

DISS. ETH NO. 29916

Magnetically responsive bacteria as living therapeutics for cancer treatment

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

Stefano Menghini

M.Sc. Molecular Health Science, ETH Zurich

born on 20.11.1992

accepted on the recommendation of

Prof. Simone Schürle-Finke, examiner

Prof. Dirk Schüler, co-examiner

Prof. Emma Slack, co-examiner

2024

Abstract

Bacteria are increasingly envisioned as living agents that can be administered to patients to carry out therapeutic actions. Interest has intensified over the past several years in harnessing these microorganisms for cancer treatment as dynamic vectors with enhanced tumour targeting properties. While various bacterial attributes, including the modulation of immune responses, local toxin secretion, and proliferation within tumours, have been extensively investigated in context of cancer therapy, less is known about their role as competitors for nutrients. Magnetotactic bacteria (MTB) constitute a unique group of bacteria capable of biomineralizing magnetic nanoparticles through iron uptake via high-affinity siderophores. Additionally, they exhibit magneto-aerotactic behaviour, enabling preferential accumulation in hypoxic tumour regions and guidance using external magnetic fields. This thesis explores the utilization of MTB as living iron chelators in the tumour microenvironment (TME), investigating the resulting competition between bacteria and human cancer cells and the induced metabolic changes in the latter. The magnetotactic behaviour of MTB was examined *in vivo* by magnetically controlling the bacteria in *X. laevis* embryos. Leveraging this trait of MTB, initial steps were finally taken towards replicating their magnetic characteristics in the probiotic strain *E. coli* Nissle 1917 by developing a protocol for the magnetic coating of its surface.

We started with recreating a hypoxic environment by engineering an *in vitro* co-culture system to cultivate the magnetotactic strain *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 under low-oxygen conditions alongside human cancer cells. Initial assessments involved the quantification of bacterial siderophore production, demonstrating equivalence to a relevant concentration of deferoxamine (DFO), a potent drug employed in iron chelation therapy. Subsequent experiments revealed an augmented expression of transferrin receptor 1 (TfR1) on the cell surface and a significant reduction in viability across various cancer cell lines, suggestive of the bacteria's capacity to alter iron homeostasis.

Metabolic effects exerted by AMB-1 were then further investigated. We demonstrated a lower rate of cellular proliferation correlating with a growing ratio of bacteria to cancer cells. Additional experiments also confirmed elevated apoptosis and an increased activity level of executioner caspases in cancer cells, with increasing number of AMB-1 in the culture. Lastly, the performed assays uncovered the dysregulation of several apoptosis-related proteins when AMB-1 were added to the culture.

Having validated the prospective utility of AMB-1 in sequestering iron from cancer cells, their magnetic responsiveness was analyzed within a living organism, an asset that allows for their magnetic control *in vivo* to enhance tumor delivery. Systemic injections of AMB-1 were administered to *Xenopus laevis* embryos, and an external rotating magnetic field was applied to exert a torque driving their motion. Synchronized rotation of bacteria was observed within vessels characterized by low or absent blood flow, and a significant extent of vascular extravasation was detected following 1 hour of magnetic actuation.

The magnetic properties of AMB-1 offer a remarkable advantage for the selective guidance of bacteria. Consequently, a methodology was established to affix magnetic material onto the surface of the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), enabling torque-based actuation. The magnetic nanoparticle-coated surface was subsequently validated through colorimetric iron assays, other iron quantification techniques, and microscopy. Our actuation scheme was assessed and the responsiveness of the resulting magnetically enhanced EcN was scrutinized. Finally, pilot experiments were conducted to examine the bacterial translocation of endothelial monolayers and the accumulation in spheroids, elucidating the potential benefits of magnetic guidance *in vitro*.

This thesis underscores the potential of AMB-1 as motile, self-replicating iron-chelating entities capable of disrupting the iron homeostasis of cancer cells, leading to a reduction in cancer cell viability. Moreover, the presented data reinforces the feasibility of employing externally applied magnetic fields to induce responsive bacterial behaviour *in vivo*, and explores the possibility to render other bacterial strains magnetic for external control. The findings presented in this thesis highlight the benefits of nutrient competition as an additional strategy for combating tumours and emphasize the advantages of magnetically responsive bacteria as a promising tool for future bacteria-based cancer therapies.

Zusammenfassung

Bakterien werden zunehmend als lebende Wirkstoffe betrachtet, die Patienten verabreicht werden können, um therapeutische Wirkungen zu entfalten. In den letzten Jahren hat sich das Interesse an der Nutzung dieser Mikroorganismen für die Krebsbehandlung als dynamische Vektoren mit verbesserten Eigenschaften zur gezielten Bekämpfung von Tumoren verstärkt. Während verschiedene bakterielle Eigenschaften, einschließlich der Modulation von Immunreaktionen, der lokalen Toxinsekretion und der Proliferation innerhalb von Tumoren, eingehend untersucht wurden, ist über ihre Rolle als Konkurrenten um Nährstoffe weniger bekannt. Magnetotaktische Bakterien (MTB) stellen eine einzigartige Gruppe von Bakterien dar, die in der Lage sind, magnetische Nanopartikel durch die Aufnahme von Eisen über hochaffine Siderophore zu biomineralisieren. Darüber hinaus zeigen sie ein magneto-aerotaktisches Verhalten, das eine bevorzugte Anreicherung in hypoxischen Tumorregionen und die Steuerung durch externe Magnetfelder ermöglicht. In dieser Arbeit wird der Einsatz von MTB als lebende Eisenchelatoren in der Tumormikroumgebung (TME) erforscht, die daraus resultierende Konkurrenz zwischen Bakterien und menschlichen Krebszellen untersucht und analysiert welche metabolischen Veränderungen induziert werden. Das magnetotaktische Verhalten von MTB wurde *in vivo* durch die magnetische Steuerung der Bakterien in *X. laevis* Embryonen untersucht. Durch die Verwendung von MTB als Modellorganismus wurden zudem erste Schritte unternommen, magnetischen Eigenschaften in dem probiotischen Stamm *E. coli* Nissle 1917 nachzubilden, indem ein Protokoll für die magnetische Beschichtung seiner Oberfläche entwickelt wurde.

Wir begannen mit der Wiederherstellung einer hypoxischen Umgebung durch die Einrichtung eines *in vitro* Co-Kultursystems mit dem magnetotaktischen Stamm *Magnetospirillum magneticum* AMB-1, der unter sauerstoffarmen Bedingungen zusammen mit menschlichen Krebszellen kultiviert wurde. Erste Untersuchungen umfassten die Quantifizierung der bakteriellen Siderophorproduktion, die einer relevanten Konzentration von Deferoxamin (DFO), einem wirksamen Medikament welches in der Eisenchelationstherapie verwendet wird, entsprach. In anschließenden Experimenten wurde eine verstärkte Expression des Transferrinrezeptors 1 (TfR1) auf der Zelloberfläche und eine signifikante Verringerung der Lebensfähigkeit verschiedener Krebszelllinien festgestellt, was auf die Fähigkeit der Bakterien hinweist, die Eisenhomöostase umliegender menschlicher Zellen beeinflussen zu können.

In Folgeexperimenten konnten wir eine geringere Zellproliferation nachweisen, die mit einem wachsenden Verhältnis von Bakterien zu Krebszellen korrelierte. Zudem wurden erhöhte apoptotische Zustände durch steigendes Aktivitätsniveau der Exekutorkaspasen in Krebszellen festgestellt, welche mit zunehmender Anzahl von AMB-1 kultiviert wurden. Schließlich wurden bei den durchgeführten Tests mehrere mit apoptotischen Signalwegen zusammenhängende Proteine aufgedeckt, die veränderte Werte aufwiesen, wenn AMB-1 der Kultur zugesetzt wurden.

Nachdem der voraussichtliche Nutzen von AMB-1 bei der Sequestrierung von Eisen aus Krebszellen validiert worden war, wurde die magnetische Reaktionsfähigkeit der Bakterien im lebenden Organismus untersucht. Systemische Injektionen von AMB-1 wurden *Xenopus laevis* Embryonen verabreicht, und ein externes rotierendes Magnetfeld wurde angelegt, um eine drehmomentbasierte Reaktion auszulösen. Innerhalb von Gefäßen, die durch geringen oder fehlenden Blutfluss gekennzeichnet waren, wurde eine synchrone Rotation von Bakterien beobachtet, und nach einer Stunde magnetischer Aktivierung konnte deutliche vaskulärer Extravasation festgestellt werden.

Die magnetischen Eigenschaften von AMB-1 bieten einen bemerkenswerten Eigenschaft für die selektive Steuerung von Bakterien. Um dieses Prinzip auf probiotische Stämme zu übertragen, wurde daher eine Methode entwickelt, die Oberfläche von EcN mit magnetischen Partikeln zu modifizieren um eine vergleichbare Steuerung mit extern angelegtem Magnetfeld zu erreichen. Die mit magnetischen Nanopartikeln beschichtete Oberfläche wurde anschließend durch kolorimetrische Assays, Mikroskopie und Eisenquantifizierungstechniken validiert. Die Reaktionsfähigkeit des resultierenden magnetisch verstärkten EcN wurde dann untersucht. Schließlich wurden Pilotexperimente durchgeführt, um die bakterielle Translokation von Endothel-Monolayern und die Akkumulation in 3D Tumor Modellen zu untersuchen und die potenziellen Vorteile der magnetischen Steuerung *in vitro* zu ergründen.

Diese Arbeit unterstreicht das Potenzial von AMB-1 als bewegliche, sich selbst replizierende eisenchelatbildende Einheiten, die in der Lage sind, die Eisenhomöostase von Krebszellen zu stören, was zu einer Verringerung ihrer Lebensfähigkeit führt. Darüber hinaus untermauern die erhobenen Daten die Anwendbarkeit, extern angelegter Magnetfelder, gezielte Steuerbarkeit von Bakterien *in vivo* zu induzieren. Auch wird gezeigt wie alternative, von Natur aus nicht magnetische, Bakterienstämme durch Oberflächenbeschichtung mit magnetischem Material funktionalisiert werden können. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse unterstreichen die auftretende Nährstoffkonkurrenz als zusätzliche Strategie zur Bekämpfung

von Tumoren und betonen die Vorteile magnetisch responsiver Bakterien als vielversprechendes Werkzeug für zukünftige bakterienbasierte Krebstherapien.