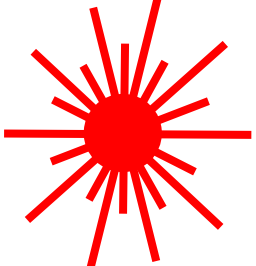
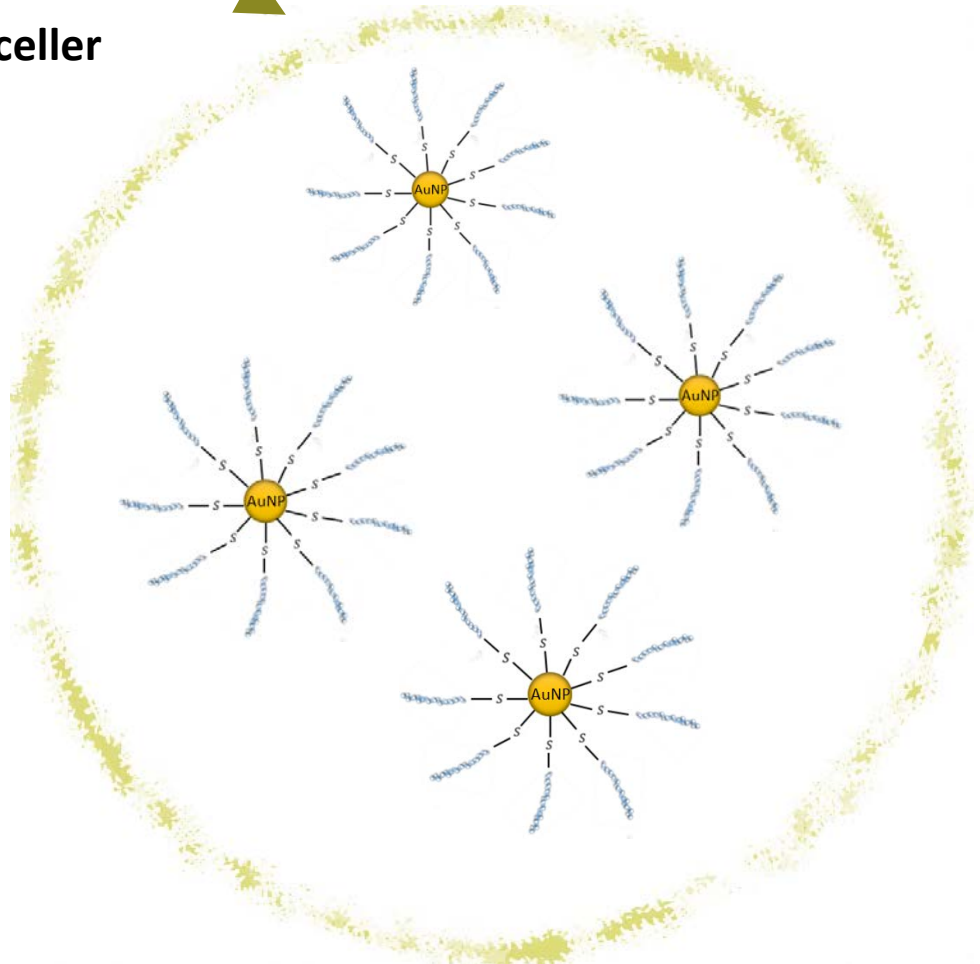


Guldnanopartikler til målrettet behandling af kræftstamceller

Eskild Bækgaard Lauritsen
Frederiksberg Gymnasium 3.z
Naturvidenskab
Projekt forskerspirer 2017
30. oktober 2017



Indhold

1 Indledning	2
2 Afgrænsning og problemformulering	2
3 Metodevalg og teori	3
4 Udførelse af projektet	4
4.1 Klargøring af HA-AuNP's	4
4.2 HA-AuNP's interaktion med kræftstamceller	6
4.3 Eliminering af kræftstamceller	6
4.4 Budget	7
4.4.1 Materialer til rådighed	7
4.4.2 Materialer der skal købes	8
5 Konklusion og perspektiv	8
6 Tak til	8
7 Litteraturliste	9
7.1 Artikler	9
7.2 Bøger	10
8 Bilag	11

1 Indledning

Nutidig kræftbehandling med kemoterapi medfører bivirkninger. Udover bivirkningerne får den nuværende kræftbehandling ikke bugt med hele tumoren. Forskningens fokus på undersøgelse af kræftcellers resistens mod kemoterapi og andre behandlingsmetoder har ledt til opdagelsen af kræftstamceller (KSC), en kræftcelle-type der besidder stamcelleegenskaber foruden resistens mod eksisterende kræftbehandling. Disse kræftstamceller spiller tre roller i at bibeholde tumoren: (i) styrket sandsynlighed for dannelse af tumorer, (ii) selvopretholdelse på lang sigt og (iii) differentiering til andre typer af tumorceller (Schatton, Frank, og Frank 2009). Det er derfor essentielt at designe målrettet behandling mod KSC, og forskere har på grundlag af dette, undersøgt hvilke fænotyper der overudtrykkes blandt KSC (Schatton, Frank, og Frank 2009).

Antallet af KSC i en kræfttumor afhænger af forskellige faktorer såsom tumorstørrelse og -type. Det er vist, at procentdelen af KSC kan variere fra 0,1-30% i en kræfttumor (Vinogradov og Wei 2012). Tal som dette understreger vigtigheden i at forske i og undersøge mulighederne for behandling af KSC.

En behandlingsmetode der har gode muligheder for fremtidig succes, hvad angår KSC behandling er nanomedicin. En bestemt type nanomedicin, guld nanopartikler (AuNP's), kan, med det rette molekyle bundet på overfladen, være målrettet mod bestemte udtrykte fænotyper af KSC. Fænotypen, der på denne måde angribes, er karakteriseret ved særlige overfladeegenskaber af cellen, som genkender det molekyle, der sidder på overfladen af guldnanopartiklen. AuNP's kan derefter endocytteres af cellen, opvarmes ved fototermisk terapi og dræbe KSC.

I dette projekt fokuseres der på muligheden for behandling af brystkræftstamceller (BKSC) *in vitro* vha. fototermisk terapi. Det specielle ved dette projekt er brugen af AuNP's med tilbundet hyaluronsyre (HA). Dette kompleks er endnu ikke blevet beskrevet til brystkræftstamcelle behandling i litteraturen.

2 Afgrænsning og problemformulering

For at undersøge muligheden for brugen af AuNP's med HA på overfladen som målrettet behandling mod BKSC, arbejdes der ikke med almindelige kræftcelle tumorer, men isolerede kræftstamceller. Samtidig fokuseres der ikke på en eventuel toksicitet ved brug af AuNP's som behandlingsmetode, da der arbejdes *in vitro*. Dette fokus medfører også, at der ikke arbejdes med faserne efter,

selve behandlingen har fundet sted, som f.eks. muligheden for at skille sig hensigtsmæssigt af med AuNP's efter succesfuld behandling *in vivo*. Af dette udledes problemformuleringen:

Hvilke kemiske forudsætninger er der for modifikationen af HA, så molekylet kan bindes til guldnanopartikler, og hvilke kemiske og fysiske forudsætninger er der for, at en efterfølgende kræftbehandling med dette guld-nanopartikel-kompleks målretter sig mod kræftstamcellerne i den solide brystkræfttumor og medvirker til at dræbe denne.

Ud fra ovenstående problemformulering og litteraturstudier gennem hele forløbet formuleres nedenstående hypotese:

Guld nanopartikler med tilbundet hyaluronsyre vil være en ideel målrettet behandlingsmetode mod brystkræftstamceller ved fototermisk behandling med en kortpulseret laser.

3 Metodevalg og teori

Viden og teorier, der bygger på hvilke fænotyper KSC i højere grad udtrykker, er opnået gennem litteraturstudier. (Al-Hajj m.fl. 2003) beskriver en overudtrykkelse af fænotypen CD44 i brystkræft, og (Vinogradov og Wei 2012) udpeger HA til at være effektiv som målrettet behandling mod BKSC, da den binder sig til CD44. Det vil derfor være ideelt at binde AuNP's med HA. Da HA er en negativt ladet syre, og AuNP's også er negativt ladede, kan bindingen af HA til AuNP's finde sted ved først at binde cystamin (CA) til HA ved reduktiv aminering efterfulgt af reduktion ved DTT, som tilgængelig gør frie thiol-grupper (Lee m.fl. 2012). Ideen ved at binde CA til HA er, at de frie thiol-grupper kan interagere med AuNP's via svovlatomets to uparrede elektroner og danne thiol-guld bindinger (Hermanson 2013b) og (Hermanson 2013a). Hele denne proces muliggør derfor, at HA-AuNP's kan dannes og teoretisk set interagere med BKSC.

Jeg foreslår, at udsætte HA-AuNP's i BKSC for fototermisk terapi ved en NIR bølglængde, hvor (Huang m.fl. 2007) bruger bølglængden 800 nm. NIR lys vælges grundet lysets penetration af menneskeligt væv i dette bølglængdeområde (K Svoboda og Block 1994). Derudover bruges med fordel en kortpulseret laser med høj energi i hver puls. Dette valg resulterer i, at guldnanopartiklerne absorberer den første og anden foton, som AuNP's udsættes for samtidigt. Energimæssigt svarer absorption af to fotoner ved 800 nm til en enkelt foton ved 400 nm. Fænomenet kaldes en to-fotonabsorption. I forbindelse med projektet har jeg selv dannet en opløsning af AuNP's, og for dis-

se er der, jf. absorptionsspektret (Bilag 1), et absorptionsmaksimum ved bølgelængden $\lambda_{\max} = 521$ nm, og meget højere absorption ved 400 nm end ved 800 nm. Derfor er det vigtigt at have en pulseret laser med høj intensitet i hver puls. I mit projekt vælger jeg at udsætte en BKSC-kultur for fototermisk terapi som et kontrolforsøg. Ved at gøre dette, kan en maksimalintensitet for laseren findes, der netop ikke dræber de rene BKSC. Når BKSC med HA-AuNP's skal udsættes for fototermisk terapi, vil der følgelig anvendes en lavere intensitet end den maksimale for BKSC.

4 Udførelse af projektet

I mit projekt består det eksperimentelle arbejde af tre overordnede skridt, som vil blive beskrevet i detalje herunder. Først beskrives, hvordan guld-nanopartikler dannes, hvorledes overfladepolariteten på den negativt ladede hyaluronsyre (HA) modificeres, samt hvordan HA, med tilbundet cystamin, bindes til de negativt ladede AuNP's. Anden del vil være fokuseret på at indsætte AuNP's med tilbundet hyaluronsyre (HA-AuNP's) i de isolerede kræftstamceller. I det tredje skridt opvarmes HA-AuNP's i kræftstamcellerne ved fototermisk terapi. Herunder vil kontrolforsøg samt visualisering af celledød efter opvarmning i kontrolforsøget såvel som selve forsøget blive diskuteret.

En del af første skridt er udført i forvejen som et pilotforsøg, i samarbejde med Matthias Fach, Post.doc ved DTU Nanotech. AuNP's blev lavet og karakteriseret med dynamisk lysspredning.

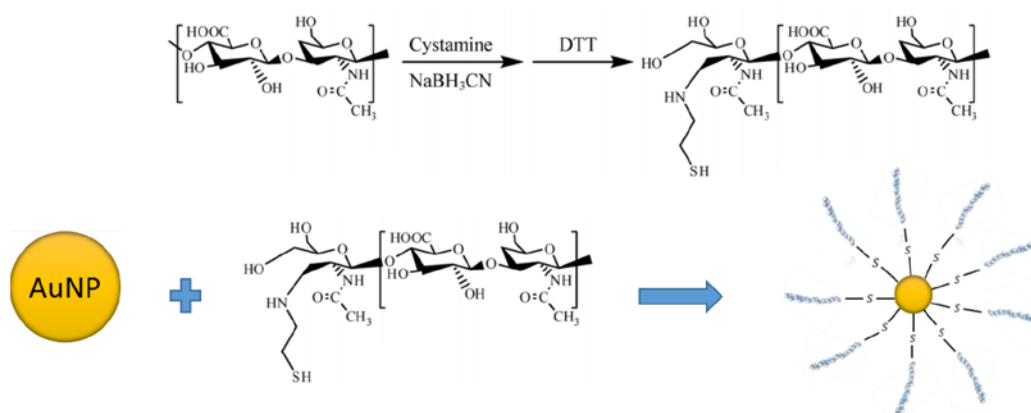
4.1 Klargøring af HA-AuNP's

AuNP's bliver lavet ud fra en opløsning af $\text{HAuCl}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (14,8 mg) i Milli-Q vand (100 mL). Under opvarmning til 75°C tilsættes vandig trinatrium citrat (8 mL). Temperaturen bibeholdes under omrøring i 60 minutter, og den resterende opløsning tilbagesvales efterfulgt af nedkøling til rumtemperatur. AuNP's (0,066 mg/mL) er herved dannet (Frellsen m.fl. 2016). Herefter udføres en absorbansmåling af AuNP's i opløsningen samt en størrelsesdistribution af AuNP's i opløsningen ved dynamisk lysspredning. Absorbansmålingen samt størrelsesdistributionens data ses i Bilag 1 og 2.

Næste skridt i protokollen går ud på at binde AuNP's til HA. Dette skridt kan blive udført præcist som beskrevet af (Lee m.fl. 2012), eller som en videreudvikling af metoden beskrevet af (Ma m.fl. 2013). Ideen er at sammenligne de to tilgange til at få bundet AuNP's til HA, da de er vidt forskellige. De to tilgange er beskrevet i detalje herunder:

(Ma m.fl. 2013) beskriver hvordan cysteamin bindes til AuNP's. AuNP's blandes med en 0,1 μM opløsning af cysteamin (CA) med koncentrationerne i forholdet 1:50 (AuNP's : CA), da det viste sig at være her, at guldpartiklerne ikke aggregerede. Blandingen rystes roligt i to timer på rysteplade efterfulgt af at stå i ca. 10 timer i køleskab ved 4°C. CA-AuNP's er herved dannet. Efterfølgende skal den negativt ladede HA bindes til de nu, positivt ladede CA-AuNP's. Min hypotese går herpå, at HA, som er en syre, der består af repetitionsenheder, kan bindes ud fra følgende ide: Hvis 50 enheder per nm^2 ønskes og den HA vi bruger har molekylemassen 400000 g/mol, skal den færdige guldpartikel være dækket af 0.05 HA kæder per nm^2 . De to trin med CA + AuNP's og HA + CA-AuNP's er dog en forsøgsprotokol, som skal udvikles. Min forskerkontakt, Matthias Fach, forudser at udviklingen af denne forsøgsprotokol ville tage 6 uger.

En anden metode til at binde HA til AuNP's er derfor ideel at bruge, for derefter at sammenligne de to metoder. (Lee m.fl. 2012) beskriver en metode, hvorved den negativt ladede HA bindes sammen med cystamin dihydrochlorid for at danne thiol-modificerede HA, der kan interagere med AuNP's gennem thiol-bindinger. Kort beskrevet blev den thiol-modificerede hyaluronsyre dannet af reduktiv aminering. NaBH_3CN tilføjes til en opløsning af cystamin og HA, og disse reagerer ved 40°C i 5 dage. Til sidst tilføjes DTT, som medvirker til, at der fremkommer en fri thiolgruppe. Inden næste skridt foretages tilsidesættes 5 mL AuNP-opløsning som kontrol til senere fototermisk terapi. De resterende AuNP's dannet ud fra første skridt vil gennemgå en efterfølgende reaktion med den thiol-modificerede hyaluronsyre, således at thiol enderne kan bindes til AuNP's, også som beskrevet af (Lee m.fl. 2012). Herved er thiol-modificerede HA bundet på overfladen af AuNP's (HA-AuNP's), se figur 1. Der udføres endnu en størrelsesfordeling vha. dynamisk lysspredning af HA-AuNP's, således at disse også karakteriseres.



Figur 1. Skematisk præsentation af de thiol-modificerede HA og HA-AuNP's (reaktionsskema fra (Lee m.fl. 2012)).

4.2 HA-AuNP's interaktion med kræftstamceller

Som næste del af forsøgsdesignet vil dyrkelse af KSC fra brystkræft (BKSC) finde sted. Her vil BKSC dyrkes, som beskrevet af (Rathinaraj m.fl. 2015) og til dels af (Huang m.fl. 2007). Kort beskrevet dyrkes BKSC ved 37°C i et vådt miljø bestående af 5% CO₂ i en polystyren skål med 10 ml DMEM opløsning sammen med 10% fetal bovine serum og 1% penicillin streptomycin G sodium (PGS). En del af BKSC cellekulturen tilsættes ikke HA-AuNP-opløsningen, men bruges som senere kontrol ved forsøgene, hvor BKSC udsættes for fototermisk terapi. Den resterende del af BKSC cellekulturen skylles med PBS buffer og tilsættes til HA-AuNP-opløsningen i 40 minutter ved stuetemperatur. Cellerne skylles med PBS buffer og tilsættes til en PBS buffer i en petriskål, således at de er klar til den fototermiske terapi. (Huang m.fl. 2007)

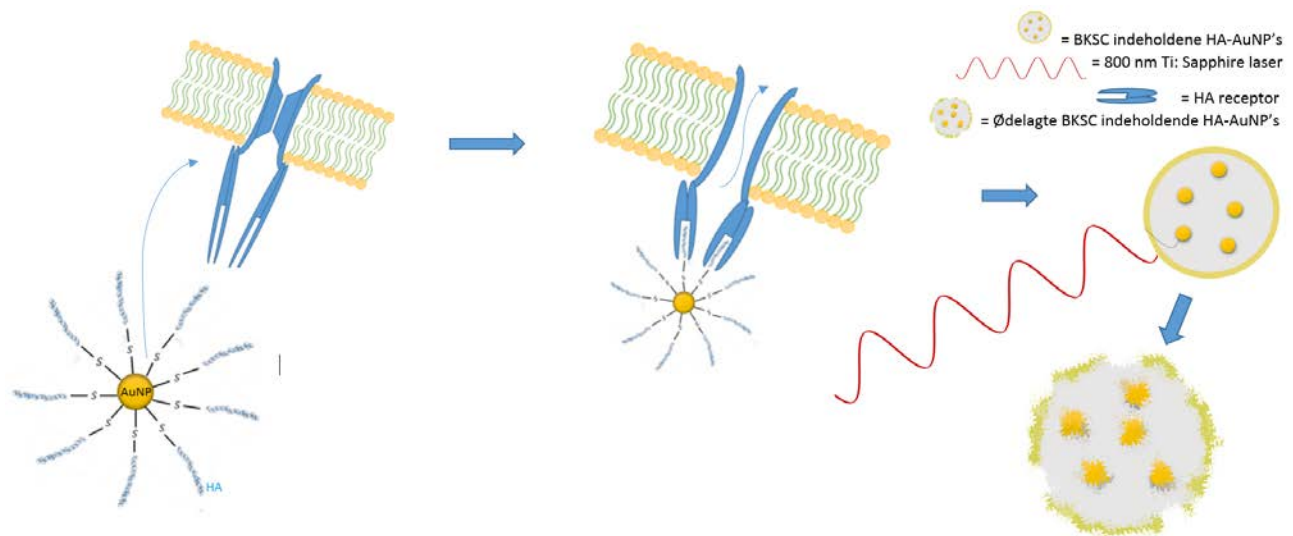
Som kontrolforsøg skylles den resterende BKSC cellekultur med PBS buffer, hvor en del af cellekulturen tilsættes til den rene AuNP-opløsning i 40 minutter ved stuetemperatur, skylles med PBS buffer og tilsættes til PBS buffer i en petriskål klar til den fototermiske terapi. Den anden del af den resterende cellekultur skylles med PBS buffer, står ved stuetemperatur i 40 minutter, skylles med PBS buffer og tilsættes til PBS buffer i en petriskål klar til den fototermiske terapi.

4.3 Eliminering af kræftstamceller

Som sidste del af forsøgsprotokollen vil de HA-AuNP interagerede BKSC, de AuNP interagerede BKSC celler og de rene BKSC celler udsættes for en pulseret Ti: Sapphire laser ved 800 nm med en pulsratio på et femtosekund og en repetitionsrate på 1 kHz, se figur 2. Laserens spotdiameter er på 1mm og de tre forskellige cellekulturer udsættes for dette i 2 minutter (Huang m.fl. 2007). De første celler der gennemgår denne terapi er de rene BKCS, da den maksimale laserstyrke hvorved rene BKCS ikke bliver ødelagt af den fototermiske terapi skal findes. Når denne maksimale laserintensitet er fundet, fuldføres forsøget med de to andre cellekulturer, hvor et antal muligheder for intensiteten, der alle er mindre end den maksimale intensitet, som de rene BKCS kan tåle, bruges i laseren. (Huang m.fl. 2007) fandt denne maksimale intensitet for HSC orale kræftceller ud fra samme princip. I deres forsøg var den maksimale intensitet 22.2 mW.

Efter de tre cellekulturer har gennemgået den fototermiske terapi, skal celledød blandt de forskellige kulturer bestemmes. Det gøres ved at teste BKCS levedygtighed med 0,4 % trypan blue farvning i 10 minutter. Døde celler vil fremkomme blå, eftersom de akkumulerer med farven, mens fortsat levende celler ikke gør (Huang m.fl. 2007). Celledød ved de forskellige intensiteter vurderes og den

lavest mulige intensitet med effektiv celledød i cellerne, hvor HA-AuNP's er tilsat, foreslås til senere *in vivo* forsøg. *In vivo* forsøg rækker ud over det her beskrevne projekt.



Figur 2. Illustration af HA-AuNP's til den målrettede interaktion med BKSC og behandling herefter.

4.4 Budget

4.4.1 Materialer til rådighed

Samtlige materialer er blevet stillet til rådighed af DTU, primært DTU nanotech.

Materialer
Ti: Sapphire laser 800 nm
Udstyr og materialer til dyrkelse af BKSC
Udstyr og materialer til produktion af AuNP's
PD-10 Desalting Column
Udstyr og materialer til dynamisk lysspredning
Udstyr of materialer til absorptionsmåling

4.4.2 Materialer der skal købes

Materialer	Pris - købssted
Hyaluronsyre (MW 12000, 1 g)	1.100 DKK - Lifecore Biomedical
Cystamin dihydrochlorid (100 g)	850 DKK - Sigma Aldrich
Brystkræft stamcelle MCF-7 (Isolerede, frosne)	3.800 DKK - ProMab Biotechnologies, Inc
Trypan Blue 0,4 % (3 x 100 mL)	850 DKK - Termofischer Scientific
Uforudsete udgifter - engangsvarer	1.000 DKK
Samlet	7.600 DKK

5 Konklusion og perspektiv

For at kunne binde HA til guldnanopartikler skal de interagerende dele af HA være bundet til cystamin. Cystamin introducerer frie thiol-grupper på overfladen af HA, som gennem svovl-guld bindinger kan sammenbinde HA og guldnanopartikler. Brystkræftstamceller overudtrykker fænotypen CD44, som HA genkender på celleoverfladen, og derefter endocyteres guldnanopartiklerne. Til den efterfølgende opvarmning er det essentielt at anvende en kortpulseret NIR laser med høj intensitet for at behandle brystkræftstamcellerne. Der er stor sandsynlighed for, at guldet ved to-fotonabsorption vil optage de to fotoner på én gang, hvilket svarer til en absorberet energi tættere på resonans i guldpartiklerne, som derefter omsættes til varme. Laserlysets bølgelængde skader ikke kroppens væv. HA bundne AuNP's er derfor ideelle til målrettet behandling af brystkræftstamceller ved fototermisk behandling.

Mit forsøg lægger op til en videre forskning, der går på at behandle brystkræft in vivo. Da en målrettet behandling af kræftstamceller vil betyde, at den enkelte tumor ikke har mulighed for at genopbygge sig selv, vil denne målrettede behandling være en ideel efterfølgende kræftbehandling.

6 Tak til

Nazila Kamaly, lektor ved DTU Nanotech - Min primære forskerkontakt som jeg har diskuteret mine ideer med. Nazila har sat mig i kontakt med Matthias, med formålet at lave guldnanopartikler fra bunden.

Matthias Fach, post.doc ved DTU Nanotech - Min vejleder der har hjulpet mig med laboratoriearbejdet og med at udarbejde forsøgsprotokollen bag de forskellige skridt for modifikationen af hyaluronsyre og guldnanopartiklerne.

Jeg har desuden haft glæden af (under efterårsferie i Hong Kong) at diskutere forskningsmuligheder med guldnanopartikler med Jianfang Wang, professor ved Chinese University of Hong Kong.

7 Litteraturliste

Hvor intet andet er angivet er figurerne i synopsen udarbejdet af mig selv.

7.1 Artikler

Al-Hajj, Muhammad, Max S. Wicha, Adalberto Benito-Hernandez, Sean J. Morrison, og Michael F. Clarke. 2003. "Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7):3983–88.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>.

Frellsen, Anders F., Anders E. Hansen, Rasmus I. Jølck, Paul J. Kempen, Gregory W. Severin, Palle H. Rasmussen, Andreas Kjær, Andreas T. I. Jensen, og Thomas L. Andresen. 2016. "Mouse Positron Emission Tomography Study of the Biodistribution of Gold Nanoparticles with Different Surface Coatings Using Embedded Copper-64". *ACS Nano* 10 (11):9887–98.

<https://doi.org/10.1021/acsnano.6b03144>.

Huang, Xiaohua, Wei Qian, Ivan H. El-Sayed, og Mostafa A. El-Sayed. 2007. "The Potential Use of the Enhanced Nonlinear Properties of Gold Nanospheres in Photothermal Cancer Therapy". *Lasers in Surgery and Medicine* 39 (9):747–53. <https://doi.org/10.1002/lsm.20577>.

K Svoboda, og and S. M. Block. 1994. "Biological Applications of Optical Forces". *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 23 (1):247–85.

<https://doi.org/10.1146/annurev.bb.23.060194.001335>.

Lee, Min-Young, Jeong-A Yang, Ho Sang Jung, Songeun Beack, Jung Eun Choi, Wonhee Hur, Heebeom Koo, Kwangmeyung Kim, Seung Kew Yoon, og Sei Kwang Hahn. 2012. "Hyaluronic Acid–Gold Nanoparticle/Interferon α Complex for Targeted Treatment of Hepatitis C Virus Infection". *ACS Nano* 6 (11):9522–31. <https://doi.org/10.1021/nn302538y>.

Ma, Yujie, Ling Jiang, Yajun Mei, Rongbin Song, Danbi Tian, og He Huang. 2013. "Colorimetric Sensing Strategy for Mercury(II) and Melamine Utilizing Cysteamine-Modified Gold Nanoparticles". *Analyst* 138 (18):5338–43. <https://doi.org/10.1039/C3AN00690E>.

Rathinaraj, Pierson, Kyubae Lee, Soo-Young Park, og Inn-Kyu Kang. 2015. "Targeted Images of KB Cells Using Folate-Conjugated Gold Nanoparticles". *Nanoscale Research Letters* 10 (1):5. <https://doi.org/10.1186/s11671-014-0725-y>.

Schatton, Tobias, Natasha Y. Frank, og Markus H. Frank. 2009. "Identification and Targeting of Cancer Stem Cells". *BioEssays* 31 (10):1038–49. <https://doi.org/10.1002/bies.200900058>.

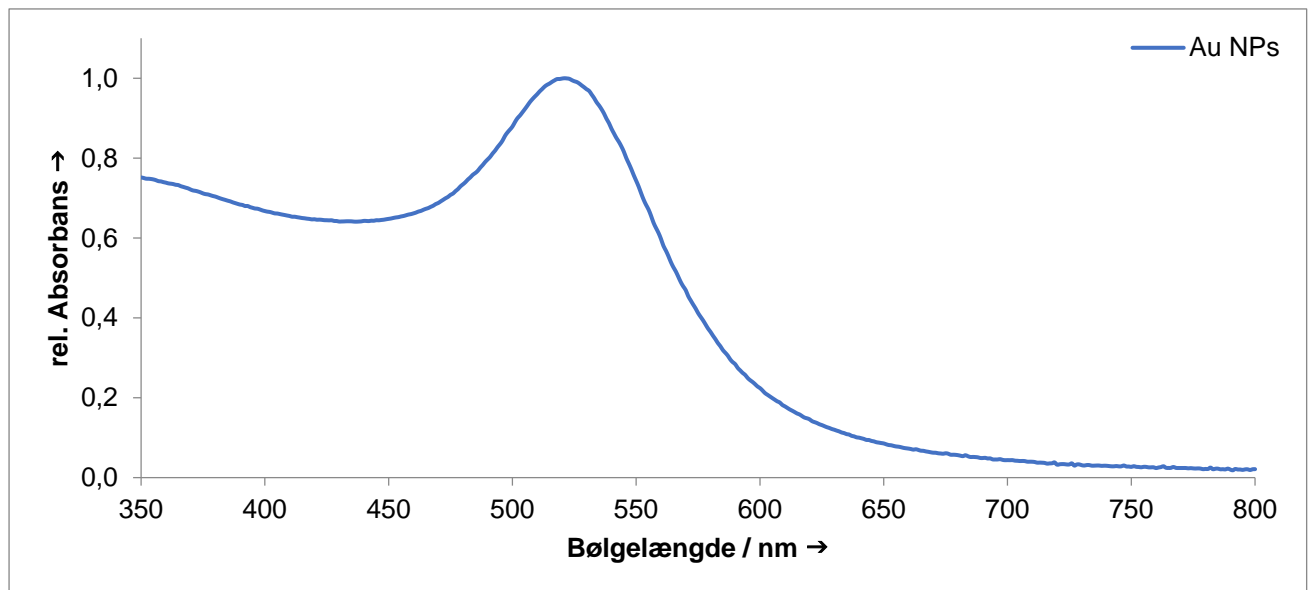
Vinogradov, Serguei, og Xin Wei. 2012. "Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine". *Nanomedicine* 7 (4):597–615. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.22>.

7.2 Bøger

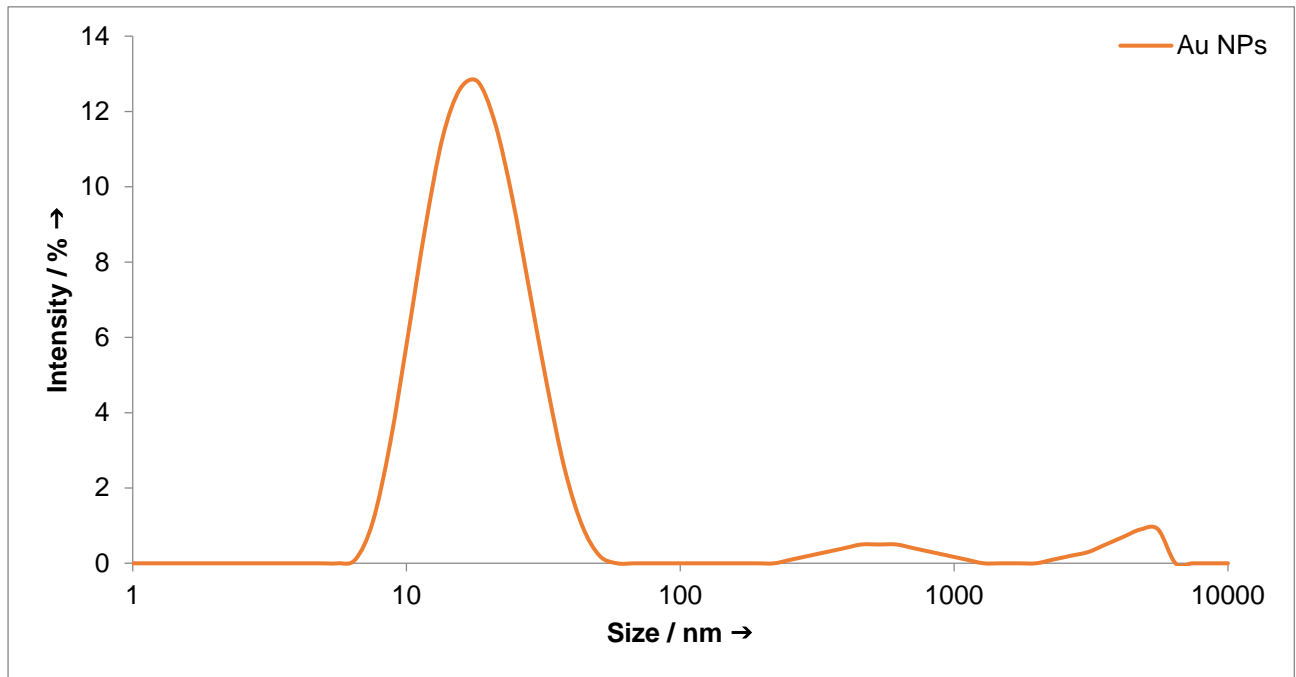
Hermanson, Greg T. 2013a. "Chapter 3 - The Reactions of Bioconjugation". I *Bioconjugate Techniques (Third edition)*, 229–58. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00003-0>.

———. 2013b. "Chapter 14 - Microparticles and Nanoparticles". I *Bioconjugate Techniques* (Third edition), 549–87. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00014-5>.

8 Bilag



Bilag 1. Relativ absorbanskurve over de dannede AuNP's. $\lambda_{max} = 521$ nm



Bilag 2. Graf over størrelsesdistributionen af rene AuNP's. Gennemsnitsstørrelsen er $17,69 \pm 0,269$ nm