft auch über chemische Mechanismen genutzt, um Biosensoren mit geringer Sensitivität zu entwickeln (nachweisbare Bakterienkonzentration_{min}: $\sim 10^7$ KBE·ml⁻¹). Die meisten dieser Biosensoren oder Nachweisverfahren können Bakterienarten nicht unterscheiden. Dennoch ist eine wirksame Behandlung erforderlich, insbesondere eine bedarfsgesteuerte Behandlung nach der Identifizierung von AMR-Bakterien.

Zur Bekämpfung von AMR-Bakterien ist es einerseits notwendig, einen wirksamen Biosensor mit hoher Sensitivität und Spezifität zu erhalten und andererseits kontrollierte Systeme für eine bedarfsgerechte Behandlung zu konzipieren. Diese Dissertation widmet sich der Entwicklung eines auf Bakteriophagen basierenden Biosensors, der Bakterien spezifisch binden kann und entwickelt parallel dazu eine kontrollierte Behandlung basierend auf verschiedenen antibakteriellen Mechanismen (wie zum Beispiel der Abtötung von Bakterien durch Kontakt/Freisetzung oder der Abtötung durch Freisetzung kombiniert mit Abwehr von Bakterien).

Um diese Ziele zu erreichen, lassen sich zwei Forschungsaspekte unterscheiden, zum einen die Entwicklung von bakteriophagenbasierten Biosensoren und zum anderen die Entwicklung kontrollierter Behandlungssysteme. In beiden Fällen ist es Voraussetzung zu verstehen, wie die **Bakterien-Material-Interaktion durch Materialeigenschaften beeinflusst** wird **(i)**. Mithilfe von **(i)** kann das Substrat für eine weitere Modifikation durch Bakteriophagen-abgeleitete Peptide ausgewählt werden, um einen spezifischen und schnellen Nachweis resistenter Bakterien zu erhalten (**Bakteriophagen-basierte Biosensoren (ii)**). Die in **(i)** ermittelten Parameter helfen auch, eine kluge Auswahl von Substraten für **kontrollierte Behandlungssysteme (iii)** zu treffen; damit können die eingebrachten antimikrobiellen Mittel bei Bedarf freigesetzt werden und Bakterien optimal abtöten.

Um **bakterielle Wechselwirkungen mit Materialien (i)** besser zu verstehen, konzentrierte sich diese Dissertation darauf, zu untersuchen, wie sich die Physikochemie einer Materialoberfläche auf die statische und dynamische bakterielle Adhäsion auf einer Oberfläche auswirkt und wie bakterielle Membranstrukturen die bakterizide Aktivität gegenüber Oberflächen beeinflusst, die reaktive Sauerstoffspezies erzeugen (ROS).

Die statische Bakterienadhäsion wurde durch die Verwendung von Polydimethylsiloxan (PDMS) untersucht. Um eine identische Oberflächenphysik zu gewährleisten und ähnliche mechanische Eigenschaften beizubehalten, wurde eine 2 nm hochvernetzte PDMS-ähnliche Polymerschicht auf PDMS-Oberflächen unterschiedlicher Steifigkeit aufgetragen. Die beschichteten PDMS-Oberflächen zeigten für alle Oberflächen eine vergleichbare Adhäsionskraft, während die unbeschichteten Oberflächen eine zunehmende Oberflächenadhäsionskraft mit abnehmendem Young-Modul der Oberfläche zeigten. Die Gram-negativen Stämme *Escherichia coli*, seine Fimbriae-Mutanten und *Pseudomonas aeruginosa* wurden neben dem Gram-positiven Stamm *Staphylococcus epidermidis* auf ihre Adhäsion auf diesen Oberflächen untersucht. Jeder getestete Stamm zeigte eine ähnliche Anzahl von anhaftenden Bakterien auf den beschichteten PDMS-Oberflächen mit verschiedenen Young-Modulen. Die Zahl der anhaftenden Bakterien auf den unbeschichteten Oberflächen nahm jedoch gegenüber der Abnahme des Young-Moduls der Oberfläche um ein Vielfaches zu. Eine ähnliche Beobachtung bezüglich der Adhäsion wurde auch für die negativ geladenen abiotischen Polystyrolkugeln von vergleichbarer Größe zu Bakterien erhalten. Diese Ergebnisse legten überzeugend nahe, dass die Oberflächenphysik eines PDMS-Substrats im Vergleich zu den mechanischen Eigenschaften die statische Bakterienadhäsion signifikanter beeinflusst.

Darüber hinaus wurde die dynamische Bakterienadhäsion auf einer Oberfläche mit PDMS, einem Modellmaterial untersucht. Dazu wurde ein Mikrofluidsystem verwendet, um eine Bakterienströmung auf einer Oberfläche zu erzeugen. Damit konnte der Einfluss der Oberflächenphysik auf die bakterielle Anlagerung und Ablösung in einem dynamischen Szenario durch empirische und Simulationsstudien untersucht werden. Als Simulationsmethode wurde das erweiterte Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-Modell verwendet, um eine theoretische Analyse der bakteriellen Adhäsion während der bakteriellen An- und Ablösung durchzuführen. Empirisch zeigten PDMS-Oberflächen mit verschiedenen Young-Modulen eine ähnliche Anzahl an angehefteten Bakterien, was durch die vergleichbaren simulierten Energiebarrieren zwischen Bakterien und den verschiedenen PDMS-Oberflächen erklärt wurde. Dennoch wurden unterschiedliche Zahlen von Restbakterien nach der Ablösung quantifiziert, wobei die PDMS-Oberflächenphysik den Ablösungsprozess entsprechend der Simulationsstudie regelte. Darüber hinaus bestätigte das Bakterienablösungsexperiment dieses vorgeschlagene Verständnis durch die Anwendung von PDMS-Proben, bei denen nicht vernetzte PDMS-Polymerketten extrahiert wurden. Die erhaltene Erklärung kann eine Vorhersage der Restadhäsion eines Bakterienflusses auf einer Oberfläche liefern.

Gram-negative *P. aeruginosa* und Gram-positive *S. aureus*, die am weitesten verbreiteten Krankheitserreger im Zusammenhang mit therapieassoziierten Infektionen, wurden als Modellstämme für zwei verschiedene Membranstrukturen verwendet. Dabei wurden diese beiden Bakterienstämme genutzt, um eine Antwort auf die Frage zu finden, wie bakterielle Membranstrukturen die bakterizide Aktivität gegenüber ROS-erzeugenden Oberflächen beeinflussen. ROS kann durch UV-Bestrahlung von zwei Arten von Ti-Oberflächen erzeugt werden, die jeweils in trockenem Zustand und 0.9 % NaCl-Lösung gelagert werden. Nach UV-Bestrahlung bei Umgebungsbedingungen zeigten die getesteten Oberflächen eine ähnliche

bakterizide Aktivität, obwohl die in 0.9 % NaCl-Lösung gelagerten Oberflächen einen etwas höheren ROS ergaben. Allerdings zeigten *P. aeruginosa* und *S. aureus* unterschiedliche Reaktionen auf die UV-bestrahlten Ti-Oberflächen, was die Wechselwirkungszeit anbelangt: Die Zahl der lebensfähigen *P. aeruginosa* zeigte eine Reduktion von bis zu 90 % nach 30 min Wechselwirkung, im Gegensatz zu den Unbehandelten, jedoch sank die Reduktion auf 69 % - 81 % nach 240min. Allerdings zeigte die UV-Bestrahlung der Ti-Oberflächen eine andere Wirkung auf *S. aureus*. Die lebensfähigen *S. aureus* zeigten nach einer Interaktion von 30 Minuten keine Reduktion, aber eine Reduktion von mehr als 99 % nach einer Interaktion von 240 Minuten. Diese Erkenntnisse lieferten eine Antwort auf die Interaktion von Bakterien mit ROS-erzeugenden Oberflächen: Die unterschiedlichen Strukturen der Gram-negativen und -positiven Bakterien können die Dynamik der ROS-Penetration gegenüber Bakterien beeinflussen, was zu einer unterschiedlichen Inaktivierungskinetik bakterieller Pathogene führt.

Nach der Untersuchung des Einflusses von Materialeigenschaften auf die bakterielle Adhäsion wurden spezifische Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Material untersucht, um gezielt bakterielle Pathogene einzufangen und Sensoren zu entwickeln. *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *E. coli* wurden als Modellpathogene für Infektionen bei Sepsis, Harnwegsinfektionen (HWI) bzw. kontaminiertem Trinkwasser verwendet. Dabei wurden drei auf **Bakteriophagen basierende Biosensoriksysteme (ii)** basierend auf den Informationen von (i) wie im Folgenden beschrieben entworfen.

Sepsis ist eine kritische Situation für einen Patienten, die möglicherweise das Leben des Patienten bedroht, und ihre Sterberate bleibt ungeachtet der fortschreitenden Technologien hoch. Das Patientenmanagement wird erheblich schwieriger, wenn eine Sepsis mit Antibiotikaresistenz auftritt, insbesondere bei Neugeborenen in Entwicklungsländern. Eine zeitnahe Diagnose und Definition der pathogenen Keime ist für eine effiziente Entscheidung zur Behandlung eines Sepsispatienten dringend erforderlich, was heutzutage zudem eine schnelle Bestimmung der antimikrobiellen Resistenz des definierten Erregers erfordert. *S. aureus*-Infektionen sind zudem eine häufige Ursache einer Sepsis; daher ist es ausserordentlich dringend, eine schnelle Isolierung und effiziente Identifizierung antimikrobieller Resistenzen bei *S. aureus* festzustellen. Hier können die entwickelten funktionalisierten magnetischen Nanocluster (MNCs) bakterielle Krankheitserreger schnell isolieren und *S. aureus* effizient und spezifisch anreichern. Im Anschluss kann eine schnelle Bestimmung einer antimikrobiellen Resistenz in der konzentrierten *S. aureus* Fraktion durchgeführt werden, unterstützt durch eine lumineszierende Sonde. Diese MNCs zeigten eine vielversprechende theranostische Perspektive zur Bekämpfung der Sepsis.

Harnwegsinfektionen (HWI) gehören zu den häufigsten mikrobiellen Erkrankungen, die zu erheblichen Belastungen im Gesundheitswesen führen und das menschliche Wohlbefinden bedrohen. Harnwegsinfektionen können sich verschlechtern, wenn sie durch *P. aeruginosa* verursacht werden, insbesondere wenn sie antimikrobiell resistent sind. Dabei kann eine schnelle Diagnose und Identifizierung des antimikrobiell resistenten *P. aeruginosa* eine effiziente Verschreibung von Medikamenten und wirksame Behandlung von Harnwegsinfektionen unterstützen und anleiten. Hier haben wir eine Plattform für eine schnelle Entfernung und effektive Identifizierung von *P. aeruginosa* entwickelt, um die berüchtigten *P. aeruginosa*-assoziierten HWI zu bekämpfen. Ein Peptid (QRKLAALKLT), das spezifisch an *P. aeruginosa* bindet, wurde auf PEG-beschichtete magnetische Nanocluster gepfropft und ermöglichte den erfolgreichen Einfang und die Anreicherung von *P. aeruginosa* aus künstlichem menschlichem Urin. Die schnelle Identifizierung der antimikrobiellen Resistenz der angereicherten *P. aeruginosa*

wurde anschliessend innerhalb von 30 Minuten unter Verwendung einer neuartigen Lumineszenzsonde zur Überwachung des Wachstums in Gegenwart von Antibiotika durchgeführt. Diese funktionalisierten magnetischen Nanocluster zeigen ein herausragendes diagnostisches Potenzial zur Bekämpfung von mit *P. aeruginosa* assoziierten HWI, das auf andere mit *P. aeruginosa* befallene Infektionen ausgeweitet werden kann.

Die häufig durch Bakterien verursachte Trinkwasserkontamination führt jedes Jahr zu erheblichen Todesfällen durch Durchfall, insbesondere in Entwicklungsregionen. Menschlicher Urin als Dünger kann bei unsachgemässer Handhabung das Trinkwasser verunreinigen. Der dominante bakterielle Erreger im Urin ist *E. coli*, der schwere durch Wasser oder Lebensmittel übertragene Krankheiten verursachen kann. In Anbetracht der Prävalenz der multiresistenten Beta-Lactamase, die *E. coli* produziert, ist eine schnelle Nachweismethode für Resistenzen dringend erwünscht. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um *E. coli* schnell zu identifizieren und gleichzeitig allgemeine bakterielle Krankheitserreger aus dem menschlichen Urin zu entfernen. Ein spezifisches Peptid GRHIFWRRGGGHKVAPR, von dem berichtet wurde, dass es eine starke Affinität zu *E. coli* hat, wurde verwendet, um die PEGylierten magnetischen Nanocluster zu modifizieren, was zu einer spezifischen Aufnahme und Anreicherung von *E. coli* aus künstlichem Urin führte. Anschliessend wurde eine neuartige lumineszierende Sonde verwendet, um die antimikrobielle Resistenz der gesammelten *E. coli* innerhalb von 30 Minuten schnell zu identifizieren. Die funktionalisierten magnetischen Nanocluster bieten eine vielversprechende Perspektive für einen schnellen Nachweis von multiresistenten *E. coli*, die erweitertes Spektrum Beta-Laktamase mit erweitertem Spektrum produzieren, in Urin und tragen zur Verringerung der Trinkwasserkontamination bei.

Die Optimierung der antimikrobiellen Anwendung ist eine weitere Strategie zur Bekämpfung von AMR. Dabei sind kontrollierte Arzneimittelabgabesysteme stark erwünscht. Zu diesem Zweck wurden drei **kontrollierte Behandlungssysteme (iii)** entwickelt, um eine kontrollierbare Wirkstofffreisetzung zu ermöglichen, die durch Nass- T_g , pH und Sol-Gel-Übergang reguliert wird, inspiriert von dem aufschlussreichen Erkenntnissen der bakteriellen Wechselwirkung mit Materialien aus **(i)**.

Für die Wundbehandlung wird ein optimierter Einsatz von Antibiotika und antimikrobiellen Wirkstoffen erwartet, der eine regulierte Wirkstofffreisetzung ermöglicht. In dieser Hinsicht sticht die Glasübergangstemperatur (T_g) eines Polymers oder einer Polymermischung als empfindlicher Stimulus hervor, um eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung unter physiologischen Bedingungen zu ermöglichen. Eine fein abgestimmte T_g kann eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung bei der physiologischen Temperatur von 37 °C ermöglichen, indem das Mischungsverhältnis von Eudragit® RS 100 und Poly(methylmethacrylat) variiert wird. Octenidin, ein antimikrobielles Mittel, das normalerweise zur Wundbehandlung verwendet wird, wurde durch eine Elektrospinnherstellung in die entwickelten Polymermischungen eingebracht, um ein optimiertes Szenario zu erzielen. Dabei kann der fein abgestimmte Thermoschalter der hergestellten Nanofasermembranen bei 37 °C „eingeschaltet“ und bei Raumtemperatur (25 °C) „ausgeschaltet“ werden, was eine kontrollierte Freisetzung des eingebrachten Octenidins manifestiert. Eine mindestens 8.5-mal höhere Menge von Octenidin kann im einschalteten Zustand für 24 h freigesetzt werden, als beim ausgeschalteten Zustand. Dieses erfolgt durch Modulation durch die Nass- T_g (34.8-36.5 °C). Der „Ein“/„Aus“-Schalter zur regulierten Wirkstofffreisetzung kann mindestens fünfmal funktionieren. Darüber hinaus zeigten die entwickelten Nanofasermembranen eine ausgeprägte antibakterielle Wirksamkeit, die bei 37 °C und dem thermischen Einschalten zu einer Verringerung der lebensfähigen Zellen sowohl für

Gram-negative als auch -positive Bakterien um 3 Logarithmen führte. Die Grundlagen für ein Behandlungskonzept, bei dem kein externer Stimulus erforderlich ist, um eine Freisetzung der beladenen Antibiotika unter physiologischen Bedingungen auszulösen, wurden demonstriert und eine vielversprechende Strategie aufgezeigt, um den Übergebrauch von Antibiotika zu reduzieren.

Bei der Entstehung chronischer Wunden kommt es zu einem erhöhten pH-Wert, der den Patienten belastet und die klinische Behandlung vor Herausforderungen stellt. In diesem Zusammenhang wurden pH-sensitive Silica-Nanopartikel (SiNPs) entwickelt, um eine gezielte Wirkstofffreisetzung in einem alkalischen Szenario zu ermöglichen, das häufig in chronischen Wunden auftritt. Dabei wurde als Modellarzneimittel ein übliches desinfizierendes und antiseptisches Chlorhexidin (CHX) in SiNPs eingebracht. Das CHX zeigte bei pH 8.0 und 8.5 eine 3- bis 4-fach stärkere Freisetzung aus der SiNPs-Matrix als bei pH 6.5, 7.0 und 7.4. Darüber hinaus zeigten mit CHX beladene SiNPs (CHX-SiNPs) eine ausgeprägte antibakterielle Wirksamkeit bei pH 8.0 und 8.5 gegenüber gramnegativen und -positiven Bakterien. Im Gegensatz dazu wurde bei der Zellviabilitätsanalyse keine Zytotoxizität beobachtet. Desweiteren wurden CHX-SiNPs zur einfachen Anwendung in Alginat-Hydrogele formuliert. Künstliche Wunden durch Ausnutzung der menschlichen Haut *ex vivo* wurden zusätzlich verwendet, um die antibakterielle Wirksamkeit von CHX-SiNPs zu untersuchen. Die Behandlung von infizierten Wunden mit CHX-SiNPs zeigte eine um 4 lg geringere Menge an lebensfähigen Bakterienzellen als bei Unbehandelten; unterdessen ergaben durch Alginat formulierte CHX-SiNPs eine um 3 lg geringere Menge bei den behandelten infizierten Wunden als bei den Unbehandelten. Unsere Ergebnisse zeigten, dass CHX-SiNPs das beladene CHX durch einen pH-Trigger effizient freisetzen können, was eine herausragende antibakterielle Wirksamkeit ermöglicht. CHX-SiNPs zeigten damit durch die optimierte Dosierung von Antibiotika eine vielversprechende klinische Anwendung zur Behandlung chronischer Wunden.

Der Sol-Gel-Übergang kann zu einer Änderung der physikalischen Eigenschaften eines Materials führen. Dabei zeigen Poly (*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAAm), ein konventionelles thermoreaktives Polymer, und Poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholin) (PMPC), ein typisches Antifouling-Polymer, das Potenzial, ein Copolymer zu ergeben, um Thermoreaktionsfähigkeit durch Sol-Gel-Übergang und Antifouling-Doppelfunktionen zu erreichen. Daher könnte das vorgeschlagene Material für einen intelligenten Wundverband verwendet werden, der eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung ermöglicht, um den Einsatz von Antibiotika und antimikrobiellen Mitteln zu optimieren. Zu diesem Zweck wurde das entworfene Copolymer-Hydrogel mit Octenidin (OCT), einem häufig verwendeten antimikrobiellen Wirkstoff zur Wundbehandlung, beladen, um Antifouling und eine regulierte Wirkstofffreisetzung zu ermöglichen. Das Hydrogel eines erwarteten Thermoschalters zeigte bei 37 °C für eine Freisetzung von 120 Minuten eine 25-fach höhere Octenidinfreisetzung ($10.77 \pm 0.88 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ im „eingeschalteten“ Zustand, die Temperatur der infizierten Wunde) als bei 30 °C ($0.41 \pm 0.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ im „ausgeschalteten“ Zustand, die normale Hauttemperatur). Darüber hinaus zeigte das Hydrogel eine herausragende Antifouling-Eigenschaft gegenüber Proteinen, Säuregärzellen und Bakterien, analysiert durch den Einsatz eines bioAFM, das eine Adhäsionsstudie auf Einzelmolekül- und Einzelzell-/Bakterium-Ebene ermöglicht. Das entwickelte, mit OCT beladene Hydrogel zeigte eine ausgeprägte antibakterielle Wirksamkeit bei künstlich infizierten Wunden, was bei 37 °C zu einer um 3 lg geringeren Menge an lebensfähigen Bakterienzellen führte als bei 30 °C. Diese Studie führte zur Entdeckung eines zweifach funktionellen Hydrogels, das durch eine Kombination von Antifouling und biokompatiblen PMPC mit ausgelöster

Wirkstofffreisetzung aus PNIPAAm bei bakterieller Besiedlung und Biofilmbildung erreicht wird. Daher liefert die Entwicklung des Copolymer-Hydrogels aufschlussreiches Material zur Vorbeugung und Behandlung von Wundinfektionen. Das Konzept der Materialien mit doppelter Funktion bietet auch eine Perspektive für andere klinische Fälle, die durch Biofilm-assoziierte Infektionen verursacht werden, wie etwa bei Harnkathetern, Stents und Zahnimplantaten.

Diese Dissertation führt zu einer umfassenden Studie zur statischen und dynamischen bakteriellen Wechselwirkung mit PDMS-Oberflächen im frühen Stadium der Biofilmbildung sowie zur Beantwortung der Frage, wie bakterielle Membranstrukturen die bakterizide Wirksamkeit auf einer ROS-erzeugenden Oberfläche beeinflussen. Darüber hinaus wurden drei Plattformen basierend auf MNCs, die durch drei verschiedene Peptide funktionalisiert wurden, etabliert, die jeweils auf Sepsis, HWI und kontaminiertes Trinkwasser ausgerichtet sind. Für jedes Ziel können die jeweiligen funktionalisierten MNCs verschiedene bakterielle Krankheitserreger aus den infizierten Medien entfernen und zu einer Isolierung von Zielbakterien für den schnellen AMR-Nachweis führen, was eine diagnostische Perspektive aufzeigt. Um die Anwendung antimikrobieller Mittel zu optimieren und das Auftreten von AMR zu vermeiden, wurden außerdem drei Systeme entwickelt, um die eingebrachten Medikamente kontrolliert freizusetzen. Daher erbringt diese Dissertation umfassende Bemühungen gegen AMR, indem sie die grundlegende Untersuchung der bakteriellen Interaktionen mit Materialien, diagnostische Systeme, die auf verschiedene Bakterienarten abzielen, und die kontrollierte Behandlung bakterieller Infektionen umfasst. Darüber hinaus liefert diese Dissertation nicht nur Antworten auf mehrere wissenschaftliche Fragen, sondern zeigt auch ihre Umsetzungspotenziale auf, um die beschriebenen Probleme zu lösen.