

DISS. ETH NO. 26377

# **BIOHYBRID AND SYNTHETIC MICROSWIMMERS FOR TARGETED CARGO DELIVERY**

A dissertation submitted to

**ETH ZURICH**

for the degree of Doctor of Science

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

**Öncay Yaşa**

Master of Science, Bilkent University

born on March 26, 1990

Citizen of Turkey

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Mehmet Fatih Yanık, co-examiner

Prof. Dr. Metin Sitti, co-examiner

Prof. Dr. Simone Schürle, co-examiner

**2019**

Effective miniaturization of functional machines to operate at the microscopic world has a great potential to revolutionize minimally invasive interventions and operations at hard-to-reach body locations. The use of microswimmers as miniaturized functional machines to deliver cargo in a targeted manner or manipulate cells at the single-cell level has been studied for more than a decade. Advancements in microfabrication techniques and our daily progress in understanding nature and natural phenomena enable us to develop more sophisticated microswimmers that could one day be utilized in real medical operations by physicians. To reach this vision, application-specific microswimmers, such as drug carriers or cell transporters, should be designed and developed, and the physical and chemical properties of the developed microswimmers should be well understood prior to their usages in medical operations. In this dissertation; initially, a bacteria powered biohybrid microswimmer design approach is presented to show that the intrinsic cell membrane properties of the bacteria could be utilized for targeted localization of the biohybrid microswimmers onto the cell membranes of specific eukaryotic cell types. With this design approach, it was demonstrated that the biological segment of biohybrid microswimmers could be further used to obtain additional functionalities, such as cell-specific localization, together with the powering and actuating the microswimmers. Then, a soft biohybrid microswimmer design approach, composed of emptied red blood cells and a bioengineered bacteria species, is presented through non-invasive integration of the cargo carriers with the biological actuators by using biotin-streptavidin-biotin conjugation chemistry. With this study, it was most importantly shown that soft biohybrid microswimmers, which could autonomously squeeze and pass through confined spaces that were smaller than their overall size, could be obtained via proper selection and integration of naturally deformable cargo carriers to the microswimmer design. After that, a unicellular microalga species is introduced as an alternative power source and actuator to flagellated bacteria species in the biohybrid microswimmer design approach. With this work, easy and facile fabrication of algal

microswimmers was demonstrated by using non-covalent electrostatic interactions between the biological actuators and the designed artificial cargo carriers. Furthermore, locomotion of the algal microswimmers was shown in various physiologically relevant fluids, including plasma, and biocompatibility of the algal microswimmers was presented towards different eukaryotic cell lines, including HeLa and OVCAR-3 cells, for a long period of time. Finally, three-dimensional fabrication of a new helical magnetic microswimmer design from biodegradable chitosan molecules is presented, and their precise control using an external magnetic field and controllable light-triggered drug release from these microswimmers were demonstrated under the microscope. In this work, it was further shown that synthetic microswimmers could be degraded by enzymes found in the human body without producing any cytotoxic by-products if natural polymers could be used in the fabrication of the microswimmers. Overall, the studies reported in this dissertation aim to develop and investigate novel microswimmer designs that can enhance our understanding of functional microswimmer fabrication and could be potentially used as a part of more sophisticated futuristic medical microswimmer designs. Several issues encountered by most of the medical microswimmers, including biocompatibility, biodegradability, and navigation through confined spaces, were separately addressed in the reported works. However, there are still many open challenges, including real-time medical imaging, locomotion in complex environments, and adaptation to local environmental changes, before integrating all these reported functionalities into more sophisticated microswimmer designs and the transition of the microswimmers into clinics.

Die effektive Miniaturisierung funktioneller Maschinen für den Einsatz in der mikroskopischen Welt hat großes Potenzial, minimal-invasive Eingriffe und Operationen an schwer zugänglichen Körperstellen zu revolutionieren. Der Einsatz von Mikroschwimmern als miniaturisierte funktionelle Maschinen zur gezielten Abgabe von Ladung oder zur Manipulation von Zellen auf Einzelzellenebene wird seit mehr als einem Jahrzehnt untersucht. Fortschritte in den Mikrofabrikationstechniken und unser täglicher Fortschritt im Verständnis der Natur und der natürlichen Phänomene ermöglichen es uns, anspruchsvollere Mikroschwimmer zu entwickeln, die eines Tages von Ärzten in realen medizinischen Operationen eingesetzt werden könnten. Um diese Vision zu erreichen, sollten anwendungsspezifische Mikroschwimmer, z.B. als Medikamententräger oder Zelltransporter, entworfen und entwickelt werden und die physikalischen und chemischen Eigenschaften der entwickelten Mikroschwimmer sollten vor ihrem Einsatz in medizinischen Operationen gut verstanden werden. In dieser Dissertation wird zunächst ein bakterienbetriebener biohybrider Mikroschwimmer-Designansatz vorgestellt, um zu zeigen, dass die intrinsischen Zellmembran-Eigenschaften der Bakterien für eine gezielte Lokalisierung der biohybriden Mikroschwimmer auf die Zellmembranen spezifischer eukaryotischer Zelltypen genutzt werden können. Mit diesem Design-Ansatz konnte gezeigt werden, dass das biologische Segment der biohybriden Mikroschwimmer weiter genutzt werden kann, um zusätzliche Funktionalitäten, wie z.B. die zellspezifische Lokalisierung, zusammen mit der Ansteuerung und dem Antrieb der Mikroschwimmer zu erhalten. Anschließend wird ein weicher biohybrider Mikroschwimmer-Designansatz, bestehend aus entleerten roten Blutkörperchen und einer biotechnologisch hergestellten Bakterienart, durch nicht-invasive Integration der Ladungsträger mit den biologischen Aktuatoren unter Verwendung der Biotin-Streptavidin-Biotin-Konjugationschemie vorgestellt. Mit dieser Studie wurde vor allem gezeigt, dass weiche biohybride Mikroschwimmer, die sich autonom zusammendrücken und durch Räume, kleiner als ihre Gesamtgröße, hindurchkommen können,

durch die richtige Auswahl und Integration von natürlich verformbaren Ladungsträgern in das Mikroschwimmerdesign gefertigt werden können. Danach wird eine einzellige Mikroalgenart als alternative Energiequelle und Antrieb für gezeißelte Bakterienarten im biohybriden Mikroschwimmer-Designansatz eingeführt. Mit dieser Arbeit wurde die einfache und unkomplizierte Herstellung von Algen-Mikroschwimmern durch die Verwendung nicht-kovalenter elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den biologischen Aktoren und den entworfenen künstlichen Ladungsträgern demonstriert. Darüber hinaus wurde die Fortbewegung der Algen-Mikroschwimmer in verschiedenen physiologisch relevanten Flüssigkeiten, einschließlich Plasma, gezeigt und die Biokompatibilität der Algen-Mikroschwimmer gegenüber verschiedenen eukaryotischen Zelllinien, einschließlich HeLa- und OVCAR-3-Zellen, über einen langen Zeitraum hinweg präsentiert. Schliesslich wird die dreidimensionale Herstellung eines neuen helixförmigen magnetischen Mikroschwimmer-Designs aus biologisch abbaubaren Chitosan-Molekülen vorgestellt, und ihre präzise Steuerung durch ein externes Magnetfeld und die kontrollierbare lichtgesteuerte Wirkstofffreisetzung aus diesen Mikroschwimmern wurde unter dem Mikroskop demonstriert. In dieser Arbeit wurde ferner gezeigt, dass synthetische Mikroschwimmer durch Enzyme im menschlichen Körper abgebaut werden können, ohne dass zytotoxische Nebenprodukte entstehen, wenn natürliche Polymere bei der Herstellung der Mikroschwimmer verwendet werden. Insgesamt zielen die in dieser Dissertation berichteten Studien darauf ab, neuartige Mikroschwimmerdesigns zu entwickeln und zu untersuchen, die unser Verständnis der funktionellen Mikroschwimmerherstellung verbessern können und die möglicherweise als Teil anspruchsvollerer futuristischer medizinischer Mikroschwimmerdesigns verwendet werden könnten. Mehrere Probleme, auf die die meisten medizinischen Mikroschwimmer stoßen, einschließlich der Biokompatibilität, der biologischen Abbaubarkeit und der Navigation durch enge Räume, wurden in den berichteten Arbeiten gesondert behandelt. Es gibt jedoch noch viele offene Herausforderungen, darunter die medizinische Echtzeit-Bildgebung, die Fortbewegung

in komplexen Umgebungen und die Anpassung an lokale Umweltveränderungen, bevor all diese berichteten Funktionalitäten in anspruchsvollere Mikroschwimmer-Designs und den Übergang der Mikroschwimmer in Klinikalltag integriert werden.