

# Photokatalytische Nanopartikel für die Krebstherapie

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigte Dissertation

von

**Elsa Friehs, M. Sc.**

geboren am 23. Februar 1990 in Hannover

2018

Referent: apl. Prof. Dr. rer. nat. habil. Detlef W. Bahnemann

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 19.11.2018

*You step onto the Road, and if you don't keep your feet, there is no knowing where you might be swept off to.*

J. R. R. Tolkien

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Detlef Bahnemann und Prof. Dr. Thomas Scheper für das spannende und interdisziplinäre Forschungsprojekt danken. Als Teil von zwei Arbeitskreisen hatte ich die Möglichkeit, sowohl meinen Interessen in der pharmazeutischen Forschung nachzugehen, als auch noch ganz neue Einblicke in die Welt der Nanotechnologie zu erlangen. Außerdem bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den gewährten Freiraum bei der Bearbeitung meines Themas. Zudem möchte ich PD Dr. Ulrich Krings für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Ich bedanke mich bei den Zellkulturexpertinnen Dr. Antonina Lavrentieva und Dr. Rebecca Jonczyk, die sowohl in praktischen als auch theoretischen Fragen immer hilfreiche Anregungen parat hatten. Auch danke ich Alina Eilers für die hilfreiche, selbstständige und sehr engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer Abschlussarbeit.

Als ehemalige Kellermeisterin bedanke ich mich bei allen Institutsmitgliedern, insbesondere meinen Bürokollegen und den Werkstattmeistern Thorsten Stempel und Friedbert Gellermann, für die engagierte und fast immer Protest-freie Hilfe beim alljährlichen Sommerfest und den alltäglichen Kellermeister-Pflichten.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kommilitonen und mittlerweile Brüdern Jonas Austerjost, Bastian Quaas und Lukas Raddatz für ihre Unterstützung und Freundschaft während meiner gesamten Zeit an der Uni Hannover bedanken. Ein besonderes Dankeschön auch an die neu gewonnenen Kollegen und Freunde Svenja Bolten, Dr. Ingo de Vries, Kimia Ekramzadeh, Pia Gellermann und Marline Kirsch. Ohne eure tatkräftige und moralische Unterstützung wäre meine Zeit am TCI nicht so unvergesslich geworden.

Natürlich danke ich auch meinen Eltern Andrea und Karl Friehs, meiner Schwester Lena und meiner Oma für die bedingungslose Unterstützung während meines Studiums und der Promotion. Zu guter Letzt danke ich meinem Verlobten Timo Gewohn für seine Unterstützung, sein Verständnis und vor allem auch seine Geduld seit nun mehr als neun Jahren.

## **Kurzfassung**

Titandioxid-Nanopartikel (TiO<sub>2</sub> NP) haben mittlerweile ein breites Anwendungsspektrum und sind besonders wegen ihrer Fähigkeit zur Photokatalyse interessant für Industrie und Forschung. In dieser Arbeit wurde die Phototoxizität von TiO<sub>2</sub> NP und das damit verbundene Potential für den pharmazeutischen Einsatz in der Krebstherapie untersucht. Es wurde zunächst das Aufnahmeverhalten von zwei Säugerzelllinien, A549 und NIH/3T3, mittels Durchflusszytometrie und Time-Lapse Mikroskopie analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass die NIH/3T3-Zellen die Nanopartikel sehr effizient aufnahmen, während bei den A549-Zellen vorwiegend Agglomerat-Bildung und äußere Anlagerung beobachtet werden konnte. Es wurden keinerlei zytotoxische Effekte bei den verwendeten TiO<sub>2</sub> NP für die untersuchten Zelllinien beobachtet. Dies änderte sich jedoch bei Bestrahlung der Zellen mit UV-A-Licht. Es wurde ein eindeutiges phototoxisches Potential der TiO<sub>2</sub> P25 NP festgestellt. Das Ausmaß der Phototoxizität hing von vielen Faktoren wie beispielsweise der untersuchten Zelllinie, Bestrahlungsdosis, Inkubationsdauer und dem verwendeten Nanomaterial ab. Eine Kombination aus mit Eisen beschichteten TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub> NP erwies sich als äußerst effizient in der Abtötung von Krebszellen (HeLa und A549) unter Bestrahlung mit UV-A-Licht. Durch verschiedene *in vitro*-Assays konnte festgestellt werden, dass sowohl intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, als auch Apoptose eingeleitet und die Membranintegrität zerstört wird. Für die Anwendung in der photodynamischen Therapie sollte die Effizienz der NP durch Oberflächenmodifizierung verbessert und ein gezielter Wirkstofftransport ermöglicht werden. Die Kopplung des Aptamers Syl3C an vorher an die NP-Oberfläche adsorbierte Polyacrylsäure-Moleküle war erfolgreich, konnte die Effizienz der verwendeten NP jedoch nur bedingt verbessern. Für eine zukünftige Anregung des photokatalytischen Prozesses unter Nahinfrarot (NIR)-Strahlung wurden außerdem Upconversion-Nanopartikel synthetisiert, die die Umwandlung von NIR-Licht (980 nm) in UV-A-Licht ermöglichen.

**Schlüsselwörter:** Photokatalyse, Photodynamische Therapie, Titandioxid Nanopartikel, *Targeted-Drug-Delivery*

## **Abstract**

### **Photodynamic Therapy with modified TiO<sub>2</sub> Nanoparticles**

Titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub> NP) are nowadays widely distributed in industrial and consumer products. The unique ability to perform photocatalysis upon UV-A irradiation has raised interest of scientists in various fields including energy production but also pharmaceutical applications. In this thesis, the phototoxicity of TiO<sub>2</sub> NP against mammalian cells and the resulting potential for pharmaceutical purposes has been investigated. At first, the uptake-behavior of two standard cell lines, A549 and NIH/3T3, has been analyzed by flow cytometric and microscopic methods. Thereby, a distinct pattern has been observed. While in case of the cancer cell line A549 the NP built large agglomerates and seemed to be only attached to the cell surface, the NIH/3T3 cells showed a circular arrangement of the aggregates around the cell nucleus. The flow cytometric data supported the assumption, that the cell lines indeed behave different regarding the uptake of TiO<sub>2</sub>, a fact that has to be considered also for toxicity assessment as the uptake of NP plays an important role in which way the material can interact with cellular compounds. There have no cytotoxic effects been observed for the used cell lines incubated with the TiO<sub>2</sub> NP. This dramatically changed when the incubated cells were irradiated with UV-A light. The TiO<sub>2</sub> P25 NP showed a definite phototoxic effect, which extent depended on different factors like the investigated cell line, light dose, incubation time and the tested material. Iron-grafted WO<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> P25 composites turned out to be very efficient in killing cancer cells (A549 and HeLa) when irradiated. The generation of intracellular reactive oxygen species, loss of membrane integrity and induction of apoptosis has been detected. For possible application in photodynamic therapy, the surface of the used TiO<sub>2</sub> NP was successfully modified by coupling of the cancer cell targeting aptamer Syl3C to pre-adsorbed polyacrylic acid molecules. However, a significant increase of the phototoxic potential was not achieved with this method. Finally, upconversion nanoparticles were synthesized to enable the activation of the photocatalytic process with near-infrared irradiation.

**Keywords:** Photocatalysis, Photodynamic Therapy, Titanium Dioxide Nanoparticles, Targeted Drug Delivery

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
CB	Engl. <i>Conduction Band</i> , Leitungsband
CHO	Engl. <i>Chinese Hamster Ovary</i> , chinesische Hamster-Ovarienzellen
CTB	<i>CellTiter-Blue®</i>
CytC	Cytochrom C
DCF	Dichlorofluorescein
DDL	Diacetyldihydrolutidin
DLS	Engl. <i>Dynamic Light Scattering</i> , Dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DNA	Engl. <i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DOX	Doxorubicin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
e <sup>-</sup>	Elektron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Engl.	englisch
EpCAM	Engl. <i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i> , epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ESA	Engl. <i>Excited-state Absorption</i>
ETU	Engl. <i>Energy Transfer Upconversion</i>
EU	Europäische Union
eV	Elektronenvolt
FCM	Engl. <i>Flow Cytometry</i> , Durchflusszytometrie
FeWT	Eisen-veredeltes, Wolframtrioxid-anteiliges Titandioxid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FL1-A	Fluoreszenzkanal 1
FSC	Engl. <i>Forward Scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
h <sup>+</sup>	Loch

H <sub>2</sub> -DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
LDH	Lactatdehydrogenase
LED	Licht-Emittierende Diode
LSPR	Engl. <i>Localized Surface Plasmon Resonance</i> , lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz
MEM	Engl. <i>Minimal Essential Medium</i>
MWCO	Engl. <i>Molecular Weight Cut Off</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NIR	Nahes Infrarot
norm.	normiert
NP	Nanopartikel
PAA	Engl. <i>Polyacrylic Acid</i> , Polyacrylsäure
PBS	Engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNP	Photokatalytisch aktive Nanopartikel
PDT	Photodynamische Therapie
PS	Photosensibilisator
PTFE	Polytetrafluorethylen
rcf	Engl. <i>relative centrifugal force</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
RFU	Engl. <i>Relative Fluorescence Units</i>
RNA	Engl. <i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	Engl. <i>Reactive Oxygen Species</i> , reactive Sauerstoffspezies
SBB	Engl. <i>Sodium Borate Buffer</i> , Natriumboratpuffer
SCCNFP	<i>Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
SSC	Engl. <i>Side Scatter</i> , Seitwärtstreulicht
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
UCNP	Upconversion-Nanopartikel
UV	Ultraviolett
VB	Valenzband
vis	Engl. <i>visible</i> , sichtbares Licht
vs	versus
XRD	Engl. <i>X-Ray Diffraction</i> , Röntgenbeugung

## Inhalt

<b>Danksagung</b> .....	<b>I</b>
<b>Kurzfassung</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Inhalt</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Zielsetzung .....	2
<b>2 Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>3</b>
2.1 Anwendungsbereiche von TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln .....	3
2.2 TiO <sub>2</sub> Nanopartikel als Photokatalysator .....	4
2.2.1 Mechanismus der Photokatalyse.....	4
2.2.2 Modifizierungen von TiO <sub>2</sub> Photokatalysatoren .....	7
2.3 Nanopartikel-Zell-Interaktionen .....	8
2.3.1 Nanopartikelaufnahme.....	8
2.3.2 Toxizität von Nanopartikeln .....	10
2.3.3 Phototoxizität von TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln .....	12
2.4 Photokatalytische Nanopartikel für pharmazeutische Anwendungen.....	14
2.4.1 TiO <sub>2</sub> Nanopartikel für die photodynamische Therapie.....	14
2.4.2 Oberflächenmodifikationen von Nanopartikeln für pharmazeutische Anwendungen .....	17
2.4.3 <i>Targeted-Drug-Delivery</i> -Systeme für die photodynamische Therapie .....	19
2.4.4 Upconversion-Nanopartikel für die photodynamische Therapie.....	20
<b>3 Experimentelle Arbeiten</b> .....	<b>23</b>
3.1 Aufnahme von TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln in verschiedene Säugerzelllinien.....	23
3.1.1 Charakterisierung verwendeter TiO <sub>2</sub> Nanopartikel.....	24
3.1.2 Analyse der Nanopartikelaufnahme mittels Durchflusszytometrie.....	27
3.1.3 Time-Lapse Mikroskopie der Nanopartikelaufnahme in Säugerzellen.....	33
3.1.4 Zusammenfassung zur Nanopartikelaufnahme in Säugerzellen.....	36
3.2 Phototoxizität von TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln.....	37
3.2.1 Bestimmung der Phototoxizität von TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln: Design und Optimierung eines <i>in vitro</i> -Assays.....	37
3.2.2 Phototoxizität von dotierten TiO <sub>2</sub> P25 Nanopartikeln.....	42
3.2.3 Vis-Aktivität dotierter TiO <sub>2</sub> P25 Nanopartikel .....	46

3.2.4	Zusammenfassung zur Phototoxizität von TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln.....	48
3.3	Untersuchung des Phototoxizitäts-Mechanismus .....	49
3.3.1	Mikroskopische Analyse von dotieren TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln mit Krebszellen	49
3.3.2	Detektion oxidativer Spezies .....	50
3.3.3	Untersuchung der Membranintegrität.....	54
3.3.4	Apoptose-Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie.....	55
3.3.5	Lebend-Zell-Analyse mittels IncuCyte™ .....	57
3.3.6	Zusammenfassung zum Phototoxizitäts-Mechanismus.....	62
3.4	Synthese, Charakterisierung und Phototoxizität von Syl3C-PAA@TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln.....	63
3.4.1	Beschichtung von TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln mit Polyacrylsäure .....	63
3.4.2	Aptamer-Kopplung auf PAA@TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln .....	66
3.4.3	Phototoxizität von zielgerichteten TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln.....	70
3.4.4	Zusammenfassung zur Oberflächenmodifizierung von TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln.	73
3.5	Herstellung und Charakterisierung von Upconversion-Nanopartikeln .....	74
3.5.1	Synthese von Upconversion-Nanopartikeln.....	74
3.5.2	Optische Eigenschaften der Upconversion-Nanopartikel.....	75
3.5.3	Zusammenfassung zur Synthese von Upconversion-Nanopartikeln .....	77
<b>4</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion und Ausblick.....</b>	<b>78</b>
	<b>Literatur.....</b>	<b>86</b>
<b>A</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>104</b>
A.1	Materialien .....	104
A.1.1	Chemikalien.....	104
A.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	105
A.1.3	Laborgeräte.....	106
A.1.4	Puffer, Lösungen, und Medien.....	108
A.1.5	Verwendete Kits.....	109
A.1.6	Eukaryotische Zelllinien .....	109
A.1.7	Verwendete Nanopartikel.....	110
A.1.8	Verwendete Oligonukleotide .....	110
A.2	Methoden.....	110
A.2.1	Kultivierung von Säugerzellen .....	110
A.2.2	Herstellung der Kryokulturen von Säugerzellen .....	111
A.2.3	Revitalisierung von kryokonservierten Säugerzellen .....	111
A.2.4	Untersuchungen zur Aufnahme von TiO <sub>2</sub> NP in A549- und NIH/3T3-Zellen.....	112

A.2.5	Phototoxizitäts-Testung von Nanopartikeln auf Säugerzellen .....	112
A.2.6	Durchflusszytometrie .....	113
A.2.7	Mikroskopische Untersuchungen .....	114
A.2.8	Viabilitäts-Testung mittels CellTiter-Blue®-Assay .....	116
A.2.9	Berechnung der mittleren effektiven Dosis von FeWT NP .....	117
A.2.10	DCF-Assay zur Detektion reaktiver Sauerstoffspezies.....	117
A.2.11	Untersuchung der Membran-Integrität mittels LDH-Assay.....	118
A.2.12	Apoptose-Messungen.....	120
A.2.13	Modifizierung von TiO <sub>2</sub> Nanopartikeln .....	120
A.2.14	Charakterisierung von Syl3C-PAA@TiO <sub>2</sub> NP.....	121
A.2.15	Aldehyd-Detektion mittels NASH-Reagenz .....	122
A.2.16	Synthese von Upconversion-Nanopartikeln.....	123
A.2.17	Charakterisierung von Upconversion-Nanopartikeln.....	124
A.3	Ergänzende Daten .....	125
A.3.1	Videomaterialien zu Säugerzellen inkubiert mit TiO <sub>2</sub> NP.....	125
A.3.2	Absorptionsspektrum Kultivierungsmedium .....	126
A.3.3	Dosis-Wirkungs-Kurven der FeWT NP .....	126
A.3.4	XRD-Spektrum der synthetisierten UCNP .....	127
	<b>Unterstützende Arbeiten .....</b>	<b>128</b>
	<b>Veröffentlichungen und Kongressbeiträge .....</b>	<b>129</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>130</b>

## 1 Einleitung und Zielsetzung

### 1.1 Einleitung

Die Nanotechnologie ist wohl eine der revolutionärsten Technologien unserer Zeit. Durch den Zusatz von Nanopartikeln wurde die Funktion zahlreicher Konsumgüter sowie industrieller Produkte optimiert und verbessert. Insbesondere Titandioxid ist ein weitverbreitetes Material, welches bei einer Skalierung im Nanometer-Bereich einzigartige und faszinierende neue chemische und physikalische Eigenschaften entwickelt. Eine dieser Eigenschaften ist die photokatalytische Generierung von hochreaktiven Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies bei Bestrahlung mit UV-Licht. Diese Fähigkeit ist besonders für den Energie-Sektor interessant, da die Nanopartikel im Bereich der Solarforschung und photokatalytischen Wasserspaltung zur Generierung von Wasserstoff als Kraftstoff Anwendung finden. Doch auch der photokatalytische Abbau organischer Moleküle durch Titandioxid-Nanopartikel hat die Aufmerksamkeit vieler Forscher und auch der Öffentlichkeit erregt. Selbstreinigende Oberflächen sind bereits kommerziell etabliert und auch die photokatalytische Reinigung von Abwasser durch den Abbau von Antibiotika oder Mikroorganismen wird intensiv erforscht.

Allerdings wirkt diese auftretende biozide Wirkung unter Lichteinfluss auf viele Konsumenten und Risikoforscher besorgniserregend, insbesondere wenn man bedenkt, dass Titandioxid als bekannter Zusatzstoff in Sonnencremes genutzt wird, die ja ironischerweise vor UV-Strahlung schützen sollen. Allgemein gilt nano-Titandioxid als nicht toxisch, jedoch ist die Risikobewertung von Nanomaterialien generell ein brisantes Thema und kann mit der schnellen Entwicklung der Technologie kaum mithalten. Die Phototoxizität wird dabei nur selten in bestehenden Studien beachtet.

Viele Forschungsgruppen versuchen jedoch, das positive aus dieser phototoxischen Wirkung zu ziehen und sie gezielt gegen Krebszellen einzusetzen. Durch die intensive Erforschung von photokatalytischen Materialien für industrielle Zwecke und dem Potential der Nanotechnologie für pharmazeutische Anwendungen ist ein nahezu grenzenloser Baukasten entstanden, der den Weg für Titandioxid-Nanopartikel zur Anwendung in der Krebstherapie eröffnet.

### 1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Phototoxizität von photokatalytisch aktiven Titandioxid-Nanopartikeln und die Beurteilung ihres Potentials für eine photodynamische Krebstherapie.

Dafür ist zunächst die Etablierung eines *in vitro*-Testsystems für die schnelle und einfache Risikobewertung von photokatalytisch aktiven Nanopartikeln unter Lichteinfluss nötig. Zum besseren Verständnis des Phototoxizitäts-Mechanismus sollen außerdem verschiedene zelluläre Vorgänge und Reaktionen nach Inkubation mit den Nanopartikeln und anschließender Bestrahlung untersucht werden. Auch die Nanopartikelaufnahme spielt hierbei eine große Rolle. Es sollen außerdem die Versuchsbedingungen variiert werden, um den Einfluss der Versuchsparameter auf die Phototoxizität zu beleuchten.

Zusätzlich sollen die Nanopartikel für den Einsatz als Wirkstoff in der photodynamischen Krebstherapie optimiert werden, was durch verschiedene Oberflächenmodifikationen und Berücksichtigung alternativer Materialien realisiert werden soll. So soll untersucht werden, ob die Kopplung eines Aptamers an die Oberfläche der Partikel die Phototoxizität gegenüber Krebszellen erhöht. Außerdem werden Materialien getestet, die die Aktivierung bei langwelligerem Licht ermöglichen sollen.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Anwendungsbereiche von TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln

Die Nanotechnologie zählt zu einer der Schlüsseltechnologien und am schnellsten wachsenden Industrien weltweit. Mittlerweile sind über 3.000 Konsumgüter verzeichnet, die Nanomaterialien enthalten (stand 2018), im Jahr 2015 waren es noch 2.000 [1]. Die Produktpalette erstreckt sich über industrielle Erzeugnisse wie Farben, Lacke oder Katalysatoren [2] sowie alltägliche Konsumgüter aus Lebensmittel-, Textil- oder Kosmetikindustrie [3,4]. Das große Interesse für Nanomaterialien mit einem Größendurchmesser von 1-100 nm ergibt sich aus den einzigartigen physikalischen und chemischen Eigenschaften und der enormen Oberflächenkapazität im Verhältnis zum Volumen [5]. Insbesondere Titandioxid (TiO<sub>2</sub>) hat das Interesse von Wissenschaftlern und Verbrauchern geweckt. Durch das breite Anwendungsspektrum von nano-TiO<sub>2</sub> (Abbildung 1) werden mittlerweile über 40.000 Tonnen jährlich produziert [6].

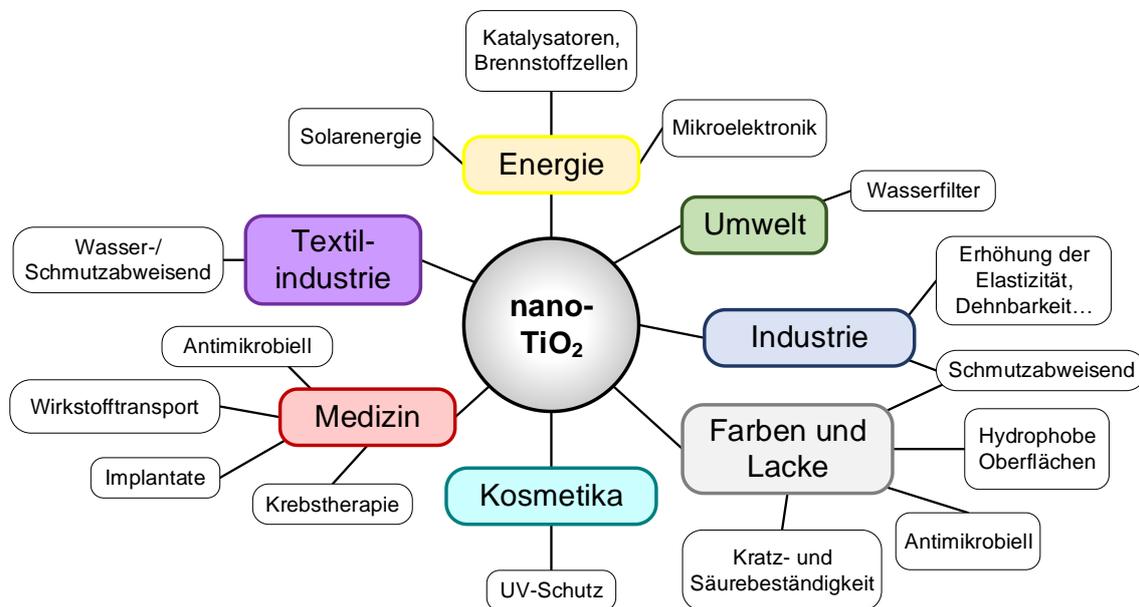


Abbildung 1: Übersicht über die Anwendungsbereiche von TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln.

Aktuelle Forschungsprojekte beziehen sich vor allem auf die photokatalytische Aktivität von TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln (NP). So wird das Potential von TiO<sub>2</sub> NP für die Entwicklung von Solarzellen, für die Wasserstoffproduktion oder den Abbau von

Schadstoffen und Verunreinigungen in Wasser, Luft oder auf Oberflächen untersucht und optimiert [7]. Auch das pharmazeutische Interesse wurde durch den möglichen Einsatz in Sterilisationsprozessen und in der Krebstherapie geweckt (Kapitel 2.4). Der Mechanismus der Photokatalyse von TiO<sub>2</sub> NP wird im folgenden Kapitel erläutert.

## 2.2 TiO<sub>2</sub> Nanopartikel als Photokatalysator

TiO<sub>2</sub> gehört zu den Halbleitermaterialien, welche sich durch einige einzigartige Eigenschaften auszeichnen. Halbleiter sind Festkörper, deren elektrischer Widerstand und Leitfähigkeit zwischen denen der Isolatoren oder Leiter liegen. Ein besonderes Merkmal ist die Fähigkeit zur Photokatalyse, welche in diesem Kapitel erläutert wird.

### 2.2.1 Mechanismus der Photokatalyse

Die elektronischen Strukturen eines Halbleiters können durch das Bänder-Modell erklärt werden. Die Elektronen sitzen hierbei auf dem Valenzband (VB), welches durch eine charakteristische Bandlücke von dem sogenannten Leitungsband (engl. *Conduction Band*, CB) getrennt ist. Die Bandlücken-Energie von Halbleitermaterialien liegt zwischen 1–4 eV und eignet sich dadurch, im Gegensatz zu isolierenden Materialien, für den Prozess der Photokatalyse [8]. Wird der Halbleiter Strahlung mit einer Energie ausgesetzt, die gleichgroß oder größer ist als die Bandlücke, regen die auftreffenden Photonen den Transfer der Elektronen aus dem VB in das CB an. Dadurch entstehen angeregte Elektronen (e<sup>-</sup>) und durch den Defekt im VB positiv geladene Löcher (h<sup>+</sup>) (Abbildung 2) [8]. Die entstandenen Ladungsträger können nun an die Oberfläche des Halbleiters wandern und hier mit adsorbierten Molekülen reagieren. Die Löcher stellen starke Oxidantien dar (+1,0 bis +3,5 V gegen die normale Wasserstoffelektrode (NHE)), die Elektronen dienen als gute Reduktionsmittel (+0,5 bis -1,5 V vs NHE) [9]. Die Effizienz dieses Prozesses wird jedoch negativ durch die spontane Rekombination der Elektronen-Loch-Paare beeinflusst, welche entweder indirekt (durch Oberflächendefekte) oder direkt (Band-zu-Band) auftreten kann [10,11].

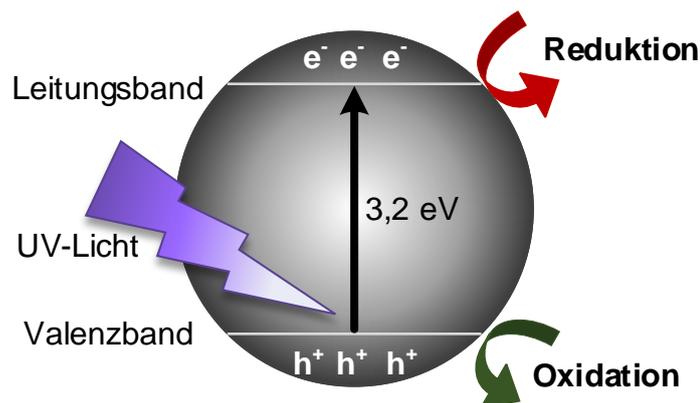


Abbildung 2: Photokatalyse in  $\text{TiO}_2$  NP (hier gezeigt: Anatas).

Neben der passenden Bandlückenenergie sind außerdem eine effiziente Lichtabsorption, eine hohe Ladungsträgermobilität, gute Stabilität und geringe Toxizität wichtige Kriterien für geeignete Photokatalysatoren [8]. Seit der Entdeckung der photokatalytischen Aktivität von  $\text{TiO}_2$  durch Fujishima und Honda [12] stellt es das am meisten genutzte photokatalytische Material dar, da es über eine sehr hohe Reaktivität und Stabilität verfügt, geringe Kosten in der Herstellung anfallen, und es außerdem die passenden optischen Eigenschaften mitbringt [13–15].

Es sind drei  $\text{TiO}_2$ -Polymorphe am bekanntesten, deren Bandlücken sich minimal unterscheiden: Anatas (3,20 eV), Brookit (2,96 eV) und Rutil (3,02 eV) [16]. Aufgrund der Bandlückenenergie ist für die Aktivierung des photokatalytischen Prozesses von  $\text{TiO}_2$  NP hochenergetisches Licht im ultraviolettem (UV)-Bereich nötig (<400 nm). Degussa  $\text{TiO}_2$  P25 ist mittlerweile als Standardmaterial etabliert, da es aufgrund der Kombination von Anatas- und Rutil-Phasen (Verhältnis 3:1) über eine sehr hohe Aktivität verfügt und sehr gut charakterisiert ist. Die Polymorphe unterscheiden sich in ihren Kristallstrukturen. Rutil und Anatas weisen eine tetragonale Struktur auf und bestehen aus  $\text{TiO}_6$ -Oktaedern (Abbildung 3) [17].

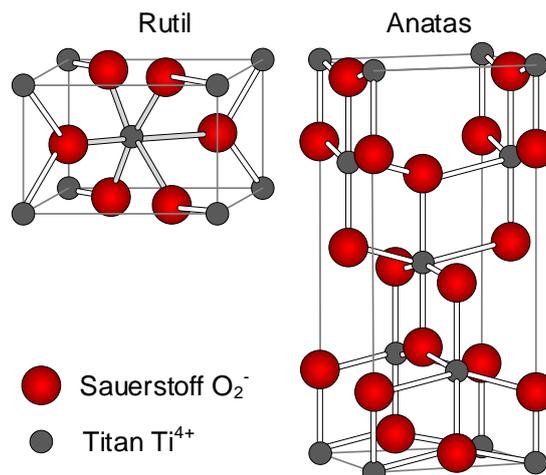
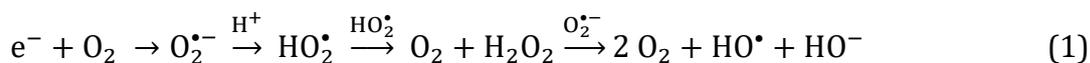


Abbildung 3: Kristallstrukturen von Rutil und Anatas  $\text{TiO}_2$ , nach [17].

Es existieren generell zwei Redox-Prozesse, die an der Oberfläche des Photokatalysators stattfinden können. Einerseits können die photogenerierten Ladungsträger ( $e^-/h^+$ ) direkt mit adsorbierten Molekülen reagieren, andererseits kann die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) aus angelagerten Sauerstoff- oder Wassermolekülen eine Kettenreaktion auslösen. Zu den hauptsächlich generierten ROS gehören Superoxid ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), Hydroxyl-Radikale ( $\text{HO}^\bullet$ ), Hydroperoxyradikale ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) und Hydrogenperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Eine Übersicht über mögliche Redox-Reaktionen zur Generierung von ROS sind im Folgenden dargestellt (1-5):

Reduktion:



Oxidation:



Um die Effizienz der Photokatalyse weiter zu optimieren, wurden bereits verschiedene Modifikationen oder Material-Kombinationen von  $\text{TiO}_2$  NP untersucht.

### 2.2.2 Modifizierungen von TiO<sub>2</sub> Photokatalysatoren

Ziel der Modifizierung von TiO<sub>2</sub> NP ist vor allem die bessere Trennung der entstehenden Ladungsträger und die Verringerung der Bandlückenenergie. Die Kopplung mit Edelmetall-NP kann beispielsweise zu einer Ladungstrennung durch die Entstehung sogenannter Elektronenfallen beitragen, welche die Rekombination der Elektronen-Loch-Paare reduzieren und den Transport auf Akzeptor-Moleküle vereinfachen [18,19]. Zudem kann die Aktivität unter sichtbarem Licht erhöht werden, da die Edelmetalle unter Lichteinwirkung durch lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR) angeregte Elektronen auf das Leitungsband der Halbleiter übertragen können [20]. So zeigten beispielsweise Gold/TiO<sub>2</sub> NP eine Wasserstoff- und Sauerstoffentwicklung unter Bestrahlung mit sichtbarem Licht [21]. Die elektrochemischen Eigenschaften von Halbleitermaterialien können außerdem durch die Einbringung von Verunreinigungen bei der Synthese beeinflusst werden. Diese sogenannte Dotierung wird oftmals mit Übergangsmetallen (beispielsweise Wolfram (W) [22], Nickel (Ni) [23] oder Eisen (Fe) [24]) oder Nichtmetallen wie Stickstoff (N) oder Kohlenstoff (C) [25] realisiert. In beiden Fällen wird die Absorption der NP weiter in höhere Wellenlängenbereiche verschoben [25,26]. Bei der Dotierung mit Übergangsmetallen entstehen Fallen für Elektronen sowie Löcher, welche die Lebensdauer der Ladungsträger verlängern [27]. Bei der Einbringung von Nichtmetallen wird ein neues Valenzband geformt, was den Elektronentransfer auf mögliche Akzeptoren erleichtert [25].

Ein genauerer Einblick in die Photokatalyse von unterschiedlichen Nanomaterialien kann dem dieser Arbeit vorangegangenen Übersichtsartikel entnommen werden [28]. Da in dieser Arbeit der Einfluss von photokatalytisch aktiven NP wie TiO<sub>2</sub> auf Säugerzellen untersucht wurde, werden im Folgenden die bisherigen Erkenntnisse über die Nanopartikel-Zell-Interaktionen und eventuelle Toxizität von TiO<sub>2</sub> NP kurz zusammengefasst.

## **2.3 Nanopartikel-Zell-Interaktionen**

Die Wirkung von NP auf Zellen und Mikroorganismen ist ein brisantes Thema, da die Technologie noch relativ neu ist und viele Mechanismen und Vorgänge noch nicht erklärt werden können. Die Anzahl von Studien, welche sich mit der Nanotoxizität solcher Materialien wie TiO<sub>2</sub> NP beschäftigen, steigt exponentiell [29]. Unterschieden wird im Fall von lichtaktivem Material zwischen Zytotoxizität, bei der die Viabilität von Säugerzellen alleine durch Inkubation mit Nanomaterialien beeinträchtigt wird, und Phototoxizität, bei der erst durch Bestrahlung der mit NP inkubierten Zellen Effekte auftreten. Für eventuelle Interaktionen ist besonders die Aufnahme von NP in die Zellen ein wichtiger Faktor. Die möglichen Effekte werden im Folgenden beschrieben.

### **2.3.1 Nanopartikelaufnahme**

Ob und über welchen Weg Nanomaterialien von Zellen aufgenommen werden, hängt von vielen Faktoren ab. Größe, Form, Oberflächenladung und die Membrandomäne, mit der die NP wechselwirken (Liganden, Rezeptoren, Lipide), spielen eine große Rolle [30,31]. Generell werden die NP von der Zellmembran umschlossen und in intrazellulären Vesikeln (frühes Endosom) *via* Endozytose aufgenommen (Abbildung 4). Dies kann sowohl spontan als auch zielgerichtet über Rezeptormoleküle geschehen. Zur detaillierteren Beschreibung der einzelnen Aufnahme-Mechanismen wird auf folgende Übersichtsartikel verwiesen [30,32].

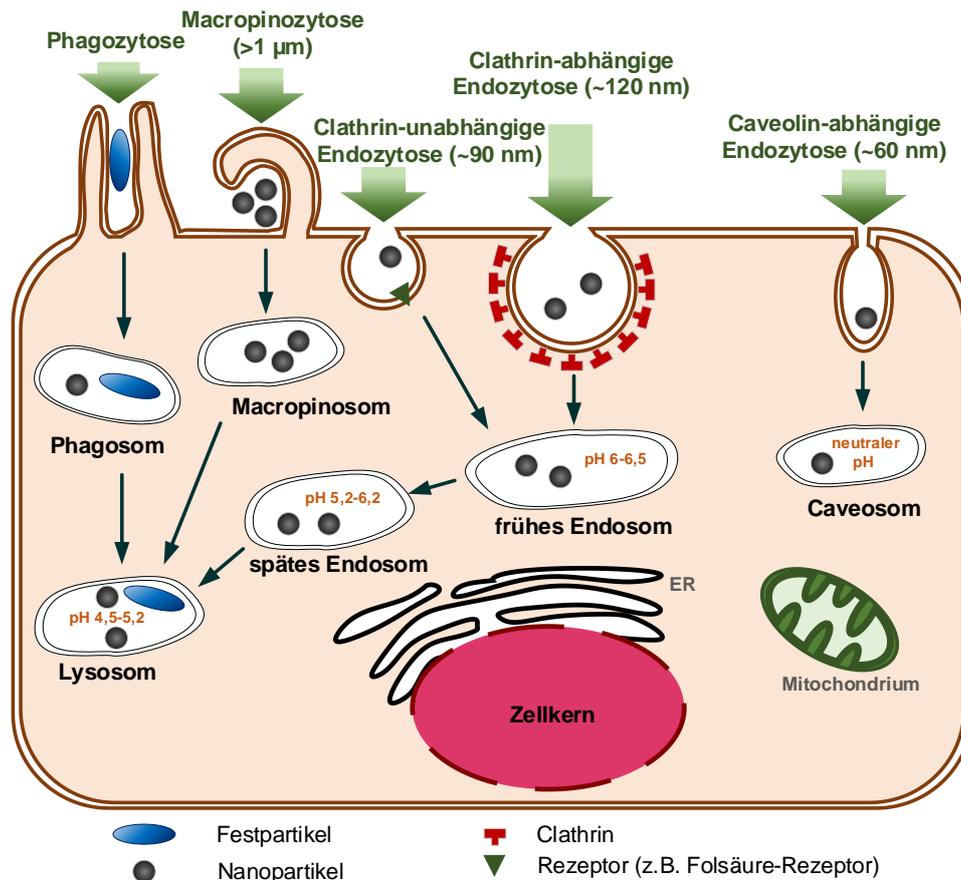


Abbildung 4: Übersicht über verschiedene Aufnahme-Mechanismen von Nanopartikeln in Säugerzellen, ER = Endoplasmatisches Retikulum. Modifiziert nach [32].

Der erste Kontakt ist elektrostatischer Natur. Kationische NP scheinen besser aufgenommen zu werden als anionische, da die Zellmembran negativ geladen ist [33]. Auch die Größe spielt eine Rolle. Suzuki *et al.* zeigten, dass kleinere TiO<sub>2</sub> NP (5-25 nm) schneller in CHO (*Chinese Hamstery Ovary*)-Zellen aufgenommen werden, als größere Partikel (bis zu 5 µm) [34]. Die Quantifizierung der tatsächlich aufgenommenen NP stellt eine Herausforderung dar, denn oft kann nicht eindeutig zwischen internalisierten und angelagerten NP unterschieden werden. Mögliche Visualisierungsmethoden sind Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) [35] und Konfokal-Mikroskopie [36,37]. Über Kryoschnitte durch einzelne Zellen (TEM) beziehungsweise durch die dreidimensionale Analyse (Konfokal-Mikroskopie) können bei diesen Methoden die NP gegebenenfalls im Zellinneren lokalisiert werden. Eine andere vielversprechende Methode stellt die Durchflusszytometrie (engl. *Flow Cytometry*, FCM) dar. FCM ermöglicht eine sehr sensitive und statistisch

relevante Analyse einzelner Zellen mit sehr hohem Durchsatz. NP können generell über zwei Methoden mittels FCM nachgewiesen werden: Lichtstreuung und Fluoreszenz. Insbesondere metallische Ionen wie Gold oder Titan streuen das Licht sehr stark aufgrund von LSPR-Effekten [38–40]. Stringer und Kollegen detektierten mittels FCM TiO<sub>2</sub> NP in Makrophagen und beschrieben einen Zusammenhang zwischen NP-Konzentration und der Fluoreszenz markierter NP sowie der Lichtstreuung [41].

Sind die NP erstmal von den Zellen aufgenommen, ist auch der Verbleib der Partikel von großer Bedeutung, insbesondere für toxische Beurteilungen. Im Gegensatz zu Polymeren oder beispielsweise Zinkoxid (ZnO)-NP gelten TiO<sub>2</sub> NP in der Regel als nicht-abbaubar [42]. Sie akkumulieren in der Zelle oder werden durch Exozytose wieder aus der Zelle hinausgeschleust [35,43]. Eine Exozytose wäre vor allem in Bezug auf das Eindringen von NP durch die Haut von großem Interesse, da TiO<sub>2</sub> NP Bestandteil vieler Sonnencremes sind. Ausführliche Sichtung und Beurteilung durchgeführter Studien durch Krug *et al.* [44] sowie Nohynek *et al.* [45] ergab jedoch, dass TiO<sub>2</sub> NP nicht weiter als bis zum *Stratum corneum* (äußere Hornschicht der Epidermis) vordringen können. Akkumulierte NP werden durch die Zellerneuerung früher oder später aus dem Körper ausgeschieden. Sind die NP erstmal in die Zelle eingedrungen, können sie auf vielfältige Weise mit zellulären Komponenten wechselwirken. Mögliche negative Effekte werden im folgenden Kapitel beschrieben.

### **2.3.2 Toxizität von Nanopartikeln**

Aufgrund ihrer sehr kleinen Größe und sehr großen Oberfläche können NP mit vielen zellulären Komponenten direkt interagieren. Eine Interaktion mit den Aminosäuregruppen von an der NP-Oberfläche adsorbierten Proteinen und Enzymen kann zur Inhibierung, Destabilisierung, Fehlfaltung und Aggregation führen [46]. So können essentielle metabolische Funktionen gestört und zellulärer Stress ausgelöst werden, was zytotoxische Effekte zur Folge haben kann. Auch die Zellmembran ist ein potentiell Ziel für angelagerte oder eingedrungene Nanomaterialien. Die Erhöhung der Membranpermeabilität durch Interaktion mit Membranproteinen oder Lipiden wurde für verschiedene NP nachgewiesen und

kann ebenfalls zytotoxisch wirken [47,48]. Mehrere Arbeitsgruppen beobachteten die Schädigung von Mitochondrien durch Silber, Silica oder TiO<sub>2</sub> NP sowie Kohlenstoff-Nanoröhrchen und Quantum Dots [49–51]. Hier wird oftmals die Elektronentransportkette gestört, was zu einer Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials führt. Diese Veränderung kann den programmierten Zelltod einleiten, die Apoptose [52,53]. Die Induktion der Apoptose in menschlichen Krebszellen wurde unter anderem bei Inkubation mit Gold-NP [54] und Kupferoxid-NP [55] beobachtet. Ein weiterer Angriffspunkt für die NP in der Zelle ist das Erbgut, die DNA. Sehr kleine NP wie zum Beispiel 2 nm-große Quantum Dots wurden im Zellkern nachgewiesen [56]. Hier können sie die Funktion von DNA-Reparatur- oder Replikations-Proteinen stören, aber auch direkt mit den Nukleotiden reagieren, was zur Kondensation der Chromosomen oder Methylierung und Oxidation einzelner Basen führen kann [57,58]. Auch wenn die NP eigentlich zu groß sind um durch die Poren des Zellkerns einzudringen, kommen sie spätestens bei der Zellteilung mit DNA in Kontakt.

Die am häufigsten beobachtete und diskutierte Ursache für zytotoxische Effekte, die durch Inkubation mit NP ausgelöst werden, ist oxidativer Stress durch die Generierung von Radikalen und anderen reaktiven Sauerstoffspezies. ROS kommen als Regulatoren von Zellwachstum, Proliferation, Apoptose oder Wundheilung in geringen Mengen natürlich in den Zellen vor und werden durch Enzyme (zum Beispiel Superoxid-Dismutasen oder Katalasen) oder Antioxidantien (zum Beispiel Glutathion) abgebaut. Werden allerdings genau diese Moleküle oder Proteine durch NP angegriffen, oder das Redox-Gleichgewicht durch die Überproduktion von ROS gestört, kann oxidativer Stress in den Zellen entstehen. NP können ROS beispielsweise durch die Freisetzung von Ionen oder durch photokatalytische Aktivität generieren (Kapitel 2.3.3) [59]. Die Freisetzung von Ionen wird vor allem durch den niedrigen pH-Wert in Lysosomen ausgelöst. Freigesetzte Metallionen (M), wie beispielsweise Eisen Fe<sup>2+</sup>, können zur Bildung von Hydroxylradikalen durch die Fenton-Reaktion (6) führen [60]:



Zudem können NP als Elektronendonoren oder -akzeptoren agieren und freie Radikale wie Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) bilden. Oxidativer Stress wird durch verschiedene Nanomaterialien ausgelöst, wie beispielsweise Karbon-Nanoröhren, Fulleren, Silica-NP, Eisenoxid-NP, ZnO-NP und auch  $TiO_2$  NP [51,60–62]. Die sehr reaktiven Sauerstoffspezies können mit nahezu jedem Molekül, was sich in der Zelle befindet, wechselwirken und so Proteinfunktionen stören, die DNA angreifen und Apoptose oder Entzündungen auslösen. Eine detailliertere Darstellung über die möglichen zellulären Angriffspunkte der verschiedenen Nanomaterialien und *in vitro*-Methoden zur Analyse der jeweiligen Effekte wurde im Übersichtsartikel zusammengefasst [28].

### 2.3.3 Phototoxizität von $TiO_2$ Nanopartikeln

Bei der Untersuchung von photokatalytisch aktiven Nanopartikeln (PCNP) müssen nicht nur generelle eventuell auftretende nanotoxische Effekte, sondern auch der Einfluss von Licht berücksichtigt werden. Beispielsweise sank die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) von  $TiO_2$  NPs für *Escherichia coli* (*E. coli*) von  $583\text{ mg L}^{-1}$  auf  $1,68\text{ mg L}^{-1}$  nach 30 minütiger Bestrahlung mit Sonnenlicht [63]. Dieser phototoxische Effekt von  $TiO_2$  wurde für verschiedene Lebewesen, inklusive Bakterien [64–66], Pilze [67], Algen [68,69], Wasserorganismen [70–76], Fische [77,78] und auch menschliche Keratinozyten [36,79–81] gezeigt. Als Hauptgrund wird die photokatalytische Generierung reaktiver Sauerstoffspezies vermutet (Kapitel 2.2.1). Diese entstehen zum Beispiel durch die Reaktion von Wasser- oder Sauerstoffmolekülen an der NP-Oberfläche, welche in großen Mengen in der natürlichen Zellumgebung vorkommen. Die in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Redox-Reaktionen (1)-(5) führen zur Generierung von ROS, welche zelluläre Organellen, Proteine oder DNA angreifen und radikalische Kettenreaktionen mit organischen Verbindungen auslösen können. Tatsächlich wurden erhöhte ROS-Niveaus detektiert, wenn Zellen und Organismen  $TiO_2$  NP in Kombination mit Bestrahlung ausgesetzt wurden [75,82,83]. Die möglichen Angriffspunkte der photogenerierten ROS in einer Säugerzelle sind in Abbildung 5 dargestellt.

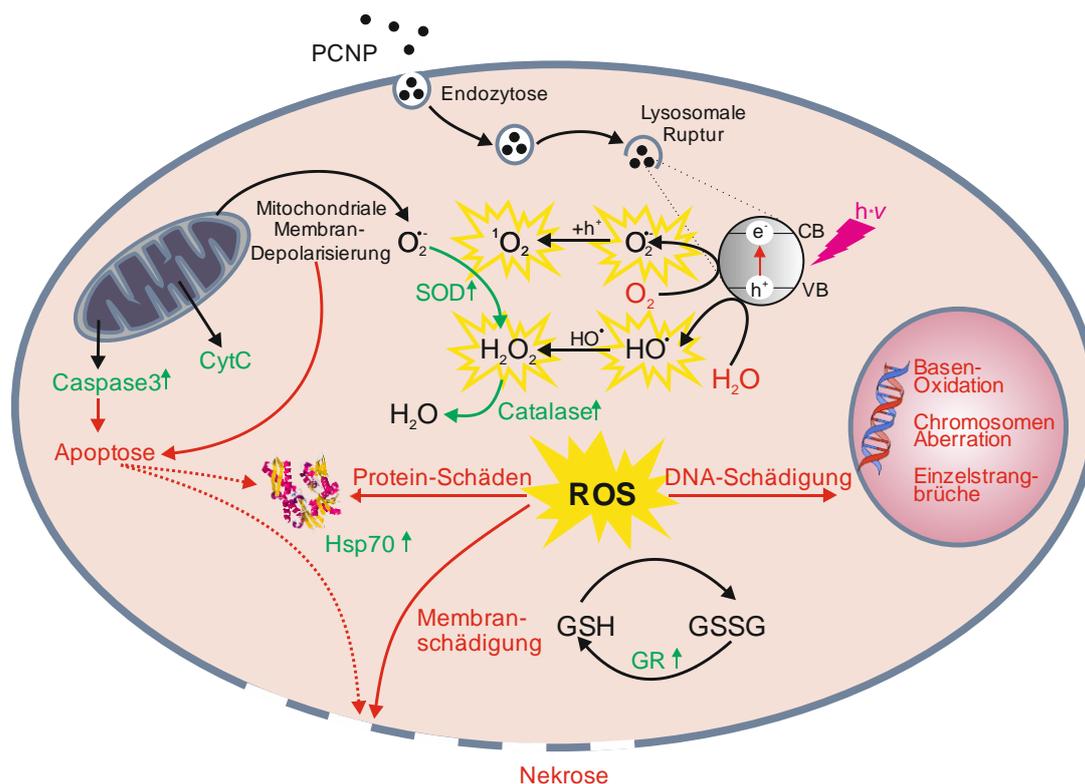


Abbildung 5: Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies durch aufgenommene photokatalytisch aktive NP in Säugerzellen und mögliche Reaktionen mit zellulären Komponenten, regulatorische Mechanismen in der Zelle (grün) und anschließende Folgen (rot). SOD = Superoxid-Dismutase, GR = Glutathion-Reduktase, GSH = Glutathion, GSSG = Glutathiondisulfid, Hsp70 = Hitzeschock-Protein 70, CytC = Cytochrom C. Modifiziert nach [28].

Ob und wie viele ROS die PCNP generieren, hängt von der Bandlückenenergie und auch der Position der Bänder ab. NP mit Leitungsbandenergien die geringer als das Redoxpotential von  $O_2/O_2^{\bullet-}$  liegen (-0,2 V) begünstigen die Formation von Superoxidradikalen, während NP deren Valenzbandenergie höher als das Redoxpotential von  $H_2O$  liegt (2,2 V) Hydroxylradikale bilden, welche als die biologisch schädlichste Form von ROS gelten [69]. Die photokatalytische Aktivität der PCNP in physiologischer Umgebung spielt eine große Rolle für die Stärke der Phototoxizität. Außerdem sind beobachtete toxische Effekte von der verwendeten Lichtintensität und NP-Konzentration abhängig. So hat sich die sehr reaktive Polymorph-Mischung  $TiO_2$  P25 als phototoxischer als andere  $TiO_2$ -Materialien erwiesen [74,80] und Anatas-Partikel als deutlich potenter als beispielsweise Rutil-Formen [66,81,84].

Eine mögliche phototoxische Aktivität muss bei der Untersuchung von photokatalytischen NP in Betracht gezogen werden. Das tatsächliche Risiko, was durch die Freisetzung von PCNP wie TiO<sub>2</sub> NP für den Menschen entsteht, wird jedoch nach wie vor als gering eingestuft [45]. Noch handelt es sich um relativ geringe Mengen die über die Umwelt in den Menschen gelangen [85,86]. Zudem ist der Anteil an aktivierendem UV-Licht im Solarspektrum relativ gering (UV-A 5,7 %; UV-B 0,3 %) [87] und die Eindringtiefe von UV-Licht in menschliches Gewebe beträgt nur wenige Millimeter [88]. In einer Untersuchung des *Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products* (SCCNFP) aus dem Jahre 2000 wurden kommerzielle TiO<sub>2</sub> Nano- und Mikropartikel weder als phototoxisch noch photo-genotoxisch eingestuft [89]. Die toxischen Effekte, welche bei gezielter Inkubation und anschließender Bestrahlung von behandeltem Gewebe oder Zellen beobachtet werden, lassen sich jedoch nicht verleugnen. Gerade sie machen jedoch die PCNP für pharmazeutische Anwendungen interessant. So wird die biozide Wirkung von TiO<sub>2</sub> unter UV-Bestrahlung für Sterilisationsprozesse von Wasser und Oberflächen, beispielsweise in Krankenhäusern, untersucht [90–93]. Auch als Wirkstoffe für die Krebstherapie kommen PCNP in Betracht, dieser Ansatz wird in Kapitel 2.4.1 näher beschrieben.

## **2.4 Photokatalytische Nanopartikel für pharmazeutische Anwendungen**

Trotz der aktuellen Diskussion um die Risiken von Nanomaterialien für Mensch und Umwelt wird auch das pharmazeutische Potential von NP ausgiebig untersucht. Durch ihre kleine Größe können sie auf molekularer Ebene mit Zellen interagieren und die verhältnismäßig große Oberfläche bietet viel Platz für Funktionalisierungen oder auch Beladung mit Wirkstoffen. Im Folgenden werden verschiedene Ansätze beschrieben, wie insbesondere PCNP wie TiO<sub>2</sub> NP für pharmazeutische Zwecke eingesetzt werden können.

### **2.4.1 TiO<sub>2</sub> Nanopartikel für die photodynamische Therapie**

Photokatalytisch aktive NP können selbst als Wirkstoff agieren, wenn ihre phototoxische Wirkung durch gezielte Bestrahlung von krankem Gewebe bewusst

ausgelöst wird. Dieser Ansatz wird auch photodynamische Therapie (PDT) genannt (Abbildung 6). Der Begriff etablierte sich schon um 1970, als Wissenschaftler erstmals die von bestrahltem Porphyrin freigesetzten ROS gezielt gegen Tumorzellen einsetzten [94]. Diese sogenannten Photosensibilisatoren können in der Regel mit Licht von einer Wellenlänge über 600 nm in einen kurzlebigen Singulett-Zustand versetzt werden und anschließend in einen längerlebigen Triplett-Zustand übergehen [95]. In diesem Zustand können entweder direkt  $^1\text{O}_2$ -Moleküle generiert werden oder Radikale durch Transfer eines Wasserstoffions oder Elektrons entstehen, welche dann wiederum mit Sauerstoff reagieren [96]. Der Mechanismus zur Generierung von ROS in der traditionellen PDT unterscheidet sich also von dem der Photokatalyse, das Anwendungsprinzip ist jedoch ähnlich: das zu behandelnde Gewebe wird mit dem Photosensibilisator inkubiert und dann lokal mit Licht der passenden Wellenlänge bestrahlt. Idealerweise ist der Wirkstoff im Dunkeln nicht toxisch, sondern entfaltet seine Wirkung erst nach der gezielten Bestrahlung (zeigt also keine sogenannte Dunkeltoxizität in Abwesenheit von Licht). So kann besonders empfindliches Gewebe schonend behandelt werden, wie zum Beispiel im Auge, Gehirn oder Magen-Darm-Trakt. Der Einsatz von nano-Photokatalysatoren in der PDT könnte die Effizienz deutlich steigern, da herkömmliche Photosensibilisatoren oftmals nicht selektiv sind und zur Aggregation neigen, was die Verteilung des Wirkstoffs verschlechtert [97].

Fujishima und Kollegen waren die ersten, die  $\text{TiO}_2$  NP gezielt gegen Krebszellen wie Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa) [98,99] und Blutkrebszellen (T-24) [100] einsetzten. Sie beobachteten eine starke Verringerung der Zellviabilität nach der Bestrahlung mit UV-Licht und führten auch *in vivo* Experimente durch, bei denen ein eindeutiger Rückgang des Tumorwachstums beobachtet werden konnte. Auch Leukämiezellen (U937) [101], Lungenkrebszellen (SPC-A1) [102], Darmkrebszellen (Ls-174-t) [103], Brustkrebszellen (MDA-MB-468) [104,105] und Gliazellen (U87) [106,107] konnten erfolgreich durch eine Kombination von  $\text{TiO}_2$  NP und Bestrahlung abgetötet werden.

Andere photokatalytische Materialien wurden ebenfalls bereits auf ihre Eignung für eine PDT getestet, wie  $\text{ZnO}$  NP [108,109] oder Wolfram-Nanodrähte [110]. Im

Gegensatz zu TiO<sub>2</sub> NP weisen ZnO NP jedoch eine hohe Dunkeltoxizität auf, was ihre Anwendung als Pharmazeutikum stark einschränkt [111].

Um die Effizienz der PDT mit TiO<sub>2</sub> NP zu optimieren, wurden verschiedene Modifikationen des Materials durchgeführt. Die Stabilität von wässrigen TiO<sub>2</sub>-Lösungen in Bezug auf Sedimentation und Agglomeration der NP wurde durch eine Beschichtung mit organischen Stoffen erhöht. Beispiele hierfür sind saure Liganden wie Polyacrylsäure (PAA) [112] oder Dimercaptobernsteinsäure [113], Polymere wie Polyethylenglycol (PEG) [106,114,115] oder auch Beschichtungen aus anderen Halbmetallverbindungen wie Siliziumoxid (SiO<sub>2</sub>) [116]. Neben verminderter Aggregation der NP wurden auch andere positive Effekte durch eine solche Beschichtung erzielt. Feng *et al.* beobachteten eine geringere Dunkeltoxizität ihrer Silica-beschichteten TiO<sub>2</sub> NP verglichen mit TiO<sub>2</sub> P25 NP [116]. Lucky und Kollegen zeigten eine erhöhte Aufnahme von PEG-modifizierten NP in Krebszellen [115]. Es muss jedoch beachtet werden, dass die photokatalytische Aktivität der Partikel durch eine Oberflächenmodifizierung auch eingeschränkt werden kann, da die entstehenden Ladungsträger nur eine sehr kurze Lebensdauer und Reichweite haben und durch Modifikationen die direkte Reaktion an der Partikeloberfläche behindert wird [116,117]. Neben einer Erhöhung der Biokompatibilität ermöglicht eine Beschichtung der NP auch eine weitere Oberflächenmodifizierung mit Liganden, die die NP-Verteilung und -Aufnahme kontrollieren können (dazu mehr in Kapitel 2.4.3). Das Prinzip einer solchen zielgerichteten PDT mithilfe von PCNP ist in Abbildung 6 dargestellt.

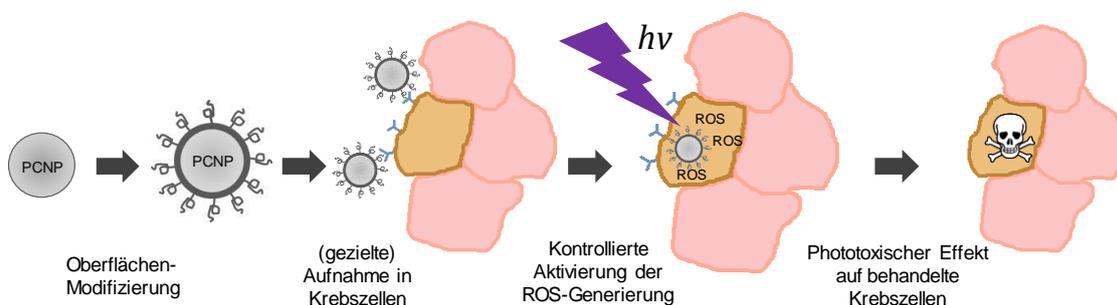


Abbildung 6: Prinzip der photodynamischen Therapie mit photokatalytisch aktiven Nanopartikeln. Zur Verbesserung der NP-Eigenschaften können diese zunächst mit Liganden und Beschichtungen modifiziert werden. Es erfolgt die Inkubation mit befallendem Gewebe und (gezielte) Aufnahme in die Tumorzellen. Bei Bestrahlung mit Licht der passenden Wellenlänge werden ROS generiert, die dann zum Zelltod führen. Modifiziert nach [28].

Wie bereits beschrieben, wird der photokatalytische Prozess in TiO<sub>2</sub> NP erst durch Licht mit der nötigen Energie, also mindestens UV-A (<385 nm), angeregt. Licht dieser Wellenlänge hat nur eine sehr geringe Eindringtiefe in Gewebe (nur wenige Millimeter) [88]. Bei durchgeführten *in vivo* Studien mit TiO<sub>2</sub>-basierter PDT musste daher das zu behandelnde Gewebe erst freigelegt werden [107,118]. Zudem ist niederwelliges Licht oftmals schädlich für Zellen und Organismen und die Lichtdosis muss dementsprechend angepasst werden [101,116].

Prinzipiell ist es nicht ungewöhnlich, dass auch bei der traditionellen photodynamischen Therapie die Bestrahlung intraoperativ erfolgt, und Lichtleiter oder Leuchtdioden (LEDs) in das zu behandelnde Gebiet eingeführt werden [119]. Doch auch hier sind größere Eindringtiefen des verwendeten Lichts unerlässlich, um eine nicht nur oberflächliche Behandlung zu gewährleisten. Zahlreiche Modifizierungen von TiO<sub>2</sub> NP zielen darauf ab, den photokatalytischen Prozess auch mit höherwelligem Licht zu aktivieren. Beispielsweise zeigten mit Platin versehene TiO<sub>2</sub> NP einen phototoxischen Effekt im sichtbaren Spektrum [120]. Auch die Beschichtung mit einem Elektronen-injizierenden organischen Liganden wie Dihydroxy-phenylacetylsäure [121] erhöhte die vis-Aktivität. Durch Dotierung von TiO<sub>2</sub> NP mit Eisen oder Stickstoff konnte die Phototoxizität mit sichtbarem Licht gezeigt werden [122,123]. Feste Bestandteile von Haut und Gewebe sind Hämoglobin und Melanin, welche im UV- und sichtbaren Bereich viel Licht absorbieren und eine tiefdringende Bestrahlung daher erschweren [124,125]. Das sogenannte optische Fenster von Gewebe liegt im nahen Infrarot-Bereich (NIR), daher sind die Bemühungen groß, eine Photokatalyse von TiO<sub>2</sub> in diesem Wellenlängenbereich zu ermöglichen. Einen vielversprechenden Ansatz bilden hierbei die Upconversion-Nanopartikel, welche in Kapitel 2.4.4 genauer thematisiert werden.

### **2.4.2 Oberflächenmodifikationen von Nanopartikeln für pharmazeutische Anwendungen**

Wie bereits beschrieben, haben die Nanomaterialien eine sehr große Oberfläche im Verhältnis zum Volumen. Diese bietet viel Platz für Modifikationen. So können verschiedene Funktionalisierungen realisiert werden, die die Eigenschaften und das

Verhalten der NP im Körper verbessern und so die Effizienz einer möglichen Therapie steigern können. Verschiedene Materialien werden für den pharmazeutischen Einsatz getestet oder bereits eingesetzt [126].

Die Beschichtung von NP kann zu einer besseren Verteilung im Körper und längeren Bioverfügbarkeit beitragen (Kapitel 2.4.1). Zudem können funktionelle Gruppen auf die Oberfläche gebracht werden, die weitere Modifikationen erleichtern. Chemische Wirkstoffe können auf der Oberfläche immobilisiert oder in Polymer- oder lysosomalen NP eingekapselt werden. Durch die Modifizierung mit sogenannten Targeting-Liganden kann die Aufnahme in die Zielzellen erhöht und ungewollte Aufnahme in beispielsweise gesunde Zellen sogar verhindert werden. Das *Targeted-Drug-Delivery* (engl. für zielgerichteten Wirkstofftransport) ermöglicht eine geringere Dosierung und minimiert negative Nebenwirkungen. Beispiele möglicher Komponenten von komplexen Nanosystemen sind in Abbildung 7 gezeigt.

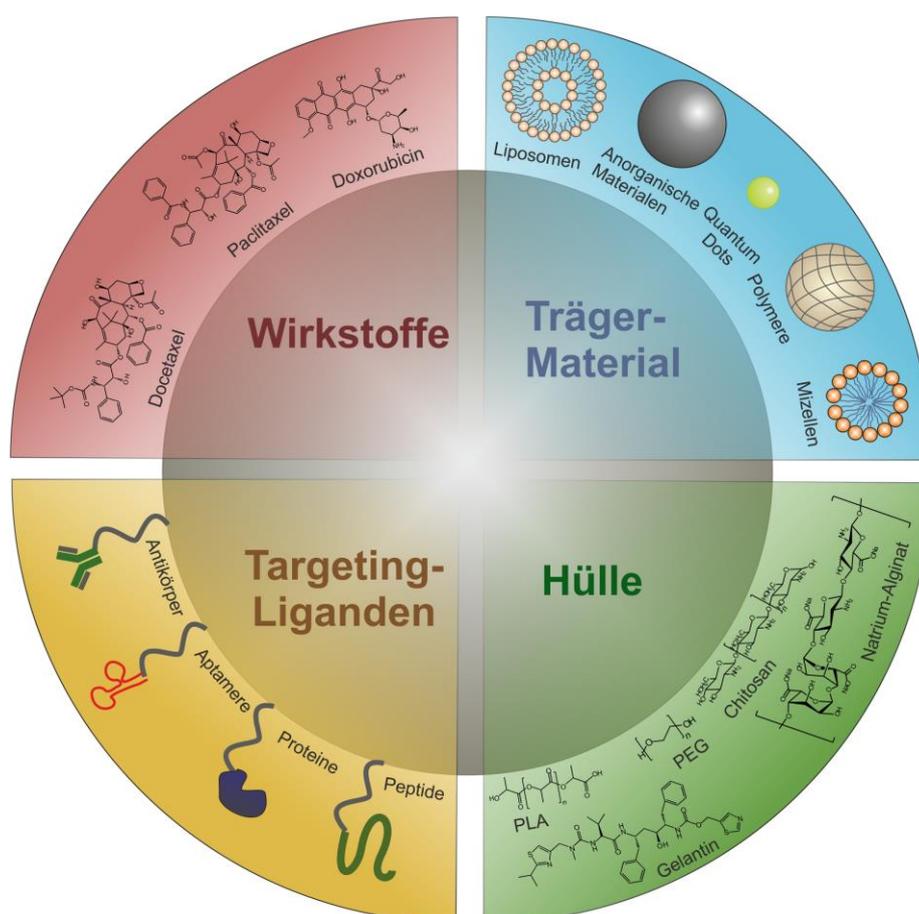


Abbildung 7: Übersicht über Beispiele verschiedener Komponenten von komplexen Nanoplattformen für pharmazeutische Anwendungen.

Für eine detaillierte Übersicht über Forschungsprojekte zum Thema *Drug-Delivery* und Nanotechnologie wird hier auf folgende Übersichtsartikel verwiesen [127,128]. Im nächsten Kapitel wird gezielt auf Modifizierungen von TiO<sub>2</sub> NP für eine zielgerichtete photodynamische Therapie eingegangen.

### **2.4.3 Targeted-Drug-Delivery-Systeme für die photodynamische Therapie**

Mögliche Liganden für eine zielgerichtete Aufnahme der NP sind Peptide, Proteine, Antikörper und Aptamere, aber auch einfache Moleküle wie beispielsweise Folsäure. Sie sind meist auf bestimmte Rezeptoren oder Membranproteine gerichtet, deren Gensequenzen von Krebs- oder Tumorzellen überexprimiert werden und welche daher vermehrt auf der Zelloberfläche vorkommen. Auch in Bezug auf die photodynamische Therapie mit TiO<sub>2</sub> NP wurden bereits komplexe *Drug-Delivery-Systeme* entwickelt. So konnte beispielsweise durch eine Funktionalisierung mit verschiedenen Antikörpern die Abtötung von mit NP-inkubierten Krebszellen durch Bestrahlung von TiO<sub>2</sub> NP verbessert werden [112,114,115,121]. Auch eine Oberflächenmodifikation mit einfacheren Molekülen wie Folsäure erhöhten die Phototoxizität [117,129–131], da die Folatrezeptoren auf der Zelloberfläche vieler Krebszellen vermehrt vorkommen [132].

Eine neuere Klasse von Liganden bilden die Aptamere, einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNA)- oder Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Oligonukleotide, die gegen nahezu jedes Zielmolekül selektiert werden können. Verglichen mit Antikörpern gelten Aptamere als sehr stabil, günstig in der Herstellung und leicht chemisch modifizierbar. Sie sind außerdem nicht immunogen oder toxisch [133]. TiO<sub>2</sub> NP welche mit einem Aptamer-Cocktail aus verschiedenen gegen *E. coli*-Bakterien gerichteten Oligonukleotiden dekoriert wurden, zeigten eine deutlich effizientere und selektive Abtötung der Mikroorganismen im Gegensatz zu unmodifizierten TiO<sub>2</sub> NP nach Bestrahlung mit UV-Licht [134]. Eine ausführliche Übersicht über Aptamer-modifizierte Nanopartikel kann in verschiedenen Artikeln nachgelesen werden [135–137].

#### 2.4.4 Upconversion-Nanopartikel für die photodynamische Therapie

Um die Photokatalyse bei Bestrahlung mit Infrarot-Licht zu ermöglichen, haben sogenannte Upconverter die Aufmerksamkeit vieler Forschungsgruppen erregt. Upconversion-Nanopartikel (UCNP) sind in der Lage, niederenergetisches, langwelliges Licht durch die Absorption mehrerer Photonen in kurzwelliges, hochenergetisches Licht umzuwandeln. Photon-Upconversion kann durch drei verschiedene Mechanismen ausgeführt werden: Energietransfer-Upconversion (ETU), *Excited State Absorption* (ESA) oder eine Photonenlawine (engl. *Photon Avalanche*) [138]. Alle drei Mechanismen basieren auf der sequentiellen Absorption mehrerer Photonen in metastabile, langlebige Energiestadien. Während beim ESA-Prozess Absorption und Emission von demselben Ion durchgeführt werden, sind bei der ETU zwei verschiedene Ionen beteiligt: ein Sensibilisator- und ein Aktivator-Ion (Abbildung 8). Dabei ist es wichtig, dass die Energielücke zwischen Grund- und angeregtem Zustand des Sensibilisators kompatibel mit den leiterartig angeordneten Energieniveaus des Aktivator-Ions ist [138].

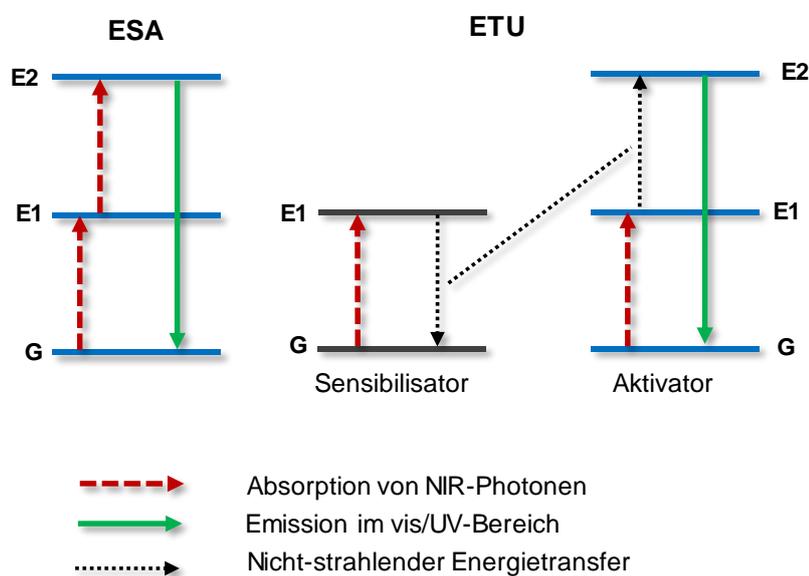


Abbildung 8: Prinzip der Photon-Upconversion *via* ESA- oder ETU-Mechanismus, E1,2: Energieniveaus der Photonen, G: Grundniveau. Bei der ESA wird das bereits im angeregten Zustand befindliche Ion durch ein weiteres absorbiertes Photon in einen höheren Energiezustand versetzt und schließlich ein höherenergetisches Photon emittiert. Bei der ETU wird die Energie des absorbierten Photons auf ein Aktivator-Ion übertragen und durch sequentielle Absorption weiterer Photonen werden höhere Energieniveaus besetzt.

Der ETU-Prozess gilt als effizienter als der ESA-Prozess und wird daher vorrangig in etwaigen Studien genutzt. Als Trägermaterial dienen Lanthanoid-dotierte Nanokristalle, insbesondere mit seltenen Erden wie Yttrium (Y) oder Gadolinium (Gd) dotierte Alkalifluoride (beispielsweise  $\text{NaYF}_4$ ). Diese haben sich als stabil und effizient im Vergleich zu anderen Materialien erwiesen [139]. Ein vielgenutzter Sensibilisator ist Ytterbium (Yb), welches Licht bei einer Wellenlänge von 980 nm effizient absorbiert. Bei Dotierung mit passenden Aktivator-Ionen wie beispielsweise Thulium (Tm) wird nach Aufnahme mehrerer NIR-Photonen Licht im UV-Bereich emittiert, welches zur Aktivierung von Photokatalysatoren genutzt werden kann (Abbildung 9A) [140]. Eine Beschichtung solcher UCNP mit Halbleitermaterialien wie  $\text{TiO}_2$  ermöglicht eine indirekte Aktivierung der ROS-Generierung mit NIR-Licht statt UV-Licht, was eine tiefere Eindringtiefe in das Gewebe ermöglicht und vielversprechend für eine effiziente PDT ist (Abbildung 9B).

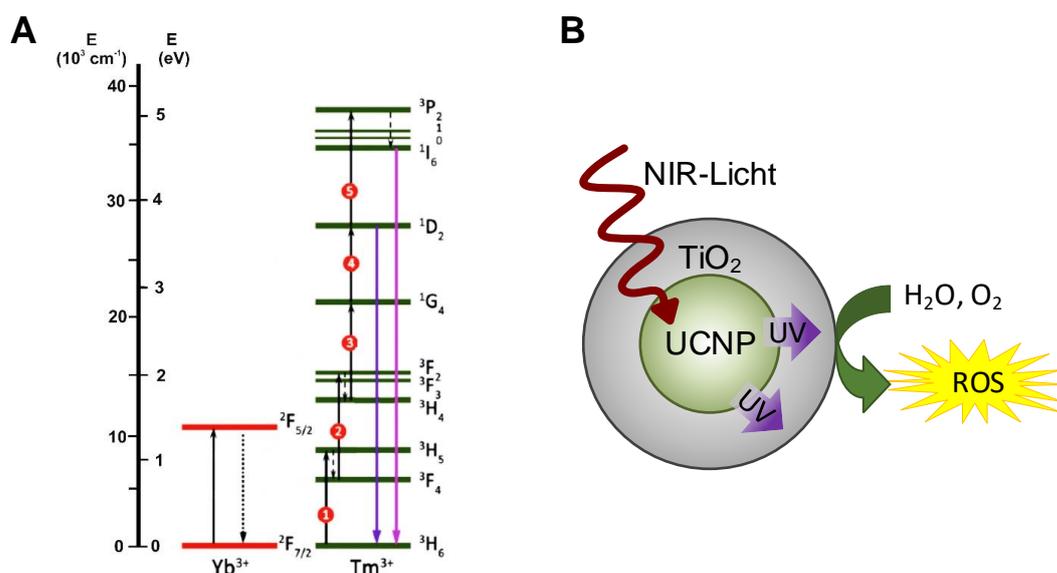


Abbildung 9: A) Energietransfer in dem gewählten Upconversion-System  $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ . Modifiziert nach [140]; B) Prinzip der Photokatalyse von mit  $\text{TiO}_2$ -beschichteten UCNP.

Eine Verringerung der Zellviabilität und vom Tumorwachstum bei Inkubation mit  $\text{TiO}_2$ -beschichteten UCNP und Bestrahlung mit NIR-Licht konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden [115,130,141–143]. Die einzigartigen Eigenschaften der UCNP haben zur Entwicklung von komplexen Nanoplattformen

geführt, welche PDT simultan mit *in vivo*-Bildgebung, gezieltem NP-Transport oder Wirkstofffreisetzung ermöglichen. So haben Zeng *et al.* ihre TiO<sub>2</sub>-UCNP mit dem Antitumor-Wirkstoff Docetaxel (DOX) beladen und mit Folsäure modifiziert, was eine gezielte, simultane photodynamische und Chemo-Therapie von Brustkrebszellen (MCF-7) ermöglichte [129]. Bei Verwendung von Gadolinium im Trägermaterial können die NP zusätzlich mittels Magnetresonanztomographie in der Diagnostik detektiert werden, da dieses als Kontrastmittel agiert [130,142]. Zudem wurden Versuche unternommen, auch die Emissionspeaks der UCNP im sichtbaren Bereich für die Photokatalyse zu nutzen, indem beispielsweise N-dotiertes TiO<sub>2</sub> als vis-aktiver Photokatalysator verwendet wurde [144]. Eine detaillierte Übersicht über effizientes Design und Anwendungen von UCNP wurde von Chen *et al.* erstellt [145].

### **3 Experimentelle Arbeiten**

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden verschiedene Versuche durchgeführt, die die Interaktion von TiO<sub>2</sub> NP mit Säugerzellen, auch unter Berücksichtigung von eventuellen phototoxischen Effekten, analysieren sollten. Dazu wurde zunächst die Nanopartikelaufnahme von TiO<sub>2</sub> NP in Säugerzellen analysiert (Kapitel 3.1). Besonderer Schwerpunkt lag auf dem Einfluss der Bestrahlung auf die Viabilität von mit TiO<sub>2</sub> NP inkubierten Zellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen und der Untersuchung für die mögliche Anwendung von nano-TiO<sub>2</sub> in der photodynamischen Krebstherapie (Kapitel 3.2). Es wurden außerdem verschiedene weiterführende Versuche durchgeführt, die genauere Aufschlüsse auf intrazelluläre Prozesse geben sollten (Kapitel 3.3). Zusätzlich wurde der Einfluss von Oberflächenmodifikationen von TiO<sub>2</sub> NP auf die Phototoxizität getestet (Kapitel 3.4). In Kapitel 3.5 sind schließlich erste Versuche für die Anregung von photokatalytischen Prozessen mit NIR-Licht aufgeführt.

#### **3.1 Aufnahme von TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln in verschiedene Säugerzelllinien**

Ein wichtiger Faktor der Nanopartikel-Zell-Interaktionen ist die Aufnahme von Nanopartikeln in die Zelle. Informationen über das Ausmaß der Nanopartikelaufnahme können außerdem zu einem besseren Verständnis eventueller toxischer Effekte beitragen. Es ist oftmals schwierig, durch herkömmliche mikroskopische Methoden die tatsächliche Aufnahme der NP in die Zelle eindeutig zu bestätigen. Die Durchflusszytometrie bietet eine gute Alternative, da die direkte NP-Zell-Interaktion zu einem veränderten Streuverhalten der einzelnen Zelle führt, welches mit dem Durchflusszytometer detektiert werden kann. Durch eine entsprechende Fluoreszenz-Modifizierung der NP kann außerdem noch das Fluoreszenzsignal der einzelnen Zellen mit dem FCM analysiert werden. Zwar ist es auch ohne zusätzliche Maßnahmen hier nicht möglich, Anlagerung von NP-Aufnahme eindeutig zu unterscheiden, da jedoch die einzelnen Zellen betrachtet werden, können direkte Interaktionen bestätigt und mögliche Effekte beobachtet werden. In dieser Arbeit wurde zunächst die NP-Zell-Interaktion von TiO<sub>2</sub> NP mit zwei Säugerzelllinien untersucht.

### 3.1.1 Charakterisierung verwendeter TiO<sub>2</sub> Nanopartikel

Zur Untersuchung der NP-Aufnahme in Säugerzellen wurden kommerziell erwerbliche Anatas TiO<sub>2</sub> NP (Hombikat UV100) verwendet, welche einen primären Durchmesser von <10 nm aufweisen (Abbildung 10A) [146]. Untersuchungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS) zeigten, dass sich die NP in wässrigen Lösungen zu Aggregaten von bis zu 3-5 µm Durchmesser zusammenlagerten (Abbildung 10B) [147].

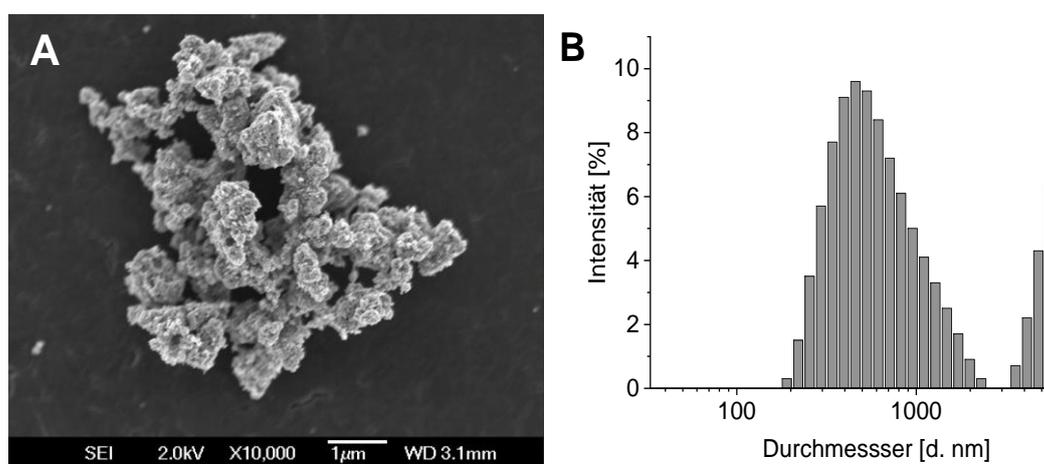


Abbildung 10: A) Rasterelektronenmikroskopie (REM) von TiO<sub>2</sub> UV100 NP; B) DLS der NP in wässriger Lösung, modifiziert nach [147].

Neben dem Streuverhalten der mit NP inkubierten Zellen sollte auch das Fluoreszenzsignal als zusätzlicher Parameter mit dem Durchflusszytometer analysiert werden. Dies stellt eine sehr sensitive Methode dar, welche außerdem weniger durch äußere Faktoren beeinflusst wird als die Lichtstreuung der einzelnen Zellen. Form- und Größenänderung spielen bei dieser Detektionsmethode eine geringere Rolle als bei der Untersuchung des Streuverhaltens. Da reine TiO<sub>2</sub> NP keine nachweisbare Fluoreszenz im Zytometer zeigen, wurden für die NP-Aufnahmeuntersuchung TiO<sub>2</sub> UV100 NP mit dem Standard-Fluoreszenzlabel Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Bei der hier verwendeten Methode wurde der Fluoreszenzfarbstoff an der Oberfläche der NP adsorbiert (A.2.13). Ähnlich wurde von Feng *et al.* bei der Untersuchung von Silica-beschichteten TiO<sub>2</sub> NP in nasopharyngealen Krebszellen vorgegangen [117]. FITC ist ein preiswertes und stark fluoreszierendes Molekül, welches mit der Standardausrüstung der

meisten Fluoreszenzgeräte im Labor nachgewiesen werden kann. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten die Partikelaggregate in nächster Umgebung zu den Zellkernen lokalisiert werden (Abbildung 11).

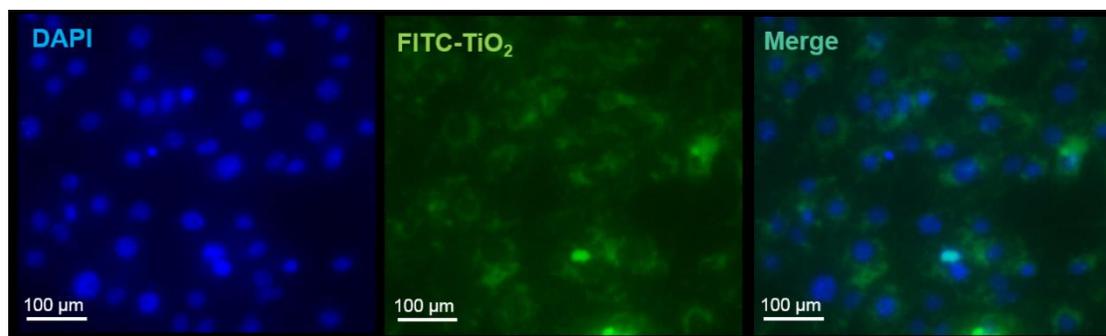


Abbildung 11: Fluoreszenzbilder von NIH/3T3-Zellen welche mit  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  FITC-TiO<sub>2</sub> NP (grün) für 4 h inkubiert wurden. Die Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung angefärbt (blau). Das rechte Bild zeigt die Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzaufnahmen (Merge). Vergrößerung: 20x [147].

Da das FITC nur an der Oberfläche der NP adsorbiert und nicht kovalent gebunden wurde, wurde die Stabilität der Signalintensität untersucht. Hierfür wurden über einen Zeitraum von 22 Tagen immer wieder NIH/3T3-Zellen ausgesiedelt, mit derselben FITC-TiO<sub>2</sub>-Lösung inkubiert und anschließend im FCM vermessen (A.2.6). Während das als Kontrolle vermessene Seitwärtsstreulicht (SSC)-Signal (siehe auch Kapitel 3.1.2) über einen Zeitraum von drei Wochen nahezu konstant blieb, waren die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen im Zytometer erst nach 4 Tagen reproduzierbar (Abbildung 12). Vermutlich geht in den ersten 72 h nach Modifikation noch ein Großteil des adsorbierten FITC wieder in Lösung und die Fluoreszenzintensität der Partikel nimmt ab. In diesem Fall wurde eine Verringerung auf ca. 11 % der ursprünglichen im Zytometer gemessenen Signalstärke nach 4 Tagen beobachtet. Danach können die Partikel über einen längeren Zeitraum verwendet werden.

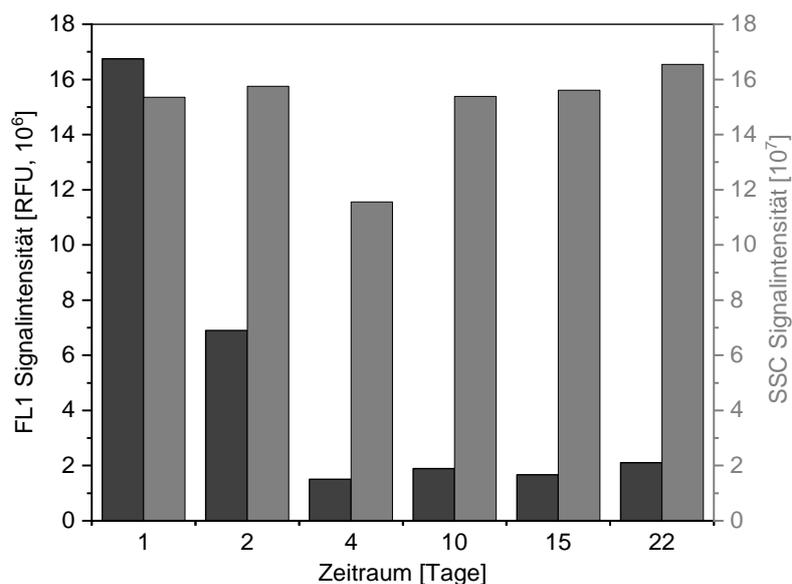


Abbildung 12: Stabilitätstest der modifizierten FITC-TiO<sub>2</sub> NP über einen Zeitraum von 22 Tagen, gezeigt sind die Daten der NIH/3T3-Zellen, nach 4 h Inkubation mit 25 µg mL<sup>-1</sup> NP-Lösung.

Es wurde im Laufe der Experimente eine deutliche Signalabnahme nach einem Zeitraum von über 4 Wochen beobachtet, die vermutlich durch eine Dissoziation weiterer Moleküle von der Oberfläche verursacht wurde. Um eine Reproduzierbarkeit der absoluten Fluoreszenzwerte zu gewährleisten, wurden daher nur Lösungen verwendet, die zwischen 4 und 22 Tagen alt waren.

Mittels der hergestellten FITC-TiO<sub>2</sub> NP wurde die Aufnahme der NP in zwei verschiedene Standardzelllinien, NIH/3T3 (embryonale murine Fibroblasten) und A549 (humanes Lungenkarzinom) untersucht. Sowohl die Lunge als auch das direkt unter der Haut liegende Bindegewebe sind mögliche Aufnahmepunkte für Nanomaterialien. Zunächst wurden toxische Effekte der NP auf die Zellen ausgeschlossen, da diese ebenfalls zu einem veränderten Streuverhalten der Zellen führen würden. Dafür wurde ein fluorometrischer Viabilitäts-Assay, der CellTiter-Blue® (CTB)-Assay, durchgeführt. Hierbei wird die metabolische Aktivität der Zellen analysiert, indem die Umwandlung des Farbstoffs Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin durch Reduktionsreaktionen vermessen wird (A.2.8). Über die metabolische Aktivität kann unter Berücksichtigung von Kontrollbedingungen auf die Viabilität der Zellen geschlossen werden.

Die Viabilität der getesteten Zelllinien wurde in dem verwendeten Konzentrationsbereich weder von unmodifizierten noch von FITC-gelabelten NP negativ beeinflusst (Abbildung 13). Die gegebenenfalls beobachteten Veränderungen im Streuverhalten sind somit auf die NP-Zell-Interaktion zurückzuführen.

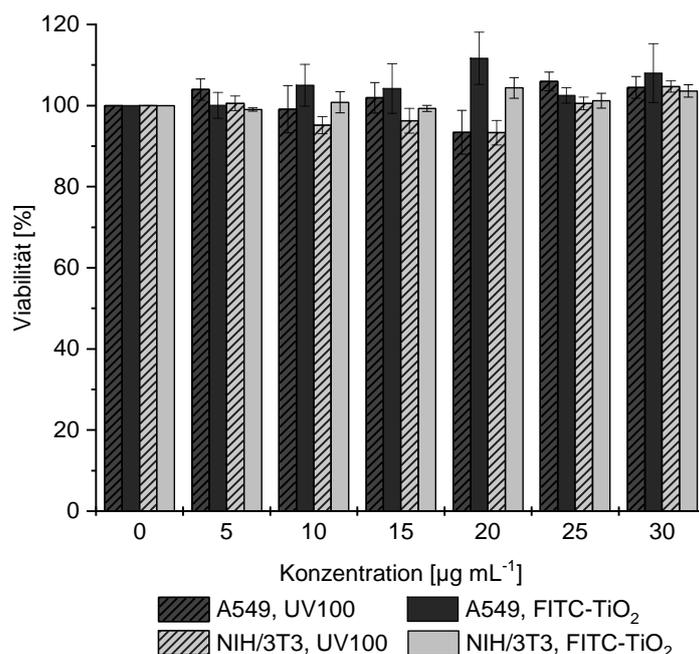


Abbildung 13: Viabilität von A549- und NIH/3T3-Zellen inkubiert mit UV100 und FITC-TiO<sub>2</sub> NP für 24 h, gemessen mittels CTB-Assay. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n \geq 3$ . Modifiziert nach [147].

Mit den hergestellten FITC-TiO<sub>2</sub> NP wurden die beiden Zelllinien hinsichtlich ihres Streu- und Fluoreszenzverhaltens mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### 3.1.2 Analyse der Nanopartikelaufnahme mittels Durchflusszytometrie

Zunächst wurde das Streuverhalten des Seitwärtsstreulichts (engl. *Side Scatter*, SSC) der einzelnen Zellen mittels FCM analysiert. Als dieses wird das ungerichtet streuende Licht bezeichnet, welches im Durchflusszytometer im 90°-Winkel gemessen wird. Das SSC-Signal gibt Aussage über die Granulierung der einzelnen Zellen. Es gilt neben dem Vorwärtstreulicht als Standardparameter, über den

Zelltypen identifiziert und Verunreinigungen, so wie in diesem Fall reine Partikelagglomerate, aus der Datenauswertung ausgeschlossen werden können. Es wurden sowohl verschiedene NP-Konzentrationen als auch Inkubationszeiten untersucht. Das Streuverhalten der Zellen, welche mit NP inkubiert wurden, weicht sehr stark von der Kontrolle ab, das SSC-Signal ist teilweise stark erhöht und deckt die kompletten Detektionsrahmen ab (Abbildung 14).

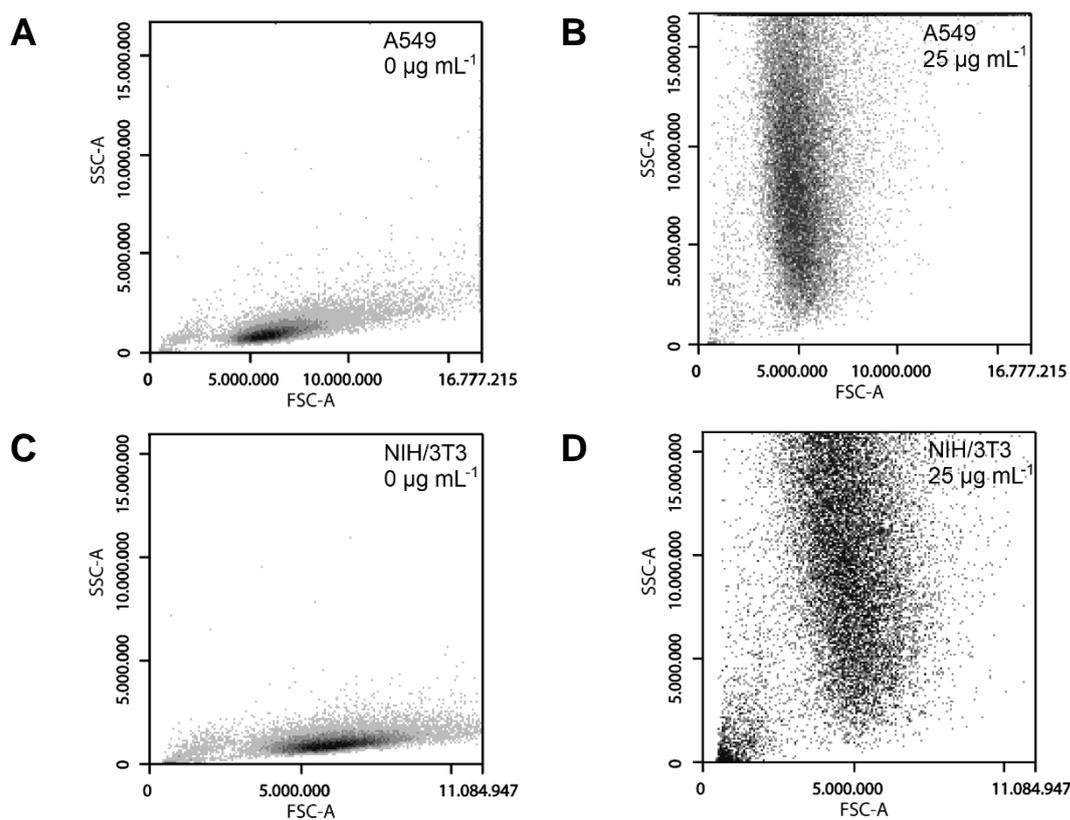


Abbildung 14: Density-Plots von SSC- und FSC Signalen von NIH/3T3-Zellen und A549-Zellen nach 24 h Inkubation mit 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  FITC-TiO<sub>2</sub> NP (A,C) und 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  FITC-TiO<sub>2</sub> NP (B,D) [147].

Die erhöhte Seitwärtsstreuung der einzelnen Zellen lässt auf eine veränderte Oberflächenstruktur und stärkere Granulierung schließen. Dies kommt vermutlich durch die Aufnahme der NP und derer Aggregate in Vesikeln, was zu Ausstülpungen in der Membran führt. Auch durch die äußere Anlagerung der Aggregate kann das Signal verändert werden. TiO<sub>2</sub> ist ein sehr stark streuendes Material, daher ist es möglich, dass sowohl bei Aufnahme als auch bei Anlagerung an die Zelle das Licht breiter gestreut wird.

Bei beiden Zelltypen korrelierte die verwendete NP-Konzentration mit der Erhöhung des Signals für die Seitwärtsstreuung (Abbildung 15). Bis zu einer Konzentration von  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  ließ sich ein linearer Zusammenhang zwischen SSC-Signal und NP-Konzentration feststellen. Die NIH/3T3-Zellen zeigten hierbei ein signifikant höheres Signal ( $30 \pm 6,5 \%$ ) für die jeweilige NP-Konzentration bei nahezu gleichem Kontrollsignal. Die NP-Aufnahmekinetik zeigt einen starken Anstieg des Signals in den ersten zwei Stunden der Inkubation bei beiden Zelltypen. Zwischen 2 und 8 Stunden blieb das Signal konstant. Nach 24 Stunden lässt sich eine ca. 25 %ige Abnahme der SSC-Signalintensität beobachten. Auch bei der Aufnahme der Kinetik ließ sich ein insgesamt höheres SSC-Signal für die Zelllinie NIH/3T3 vermerken.

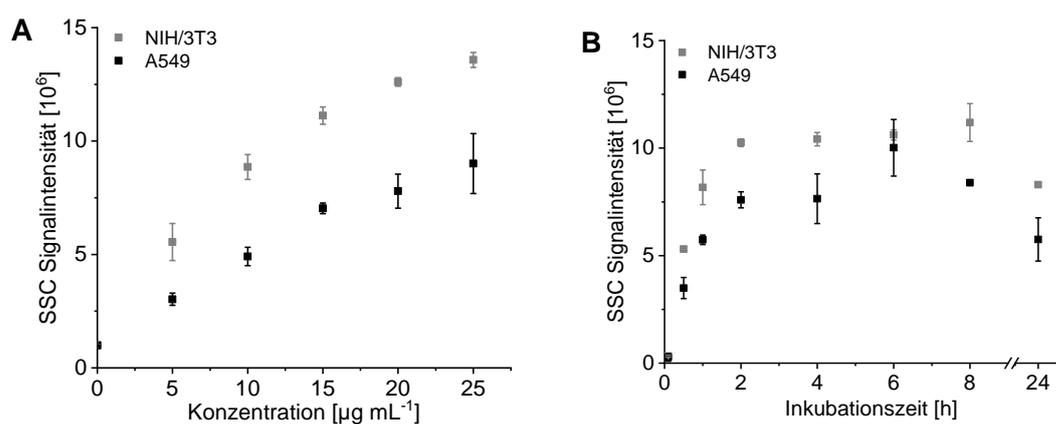


Abbildung 15: Seitwärtsstreu-Signale von A549 und NIH/3T3-Zellen. A) SSC Signale nach 24-stündiger Inkubation verschiedener FITC-TiO<sub>2</sub> NP-Konzentrationen; B) SSC Signal-Kinetik; modifiziert nach [147].

Die Abnahme der Signalintensität nach 24 Stunden Inkubation lässt sich durch das veränderte NP/Zell-Verhältnis infolge der Zellteilung erklären. Da im Zytometer einzelne Zellen betrachtet werden, kann eine solche Umverteilung der konstanten NP Menge auf die neuen Zellen als plausibler Grund für die Signalabnahme angeführt werden. Die Ergebnisse lassen außerdem auf eine insgesamt höhere Aufnahme/Anlagerung der TiO<sub>2</sub> NP an die NIH/3T3-Zellen schließen. Auch Tedja *et al.* beobachteten bereits eine deutlich geringere Aufnahme von TiO<sub>2</sub> NP in A549-Zellen, hier im Vergleich zu H1299-Zellen [148].

Es konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass allein über die Beobachtung des Seitwärtsstreulichts der Zellen bereits geringe Konzentrationsänderungen der NP-Lösungen detektiert sowie Unterschiede im NP-Aufnahmeverhalten zweier Säugerzelllinien sichtbar gemacht werden können.

Parallel zum SSC wurde auch die Vorwärtsstreuung (engl. *Forward Scatter*, FSC) der Zellen nach Inkubation mit FITC-TiO<sub>2</sub> NP untersucht. Als Vorwärtsstreulicht wird in einem sehr geringen Winkel gestreutes Licht bezeichnet. Das FSC-Signal ist von den Brechungseigenschaften der Oberfläche wie beispielsweise der Zellmembran abhängig und korreliert zumeist mit der Größe der untersuchten Objekte. Das FSC-Signal zeigt eine konzentrations- sowie zeitabhängige Abnahme der Intensität bei beiden Zelllinien nach NP-Inkubation (Abbildung 16).

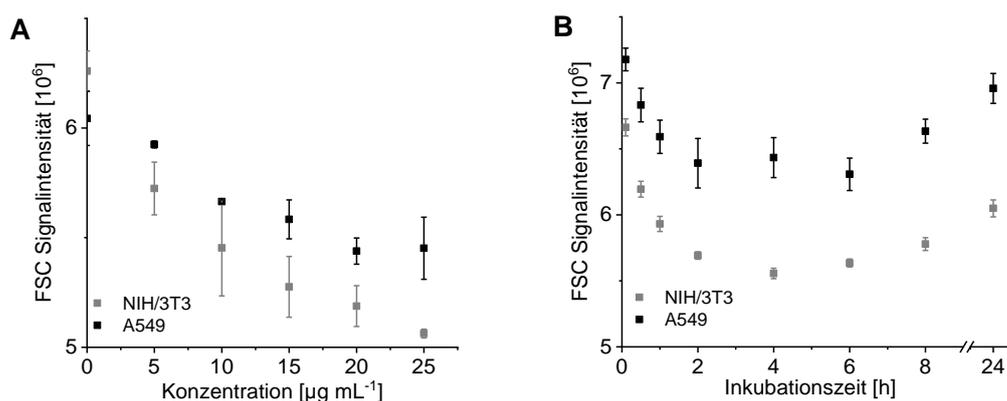


Abbildung 16: FSC-Signale von NIH/3T3- und A549-Zellen. A) nach Inkubation mit verschiedenen FITC-TiO<sub>2</sub>-Konzentrationen; B) Kinetik des FSC-Signals über einen Zeitraum von 24 h nach Inkubation mit  $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  NP-Lösung; modifiziert nach [147].

Im Gegensatz zum Seitwärtsstreulicht sinkt das FCS-Signal mit steigender NP-Konzentration und Inkubationszeit ab. Ein verringertes FSC-Signal lässt normalerweise auf einen toxischen Effekt oder morphologische Veränderungen der Zellen schließen. Dies konnte jedoch mittels des Viabilitätstests (Abbildung 13) und über mikroskopische Aufnahmen ausgeschlossen werden. Die Signalabnahme lässt sich durch die starke Streuung der aufgenommenen und angelagerten Nanopartikel erklären, durch die vermutlich weniger Licht in den Detektor für das Vorwärtsstreulicht fällt, da es zu allen Seiten abgelenkt wird. Bei der Kinetik fällt

auf, dass das Signal nach längerer Inkubationszeit wieder ansteigt, was auch hier auf die Zellteilung und das veränderte Zell/NP-Verhältnis zurückzuführen ist.

Zusätzlich zu den Streulicht-basierten Detektionsverfahren wurde das Fluoreszenzsignal der einzelnen Zellen analysiert. Auch hier ist ein eindeutiger Zusammenhang zwischen NP-Konzentration beziehungsweise Inkubationszeit und dem detektierten Fluoreszenz (FL1)-Signal zu erkennen (Abbildung 17). Auffällig ist hier, dass die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien bei dieser Detektionsmethode sehr deutlich sichtbar werden. So liegen die Signale der NIH/3T3-Zellen deutlich über denen der A549 Zellen.

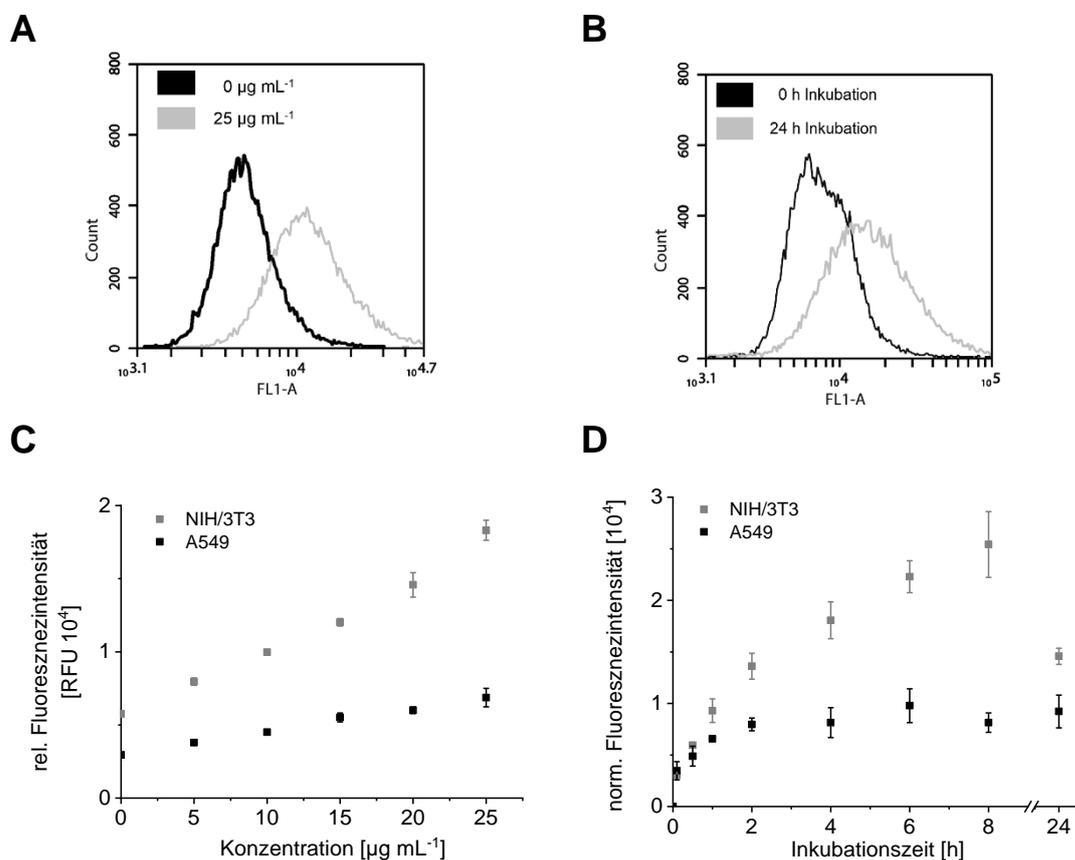


Abbildung 17: Fluoreszenzsignale der Zellen nach Inkubation mit FITC-TiO<sub>2</sub> NP. A) Beispielhafter Vergleich des FL1-Signals von NIH/3T3-Zellen mit und ohne NP; B) Vergleich der Signale der NIH/3T3-Zellen nach 0 und nach 24 h Inkubation mit 12,5 µg mL<sup>-1</sup> FITC-TiO<sub>2</sub> NP; C) Konzentrationsabhängigkeit des FL1-Signals; D) Zeitliche Änderung des Signals nach Inkubation mit 12,5 µg mL<sup>-1</sup>, FL1-Signal nach Abzug der jeweiligen Autofluoreszenz der Zelllinie, modifiziert nach [147].

Die Beobachtung des Fluoreszenzsignals über einen Zeitraum von 24 h gibt einige interessante Einblicke über das unterschiedliche NP-Aufnahmeverhalten der beiden Zelltypen (Abbildung 17D). Um diese Unterschiede in der Kinetik noch besser beurteilen zu können, wurde hier die Autofluoreszenz der Zellen abgezogen. Die mit FITC-TiO<sub>2</sub> NP inkubierten NIH/3T3-Zellen fluoreszieren deutlich stärker, das Signal steigt bis zu dem Zeitpunkt von 8 h stark an. Bei den A549-Zellen ist schon nach 2 h eine konstante Signalintensität erreicht, es scheinen keine weiteren Partikel mehr aufgenommen beziehungsweise angelagert zu werden. Ein sehr ähnlicher Verlauf wurde auch von Thurn *et al.* für mit Alizarin-Rot-markierte TiO<sub>2</sub> NP und Prostatakrebszellen beobachtet, die ebenfalls eine immer schwächer werdende Steigerung der Fluoreszenzsignale in den ersten zwei Stunden detektierten [149].

Interessanterweise steigt das Fluoreszenzsignal schon nach minimaler Inkubationszeit (Zeitpunkt 0), bei dessen Messung die Zellen nur wenige Sekunden mit der NP-Lösung inkubiert wurden, und danach direkt für die FCM-Messung vorbereitet wurden. Dies lässt eine direkte Anlagerung der NP an die Zellen vermuten. Besonders auffällig ist der sehr starke Verlust der Fluoreszenzintensität der NIH/3T3-Zellen nach 24 h. Dies ist auch hier wieder auf die Verteilung der NP auf die Tochterzellen nach der Zellteilung zurückzuführen. Zudem ist es möglich, dass die pH-Sensitivität des Moleküls FITC eine Rolle spielt [150]. Nach Aufnahme der NP sammeln sich diese oftmals in späten Endosomen oder Lysosomen, wo ein pH von 4,5 und 5,5 vorliegt [42]. Da FITC seine Fluoreszenzintensität bei niedrigem pH verliert, könnte das stark abfallende Signal ein Zeichen für die eindeutige Aufnahme der NP in die Zellen sein. Diese Schlussfolgerungen lassen darauf schließen, dass bei den A549-Zellen entweder noch nicht alle NP aufgenommen wurden und so auch die Tochterzellen noch freie NP zur Aufnahme zur Verfügung haben, oder dass die NP nur angelagert statt internalisiert sind, da hier keine solche Signalabnahme nach 24 h beobachtet wurde.

Die Analyse von mit markierten NP inkubierten Zellen im Durchflusszytometer stellt eine gute Methode dar, um Aufschlüsse über die Aufnahme von den Nanomaterialien in die Zellen zu geben. Mit mikroskopischen Methoden können die gewonnenen Daten bestätigt werden. Die bildgebende Durchflusszytometrie

kombiniert beispielsweise FCM mit Konfokal-Mikroskopie. Mittels dieser Methode untersuchten Vranic *et al.* die Endozytose von FITC-markierten Silica und unmarkierten TiO<sub>2</sub> NP in Lungen Epithelzellen [151]. Auch sie stellten eine schnelle Steigerung der Fluoreszenzsignale direkt nach Inkubation fest, das Signal blieb hier nach ca. 4 h konstant.

Bei den in dieser Arbeit mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten wurde deutlich, dass die zwei verglichenen Zelltypen ein unterschiedliches NP-Aufnahmeverhalten aufweisen. Die SSC- sowie auch die Fluoreszenzsignale lassen darauf schließen, dass die NIH/3T3-Zellen deutlich mehr NP aufnehmen als die A549-Zellen. Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurden die Zellen zusätzlich mikroskopisch analysiert.

### **3.1.3 Time-Lapse Mikroskopie der Nanopartikelaufnahme in Säugerzellen**

Um weitere Einsicht in das NP-Aufnahmeverhalten der beiden Zelltypen zu erlangen und die gewonnenen Erkenntnisse aus der FCM-Analyse zu bestätigen, wurden die Zellen über einen Zeitraum von 24 h lichtmikroskopisch beobachtet. Dabei wurden 60 Bilder pro Stunde aufgenommen und im Nachhinein zu einem Film zusammengefügt (A.3.1). Die NP-Agglomerate erschienen als schwarze Punkte und setzten sich deutlich von den Zellen ab.

Innerhalb der ersten Stunde sedimentierten die NP und setzten sich am Boden der Kulturkammer ab. Generell ließ sich eine höhere Mobilität und Proliferationsrate der NIH/3T3-Zellen im Gegensatz zu den A549-Zellen beobachten. Bei den A549-Zellen fiel auf, dass sich die NP auf zellfreien Flächen ansammelten und große Agglomerate von bis zu 25 µm bildeten (Abbildung 18). Es schienen zwar auch einige Aggregate direkt mit den Zellen assoziiert zu sein, in den Videoaufnahmen wird jedoch sichtbar, dass sich diese oft bei der Zellbewegung oder Teilung wieder von den Zellen ablösten. Eine tatsächliche Aufnahme konnte zumindest für die sichtbaren Aggregate nicht eindeutig nachgewiesen werden.

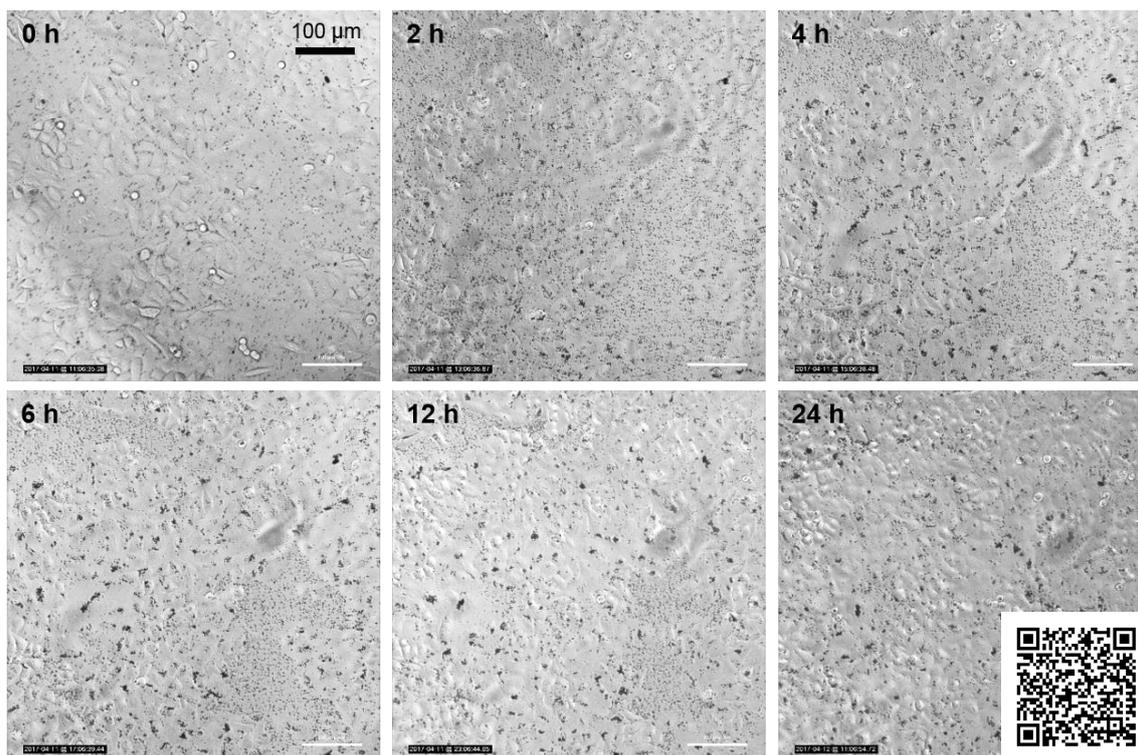


Abbildung 18: Time-Lapse Mikroskopie von A549 Zellen inkubiert mit  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  FITC- $\text{TiO}_2$  NP für 24 h. Gezeigt sind hier Durchlicht-Aufnahmen 0, 2, 4, 6, 12 und 24 Stunden nach NP-Zugabe zu den Zellen. Vergrößerung 20x [147].

Die NP-Aufnahme der NIH/3T3-Zellen unterschied sich stark von der der A549-Zellen. Die NP-Aggregate zeigten eine eindeutige Assoziation mit den Zellen (Abbildung 19). Nach 12 h waren kaum noch freie NP-Aggregate sichtbar. Stattdessen wiesen die Bereiche um die Zellkerne einen schwarzen Ring auf, welcher darauf schließen ließ, dass die NP ins Zytoplasma der Zellen aufgenommen wurden. Anderenfalls wäre eine zufällige Anordnung der NP-Aggregate auf der Zelloberfläche sichtbar. Eine solche Ansammlung von NP-Aggregaten um den Nukleus von NIH/3T3-Zellen wurde bereits nach Inkubation mit Silber-NP [152] und Eisenoxid-NP [153] beobachtet.

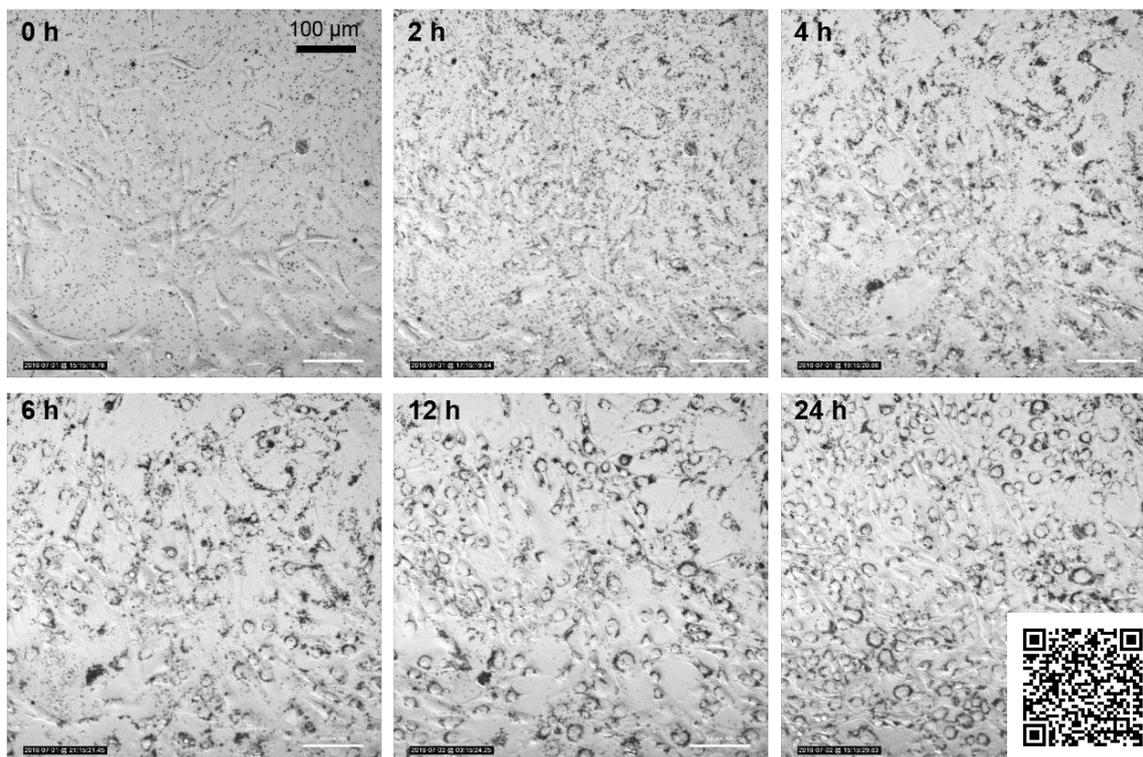


Abbildung 19: Time-Lapse Mikroskopie von NIH/3T3-Zellen inkubiert mit  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  FITC- $\text{TiO}_2$  NP für 24 h. Gezeigt sind hier Durchlicht-Aufnahmen 0, 2, 4, 6, 12 und 24 Stunden nach NP-Zugabe zu den Zellen. Vergrößerung 20x [147].

Die kreisförmige Anlagerung der NP-Aggregate um den Zellkern lässt sich durch die Zellmorphologie erklären. Adhärierte NIH/3T3-Zellen weisen eine sehr längliche, flache Form auf, bei der der Zellkern eine deutliche Erhebung bildet [154,155]. Nur das Zytoplasma direkt um den Zellkern weist den nötigen Platz für die aufgenommenen Partikel auf. Die Tatsache, dass die Zellkerne frei von sichtbaren NP-Aggregaten sind, lässt auf eine tatsächliche NP-Aufnahme schließen, da bei einer zufälligen Anlagerung an die Zelloberfläche auch an diesen Stellen Aggregate sichtbar sein müssten.

Die mikroskopischen Aufnahmen bestätigen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. So wird zum einen deutlich, dass die  $\text{TiO}_2$  NP die Viabilität und Proliferation der Zellen nicht negativ beeinflussen. Zum anderen wird das unterschiedliche Aufnahmeverhalten sichtbar. Die NIH/3T3-Zellen scheinen deutlich mehr NP aufzunehmen, wie bereits die Analyse des SSC- und Fluoreszenzsignals vermuten ließ. Zwar können im Lichtmikroskop nur NP-Aggregate nachgewiesen werden, für eine genauere Betrachtung wären

TEM-Aufnahmen nötig. Jedoch aggregieren die NP auch *in vivo* [148], daher können durchaus relevante Rückschlüsse über den Verbleib der NP nach Inkubation mit den Zellen geschlossen werden.

### **3.1.4 Zusammenfassung zur Nanopartikelaufnahme in Säugerzellen**

Durch eine simple und günstige Adsorptionsmethode konnten die TiO<sub>2</sub> NP mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC erfolgreich modifiziert werden. Somit war es möglich, sowohl über die Lichtstreuung als auch die Fluoreszenz einzelne Zellen im Durchflusszytometer nach Inkubation mit TiO<sub>2</sub> NP zu analysieren. Dabei erwies sich die Durchflusszytometrie als sehr sensitive und zuverlässige Methode, um reproduzierbare und statistisch relevante Daten zur Interaktion der NP mit den untersuchten Zellen zu erhalten. Die gewonnenen Erkenntnisse konnten mittels Time-Lapse Mikroskopie bestätigt werden. Es wurde deutlich, dass die NP-Aufnahme zwischen den Zelllinien stark variiert. Dies muss bei Toxizitätstestungen berücksichtigt werden, da die NP-Aufnahme für intrazelluläre Effekte eine essentielle Rolle spielt. Es konnte während dieser Versuchsreihe bestätigt werden, dass die verwendeten TiO<sub>2</sub> NP keine toxischen Effekte auf beide hier untersuchten Zelllinien hatten.

### 3.2 Phototoxizität von TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Effekt der photokatalytischen Aktivität von TiO<sub>2</sub> NP auf Säugerzellen untersucht werden. Der Fokus hierbei lag nicht nur auf der generellen Untersuchung der Phototoxizität, sondern auf dem potentiellen Nutzen der PCNP für eine photodynamische Krebstherapie. Eine effiziente Abtötung durch eine Kombination von NP-Inkubation und anschließender Bestrahlung ist hierbei also als positiv zu betrachten.

Es wurde hauptsächlich das Material TiO<sub>2</sub> P25 untersucht. Dabei handelt es sich um ein gut charakterisiertes, kommerziell erhältliches Pulver, welches bereits in vielen Toxizitätsstudien verwendet wurde. Durch die Mischung der Phasen Anatas und Rutil im Verhältnis 3:1 wird eine sehr hohe photokatalytische Aktivität erreicht. Für spätere Versuche wurden außerdem die sehr aktiven Eisen- und Wolfram-dotierten TiO<sub>2</sub> P25 NP verwendet. Diese wurden innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelt und freundlicherweise von Narmina Balayeva zur Verfügung gestellt [156].

Zu Beginn der Arbeit wurden alle Versuche mit den bereits hinsichtlich der Nanopartikelaufnahme untersuchten Standardzelllinien A549 und NIH/3T3 durchgeführt. Später wurden außerdem noch Zellen der HeLa-Linie betrachtet. Hierbei handelt es sich um Gebärmutterhalskrebszellen, welche vor allem in Hinblick auf die spätere Anwendung der NP in der photodynamischen Therapie ausgewählt wurden, da es in diesem Bereich des Körpers möglich wäre, mit Lichtleitern o.Ä. eine lokale Bestrahlung durchzuführen.

#### 3.2.1 Bestimmung der Phototoxizität von TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln: Design und Optimierung eines *in vitro*-Assays

Um die Eignung von TiO<sub>2</sub> NP für eine photodynamische Therapie zu untersuchen, wurden *in vitro* verschiedene Methoden angewendet, die einen Einblick bezüglich der Phototoxizität gegenüber Säugerzellen und den Wirkmechanismus liefern sollten. Die Zellen wurden mit den zu untersuchenden NP inkubiert und anschließend bestrahlt (A.2.5). Als Kontrolle wurde immer ein Teil der Platte mit Aluminiumfolie von der Lichtquelle abgeschirmt, welcher unbehandelte Zellen enthielt (0 µg mL<sup>-1</sup> NP). Nach der Bestrahlung folgte meist eine Regenerationszeit, in der außerdem die toxischen Auswirkungen sichtbar werden sollten. Bei den

Untersuchungen zur allgemeinen phototoxischen Wirkung der NP wurde ein CTB®-Assay (A.2.8) zur Bestimmung der Zellviabilität durchgeführt.

Während zu Beginn der experimentellen Arbeiten noch mit einer freistehenden UV-A-Lampe bestrahlt wurde, wurden die späteren Versuche mit einer Bestrahlungskammer, dem Bio-Link 365 (Vilber), durchgeführt. Diese hat den Vorteil, dass die Zellen während der Bestrahlung in einem geschlossenen Raum stehen, welcher sich während der Bestrahlung leicht erwärmt und so eher den normalen Kultivierungstemperaturen (37°C) entspricht. Zudem ist eine Messsonde integriert, sodass die gewünschte Lichtdosis genau eingestellt werden kann.

Die in den folgenden Versuchen verwendeten Bestrahlungsintensitäten sind teilweise an die jeweilige Fragestellung und Lichtquelle angepasst und wurden in den Abbildungsunterschriften vermerkt. Die zu Anfang verwendeten NIH/3T3-Zellen erwiesen sich beispielsweise als sehr empfindlich und wurden daher mit geringeren Intensitäten bestrahlt als die später verwendeten HeLa- und A549-Zellen. Der Einfluss der Strahlungsintensitäten wird in Kapitel 3.2.2 beschrieben und muss beim Vergleich der absoluten Viabilitätswerte bei verschiedenen Fragestellungen berücksichtigt werden.

Während den durchgeführten Bestrahlungsversuchen konnte wiederholt die Dunkeltoxizität von allen verwendeten TiO<sub>2</sub> NP auf die untersuchten Säugerzellen ausgeschlossen werden. Zudem wurde beobachtet, dass die Bestrahlung deutlich effizienter wurde, wenn die Zellen währenddessen in Phosphat-Puffer (PBS) und nicht im Kulturmedium inkubiert wurden (Abbildung 20). So wurde die Viabilität von in PBS bestrahlten NIH/3T3-Zellen schon bei einer Konzentration von 30 µg mL<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> NP um 50 % reduziert, während dies im Medium erst mit 50 µg mL<sup>-1</sup> erreicht werden konnte. Dies hängt vermutlich mit der Absorption vom Kulturmedium im UV-Bereich (A.3.2, Abbildung 63) sowie den im Medium verfügbaren Antioxidantien zusammen [157,158].

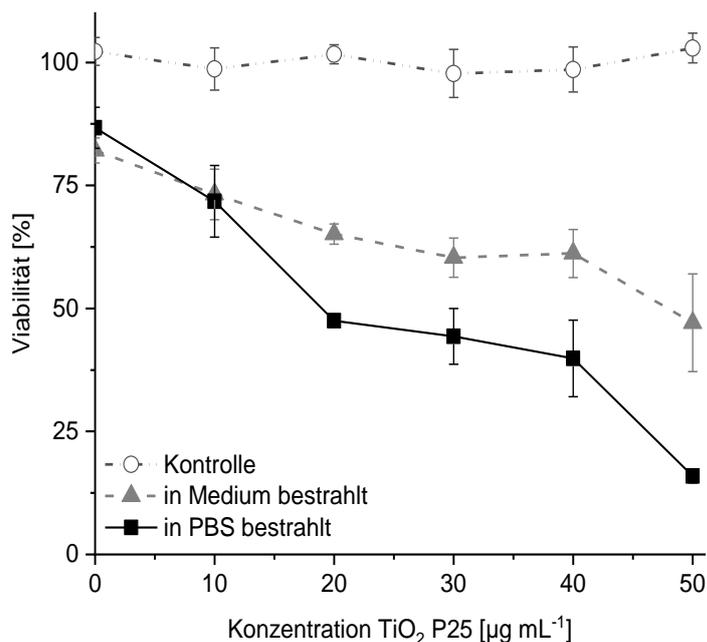


Abbildung 20: Viabilität von NIH/3T3-Zellen nach Inkubation mit TiO<sub>2</sub> P25 NP bei 3 J cm<sup>-2</sup> unter verschiedenen Bedingungen. Im Fall der Kontrolle wurden die Zellen nicht mit UV-Licht bestrahlt. Beispielhaft gezeigt sind hier die Ergebnisse nach Inkubation mit PAA@TiO<sub>2</sub> NP (siehe Kapitel 3.4.1). Dargestellt sind die Mittelwerte bezogen auf die Dunkelkontrolle bei 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  NP nach Dreifachmessung  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

Es konnte eine deutliche, konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität der mit TiO<sub>2</sub> NP inkubierten Zellen nach Bestrahlung in PBS sowie im Medium beobachtet werden. Zwar starben auch ohne die Inkubation mit NP bis zu 20% der Zellen allein durch die UV-A-Bestrahlung ab (Daten für 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  bei Bestrahlung in PBS und Medium, Abbildung 20), es war jedoch ein eindeutiger phototoxischer Effekt bei Bestrahlung nach Inkubation mit TiO<sub>2</sub> NP zu beobachten. Für die nachfolgenden Experimente wurde immer unmittelbar vor der Bestrahlung das Medium abgenommen und die Zellen für die Zeit der Bestrahlung in PBS inkubiert, um deutlichere Effekte zu erzielen und die phototoxischen Mechanismen besser untersuchen zu können. Die Inkubation der Zellen mit PBS während des Bestrahlungsvorgangs wurde auch von Yin *et al.* bei der Untersuchung der Phototoxizität von TiO<sub>2</sub> NP auf Keratinozyten praktiziert [81].

Um die Sensitivität des Phototoxizitäts-Assays weiter zu erhöhen, wurde zunächst der Einfluss der Inkubationszeit der Zellen mit den Nanopartikeln vor der Bestrahlung betrachtet. Hierbei passen die Ergebnisse zu den aus den

NP-Aufnahme-Versuchen gewonnenen Daten (Kapitel 3.1.2). Bei einer Inkubation von HeLa-Zellen mit TiO<sub>2</sub> P25 NP über Nacht ist die geringste Phototoxizität zu beobachten (Abbildung 21). Dies lässt sich auch hier wieder mit dem veränderten NP/Zellen-Verhältnis in Folge der Zellproliferation erklären. Nach Inkubation für 4 h war der Effekt am deutlichsten zu sehen. Hier wurde die Viabilität nach Inkubation mit 45 µg mL<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> P25 NP auf 25 ± 6 % reduziert, während bei einer Inkubation über Nacht noch 70 % metabolische Aktivität im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle gemessen werden konnten. Es wurde daher bei den Phototoxizitätsversuchen die Bestrahlung nach einem Zeitraum von 3-6 h NP-Inkubation durchgeführt.

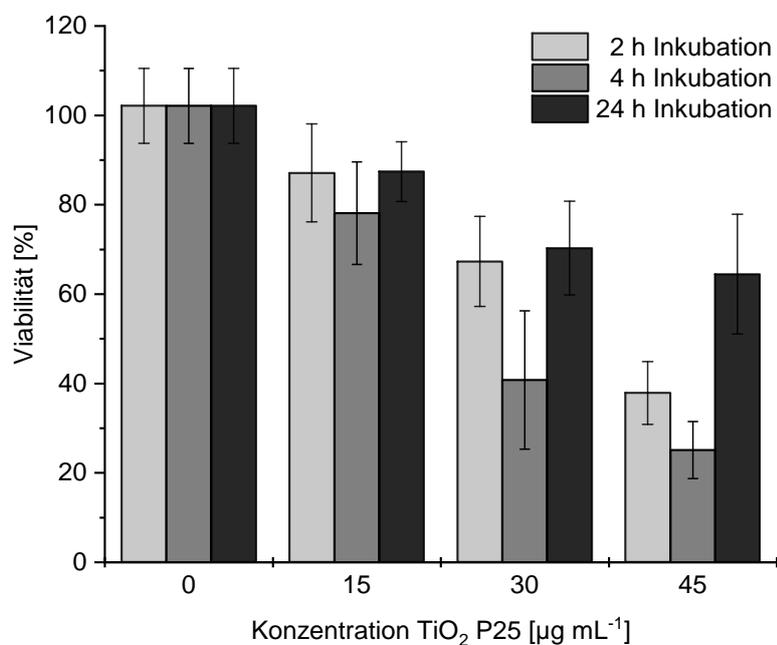


Abbildung 21: Vergleich der Zellviabilität von HeLa-Zellen nach Bestrahlung nach unterschiedlicher Inkubationszeit mit TiO<sub>2</sub> P25 NP. Bestrahlung: 6 J cm<sup>-2</sup>. Dargestellt sind die Mittelwerte bezogen auf die Dunkelkontrolle bei 0 µg mL<sup>-1</sup> NP nach Dreifachmessung ± Standardabweichung, n ≥ 3.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Wellenlänge der Bestrahlungsquelle erheblichen Einfluss auf die Phototoxizität von TiO<sub>2</sub> P25 NP hat. Beim Vergleich der Zellviabilitäten von HeLa-Zellen nach Bestrahlung mit UV- oder sichtbarem Licht wurde deutlich, dass durch Bestrahlung mit langwelligerem Licht (405 nm, LED-Array) keine Einschränkungen der metabolischen Aktivität gemessen werden

konnten, während in diesem Versuch bis zu  $30 \pm 5\%$  der Zellen durch die Bestrahlung mit UV-A-Licht abgetötet wurden (nach Inkubation mit  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Abbildung 22).

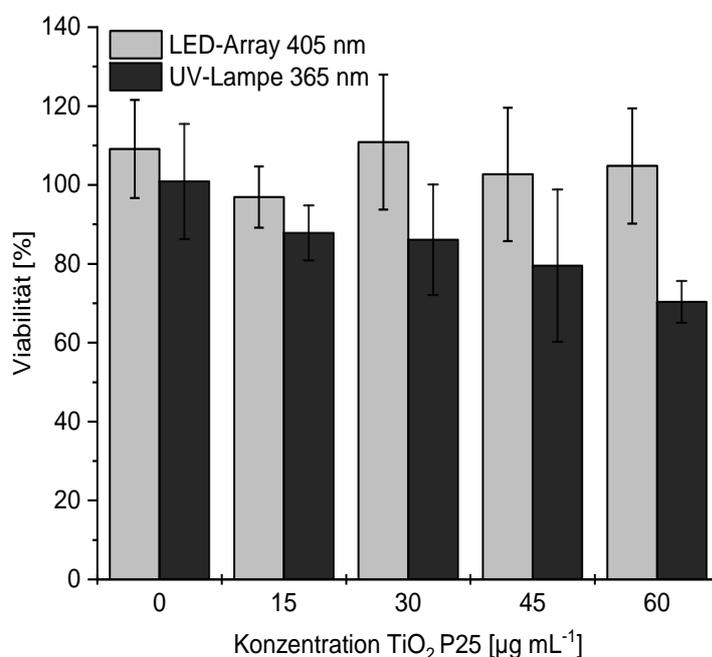


Abbildung 22: Viabilität von HeLa-Zellen nach Inkubation mit  $\text{TiO}_2$  P25 NP und Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm) und sichtbarem Licht (405 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte bezogen auf die Dunkelkontrolle bei  $0 \mu\text{g mL}^{-1}$  NP nach Dreifachmessung  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

Auch Ma *et al.* zeigten, dass die Phototoxizität von  $\text{TiO}_2$  P25 NP nicht mit Licht von einer Wellenlänge  $>400$  nm ausgelöst wird [75]. Die Energie der Photonen reicht vermutlich nicht aus, um den photokatalytischen Prozess zu aktivieren und damit schädliche ROS in den Zellen zu generieren. Es ist somit UV-A-Licht nötig, um einen Effekt mit unmodifizierten  $\text{TiO}_2$  NP zu erzielen, was besonders in Bezug auf pharmazeutische Anwendungen berücksichtigt werden muss (Kapitel 2.4).

Mit den gewonnenen Erkenntnissen aus den Vorversuchen wurde ein Assay etabliert, mit dem die genaueren Mechanismen der Phototoxizität sowie verschiedene Zellen und Partikel untersucht werden konnten (A.2.5). Der typische Ablauf der für diese Arbeit verwendeten Phototoxizitäts-Assays ist in Abbildung 23 dargestellt. Nach Heranziehen der Zellen in Kulturflaschen wurden diese vereinzelt und in Well-Platten ausgesiedelt. Nach Adhäsion über Nacht erfolgte die NP-Zugabe

und Inkubation für 4-6 Stunden. Anschließend wurde das Medium abgenommen und PBS zu den Zellen gegeben und die Platten zur Bestrahlung in der Bestrahlungskammer der gewünschten Strahlungsdosis ausgesetzt. Schließlich wurden die jeweiligen Assays durchgeführt, um die Reaktionen der Zellen auf NP-Inkubation und Bestrahlung zu untersuchen.

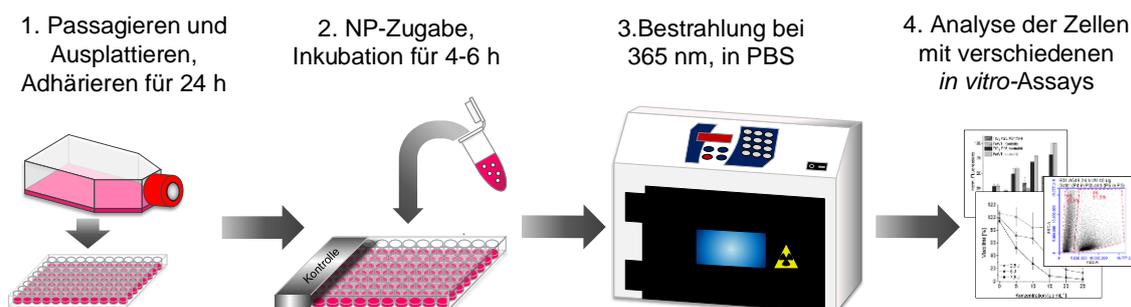


Abbildung 23: Typischer Ablauf eines Phototoxizitäts-Assays. Nach ausplattieren der Zellen in Well-Platten erfolgt die Inkubation mit den zu untersuchenden Nanomaterialien. Anschließend wird die NP-Lösung abgenommen und die Zellen in PBS im Bio-Link 365 bestrahlt. Es folgt die Analyse der Zellen mit den jeweilig gewählten Methoden. Als Kontrolle wurde immer ein Teil der Well-Platte mit Aluminiumfolie von der Strahlung abgeschirmt.

Mit dem etablierten Phototoxizitäts-Assay wurden im Laufe dieser Arbeit die Effekte von unterschiedlichen  $\text{TiO}_2$  NP auf verschiedene Zelllinien betrachtet.

### 3.2.2 Phototoxizität von dotierten $\text{TiO}_2$ P25 Nanopartikeln

Für die meisten Vorversuche wurde das Standardmaterial  $\text{TiO}_2$  P25 verwendet, welches als besonders photokatalytisch aktiv gilt. Um die Effizienz in Hinblick auf möglich pharmazeutische Anwendungen weiter zu steigern, wurden alternative  $\text{TiO}_2$ -Materialien getestet. Die Wahl fiel hierbei auf mit Eisen (Fe) veredelte und 2,5 % Wolframtrioxid ( $\text{WO}_3$ )-versetzte  $\text{TiO}_2$  P25 NP (folgend: FeWT NP), welche sich zuvor als besonders effizient und auch im vis-Bereich aktiv erwiesen hatten [156]. Es wurden zwei verschiedene Zelllinien und zwei Fe-Dotierungsgrade der FeWT NP getestet: 0,1 % Fe-veredelte  $\text{WO}_3/\text{TiO}_2$  P25 NP (0,1-FeWT) und 0,05 % Fe-veredelte  $\text{WO}_3/\text{TiO}_2$  P25 NP (0,05-FeWT). Hierbei stellte sich heraus, dass die FeWT NP allgemein ein sehr hohes phototoxisches Potential aufwiesen. So waren bereits nach Inkubation mit  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  0,1-FeWT NP  $46 \pm 5,5 \%$  der

HeLa-Zellen und  $37 \pm 1,5$  % der A549-Zellen abgetötet (Abbildung 24). In anderen Phototoxizitätsstudien wurden deutlich höhere NP-Konzentrationen verwendet [103,159].

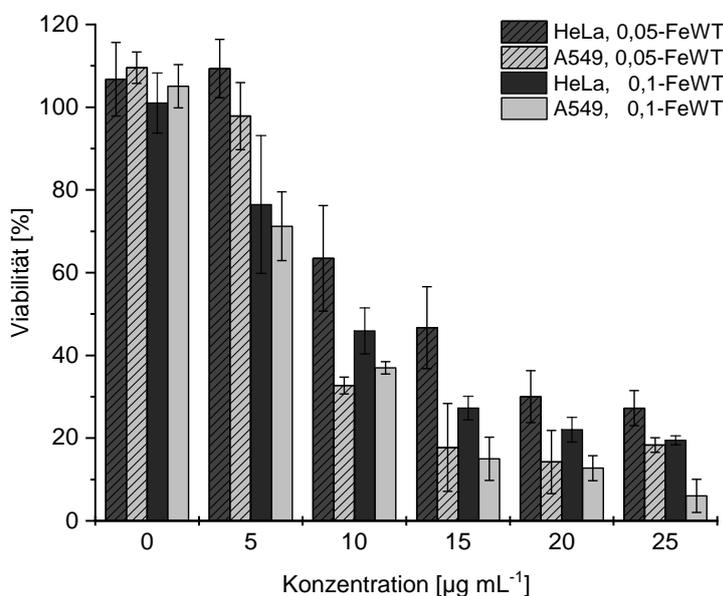


Abbildung 24: Phototoxizitätsbestimmung der verschieden-dotierten FeWT NP auf A549- und HeLa-Zellen. Bestrahlung bei  $5 \text{ J cm}^{-2}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte bezogen auf die Dunkelkontrolle bei  $0 \mu\text{g mL}^{-1}$  NP nach Dreifachmessung  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

Die 0,1-FeWT NP wirkten insgesamt phototoxischer als die 0,05-FeWT NP und wurden daher für die nachfolgenden Experimente weiterverwendet. In Folgendem sind mit der Abkürzung FeWT also die 0,1-FeWT gemeint.

Der direkte Vergleich zu unmodifizierten  $\text{TiO}_2$  P25 NP bestätigt die hohe Effizienz der FeWT, besonders bei den robusten A549-Zellen (Abbildung 25). Während bei den P25  $\text{TiO}_2$  NP die Viabilität der A549-Zellen bei der höchsten getesteten Konzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  nach UV-A-Bestrahlung nur um 30 % verringert wurde, sind bei Inkubation mit  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  nach der Bestrahlung bereits 75 % der metabolischen Aktivität eingestellt. Auch im Falle der HeLa-Zellen wurden je nach NP-Konzentration 20 % - 30 % mehr Zellen durch die FeWT NP abgetötet als durch die  $\text{TiO}_2$  P25 NP.

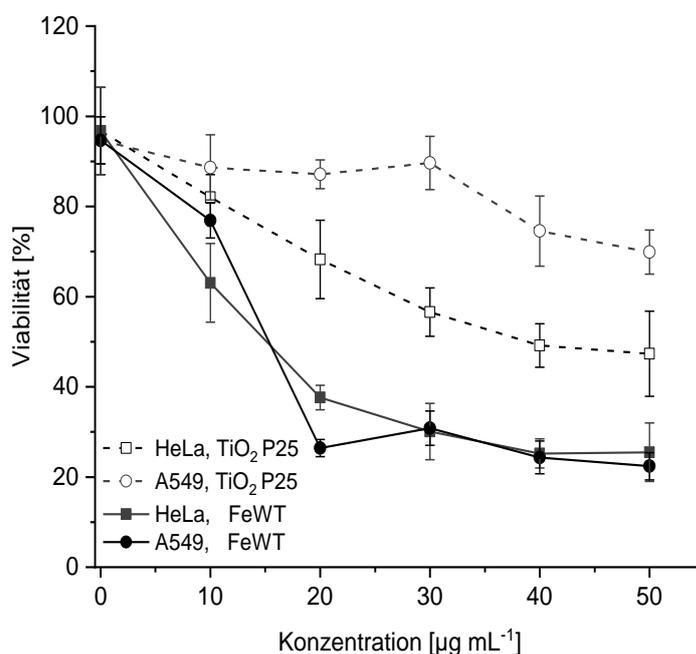


Abbildung 25: Phototoxizitäts-Assay von HeLa- und A549-Zellen inkubiert mit  $\text{TiO}_2$  P25 und FeWT NP, Bestrahlung  $7,5 \text{ J cm}^{-2}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte bezogen auf die Dunkelkontrolle bei  $0 \mu\text{g mL}^{-1}$  NP nach Dreifachmessung  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

Durch die hohe Phototoxizität der FeWT NP konnte nun auch der Zusammenhang der Phototoxizität von  $\text{TiO}_2$  NP mit der Strahlungsdosis genauer analysiert werden. Es wurde hierbei die phototoxische Wirkung von FeWT NP ( $0$ - $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) auf die Krebszellen bei drei verschiedenen Dosen ( $2,5$ ,  $5$  und  $7,5 \text{ J cm}^{-2}$ ) verglichen (Abbildung 26). Die Kontrolle bei ausbleibender Bestrahlung ( $0 \text{ J cm}^{-2}$ ) bestätigt, dass auch die FeWT NP wie schon die unmodifizierten  $\text{TiO}_2$  P25 NP keine Zytotoxizität ohne UV-A-Licht aufweisen.

Die Abhängigkeit des phototoxischen Effekts von der Strahlungsdosis ist klar zu erkennen. Bei einer Bestrahlung mit  $2,5 \text{ J cm}^{-2}$  wurde die Zellviabilität beider Zelllinien bei der höchsten getesteten NP-Konzentration ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) bereits um  $50 \%$  reduziert. Bei dieser Konzentration waren bei einer Intensität von  $5 \text{ J cm}^{-2}$  UV-A bereits über  $80 \%$  Viabilitätsverlust zu verzeichnen. Bei Bestrahlung mit  $7,5 \text{ J cm}^{-2}$  war bereits bei  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  eine nur noch  $10 \%$ ige Viabilität messbar.

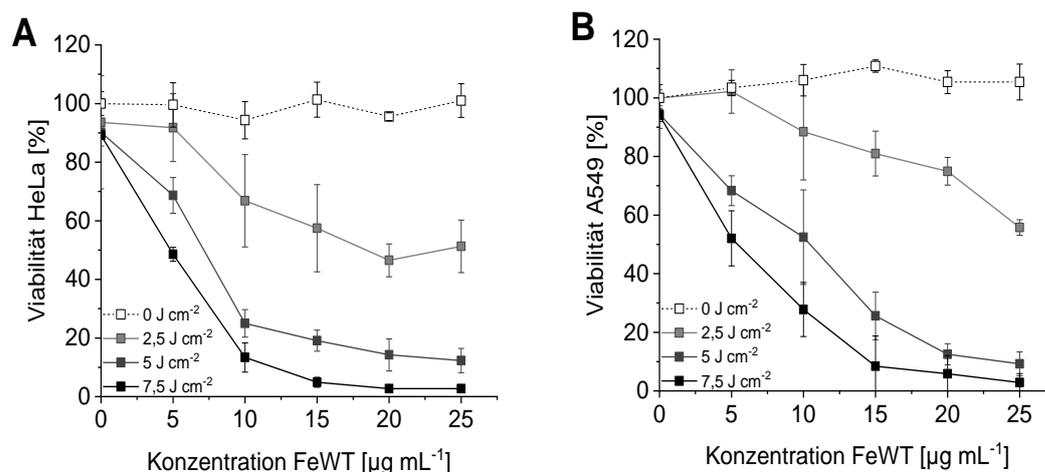


Abbildung 26: Vergleich der konzentrationsabhängigen phototoxischen Wirkung von FeWT NP bei verschiedenen UV-A-Strahlungsdosen, A) HeLa-Zellen; B) A549-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte bezogen auf die Dunkelkontrolle bei  $0 \mu\text{g mL}^{-1}$  NP nach Dreifachmessung  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

So liegt der  $\text{IC}_{50}$ -Wert (mittlere inhibitorische Konzentration) von FeWT NP nach Bestrahlung mit nur  $2,5 \text{ J cm}^{-2}$  bei A549-Zellen bei  $>25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , während er bei doppelt so hoher Dosis nur noch bei ca.  $8,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  liegt. Bei einer Strahlungsdosis von  $7,5 \text{ J cm}^{-2}$  ist die Viabilität schon bei ca.  $5,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  um 50 % reduziert (A.2.9). Bei den HeLa-Zellen betragen die  $\text{EC}_{50}$ -Werte  $16,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $6,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ , und  $4,9 \mu\text{g mL}^{-1}$  bei  $2,5 \text{ J cm}^{-2}$ ,  $5 \text{ J cm}^{-2}$  beziehungsweise  $7,5 \text{ J cm}^{-2}$ . Die zugehörigen Dosis-Wirkungskurven, die zur Berechnung dieser Werte herangezogen wurden, sind im Anhang aufgeführt (A.2.9 und A.3.3).

### 3.2.3 Vis-Aktivität dotierter TiO<sub>2</sub> P25 Nanopartikel

Im Laufe der Arbeit wurde ein deutlicher phototoxischer Effekt der untersuchten TiO<sub>2</sub> NP nach Bestrahlung mit UV-A-Licht (365 nm) auf verschiedene Zelltypen beobachtet. Da das UV-A-Licht nur eine sehr geringe Eindringtiefe ins Gewebe aufweist (Kapitel 2.4.1), wurden Möglichkeiten untersucht, andere Wellenlängen für die Generierung der reaktiven Sauerstoffspezies zu nutzen.

Es konnte bereits eine photokatalytische Aktivität der FeWT NP im sichtbaren Lichtspektrum für den Abbau von Acetaldehyd gezeigt werden [156]. Um eine mögliche Phototoxizität bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht zu untersuchen, wurden die HeLa-Zellen mit TiO<sub>2</sub> P25 NP und FeWT NP inkubiert und mit einem LED-Array (405 nm) bestrahlt. Hierbei ließ sich für die FeWT NP im Gegensatz zu den undotierten TiO<sub>2</sub> P25 NP ein deutlicher Viabilitätsverlust der Zellen von ca. 40 % bei einer Konzentration von 60 µg mL<sup>-1</sup> verzeichnen (Abbildung 27). Die TiO<sub>2</sub> P25 NP zeigten keinerlei Effekt bei einer Bestrahlung mit dieser Wellenlänge (siehe auch Abbildung 22, Kapitel 3.2.1). Dies verdeutlicht den Einfluss der Bandlücke des PCNP-Materials und der Wellenlänge der Bestrahlungsquelle auf die Phototoxizität.

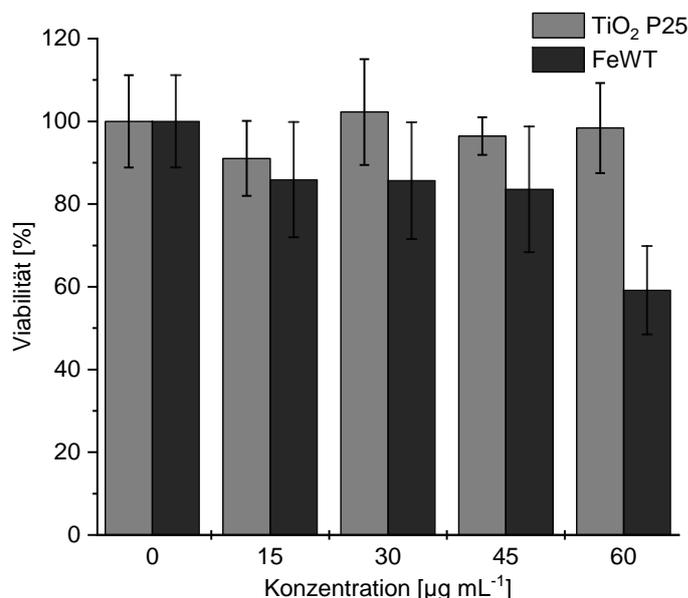


Abbildung 27: Viabilität von HeLa-Zellen nach Inkubation mit TiO<sub>2</sub> P25 und FeWT NP und Bestrahlung mit sichtbarem Licht (405 nm LED-Array). Dargestellt sind die Mittelwerte bezogen auf die Dunkelkontrolle bei 0 µg mL<sup>-1</sup> NP nach Dreifachmessung ± Standardabweichung, n ≥ 3.

Die Aktivität von  $\text{TiO}_2/\text{WO}_3$ -Nanokompositen im sichtbaren Lichtspektrum wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beobachtet [156,160]. Zurückgeführt wird diese Eigenschaft auf die geringere Bandlückenenergie der  $\text{WO}_3$  NP und die Unterschiedliche Positionierung der Leitungs- und Valenzbänder des  $\text{WO}_3$  und  $\text{TiO}_2$ . Mit einer Bandlücke von 2,8 eV kann  $\text{WO}_3$  bereits im sichtbaren Spektrum angeregt werden. Durch die höhere Negativität des Valenzbandes können die Löcher vom  $\text{WO}_3$  auf die des  $\text{TiO}_2$  übertragen werden, umgekehrt kann der Elektronenüberschuss des  $\text{TiO}_2$  auf das Leiterband des  $\text{WO}_3$  übergehen und schafft eine Elektronenfalle, sodass die Ladungsträger länger voneinander getrennt existieren können (Abbildung 28) [156,161]. Die Eisen-Ionen ermöglichen eine Multi-Elektronen-Reduktion und erhöhen nochmals die Mobilität der generierten Ladungsträger im System. Durch das Redoxpotential von 0,77 V der  $\text{Fe}^{3+}$  Ionen entstehen zusätzliche Elektronenfallen, welche die Delokalisierung der Elektronen aus dem Valenzband von  $\text{TiO}_2$  sowie  $\text{WO}_3$  auch bei sichtbarem Licht ermöglichen [156].

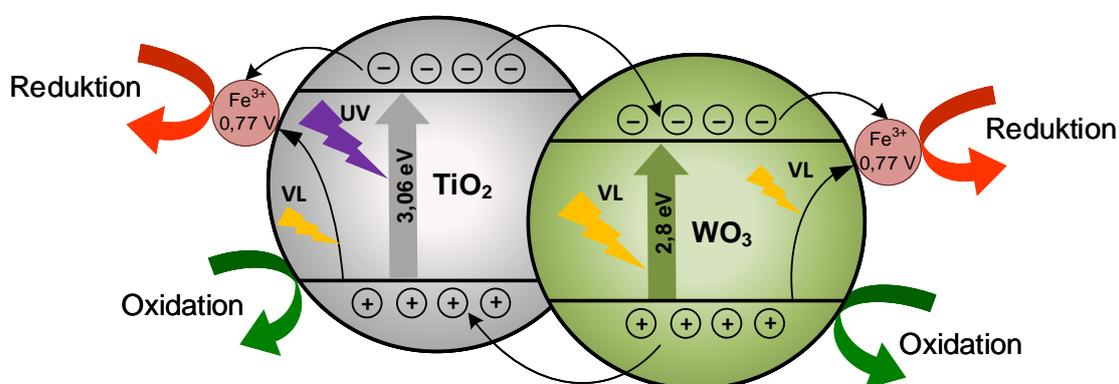


Abbildung 28: Vorgeschlagener Mechanismus der verwendeten FeWT NP für die erhöhte Aktivität im sichtbaren Lichtspektrum. VL = sichtbares Licht; UV = UV-A-Licht. Modifiziert nach [156].

Die Kombination von  $\text{TiO}_2$  NP mit anderen Materialien hat auch bei anderen Arbeitsgruppen bereits für eine erfolgreiche Abtötung von Krebszellen unter Bestrahlung von sichtbarem Licht geführt. Shang *et al.* zeigten, dass eine Kombination von  $\text{TiO}_2$  NP mit reduziertem Graphenoxid die Viabilität von HepG2-Zellen (menschliche Leberkrebszellen) nach Bestrahlung mit UV- und auch sichtbarem Licht verringerte [159]. Die Überlebensrate konnte auf bis zu 50 %

reduziert werden, allerdings bei relativ hohen Konzentrationen von  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Huang *et al.* zeigten, dass eine Dotierung von  $\text{TiO}_2$  NP mit Eisen zu einer 80 %igen PDT-Effizienz bei humanen Leukämiezellen unter Bestrahlung mit sichtbarem Licht (400-410 nm) führte [162].

### **3.2.4 Zusammenfassung zur Phototoxizität von $\text{TiO}_2$ Nanopartikeln**

Zur Untersuchung der Phototoxizität von  $\text{TiO}_2$  NP wurde ein *in vitro*-Assay etabliert, der die Analyse und den Vergleich Licht-induzierter Effekte von PCNP auf verschiedene Säugerzelllinien ermöglicht. Es wurde dabei festgestellt, dass viele Faktoren einen Einfluss auf die phototoxische Wirkung von  $\text{TiO}_2$  NP haben, beispielsweise NP-Konzentration, Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis, Wellenlänge, Zelllinie und das Nanomaterial selbst. Die mit Eisen und Wolfram modifizierten  $\text{TiO}_2$  P25 NP (FeWT NP) zeigten ein sehr hohes phototoxisches Potential auch gegenüber den robusteren Krebszelllinien HeLa und A549 und könnten sich somit für einen photodynamischen Therapieansatz eignen. Auch eine phototoxische Wirkung bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht konnte hier detektiert werden.

### 3.3 Untersuchung des Phototoxizitäts-Mechanismus

Um den genaueren Mechanismus der Phototoxizität zu untersuchen, und auch die erhöhte Toxizität der FeWT NP gegenüber der TiO<sub>2</sub> P25 NP zu analysieren, wurden zusätzlich zu den Viabilitäts-Assays weitere Methoden zur Zellanalyse herangezogen.

#### 3.3.1 Mikroskopische Analyse von dotieren TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln mit Krebszellen

Zunächst wurden die FeWT NP nach Inkubation mit den hier untersuchten Krebszellen mikroskopisch lokalisiert (Abbildung 29). Nach 12 h Inkubation bildeten sie Mikrometer-große Agglomerate, die mit den Zellen assoziiert erschienen. Dies konnte auch schon für die A549-Zellen nach Inkubation mit TiO<sub>2</sub> UV100 NP gezeigt werden (Kapitel 3.1.3). Sie bildeten jedoch keine so signifikante Anordnung um den Zellkern wie bei den Fibroblasten NIH/3T3. Die Agglomerate erschienen zufällig verteilt und eine eindeutige Unterscheidung zwischen Anlagerung und Aufnahme war mikroskopisch nicht möglich.

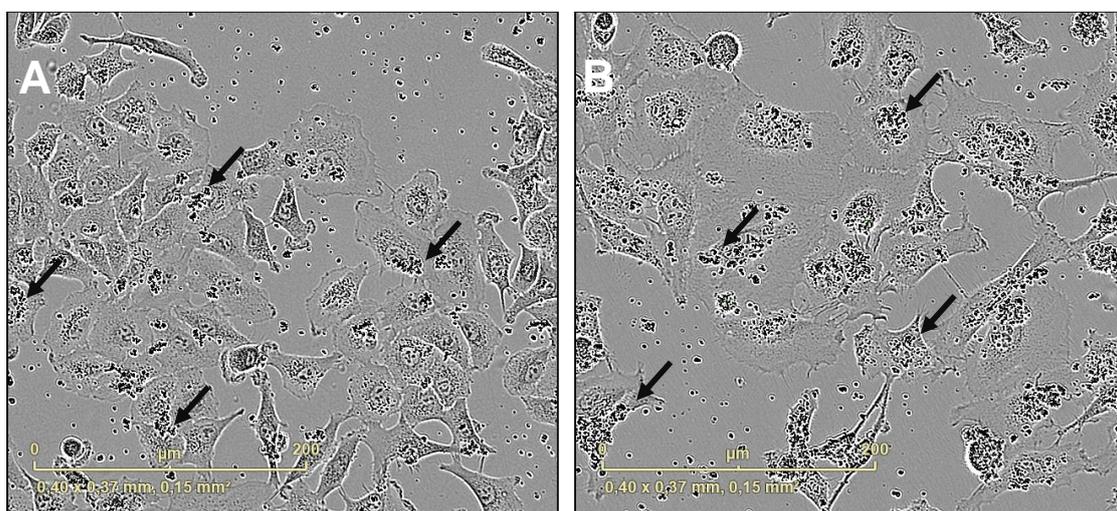


Abbildung 29: A549-Zellen (A) und HeLa-Zellen (B) nach 12 h Inkubation mit 10 µg mL FeWT NP, die Pfeile markieren NP-Agglomerate. Vergrößerung 20x, Phasenkontrast, IncuCyte™-Mikroskop.

Um sich einen besseren Eindruck zu verschaffen, wurden auch die HeLa-Zellen mittels Time-Lapse Mikroskopie nach Inkubation mit FeWT NP analysiert. Hierbei wurde deutlich, dass die FeWT NP durchaus eine hohe Affinität zu den Zellen zeigten

und nach 24 h deutlich weniger freie Agglomerate als zu Beginn der Aufnahmen sichtbar waren (Abbildung 30). Jedoch schienen die Agglomerate sich während der Zellwanderung und -Teilung oftmals wieder von den Zellen zu lösen, wie auch schon zuvor bei den A549-Zellen mit UV100 NP beobachtet (Kapitel 3.1.3). Besonders bei partiell abgelösten Zellen wurde die enge Anlagerung deutlich, da die Agglomerate sich als schwarze Punkte entlang der Zellmembran abzeichneten (Abbildung 30, schwarze Pfeile).

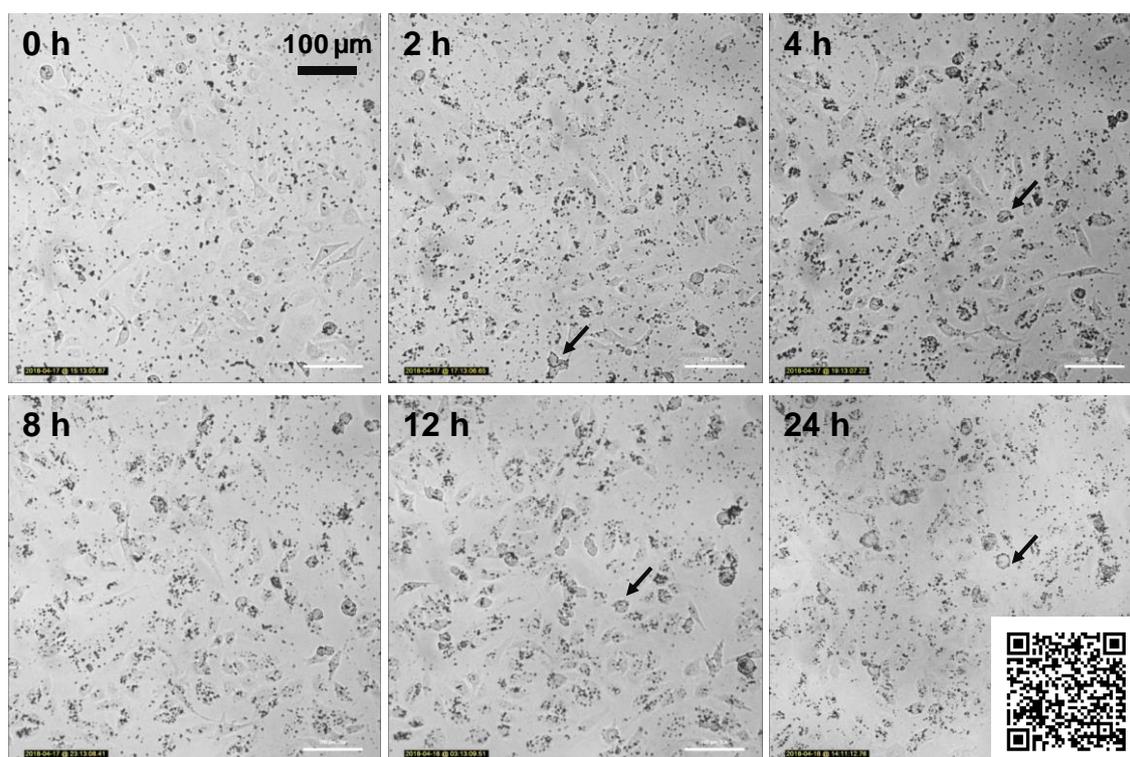


Abbildung 30: Time-Lapse Mikroskopie von HeLa-Zellen inkubiert mit FeWT NP, 20 x Vergrößerung. Die Pfeile markieren beispielhaft die Anlagerung der FeWT-Agglomerate an abgerundete Zellen bei der Zellteilung.

Wie auch schon für die A549 und NIH/3T3-Zellen wurden mittels der Time-Lapse Mikroskopie ein Video von den mit FeWT inkubierten HeLa-Zellen erstellt (A.3.1).

### 3.3.2 Detektion oxidativer Spezies

Wie bereits in Kapitel 2.3.3 erläutert, wird allgemein als Hauptgrund für die Phototoxizität von  $\text{TiO}_2$  NP die photokatalytische Generierung reaktiver Sauerstoffspezies angeführt. Um dies zu überprüfen, wurde das Substrat

2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) vor der Bestrahlung zu den Zellen gegeben. Nach Aufnahme in die Zellen werden die Acetat-Gruppen durch interzelluläre Esterasen abgespalten und das Produkt ist anfällig gegenüber oxidativen Spezies. Durch Oxidation entsteht das grün fluoreszierende 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF), welches mit dem Plattenleser oder Durchflusszytometer detektiert werden kann (A.2.10).

Die Verwendung von H<sub>2</sub>DCF-DA ist zwar teilweise umstritten, da die Sauerstoffspezies nicht spezifiziert werden können und das Substrat auch durch zelleigene oxidative Spezies oder Enzyme oxidiert werden kann. Bei Berücksichtigung von Kontrollexperimenten stellt der Assay jedoch einen eindeutigen Indikator für oxidativen Stress dar [163]. Um möglichst eine Analyse von intrazellulär gebildeten ROS in lebenden Zellen zu gewährleisten, wurden geringe NP-Konzentrationen (maximal 7,5 µg mL<sup>-1</sup>) und eine geringe Bestrahlungsdosis gewählt (3,5 J cm<sup>-2</sup>). Die relativ geringe UV-Dosis soll zudem ein Ausbleichen des entstehenden Fluoreszenzfarbstoffs verhindern.

Das Fluoreszenzsignal steht in diesem Fall in einem eindeutigen Zusammenhang mit der Konzentration der TiO<sub>2</sub> NP sowie der Bestrahlung mit UV-A-Licht. Auch ohne NP-Inkubation stieg das Signal nach Bestrahlung mit nur 3,5 J cm<sup>-2</sup> bereits deutlich an. Dies war zu erwarten, da UV-A-Strahlung oxidativen Stress in Zellen auslösen kann [164]. Die Zellen, welche zuvor mit TiO<sub>2</sub> NP inkubiert wurden, wiesen eine stärkere Fluoreszenz auf, welche in Abhängigkeit mit der Konzentration zunimmt (Abbildung 31). Der Unterschied zwischen bestrahlten und nicht-bestrahlten Zellen ist hierbei eindeutig zu erkennen. Auffällig ist der Unterschied zwischen den unmodifizierten TiO<sub>2</sub> P25 und den FeWT NP. Während die TiO<sub>2</sub> P25 NP ohne Bestrahlung mehr oxidativen Stress auslösten, waren die Signale nach UV-Einwirkung bei den FeWT NP vergleichsweise höher.

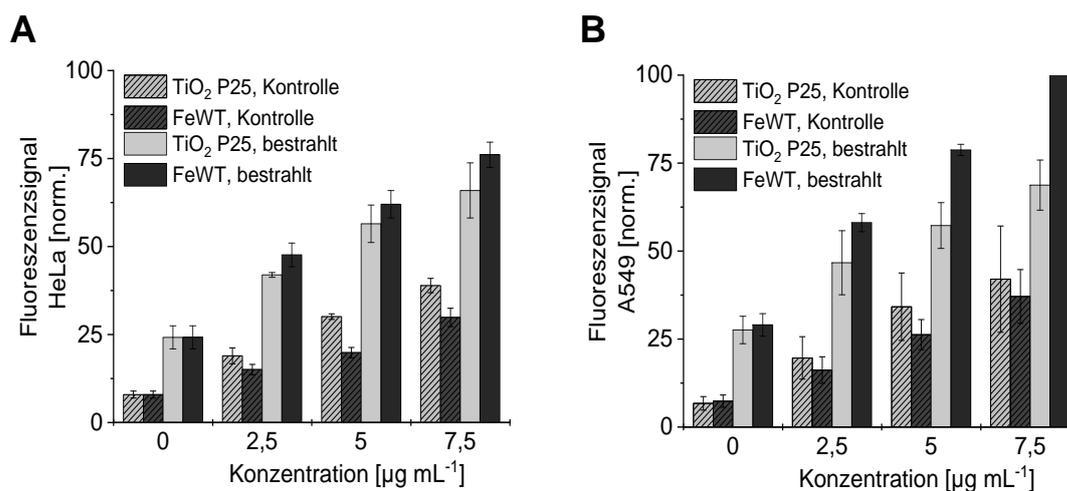


Abbildung 31: Fluoreszenzsignale von HeLa- (A) und A549- (B) Zellen nach Inkubation mit H<sub>2</sub>DCF-DA und Bestrahlung bei 3,5 J cm<sup>-2</sup>; ausgelesen mit dem Plattenlesegerät bei 488<sub>Ex</sub>/538<sub>Em</sub> nm, normiert auf den höchsten Fluoreszenzwert (A549-Zellen 7,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n $\geq$ 3.

Um einen besseren Vergleich der Zelllinien und der verschiedenen NPs zu ermöglichen, wurden die Daten als Differenz zur unbestrahlten Kontrolle neu aufbereitet (Abbildung 32). Insgesamt konnten für die A549-Zellen höhere Signal-Differenzen im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden (ca. 15 % höher bei Inkubation mit TiO<sub>2</sub> P25 NP, ca. 30 % höher bei FeWT NP). Außerdem bestätigt diese Betrachtung die eindeutig erhöhten Signale für die FeWT NP im Vergleich zu den TiO<sub>2</sub> P25 NP. Hier zeigt der Vergleich zur Kontrolle eine doppelt so hohe Signaländerung der mit FeWT NP inkubierten A549-Zellen (bei 7,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

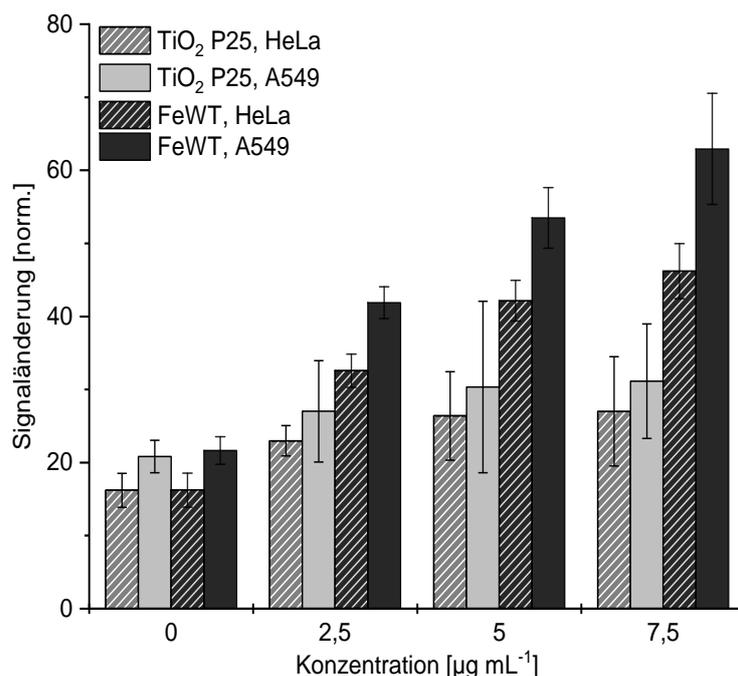


Abbildung 32: Differenzen der Fluoreszenzsignale nach Generierung von DCF durch ROS nach NP-Inkubation und Bestrahlung in a) HeLa und b) A549-Zellen; Dargestellt ist die normierte Signaländerung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

Die erhöhten Signale im Vergleich der FeWT NP zu den TiO<sub>2</sub> P25 NP lassen darauf schließen, dass hier mehr intrazelluläre ROS gebildet wurden. Dies kann entweder durch eine erhöhte NP-Aufnahme in die Zellen oder auch eine allgemein höhere photokatalytische Aktivität der FeWT NP begründet werden.

Somit konnte mittels H<sub>2</sub>DCF-DA-Assay oxidativer Stress nach Inkubation mit TiO<sub>2</sub> NP und Bestrahlung nachgewiesen werden. Auch ohne die Bestrahlung mit UV-A-Licht wurde eine erhöhte Menge an ROS detektiert. Diese Beobachtung wurde von anderen Arbeitsgruppen bereits berichtet [79,165]. Selbst ohne eine Aktivierung photokatalytischer Prozesse können NP oxidativen Stress auslösen, indem sie beispielsweise als Elektronendonoren oder -Akzeptoren dienen oder mit Proteinen interagieren, die für die Erhaltung des zellulären Redox-Gleichgewichts zuständig sind (Kapitel 2.3.2). Die Erhöhung der ROS-Level nach Bestrahlung der Zellen ist jedoch signifikant. Da der Assay speziell interzelluläre ROS detektiert, kann davon ausgegangen werden, dass zumindest ein Teil der NP von den Zellen aufgenommen wird und hier ROS bildet. Um den phototoxischen Mechanismus weiter aufzuklären wurden verschiedene zelluläre Vorgänge untersucht.

### 3.3.3 Untersuchung der Membranintegrität

Die Zellmembran spielt eine zentrale Rolle in der Zellphysiologie und ist für den Schutz, die Aufrechterhaltung des intrazellulären Milieus, sowie jegliche morphologischen Veränderungen zuständig. Zudem laufen über sie viele Signalkaskaden und auch der In- und Export von Molekülen und Ionen ab. Sowohl interzelluläre als auch extrazelluläre ROS können die Membranintegrität von Säugerzellen stören und so zu einer verringerten Zellviabilität führen (Kapitel 2.3.3). Auch eine direkte Reaktion der Membranbestandteile an der NP-Oberfläche ist nicht ausgeschlossen. Die Membranintegrität kann durch die Vermessung der Aktivität der L-Lactat-Dehydrogenase im Überstand analysiert werden. Bei Schädigung der Membran wird diese ins Kulturmedium freigesetzt und kann dort mithilfe eines fluorometrischen Assays nachgewiesen werden (LDH-Assay, A.2.11).

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Freisetzung von LDH nach Inkubation mit TiO<sub>2</sub> NP und nachfolgender Bestrahlung untersucht. Es wurden hierbei wieder die beiden Krebszelllinien A549 und HeLa sowie die verwendeten NP TiO<sub>2</sub> P25 und FeWT verglichen. Die Ergebnisse zeigen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen NP Konzentration, UV-A-Bestrahlung und LDH-Freisetzung bei beiden Zelllinien. Die Signaländerung ist dabei nach Inkubation mit FeWT NP und anschließender Bestrahlung deutlich signifikanter als bei den herkömmlichen TiO<sub>2</sub> P25 NP (Abbildung 33). Bei Inkubation mit 10 µg mL<sup>-1</sup> FeWT NP ist die Menge an freigesetzter LDH im Medium um 86 % (A549) beziehungsweise 63 % (HeLa) nach Bestrahlung mit UV-A-Licht gestiegen. Bei Inkubation mit unmodifizierten TiO<sub>2</sub> P25 NP ist bei dieser Konzentration kein eindeutiger Anstieg zu verzeichnen. Bei einer Konzentration von 15 µg mL<sup>-1</sup> ist die Signaländerung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle der A549-Zellen nach Inkubation mit FeWT fast 5-mal so hoch (116 % bei FeWT und 24 % bei TiO<sub>2</sub> P25). Auch ohne die Inkubation mit TiO<sub>2</sub> NP wird bei Bestrahlung LDH freigesetzt (0 µg mL<sup>-1</sup>), jedoch ist der Anstieg nach Kombination mit FeWT NP eindeutig.

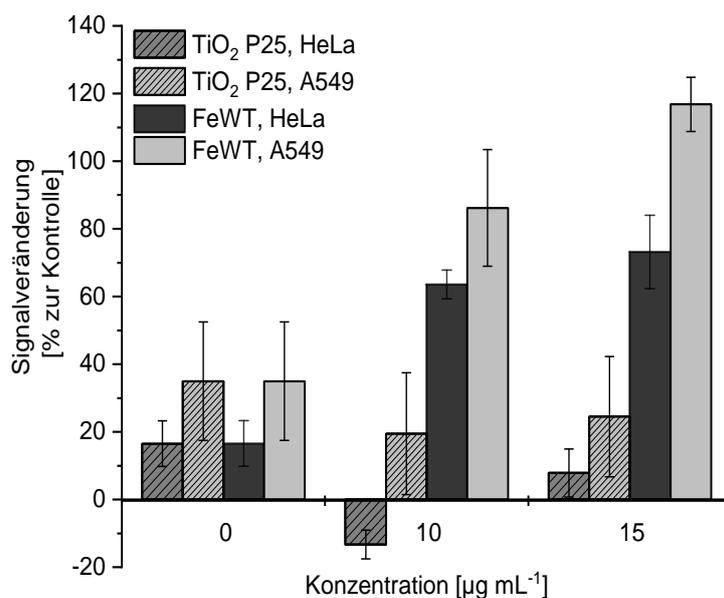


Abbildung 33: Signalveränderung der Fluoreszenzsignale im LDH-Assay von HeLa und A549 inkubiert mit TiO<sub>2</sub> NP im Vergleich bestrahlt/unbestrahlt (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

Auch Yin *et al.* beobachteten eine erhöhte Freisetzung der LDH bei mit TiO<sub>2</sub> P25 NP inkubierten und UV-A-bestrahlten HaCaT-Keratinocyten [81]. Die höhere LDH-Freisetzung durch die FeWT NP kann auf die erhöhte photokatalytische Aktivität oder aber eine stärkere Anlagerung an die Zellen hinweisen. Es ist zu beachten, dass die Membran sowohl durch direkten Angriff von ROS auf die Membran-bildenden Lipide und Proteine als auch im Zuge des nekrotischen Zelltods durch eventuelle toxische Effekte geschädigt werden kann.

Ähnlich wie im H<sub>2</sub>DCF-DA Assay gezeigt, liefern auch beim LDH-Assay die A549-Zellen die höheren Signale. Dies lässt auf eine stärkere Schädigung der A549-Zellen schließen.

### 3.3.4 Apoptose-Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie

Um den Mechanismus des Zelltodes in Folge der phototoxischen Effekte genauer zu untersuchen, wurden die Zellen hinsichtlich apoptotischer oder nekrotischer Vorgänge untersucht.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht einen schnellen Überblick über den Zustand der Zellpopulation nach Inkubation mit entsprechenden Fluoreszenzmarkern.

Hierfür wurden A549-Zellen 24 h nach der Bestrahlung mit den Apoptose-Marker Annexin V und dem Nekrose-Marker 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) angefärbt und im FCM vermessen (A.2.12). Annexin V detektiert die Delokalisierung von Phosphatidylserin an die Außenseite der Membran, eine Folge der Apoptose. 7-AAD kann nur in bereits tote Zellen mit geschädigter Membran eindringen und fluoresziert rot nach Bindung an intrazelluläre DNA.

Schon anhand der Streuung ist erkennbar, dass nach Inkubation mit FeWT NP und Bestrahlung ca. die Hälfte der Zellen morphologische Veränderungen besonders bezüglich des Vorwärtsstreulichts aufweisen (Abbildung 34A). Betrachtet man die roten und grünen Fluoreszenzsignale, wird deutlich, dass sich zwei Populationen gebildet haben. Im Gegensatz zu den Kontrollen ohne NP-Inkubation ist ein insgesamt höheres Fluoreszenzsignal detektiert worden. Nach Inkubation mit  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  FeWT NP und Bestrahlung weisen ca. 37 % eine starke grüne Fluoreszenz auf (Abbildung 34B), ca. 44 % leuchten stark rot (Abbildung 34C). Dies lässt darauf schließen, dass apoptotische Vorgänge in der Zelle aktiviert wurden, jedoch auch die Zellmembran vieler Zellen schon nicht mehr intakt war.

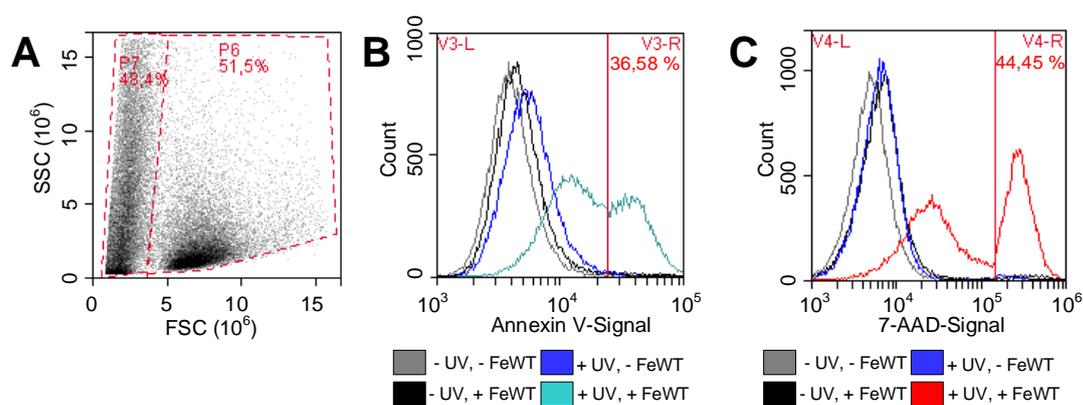


Abbildung 34: Ergebnisse des Apoptose-Assays mittels Durchflusszytometrie. A549-Zellen wurden zuvor nach Inkubation mit  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  FeWT NP mit  $7,5 \text{ J cm}^{-2}$  bestrahlt und nach 24 h mittels 7-AAD und Annexin V angefärbt. A: Lichtstreuung der Zellen. B: Annexin V-Signal, C: 7-AAD-Signal.

Es konnte mittels des Apoptose-Assays außerdem bestätigt werden, dass die FeWT NP auch bei hohen Konzentrationen ohne die Einwirkung von UV-A-Licht keine toxischen Effekte bei A549-Zellen auslösen. Hier wurde weder eine apoptotische noch eine nekrotische Population detektiert (vgl. - UV, + FeWT).

### 3.3.5 Lebend-Zell-Analyse mittels IncuCyte™

Um den genauen Ablauf des Zelltodes zu analysieren, wurden die Zellen mittels des Lebend-Zell-Analyse-Systems IncuCyte™ (Essen Bioscience, Sartorius) hinsichtlich morphologischer Veränderungen sowie Apoptose und Nekrose untersucht. Das System basiert auf einer dynamischen Bildanalyse, welche die automatisch generierten mikroskopischen Aufnahmen der Zellen auf zuvor festgelegte Merkmale untersucht und so Aussagen über aktive biologische Prozesse erlaubt [166,167]. Durch Einbau in den Inkubator ermöglicht das Gerät minimal invasive Messungen in einer physiologischen Umgebung. Die Zellen werden über mikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast und mit rotem und grünem Fluoreszenzkanal analysiert. Die Software dient der qualitativen sowie quantitativen Auswertung der entstandenen Bilder über sogenannte Masken, welche für die jeweiligen Zwecke selbst angepasst wurden. So können morphologische Veränderungen wie auch Fluoreszenzsignale detektiert werden.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde vor allem der Vorgang der Apoptose und Nekrose von A549- und HeLa-Zellen nach Inkubation mit TiO<sub>2</sub> P25 und FeWT NP und Bestrahlung mit Hilfe von entsprechenden Fluoreszenz-Reagenzien beobachtet. Zur Detektion der Apoptose wurden zwei Farbstoffe verwendet, die den programmierten Zelltod nach unterschiedlichen Prinzipien nachweisen. Das *IncuCyte™ Caspase 3/7 green reagent* detektiert die Proteine Caspase-3 und Caspase-7, die nach Einleitung der Apoptose aktiviert werden. Außerdem wurde wie schon bei der Durchflusszytometrie die Translokation von Phosphatidylserin an die Membranaußenseite mit Annexin V nachgewiesen (*IncuCyte™ Annexin V green reagent*). Zusätzlich wurde das Zytotoxizitätsreagenz (*IncuCyte™ Cytotox red reagent*) als Indikator für die Nekrose verwendet. Ähnlich wie Propidiumiodid und 7-AAD dringt der Farbstoff in Zellen ein, die bereits ihre Membranintegrität verloren haben und interkaliert in die DNA-Stränge toter Zellen. In Abbildung 35 ist ein typischer Ablauf eines mittels IncuCyte™ durchgeführten Versuchs dargestellt. Die Zellen wurden je nach Experiment in 96- oder 48-Well-Platten ausgesiedelt und nach Adhäsion mit den NP-Lösungen und den Apoptose- und Zytotoxizitätsreagenzien für 4-6 h inkubiert. Danach wurden die Zellen für die

Bestrahlung aus dem Inkubator genommen und in der Bestrahlungskammer bestrahlt. Da sich zuvor eine moderate Bestrahlungsdosis von  $5 \text{ J cm}^{-2}$  als ausreichend erwiesen hatte um die Krebszellen effizient mit FeWT NP abzutöten, (Kapitel 3.2.2., Abbildung 26) wurde diese Dosis gewählt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern und den alleine durch die Bestrahlung verursachten Zellschaden zu minimieren. Es wurden stündlich mikroskopische Aufnahmen der einzelnen Wells gemacht. Dabei wurden 4 Bilder pro Well aufgenommen und anschließend mit der Software analysiert.

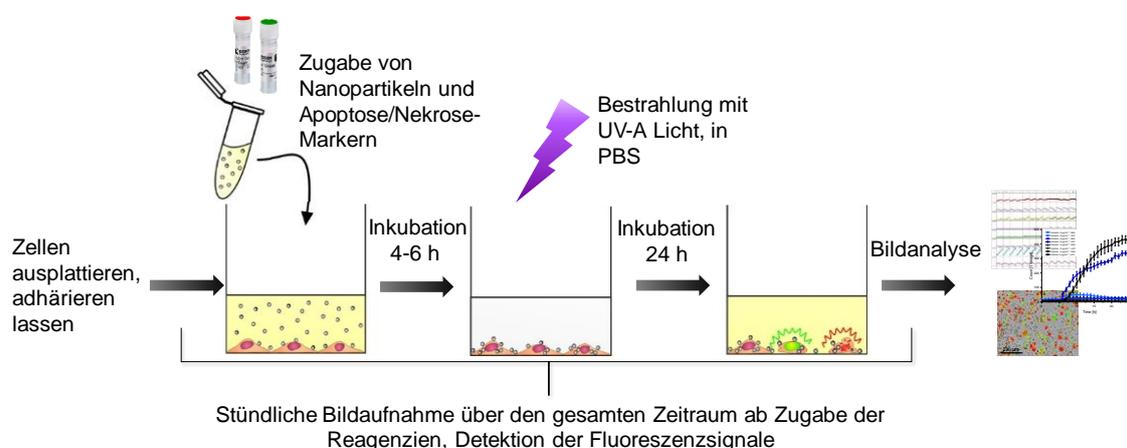


Abbildung 35: Ablauf eines typischen IncuCyte™ Experiments.

Mittels der Lebend-Zell-Analyse konnten die Reaktionen der Zelllinien A549 und HeLa auf die Inkubation mit  $\text{TiO}_2$  NP und anschließende UV-A-Bestrahlung genau beobachtet werden. Der Effekt der Bestrahlung war bei beiden Zelllinien direkt sichtbar. Beispielfhaft sind hier die A549-Zellen gezeigt. Die Zellen erschienen im Phasenkontrast nach der Inkubation mit FeWT NP und anschließender Bestrahlung mit  $5 \text{ J cm}^{-2}$  deutlich abgerundet (Abbildung 36 und Abbildung 37). Auch die Fluoreszenzmarker bestätigten, dass sowohl Apoptose als auch Nekrose stattfand. Schon bei Inkubation mit nur  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  FeWT NP waren direkt nach der Bestrahlung Fluoreszenzsignale detektierbar (Abbildung 36).

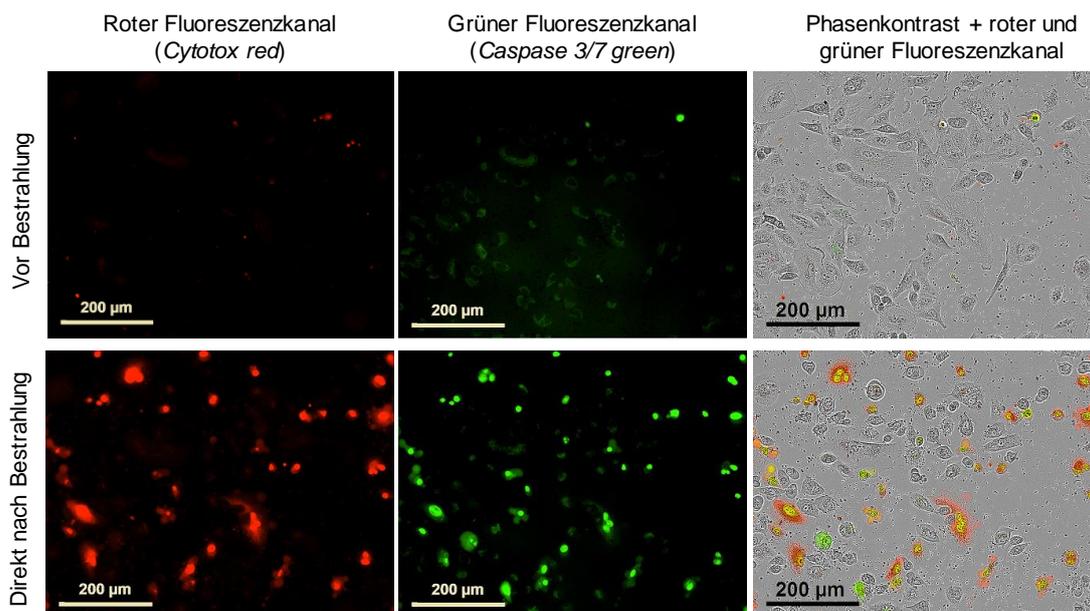


Abbildung 36: Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen von A549-Zellen inkubiert mit  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  FeWT NP und *Caspase 3/7 green* sowie *Cytotox red*-Reagenzien; direkt vor und nach der Bestrahlung mit  $5 \text{ J cm}^{-2}$ .

Die Zellen wurden nach der Bestrahlung weitere 12-24 h beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass im Laufe der Zeit immer mehr Zellen als apoptotisch oder nekrotisch markiert wurden. Oft erschienen die Zellen direkt nach der Bestrahlung bereits grün und färbten sich im Laufe der Zeit rot an (Abbildung 37). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Apoptose zuerst einsetzte und nach Verlust der Membranintegrität auch der Zellkern angefärbt wurde. Bei den Kontrollen ohne NP wurden nur vereinzelte Signale detektiert.

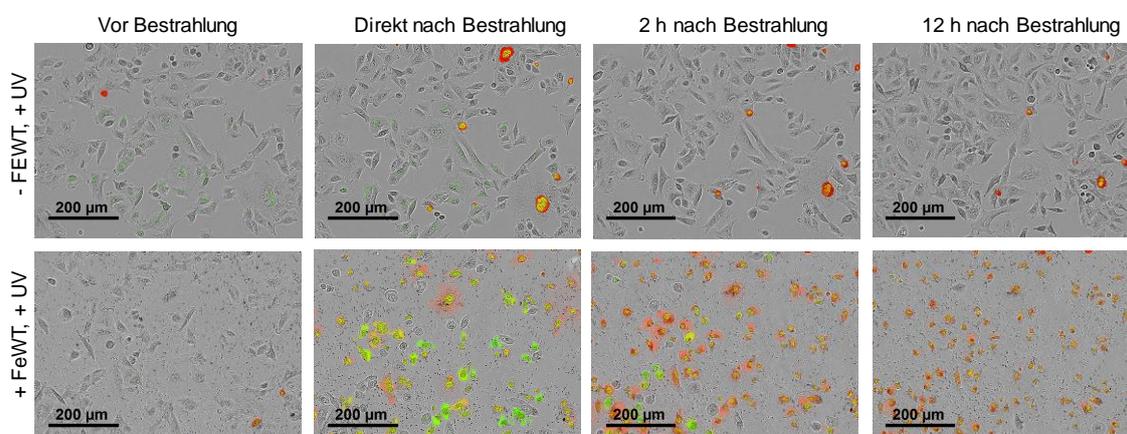


Abbildung 37: A549-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Grüne Fluoreszenz: *Caspase 3/7 green Reagent*; rote Fluoreszenz: *Cytotox red Reagent*. Mit und ohne Inkubation mit FeWT NP ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Bestrahlung:  $5 \text{ J cm}^{-2}$ .

Auch die Ergebnisse der Bildauswertung mit der zugehörigen Software bestätigten die Beobachtungen. Die Anzahl der als grün fluoreszierend detektierten Zellen pro Bild stieg direkt nach der Bestrahlung an und nahm in den ersten 6 h nach Bestrahlung zu (bei Inkubation mit FeWT NP). Danach stagnierte das Caspase-Signal und stieg nicht weiter an. Aus den Mikroskopaufnahmen wurde ersichtlich, dass oftmals ab einem bestimmten Zeitpunkt 90-100 % der sich im Bild befindenden Zellen fluoreszierten und eine weitere Signalzunahme dadurch nicht mehr möglich war (siehe auch Abbildung 37). Die Nekrose-Signale erzeugt durch das *Cytotox red*-Reagenz stiegen etwas langsamer an, nahmen jedoch auch nach 10 h noch weiter zu und erreichten schließlich dieselbe Anzahl wie die Apoptose-Signale. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die vorher grün fluoreszierenden Zellen nach eingetretenem Zelltod und damit verbundenen Verlust der Membranintegrität auch als nekrotisch markiert werden. Besonders auffällig ist auch hier wieder der deutliche Unterschied zwischen FeWT NP und unmodifizierten TiO<sub>2</sub> P25 NP (beispielhaft für A549-Zellen gezeigt; Abbildung 38A). Zwar nimmt auch hier das Signal direkt nach der Bestrahlung zu, ist jedoch nur geringfügig höher als das der UV-A-Kontrolle. Es wurde außerdem festgestellt, dass die HeLa-Zellen sensitiver auf die UV-A-Bestrahlung reagieren (Abbildung 38B). Auch ohne die Inkubation mit NP waren hier die Apoptose- und Nekrose-Signale, im Gegensatz zu den A549-Zellen, deutlich erhöht.

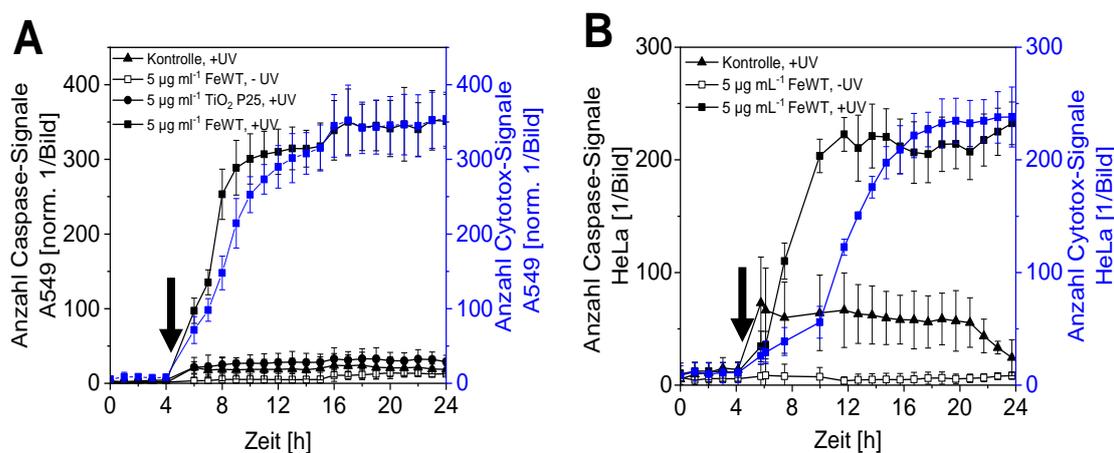


Abbildung 38: Anzahl der Fluoreszenzsignale generiert durch die Apoptose- (*Caspase 3/7 green*) und Nekrose-Detektionsreagenzien (*Cytotox red*); A) A549-Zellen; B) HeLa-Zellen. Pfeile markieren den Zeitpunkt der Bestrahlung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

Die Versuche mit dem zweiten Apoptose-Marker Annexin V bestätigen die zuvor erhaltenen Ergebnisse. Auch hier ist ein deutlicher Anstieg von Nekrose- und Apoptose-Signalen nach der Bestrahlung bei mit FeWT NP inkubierten Krebszellen detektiert worden (Abbildung 39). Die HeLa-Zellen zeigten wie schon zuvor eine erhöhte Signalintensität bei Bestrahlung mit UV-A-Licht auch ohne vorherige Inkubation mit TiO<sub>2</sub> NP (Abbildung 39 B). In dem hier dargestellten Experiment war von Beginn an eine relativ hohe Anzahl an HeLa-Zellen nicht mehr adhärirt und wurden als apoptotisch und nekrotisch markiert (Zeitpunkt 0-4 h). Im Zuge der Bestrahlung in PBS wurden vermutlich viele dieser Zellen beim Austausch der Inkubationslösung aus den Wells entfernt, was die plötzliche Signalabnahme direkt nach der Bestrahlung erklärt (Zeitpunkt 5,5 h).

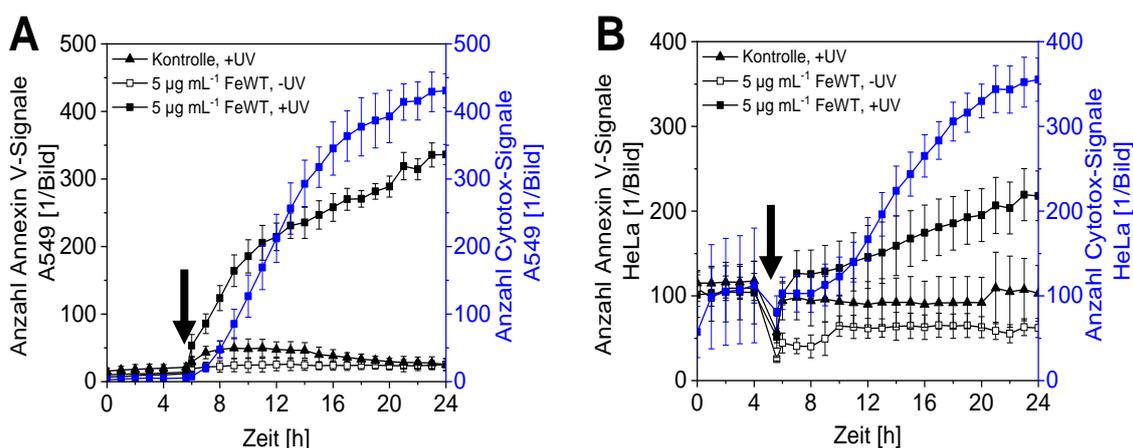


Abbildung 39: Anzahl der Fluoreszenzsignale generiert durch die Apoptose- (*Annexin V green*) und Nekrose-Detektionsreagenzien (*Cytotox red*); A) A549-Zellen; B) HeLa-Zellen. Pfeile markieren den Zeitpunkt der Bestrahlung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

Auffällig ist außerdem, dass die Anzahl der mit Annexin V gefärbten Zellen bei beiden Zelllinien deutlich langsamer ansteigt, als in den Experimenten mit dem Caspase-3/7-Detektionsreagenz. Die Anzahl der mit *Cytotox red* als nekrotisch angefärbten Zellen übersteigt die Anzahl der apoptotischen Zellen bereits 6 h (HeLa) bzw. 7 h (A549) Stunden nach der Bestrahlung und bleibt erst ca. 15 h nach der Bestrahlung konstant. Dies liegt vermutlich daran, dass die Delokalisierung des Phosphatidylserins später erfolgt als die Aktivierung der Caspasen 3 und 7. Ein weiterer möglicher Grund für diese Unterschiede zwischen den beiden Apoptose-Färbungen ist die unterschiedliche Lokalisation der Marker und die damit

einhergehenden Unterschiede in der Bildanalyse. Das Annexin V-Signal ist vergleichsweise großflächiger durch Färbung der Membran und macht eine eindeutige Quantifizierung durch die Software schwieriger. Für die hier verwendete Quantifizierungsmethode mittels Bildanalyse ist die Detektion der Caspase-3/7-Aktivierung die geeignetere Methode. Als allgemeiner Indikator für die Apoptose ist die Detektion des delokalisierten Phosphatidylserins durch Annexin V jedoch gut geeignet.

Die Einleitung des programmierten Zelltods durch eine Kombination von TiO<sub>2</sub> NP und UV-A-Bestrahlung wurde auch von anderen beobachtet. Yoo *et al.* ermittelten beispielsweise eine hohe Anzahl von apoptotischen Zellen mittels Annexin V/Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie nach Inkubation mit TiO<sub>2</sub> P25 und anschließender Bestrahlung von Chang-Zellen. Hier wurde ebenfalls eine erhöhte Level an Caspase-Proteinen dokumentiert [168].

### **3.3.6 Zusammenfassung zum Phototoxizitäts-Mechanismus**

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche sollten zu einem besseren Verständnis der Phototoxizität von TiO<sub>2</sub> NP auf Säugerzellen beitragen. Es konnte bestätigt werden, dass die TiO<sub>2</sub> NP nach UV-A-Bestrahlung oxidativen Stress auslösen, die Membranintegrität schädigen, und Apoptose induzieren. Hierbei waren die FeWT NP immer potenter als die TiO<sub>2</sub> P25 NP. Mittels Lebend-Zell-Analyse konnte beobachtet werden, dass die Viabilität der Zellen direkt nach der Bestrahlung abnimmt und morphologische Veränderungen sichtbar werden. Sowohl die Delokalisierung von Phosphatidylserin als auch die erhöhte Expression der Apoptosemarker Caspase-3 und -7 wurde fluorometrisch detektiert. Es wurden jedoch oftmals die Zellkerne der betroffenen Zellen zeitnah zusätzlich mit dem verwendeten Nekrose-Detektionsfarbstoff angefärbt, was darauf schließen lässt, dass die Membranintegrität schon sehr früh durch phototoxische Effekte zerstört wird. Dies könnte auf einen direkten Angriff der reaktiven Sauerstoffspezies oder eine direkte Reaktion der Membranlipide mit den Elektronen-Loch-Paaren der NP hinweisen.

### 3.4 Synthese, Charakterisierung und Phototoxizität von Syl3C-PAA@TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln

Um das Potential der TiO<sub>2</sub> NP für die photodynamische Therapie zu erhöhen, sollte die Oberfläche der NP mit Targeting-Molekülen funktionalisiert werden. Dies würde im Idealfall eine spezifische und effiziente Aufnahme der NP in Krebszellen ermöglichen. Es wurden sowohl die kommerziell erhältlichen TiO<sub>2</sub> P25 NP als auch die FeWT NP im Zuge dieser Arbeit modifiziert.

#### 3.4.1 Beschichtung von TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln mit Polyacrylsäure

Um die Kopplung der Targeting-Moleküle auf die Oberfläche der TiO<sub>2</sub> NP zu ermöglichen, wurde diese mit Carboxylgruppen funktionalisiert. Dafür wurde Polyacrylsäure auf die Oberfläche adsorbiert. Polyacrylsäure (*polyacrylic acid*, PAA) besitzt eine große Anzahl an Carboxylgruppen und kann in einem einfachen Prozess auf die Oberfläche der TiO<sub>2</sub> NP gebracht werden (A.2.13).

Der Erfolg einer solchen Modifikation kann direkt optisch bestätigt werden, da die Anlagerung von PAA die Stabilität von TiO<sub>2</sub> NP-Suspensionen in Wasser erhöht und die starke Sedimentation der NP-Agglomerate verhindert [169,170]. Die Unterschiede im Sedimentationsverhalten von modifizierten (PAA@TiO<sub>2</sub> P25) und nicht modifizierten TiO<sub>2</sub> P25 NP sind in der folgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 40).

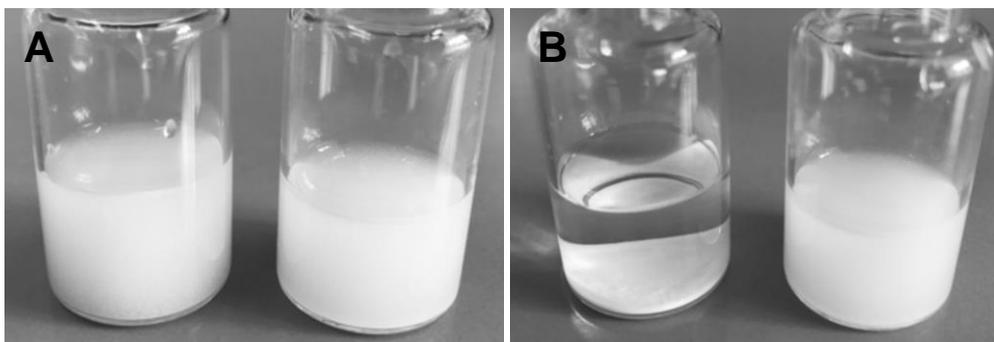


Abbildung 40: Sedimentation von unmodifizierten TiO<sub>2</sub> P25 NP und PAA@P25 NP in H<sub>2</sub>O. A) direkt nach Ultraschallbehandlung; B) 24 h nach Herstellung der Lösung. Jeweils rechts im Bild befindet sich die Probe mit PAA@TiO<sub>2</sub> P25 NP, links die unmodifizierten TiO<sub>2</sub> P25 NP; nach [171].

Um die photokatalytische Aktivität der synthetisierten PAA@TiO<sub>2</sub> P25 NP zu überprüfen, wurde der photokatalytische Methanol-Abbau mittels NASH-Reagenz detektiert (A.2.15). Bei der Oxidation von Alkoholen entstehen als erstes stabiles Produkt Aldehyde, welche mit dem NASH-Reagenz zu 1,4-Diacetyldihydropyridin (auch Diacetyldihydrolutidin, DDL) reagieren (Abbildung 41). Dieses Produkt kann über das Absorptionsmaximum bei 413 nm photometrisch detektiert werden [172]. Als Edukt diente hierbei Methanol, welches zu Formaldehyd oxidiert wurde. Dabei kann das Methanol direkt an der Oberfläche der TiO<sub>2</sub> photokatalytisch oxidiert werden, oder durch photogenerierte ROS [173].

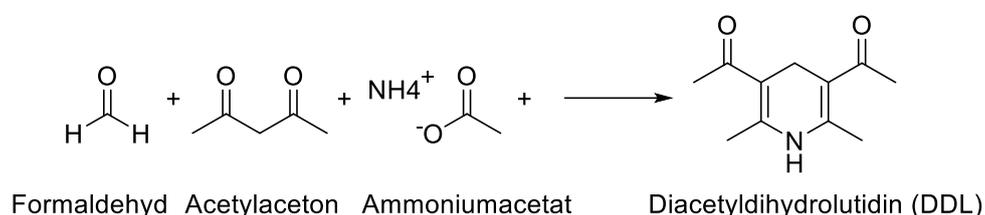


Abbildung 41: Reaktionsschema des NASH-Reagenz mit dem photokatalytisch zu Formaldehyd oxidierten Methanol. Gemäß der HANTZschen Dihydropyridinsynthese reagiert der aus dem Ammoniumacetat freigesetzte Ammoniak mit Acetylaceton und dem Formaldehyd zu 1,4-Diacetyldihydrolutidin (DDL).

Die photokatalytische Oxidation von Methanol durch TiO<sub>2</sub> P25 NP und beschichtete PAA@TiO<sub>2</sub> P25 NP wurde über einen Zeitraum von bis zu 4 h analysiert. In Abbildung 42 sind die Absorptionsspektren der entstandenen Lösungen zu ausgewählten Zeitpunkten in einem Wellenlängenbereich von 340-500 nm dargestellt. Wie erwartet liegt das Absorptionsmaximum bei 413 nm. Ohne Bestrahlung war keine Signalzunahme detektierbar. Das Signal stieg mit zunehmender Bestrahlungszeit an. Bei den unmodifizierten TiO<sub>2</sub> P25 NP wurde das Signalmaximum nach 120 min erreicht, nach 180 min verringerte sich die Absorption wieder, es wurde also weniger Formaldehyd bei dieser Probe gebildet. Es ist möglich, dass bis dahin schon fast alles an Methanol vom Photokatalysator oxidiert wurde.

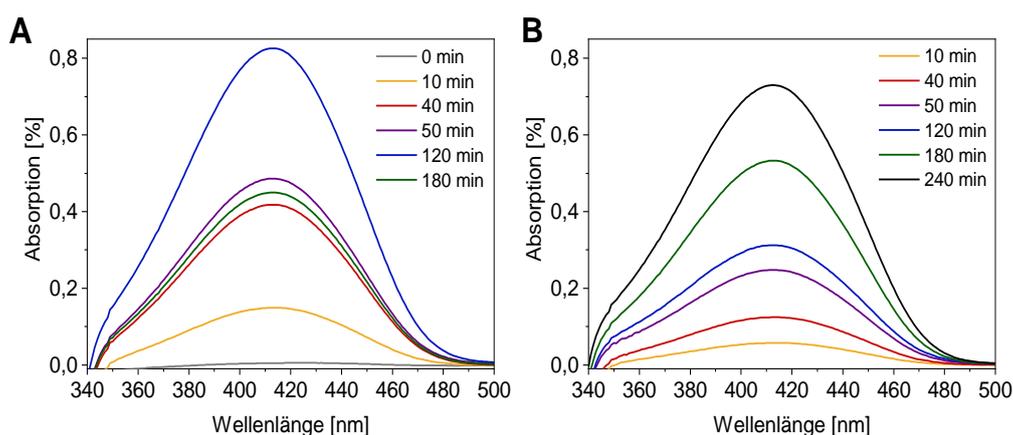


Abbildung 42: Photokatalytische Aktivität von unmodifizierten P25 NP (A) und PAA@TiO<sub>2</sub> P25 (B). Es wurde die jeweilige NP-Methanol-Suspension mit UV-A-Licht bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Vermessen wurde das Absorptionsspektrum der gefilterten Lösung nach Inkubation mit dem NASH-Reagenz; nach [171].

Bei den PAA@TiO<sub>2</sub> P25 NP sind insgesamt deutlich geringere Absorptionssignale detektiert worden. Das Signal steigt bis zum letzten Zeitpunkt hin weiter an, was darauf schließen lässt, dass noch Methanol in der Lösung vorlag. Die geringere photokatalytische Aktivität der beschichteten TiO<sub>2</sub> NP kann verschiedene Ursachen haben. So ist die Oberfläche der NP durch die Anlagerung der PAA-Moleküle schwerer für Methanol-Moleküle zugänglich, auch generierte Ladungsträger können durch die Beschichtung abgefangen werden [117,174]. Es lässt sich jedoch festhalten, dass die modifizierten PAA@TiO<sub>2</sub> P25 NP auch weiterhin photokatalytisch aktiv sind.

Auch die zuvor getesteten FeWT NP wurden mit PAA beschichtet und zeigten ebenfalls direkt sichtbare Unterschiede in der Stabilität der TiO<sub>2</sub>-Suspensionen in Wasser (Abbildung 43).

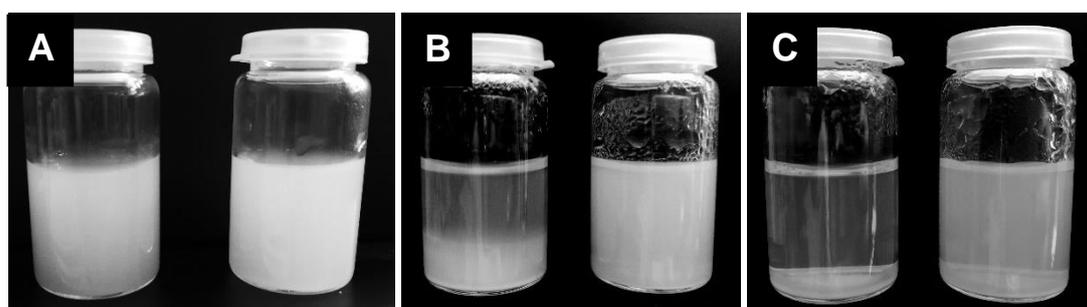


Abbildung 43: Sedimentation von FeWT und PAA@FeWT NP nach Ultraschall-Homogenisierung A) nach 0 Tagen; B) nach 3 Tagen; C) nach 14 Tagen.

Die Adsorption von organischen Molekülen auf der NP-Oberfläche stellt eine sehr einfache und robuste Methode zur Oberflächenfunktionalisierung dar. Erst kürzlich zeigten Forscher aus Mainz, dass die Adsorption von Antikörpern an die Oberfläche von Polymer-NP die Aufnahme in Zielzellen erhöht [175]. In dieser Arbeit wurde eine kovalente Kopplung der Targeting-Liganden an die adsorbierte Polyacrylsäure angestrebt. Hierbei wurden beide oberflächenmodifizierte TiO<sub>2</sub>-Nanomaterialien (PAA@TiO<sub>2</sub> P25 und PAA@FeWT) mit einem Aptamer für den zielgerichteten Transport in HeLa-Zellen modifiziert, was in folgendem Kapitel beschrieben wird.

### 3.4.2 Aptamer-Kopplung auf PAA@TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln

In dieser Arbeit wurde das Aptamer Syl3C als Targeting-Molekül ausgewählt, welches gegen das transmembrane Glykoprotein EpCAM (engl. *Epithelial Cell Adhesion Molecule*, Epitheliales Zelladhäsionsmolekül) selektiert wurde und hohe Affinität zu HeLa-Zellen gezeigt hat [176,177]. Durch eine 5'-Amino-Modifizierung kann das Aptamer mittels einer EDC-Kopplung an die Carboxyl-Gruppen der PAA-Moleküle auf der NP-Oberfläche immobilisiert werden (A.2.13).

Der Erfolg der Kopplungsreaktion wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (A.2.14). Bei den erhaltenen Syl3C-PAA@TiO<sub>2</sub> P25 NP ist eine deutliche Bande sichtbar, welche auf vorhandene DNA in der Probe hinweist (Abbildung 46). Da das Aptamer in hohem Überschuss zugegeben wurde, war auch im Überstand der Synthese noch DNA detektierbar. Die Proben der Waschschrte erzeugten nur noch sehr schwache Banden in den ersten Schritten.



Abbildung 44: Agarose-Gelelektrophorese von Syl3C-PAA@TiO<sub>2</sub> P25 funktionalisierten NP. A=reines Aptamer; NP=PAA@FeWT; A-NP=Syl3C-PAA@FeWT; Ü=Überstand direkt nach der Synthese; W1-8=Waschschrte.

Um die gewonnenen Partikel weiter zu charakterisieren, wurde der hydrodynamische Durchmesser anhand der DLS ermittelt. Die Größenverteilung der oberflächenmodifizierten NP unterscheidet sich von den herkömmlichen  $\text{TiO}_2$  P25 NP (Abbildung 45). Die Intensitäts-Peaks der Größenverteilung lagen bei 1145 nm, 455 nm und 380 nm für jeweils  $\text{TiO}_2$  P25, PAA@ $\text{TiO}_2$  P25 und Syl3C-PAA@ $\text{TiO}_2$  P25. Diese Veränderungen des hydrodynamischen Durchmessers in wässriger Lösung weisen auf eine erfolgreiche Oberflächenmodifizierung der NP hin.

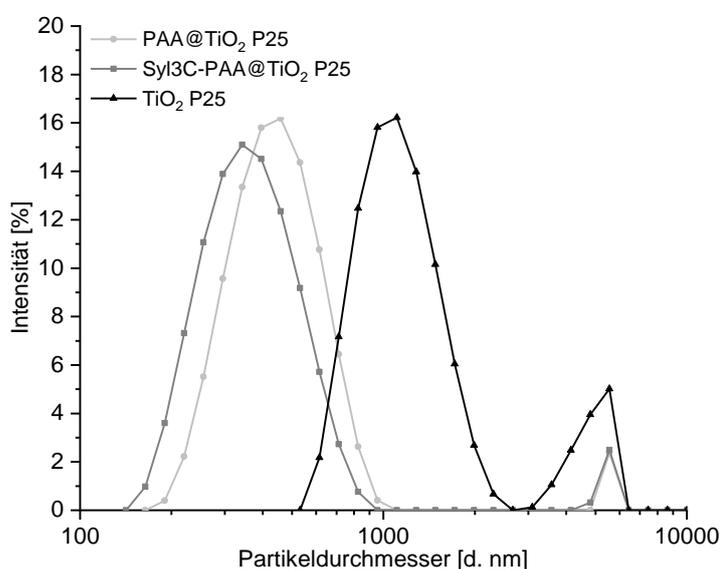


Abbildung 45: DLS-Messung der  $\text{TiO}_2$  P25 NP und der modifizierten  $\text{TiO}_2$  P25 NP (PAA@ $\text{TiO}_2$  P25; Syl3C-PAA@ $\text{TiO}_2$  P25) in PBS.

Auch an die Oberfläche der PAA@FeWT NP wurde das Aptamer Syl3C gekoppelt. Die Agarose-Gelelektrophorese bestätigte die Existenz von DNA in der Probe nach der Synthese und Aufreinigung von der Säule (Abbildung 46). Wie schon bei den  $\text{TiO}_2$  P25 NP beobachtet, wurde auch hier ein Überschuss an Aptamer in den ersten Waschschrritten entfernt.



Abbildung 46: Agarose-Gelelektrophorese von Syl3C-PAA@FeWT funktionalisierten NP. A=reines Aptamer; NP=PAA@FeWT; A-NP=Syl3C-PAA@FeWT nach Aufreinigung; Ü=Überstand; W1-8=Waschschrirte.

Durch die Oberflächenmodifizierung der FeWT NP veränderte sich auch der hydrodynamische Durchmesser sowie das Zeta-Potential der einzelnen Proben. Die Messung der dynamischen Lichtstreuung ergab für die FeWT NP einen hydrodynamischen Durchmesser von >1500 nm. Nach Adsorption von PAA auf der Oberfläche verringerte sich dieser auf ca. 240 nm (PAA@FeWT), nach Aptamer-Kopplung auf 200 nm (Syl3C-PAA@FeWT) (Abbildung 47A). Die unterschiedlichen Durchmesser weisen auf eine erfolgreiche Funktionalisierung der FeWT NP hin. Auch das Zeta-Potential der modifizierten FeWT NP unterscheidet sich von dem der unbeschichteten. Während die unbeschichteten FeWT NP ein Potential von -21 mV aufwiesen, waren sowohl PAA- als auch Aptamer-modifizierte NP negativer geladen (-31 bzw. -23 mV) (Abbildung 47B). Dies entspricht den Erwartungen, da sowohl die Carboxylgruppen der Polyacrylsäure als auch die Phosphatgruppen der Oligonukleotide des Aptamers bei einem pH von 7,4 (Lösungsmittel PBS) eine negative Ladung aufweisen.

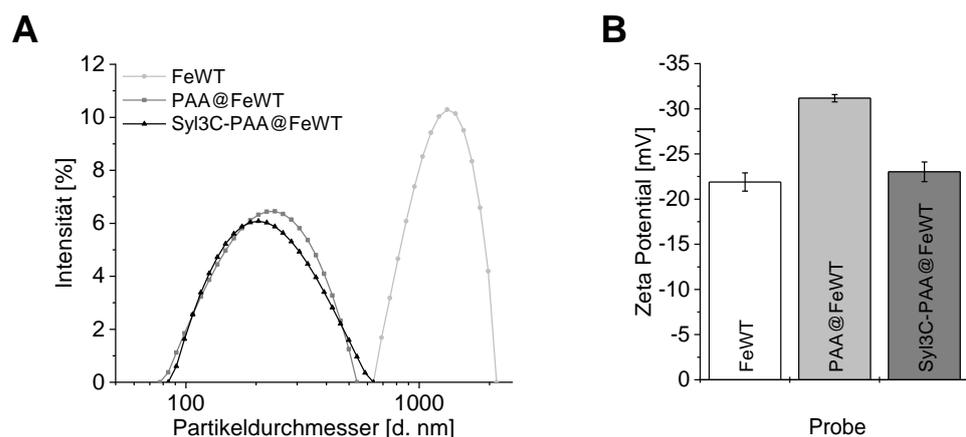


Abbildung 47: Charakterisierung der Aptamer-modifizierten FeWT NP; A) Signalintensität der DLS-Messung in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers; B) Zeta-Potential der verschiedenen NP.

Für eine weitere Bestätigung der erfolgreichen Kopplung von PAA und Aptamer an die Oberfläche der FeWT NP wurden die unmodifizierten FeWT NP sowie PAA@FeWT und Syl3C-PAA@FeWT NP mittels Infrarotspektroskopie vermessen. Dadurch können über unterschiedliche Schwingungen von funktionellen Gruppen die Adsorption von Molekülen an die Oberfläche der TiO<sub>2</sub> NP nachgewiesen werden. Die verschiedenen Materialien weisen unterschiedliche Absorptionsspektren des Infrarotlasers auf (Abbildung 48).

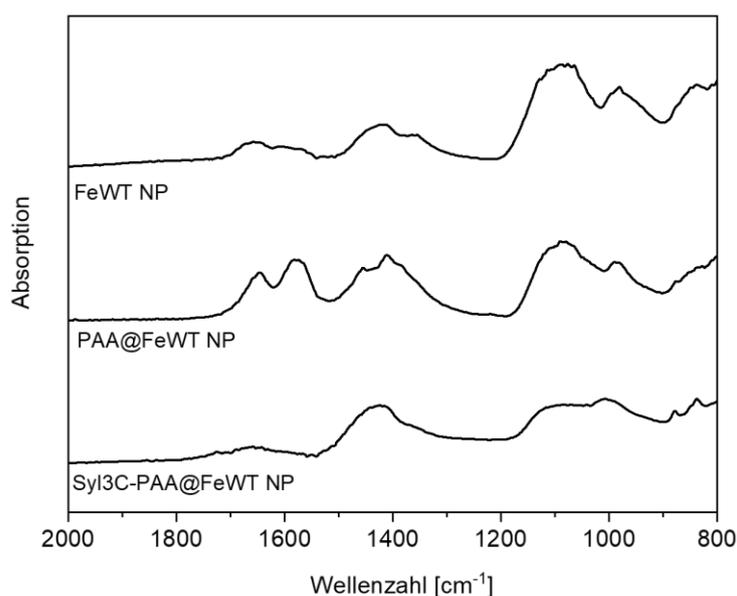


Abbildung 48: ATR-FTIR-Spektrum der modifizierten FeWT NP, PAA@FeWT NP und Aptamer-gekoppelte Syl3C-PAA@FeWT NP.

Die beiden Peaks der PAA@FeWT NP im Bereich von  $1400\text{ cm}^{-1}$  bis  $1700\text{ cm}^{-1}$  sind den C-O und C=O-Schwingungen der Carboxylgruppen der Polyacrylsäure zuzuordnen und bestätigen die Adsorption der Polyacrylsäure auf der Oberfläche der FeWT [178]. Der Peak um  $1700\text{ cm}^{-1}$  ist der  $\text{COO}^-$  Gruppe zuzuordnen [134]. Die Abwesenheit dieses Peaks nach Vermessung der Syl3C-PAA@FeWT NP lässt auf die Reaktion der Carboxylgruppe mit der Aminogruppe des Aptamers schließen.

Es wurde von einer erfolgreichen Kopplung des Aptamers an die Carboxylgruppen der Polyacrylsäure auf der Oberfläche der  $\text{TiO}_2$  NP ausgegangen und diese in den Phototoxizitäts-Assays getestet.

### 3.4.3 Phototoxizität von zielgerichteten $\text{TiO}_2$ Nanopartikeln

Um zu untersuchen, ob die Aptamer-Kopplung auf die Oberfläche von  $\text{TiO}_2$  NP die Phototoxizität erhöht, wurden sowohl modifizierte als auch unmodifizierte NP an HeLa-Zellen getestet. Für die  $\text{TiO}_2$  P25 NP ergab sich hierbei eine höhere Effizienz der zielgerichteten NP mit Aptamer auf der Oberfläche. Es wurden allerdings insgesamt nicht mehr als ca. 20 % der Zellen durch die bestrahlten NP bei den getesteten Konzentrationen abgetötet (Abbildung 49).

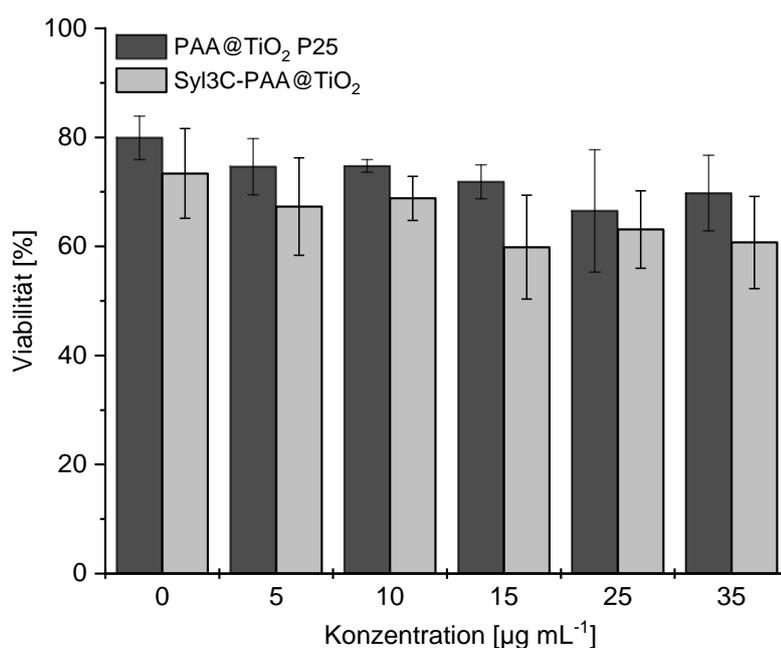


Abbildung 49: Viabilität von HeLa-Zellen nach Inkubation mit PAA@ $\text{TiO}_2$  und Syl3C-PAA@ $\text{TiO}_2$  NP und Bestrahlung ( $5\text{ J cm}^{-2}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte bezogen auf die Dunkelkontrolle bei  $0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  NP nach Dreifachmessung  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

Die Funktionalisierung der NP mit den Aptameren wurde mit den dotierten FeWT NP wiederholt, um das phototoxische Potential weiter zu maximieren. Es konnte bestätigt werden, dass die Oberflächenmodifizierungen der FeWT NP keinen Einfluss auf die Dunkeltoxizität hatte (Abbildung 50, Kontrollen), da nach Inkubation mit sowohl PAA@FeWT NP als auch mit Syl3C-PAA@FeWT die Viabilität der HeLa-Zellen nicht beeinträchtigt wurde. In den hier durchgeführten Versuchen konnte die Phototoxizität der mit Aptamer-modifizierten FeWT NP jedoch nicht weiter erhöht werden. Obwohl bei geringen NP-Konzentrationen zunächst eine geringere Zellviabilität für bestrahlte, mit Syl3C-PAA@FeWT NP inkubierte HeLa-Zellen beobachtet wurde, zeigten die PAA@FeWT NP ohne Oligos eine deutlich höhere Effizienz bei höheren NP-Konzentrationen (Abbildung 50).

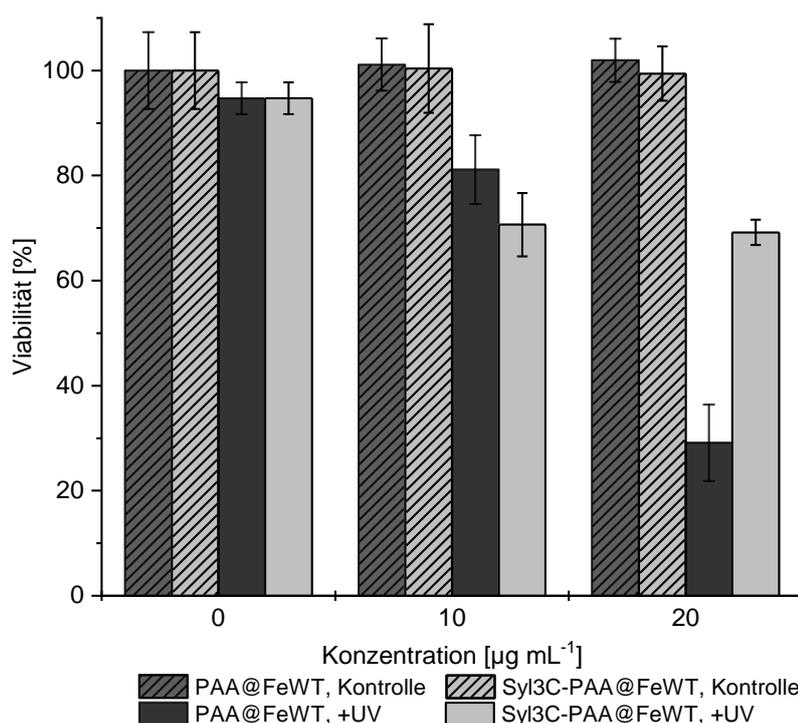


Abbildung 50: Viabilität von HeLa-Zellen nach Inkubation mit modifizierten und unmodifizierten FeWT NP. Die Kontrollen stellen die unbestrahlten Proben dar, die Bestrahlung erfolgte bei  $7,5 \text{ J cm}^{-2}$  UV-A (365 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte bezogen auf die Dunkelkontrolle bei  $0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  NP nach Dreifachmessung  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

Auch die Quantifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies mittels H<sub>2</sub>DCF-DA ergab ein deutlich geringeres Signal für die Aptamer-modifizierte FeWT NP. Das Fluoreszenzsignal war zwar erhöht im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, jedoch bildeten die unbeschichteten FeWT NP mehr ROS (Abbildung 51).

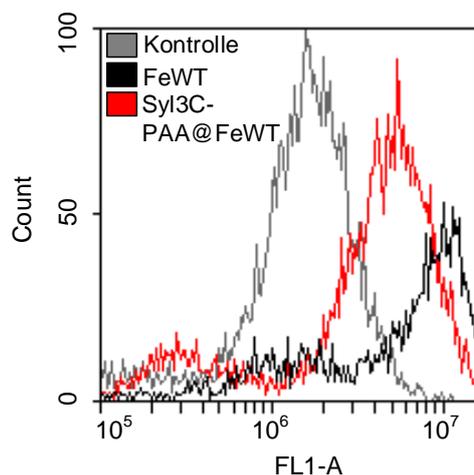


Abbildung 51: Grüne Fluoreszenzsignalintensitäten (FL1-A) von HeLa-Zellen inkubiert mit 5 µg mL<sup>-1</sup> FeWT schwarz und Syl3C-PAA@FeWT (rot), Kontrolle ohne NP und UV-Licht (grau). Gemessen im FCM nach H<sub>2</sub>DCF-DA-Inkubation und Bestrahlung (3,5 J cm<sup>-2</sup>).

Die Daten weisen darauf hin, dass weniger modifizierte NP in die Zellen aufgenommen wurden und ROS bildeten. Es ist möglich, dass durch die negative Ladung der NP durch die Carboxylgruppen der PAA und die Phosphatgruppen der Oligonukleotide die Anlagerung an die ebenfalls negative Zellmembran erschwert wird. Es wurde gezeigt, dass kationische NP besser von Zellen aufgenommen werden (Kapitel 2.3.1) [179,180]. Zudem könnte eine Oberflächenmodifizierung der FeWT einen negativen Einfluss auf die verbesserte photokatalytische Reaktivität im Vergleich zu TiO<sub>2</sub> P25 haben. Das Absorptionsspektrum zeigte eine deutliche Verschiebung in Richtung des UV-Bereichs (Abbildung 52). Es liegt eindeutig eine Veränderung der optischen Eigenschaften der FeWT NP vor, was die photokatalytische Aktivität beeinflussen kann. Zudem kann die Beschichtung den Zugang zu entstehenden ROS zu möglichen Zielmolekülen in der Zelle erschweren, wie bereits beschrieben (Kapitel 3.4.1).

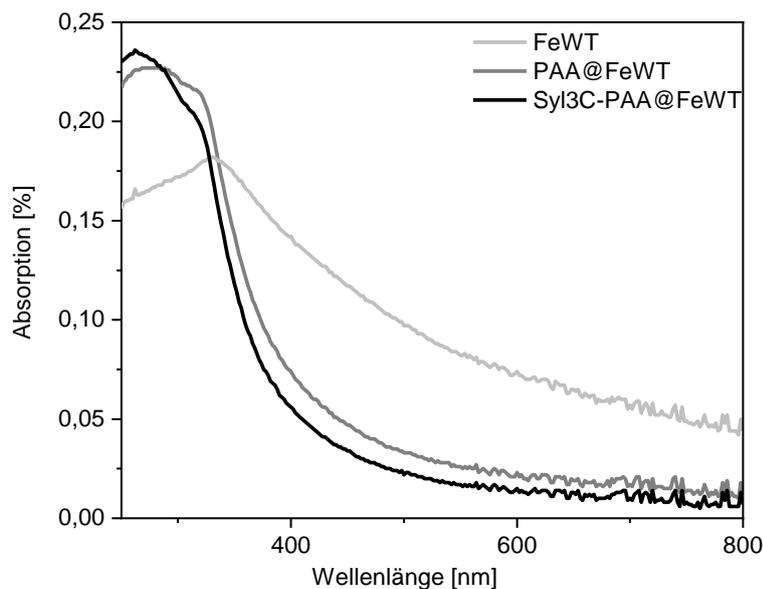


Abbildung 52: UV/vis-Absorptionsspektrum von FeWT, PAA@FeWT und Syl3C-PAA@FeWT in PBS.

Es war leider nicht möglich, die Effizienz der FeWT durch Anbringung von den hier gewählten Targeting-Liganden weiter zu steigern. Es müssen daher in Zukunft alternative Oberflächenmodifizierungen getestet werden.

#### 3.4.4 Zusammenfassung zur Oberflächenmodifizierung von TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln

Das gegen den Krebsmarker EpCAM gerichtete Aptamer Syl3C konnte erfolgreich auf TiO<sub>2</sub> P25 und FeWT NP über eine Kopplung an PAA immobilisiert werden. Während die Oberflächenmodifizierung auf normale TiO<sub>2</sub> P25 NP einen positiven Einfluss hatte und die Phototoxizität gegenüber HeLa-Zellen erhöhte, wurde die Effizienz der FeWT NP verschlechtert. Um den genauen Grund hierfür herauszufinden, müssen zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden. Möglicherweise werden die Vorteile der dotierten NP in Bezug auf die Bandlücke und entstehende Elektronenfallen durch eine Modifizierung der NP-Oberfläche wieder dezimiert.

### 3.5 Herstellung und Charakterisierung von Upconversion-Nanopartikeln

Um Wellenlängen mit einer noch tieferen Eindringweite ins Gewebe für die Aktivierung der Photokatalyse von  $\text{TiO}_2$  NP nutzbar zu machen, wurde in den letzten Jahren aktiv an der Entwicklung von komplexen Nanoplattformen gearbeitet (Kapitel 2.4.4). Den Kern bildet hierbei ein sogenannter Upconversion-Nanopartikel (UCNP), welcher die Umwandlung von höherwelligem Licht in energiereicheres Licht mit niedriger Wellenlänge ermöglicht.

#### 3.5.1 Synthese von Upconversion-Nanopartikeln

Bei einem Emissionspeak der synthetisierten UCNP im UV-Bereich wäre eine Aktivierung der Photokatalyse durch eine  $\text{TiO}_2$ -Partikeloberfläche möglich. Es wurde daher eine Kombination der seltenen Erden Yttrium und Ytterbium mit einer Thulium-Dotierung gewählt, welche für ein passendes Emissionsspektrum bekannt ist [115]. Die UCNP wurden mittels einer thermalen Dekomposition der Trifluoracetat-Salze der Ausgangsstoffe synthetisiert (A.2.16). Die entstandenen  $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$  UCNP wurden anschließend im TEM untersucht (Abbildung 53).

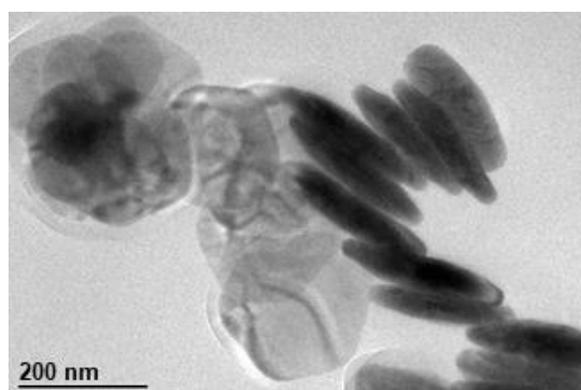


Abbildung 53: TEM-Aufnahme der synthetisierten  $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$  UCNP.

Die TEM-Aufnahmen zeigten, dass sehr uniforme UCNP synthetisiert wurden, die eine hexagonale, scheibenartige Form aufwiesen. Die sechseckige Form der UCNP wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [181]. Die hier synthetisierten Upconverter wiesen einen Durchmesser von ca. 200 nm auf, was deutlich größer als erwartet war, da in beschriebenen Protokollen Durchmesser von

10-12 nm erreicht wurden [142,182]. Die Synthese müsste hierhingehend noch optimiert werden. Eine Kristallstrukturanalyse mittels XRD (engl. *X-Ray Diffraction*) ergab die erwartete Gitterstruktur von hexagonalem Natrium-Yttrium-Fluorid (A.3.4, Abbildung 66).

### **3.5.2 Optische Eigenschaften der Upconversion-Nanopartikel**

Durch die Anregung mit einem 980 nm Laser konnte ein Emissionsspektrum aufgezeichnet werden, welches mehrere einzelne Peaks bei verschiedenen Wellenlängen aufweist (Abbildung 54A und B). Der Hauptpeak liegt hierbei im blauen Bereich bei ca. 480 nm. Direkt daneben befindet sich bei etwa 460 nm der zweitintensivste Peak des Spektrums. Hielt man den Strahl des ansonsten nicht sichtbaren Infrarot-Lasers an eine klare Suspension der UCNPs in Hexan, wurde ein bläuliches Licht auf Höhe des Laserstrahls sichtbar (Abbildung 54C), was den Erwartungen aufgrund des Emissionsspektrums entspricht. Es sind außerdem zwei Peaks im langwelligen Bereich detektiert worden (ca. 700 und 730 nm). Für die weitere Anwendung am interessantesten sind jedoch die beiden Peaks im UV-Bereich, die ca. bei 350 und 370 nm aufgezeichnet wurden.

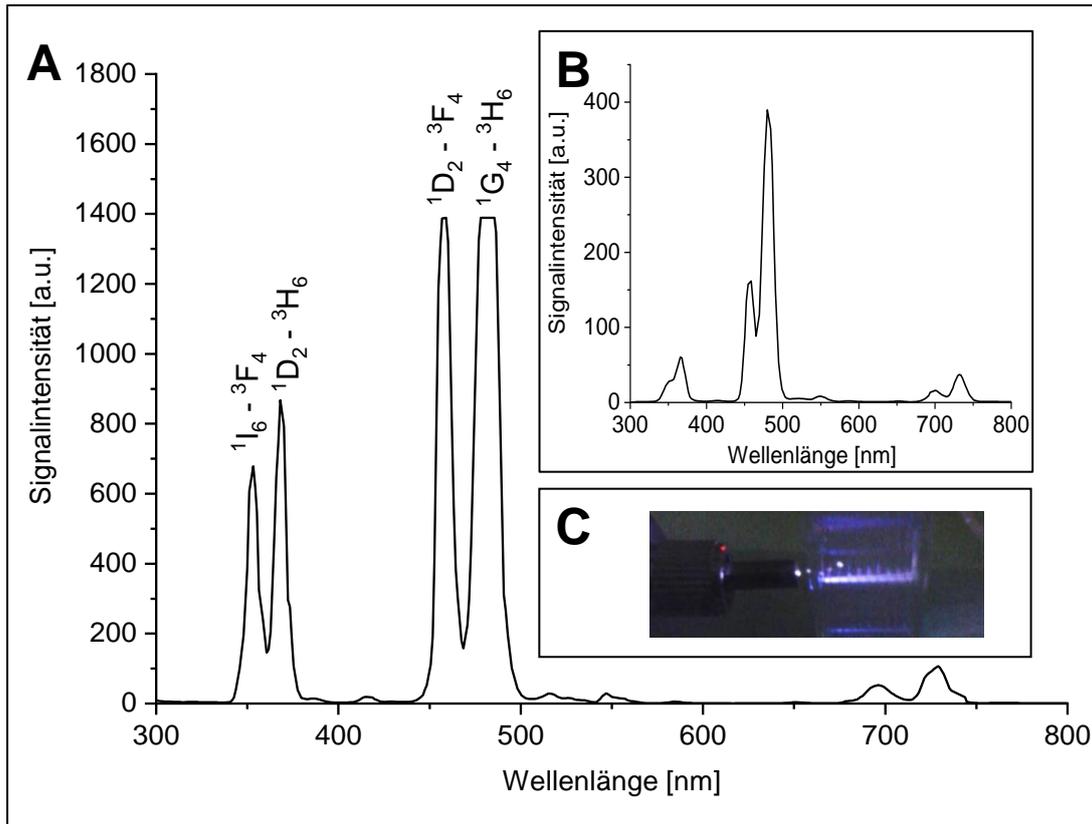


Abbildung 54: Emissionsspektrum der synthetisierten UCNP bei Anregung mit einem 980-nm Laser; A) Detailliertes Emissionsspektrum und vermutete Elektronenübergänge bei großer Detektoröffnung; B) gesamtes Spektrum bei kleinerer Detektoröffnung; C) Sichtbar gewordener NIR-Laserstrahl einer Hexan-UCNP-Suspension in einer Küvette.

Die vier Peaks im kurzwelligeren Bereich sind auf die verschiedenen Elektronenübergänge  $^1I_6-^3F_4$ ,  $^1D_2-^3H_6$ ,  $^1D_2-^3F_4$  und  $^1G_4-^3H_6$  der leiterartig angesiedelten Energieniveaus des Thuliums zurückzuführen (Kapitel 2.4.4, Abbildung 9). Wie bereits in Kapitel 2.4.4 erläutert, werden mehrere Photonen des NIR-Lasers von den Ytterbium-Ionen absorbiert und auf das Aktivator-Ion, in diesem Fall Thulium, übertragen. Für die Emission im UV-Bereich ist die Absorption von 4 bzw. 5 niederenergetischen Photonen nötig, um ein energiereicheres Photon zu generieren. Hochenergetische Laser sind daher nötig, um diesen Effekt zu erzielen. Das muss auch in Bezug auf mögliche Anwendungen in der photodynamischen Therapie berücksichtigt werden. Eine kurze oder Intervall-artige Bestrahlung kann jedoch die übermäßige Überhitzung oder Schädigung der Zellen durch das hochdosierte Infrarotlicht verhindern [183,184].

### **3.5.3 Zusammenfassung zur Synthese von Upconversion-Nanopartikeln**

Es konnten erfolgreich Partikel synthetisiert werden, welche die Umwandlung von NIR in UV-Licht ermöglichen. Größe und Effizienz der UCNP kann durch weitere Optimierung der Synthese angepasst werden. Wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben werden solche Partikel bereits ausgiebig hinsichtlich ihres Potentials für die photodynamische Therapie untersucht. Der nächste Schritt wäre eine Beschichtung der UCNP mit photokatalytischem Material wie beispielsweise TiO<sub>2</sub>. Zudem sind unzählige weitere Modifikationen möglich, um die Effizienz der NP bezüglich der gezielten Abtötung von Krebszellen weiter zu steigern. So könnte eine PDT mit TiO<sub>2</sub>-basierten NP mit tiefer eindringendem Infrarot-Licht realisiert werden.

#### 4 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln (TiO<sub>2</sub> NP) mit Säugerzellen untersucht. Besonderer Schwerpunkt lag auf dem Einfluss der Bestrahlung auf die Toxizität von TiO<sub>2</sub> NP. Dafür wurde zunächst die Aufnahme und Anlagerung von TiO<sub>2</sub> NP in beziehungsweise an Säugerzellen analysiert. Mittels Durchflusszytometrie konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen NP-Konzentration oder Inkubationszeit und der gemessenen Lichtstreuung sowie Fluoreszenz von markierten Partikeln bestätigt werden (Kapitel 3.1.2). Dabei wurde auch das unterschiedliche Aufnahmeverhalten der beiden untersuchten Zelllinien A549 und NIH/3T3 deutlich. Die Partikelaufnahme spielt eine wichtige Rolle für die Interaktion mit intrazellulären Komponenten und kann somit die Toxizität der NP beeinflussen. Das Durchflusszytometer erwies sich als sehr sensitives Instrument, was auch bei niedrigen NP-Konzentrationen statistisch relevante und reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Die zusätzlich durchgeführte Time-Lapse Mikroskopie bestätigte die mittels Durchflusszytometrie erhaltenen Daten und enthüllte das spezielle Aufnahmeverhalten der murinen Fibroblasten. Die NIH/3T3-Zellen zeigten eine sehr hohe Affinität zu den TiO<sub>2</sub> NP, welche sich innerhalb von 24 Stunden kreisförmig um den Zellkern herum ablagerten. Im Gegensatz dazu waren bei den beobachteten Krebszellen eine erhöhte Agglomerat-Bildung und willkürliche Verteilung um die Zellen herum zu sehen (Abbildung 55, Kapitel 3.1.3).

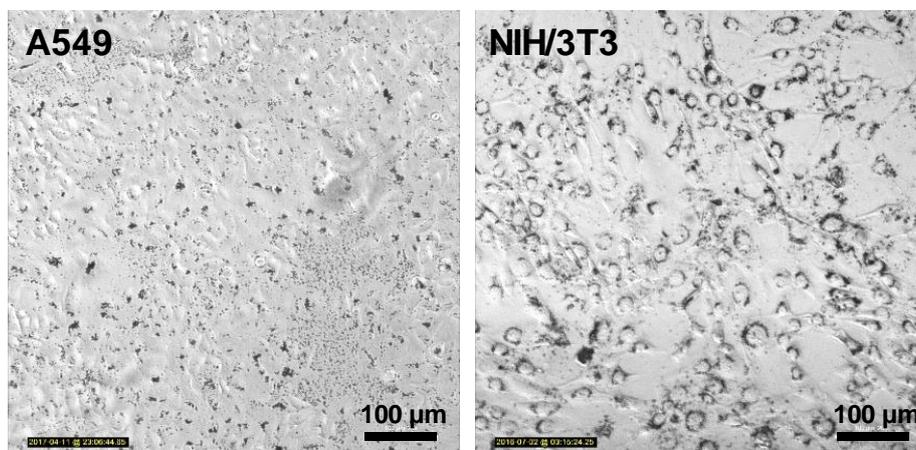


Abbildung 55: Vergleich der Mikroskopbilder beiden untersuchten Zelllinien A549 und NIH/3T3 nach 12-stündiger Inkubation mit FITC-TiO<sub>2</sub> NP. Die NP-Agglomerate erscheinen als schwarze Punkte.

Ein unterschiedliches Aufnahmeverhalten verschiedener Zelltypen ist eine wichtige Erkenntnis für die Risikobewertung von Nanomaterialien. Zudem ist eine effiziente und gezielte Aufnahme von pharmazeutischen Nano-Carriern in Krebszelllinien von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Therapie. Um eine tatsächliche NP-Aufnahme in die Zellen zu verifizieren, sollte zukünftig eine Markierung von TiO<sub>2</sub> NP mit pH-sensitiven Farbstoffen erfolgen. Durch den pH-Shift im inneren der späten Endosomen könnte somit zwischen äußerer Anlagerung und tatsächlicher Endozytose unterschieden werden [185]. Es muss jedoch beachtet werden, dass jegliche Oberflächenmodifizierung der NP nur bedingt auf die Aufnahmerate freigesetzter, unmodifizierter NP schließen lässt, da es sich strenggenommen um ein neues Material handelt und die Oberflächenbeschaffung erwiesenermaßen eine große Rolle für die Aufnahme von Nanomaterialien spielt [179].

Die Risikobewertung von Nanomaterialien *in vitro* stellt eine große Herausforderung dar [186]. Sedimentation und Agglomeration der NP sowie unterschiedliche Besiedlungen der Zellen von Kulturoberflächen machen eine genaue Einschätzung der Dosierung schwierig. Die hohe Sensitivität von Säugerzellen auf äußere Einflüsse und das unterschiedliche (Wachstums-) Verhalten verschiedener Zelllinien erschweren zusätzlich die Generierung relevanter Daten. Auch die mögliche Wechselwirkung, gerade von katalytisch aktiven NP, mit Assay-Komponenten ist allgemein bekannt [28,186]. Durch sorgfältige Versuchsdurchführung und Berücksichtigung aller nötigen Kontrollexperimente können jedoch trotzdem eindeutige Trends beobachtet und Mechanismen erforscht werden.

In dieser Arbeit wurde die Phototoxizität von TiO<sub>2</sub> NP untersucht. Dabei wurde zunächst ein experimenteller Ablauf entwickelt, um die Wirkung von verschiedenen Materialien auf unterschiedliche Zelllinien bei bestimmten Versuchsbedingungen reproduzierbar und effektiv zu untersuchen (Abbildung 56). Da die NP in Bezug auf die pharmazeutische Anwendung in der Krebstherapie beurteilt werden sollten, wurde hierbei auf eine Maximierung des sichtbaren phototoxischen Effekts abgezielt. So konnte beispielsweise durch Anpassung von Inkubationszeiten, Bestrahlungsintensitäten und die Verwendung einer Bestrahlungskammer die Phototoxizität der Nanomaterialien bei höchster Effizienz und bestmöglicher

Reproduzierbarkeit untersucht werden. Bei der Bestrahlung in Phosphatpuffer statt Kulturmedium, relativ kurzer Inkubationszeit von 4-6 Stunden und Bestrahlung mit nicht zu zellschädigendem UV-A-Licht (365 nm) von 5-7,5 J cm<sup>-2</sup> konnten deutliche Effekte der NP auf die Säugerzellen beobachtet und analysiert werden (Kapitel 3.2.1).

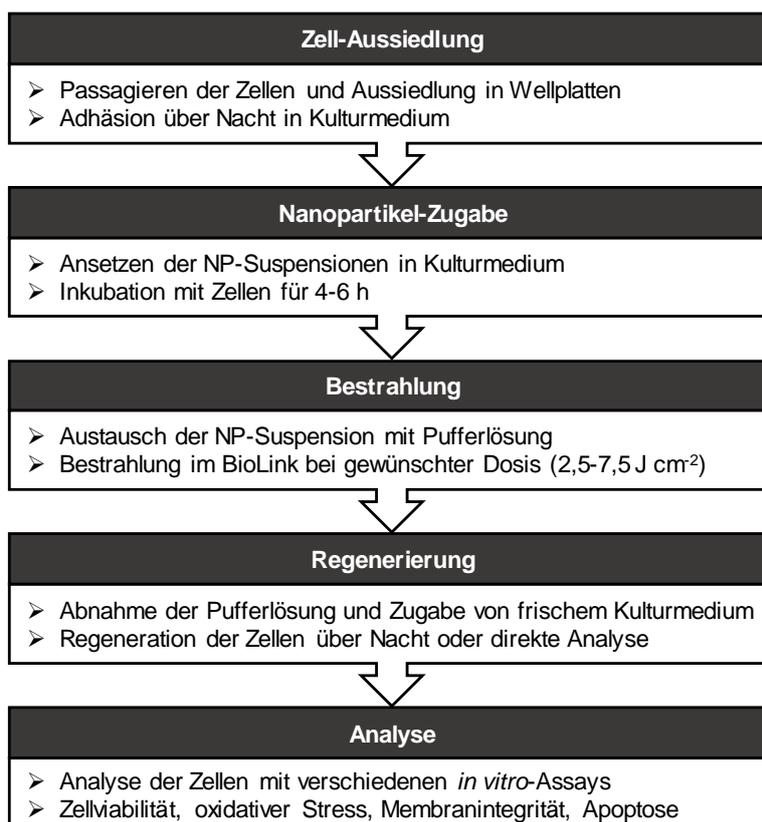


Abbildung 56: Ablauf eines typischen Phototoxizitäts-Assays mit Säugerzellen und TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln.

In allen durchgeführten Versuchen konnte eine Dunkeltoxizität der verwendeten TiO<sub>2</sub> Materialien auf die Säugerzellen ausgeschlossen werden. Dies wurde bereits zuvor von der Arbeitsgruppe beobachtet [187]. Bei der Untersuchung der Nanopartikel-Aufnahme konnten mittels Durchflusszytometrie und Time-Lapse Mikroskopie keine relevanten Populationen toter Zellen detektiert werden. Auch während der Versuche zur Phototoxizität waren die entsprechenden unbestrahlten Kontrollen bei den verwendeten NP-Dosen nicht in ihrer Viabilität eingeschränkt. Es wurde jedoch ein eindeutiger phototoxischer Effekt beobachtet, sobald die mit NP inkubierten Zellen mit UV-A-Licht bestrahlt wurden. Dabei wurde ein

Zusammenhang zwischen NP-Konzentration, Strahlungsintensität, Wellenlänge der Bestrahlungsquelle, untersuchtem Zelltyp und untersuchtem Nanomaterial mit der Phototoxizität von TiO<sub>2</sub> NP festgestellt (Kapitel 3.2.1). Die mit Eisen (Fe) und Wolframtrioxid (WO<sub>3</sub>) veredelten TiO<sub>2</sub> P25 NP erwiesen sich gegenüber den robusteren Krebszelllinien A549 und HeLa als äußerst phototoxisch (Kapitel 3.2.2). Hier konnten bereits nach Inkubation mit nur 10 µg mL<sup>-1</sup> FeWT NP bis zu 90 % der A549-Zellen mittels UV-A-Bestrahlung abgetötet werden und mit 25 µg mL<sup>-1</sup> FeWT NP der 80 % HeLa-Zellen. Dies ist vermutlich auf die erhöhte photokatalytische Aktivität der NP zurückzuführen [156]. Auch eine Aktivität bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht konnte für dieses Material nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.3). Die Dotierung von Halbleitermaterialien stellt eine sehr vielversprechende Methode dar, um die photokatalytische Aktivität eines Materials an die entsprechenden Bedürfnisse anzupassen. So kann beispielsweise die Bandlückenenergie herabgesetzt und die ungewünschte Rekombination der generierten Ladungsträger gehemmt werden [188]. Auch in diesem Fall wurde davon ausgegangen, dass durch die Entstehung sogenannter Elektronen-Fallen durch die unterschiedlichen Redox-Potentiale von TiO<sub>2</sub>, Fe<sup>3+</sup> und WO<sub>3</sub> die Ladungsträger länger voneinander separieren und die Aktivierung mit sichtbarem Licht ermöglichen (Abbildung 28 und 57).

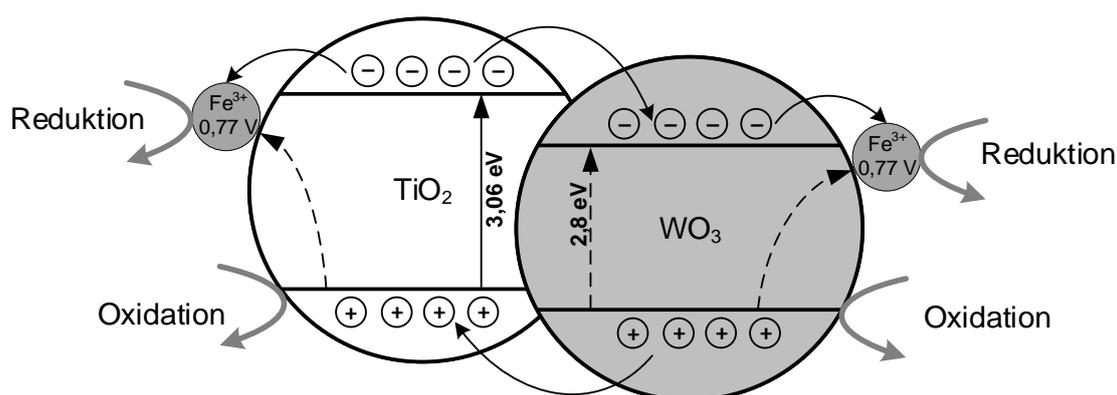


Abbildung 57: Vorgeschlagener Mechanismus der Anregung von FeWT NP auch mit sichtbarem Licht. Gestrichelte Pfeile indizieren die mögliche Anregung im sichtbaren Spektrum. Basierend auf Abbildung 28 und [156].

Die Entwicklung solcher hochaktiven Materialien ist auch für die pharmazeutische Anwendung vielversprechend, da eine erhöhte photokatalytische Aktivität die Generierung der schädlichen ROS steigert. Die FeWT stellen ein sehr effizientes Material für die potentielle Anwendung in der photodynamischen Therapie dar. Andererseits muss natürlich bedacht werden, dass bei erhöhter Anwendung und der damit verbundenen Freisetzung dieser modifizierten Materialien auch ein erhöhtes Risiko für Mensch und Umwelt besteht, da der phototoxische Effekt dieser hochreaktiven NP auch im sichtbaren Spektrum angeregt werden kann.

Die allgemeine Annahme, dass photokatalytische NP intrazelluläre ROS bilden, konnte mittels DCF-DA-Assay bestätigt werden (Kapitel 3.3.2). Hierbei wurde ein deutlicher Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen sichtbar. Die FeWT NP bildeten mehr ROS als die unmodifizierten TiO<sub>2</sub> P25 NP. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die FeWT NP durch ihre starke photokatalytische Aktivität mehr ROS in den Zellen bilden und bestätigen die zuvor in den Viabilitäts-Assays beobachtete erhöhte Phototoxizität. Zudem konnte eine erhöhte Freisetzung der Lactat-Dehydrogenase ins Kulturmedium mittels LDH-Assay detektiert werden, was auf eine erhöhte Zellmembranpermeabilität schließen lässt (Kapitel 3.3.3). Auch hier waren die Signale der FeWT NP stets höher als die der TiO<sub>2</sub> P25 NP.

Es wurde zusätzlich festgestellt, dass nach Inkubation mit TiO<sub>2</sub> NP, insbesondere den FeWT NP, direkt nach der Bestrahlung mit UV-A-Licht der programmierte Zelltod ausgelöst wird. Die Apoptose-Marker Caspase 3/7 sowie die Delokalisierung des Phosphatidylserins wurden vermehrt in den bestrahlten Zellen detektiert (Kapitel 3.3.4 und 3.3.5). Mittels Lebend-Zell-Analyse konnte hierbei eine Sterbekinetik für die Zellen HeLa und A549 aufgezeichnet werden. So wurde deutlich, dass bereits wenige Minuten nach der Bestrahlung Apoptose-Marker detektiert werden können und morphologische Veränderungen der Zellen sichtbar sind (Abbildung 58). Durch die parallele Lebend-Tod-Färbung wurde außerdem gezeigt, dass bei den meisten Zellen bereits nach kurzer Zeit eine zerstörte Zellmembran vorliegt, da nur so der Farbstoff *Cytotox red* in die Zellen eindringen konnte. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Krebszellen nach einer



gerichteten Aptamer Syl3C verbesserte die Effizienz von  $\text{TiO}_2$  P25 NP in der photodynamischen Behandlung von HeLa-Zellen (Kapitel 3.4.3). Der Großteil der Zellen blieb bei dieser Behandlung jedoch metabolisch aktiv. Da die unmodifizierten  $\text{TiO}_2$  P25 NP insgesamt einen eher moderaten phototoxischen Effekt auf die Krebszellen hatten, könnte hier eine Kombination von photodynamischer und chemischer Therapie in Betracht gezogen werden.  $\text{TiO}_2$  NP haben sich bereits aufgrund ihrer guten Charakterisierung und geringen Zytotoxizität als geeignete Transportmittel für etablierte Wirkstoffe erwiesen [189]. Zudem könnten weitere Targeting-Liganden wie alternative Aptamere, Antikörper, Peptide oder deren Kombinationen getestet werden, um noch eine Steigerung der Phototoxizität zu erreichen.

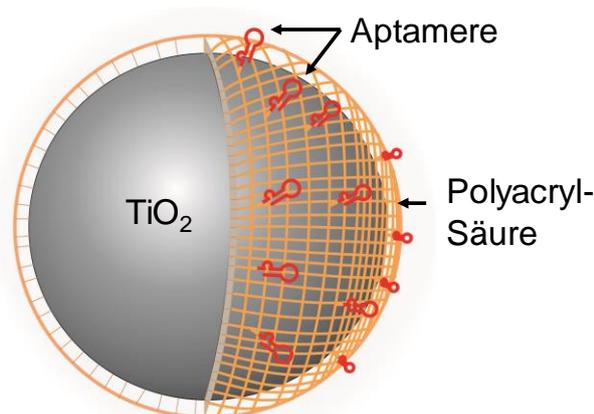


Abbildung 59: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit funktionalisierten  $\text{TiO}_2$  NP ( $\text{TiO}_2$  P25 oder FeWT). Die Aptamere (in diesem Fall Syl3C) sind über eine Aminogruppe an die Carboxy-Gruppen der adsorbierten Polyacrylsäure gebunden. Größenverhältnisse entsprechen nicht den genauen Maßstab.

Die FeWT NP erwiesen sich auch ohne Oberflächenmodifikation als äußerst phototoxisch gegenüber der untersuchten Krebszelllinien HeLa und A549. Ein zielgerichteter Transport könnte hier jedoch die nötige Dosierung noch weiter verringern und auch eventuelle Nebenwirkungen minimieren, indem die Aufnahme in gesundes Gewebe idealerweise unterbunden werden würde. Mit dem in dieser Arbeit getesteten Aptamer konnte der phototoxische Effekt der FeWT NP auf HeLa-Zellen nicht verbessert werden, auch hier wäre die Testung alternativer Targeting-Liganden notwendig, um ein noch effizienteres und zielgerichtetes System zu entwickeln.

Generell wird vermutlich die Wechselwirkung von zellulären Komponenten oder auch Molekülen wie Sauerstoff und Wasser mit der photokatalytisch aktiven Oberfläche durch jegliche Oberflächenmodifizierung eingeschränkt. Viele Beispiele zeigen jedoch, dass dieser Effekt durch die erhöhte NP-Aufnahme in die Zellen ausgeglichen und die Effizienz insgesamt trotzdem deutlich durch das *Targeted-Drug-Delivery* erhöht werden kann [117,121,134].

Eine weitere große Herausforderung stellt die Anpassung der Wellenlänge dar, mit welcher der photokatalytische Prozess in Bezug auf therapeutische Anwendungen angeregt werden kann. Die geringe Eindringtiefe von UV-Licht in menschliches Gewebe macht die tatsächliche Nutzung unmodifizierter TiO<sub>2</sub> NP *in vivo* sehr umständlich. Durch die Verwendung der FeWT NP konnten die HeLa-Zellen auch bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht erfolgreich abgetötet werden (Kapitel 3.2.3). Hier könnte durch Oberflächenmodifizierungen oder Anpassung der Bestrahlungsparameter die Effizienz zukünftig noch verbessert werden. Auch die Umwandlung von NIR-Licht in UV-A-Licht konnte erfolgreich durch die Synthese von Upconversion-Nanopartikeln umgesetzt werden. Sie bilden einen guten Ausgangspunkt für weitere Beschichtungen mit photokatalytisch-aktiven Materialien. Die Verwendung von UCNP@TiO<sub>2</sub> NP stellt ein hohes Potential für die Behandlung tieferliegender Tumore dar [115,142,190].

In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein *in vitro* Testsystem etabliert werden, welches die Einschätzung des phototoxischen Potentials von Nanomaterialien ermöglicht. Es wurde gezeigt, dass TiO<sub>2</sub> NP nach Inkubation mit Säugerzellen und anschließender Bestrahlung verschiedene Reaktionen in den Zellen auslösen und zum Zelltod führen können. Besonders neu entwickelte Materialien wie die hier verwendeten FeWT NP haben aufgrund ihrer hohen photokatalytischen Aktivität großes Potential für die Anwendung als Tumorheilmittel in der photodynamischen Therapie.

**Literatur**

1. The Nanodatabase Available online: <http://nanodb.dk/> (accessed on Jun 25, 2018).
2. Alshatwi, A. A.; Subbarayan, P. V.; Ramesh, E.; Al-Hazzani, A. A.; Alsaif, M. A.; Alwarthan, A. A. Aluminium oxide nanoparticles induce mitochondrial-mediated oxidative stress and alter the expression of antioxidant enzymes in human mesenchymal stem cells. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2013**, *30*, 1–10, doi:10.1080/19440049.2012.729160.
3. Radziun, E.; Dudkiewicz Wilczynska, J.; Ksiazek, I.; Nowak, K.; Anuszezwska, E. L.; Kunicki, A.; Olszyna, A.; Zabkowski, T. Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. *Toxicol. Vitro* **2011**, *25*, 1694–1700, doi:10.1016/j.tiv.2011.07.010.
4. Sun, J.; Wang, S.; Zhao, D.; Hun, F. H.; Weng, L.; Liu, H. Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles in human cardiac microvascular endothelial cells: cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles. *Cell Biol Toxicol* **2011**, *27*, 333–342, doi:10.1007/s10565-011-9191-9.
5. Beer, C.; Foldbjerg, R.; Hayashi, Y.; Sutherland, D. S.; Autrup, H. Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion? *Toxicol Lett* **2012**, *208*, 286–292, doi:10.1016/j.toxlet.2011.11.002.
6. Krug, H. F.; Bohmer, N.; Kühnel, D.; Marquardt, C.; Nau, K.; Steinbach, C. The DaNa2.0 Knowledge Base Nanomaterials - An Important Measure Accompanying Nanomaterials Development. *Nanomater. (Basel, Switzerland)* **2018**, *8*, doi:10.3390/nano8040204.
7. Nakata, K.; Fujishima, A. TiO<sub>2</sub> photocatalysis: Design and applications. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2012**, *13*, 169–189, doi:10.1016/j.jphotochemrev.2012.06.001.
8. Hernández-Ramírez, A.; Medina-Ramirez, I. Semiconducting Materials. In *Photocatalytic Semiconductors. Synthesis, Characterization, and Environmental Applications*; Hernández-Ramírez, A., Medina-Ramirez, I., Eds.; Springer, 2015; pp. 1–40 ISBN 978-3-319-10999-2.
9. Hoffmann, M. R.; Martin, S. T.; Choi, W.; Bahnemann, D. W. Environmental Applications of Semiconductor Photocatalysis. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 69–96, doi:10.1021/cr00033a004.
10. Pichat, P. A brief overview of photocatalytic mechanisms and pathways in water. *Water Sci. Technol.* **2007**, *55*, 167–173, doi:10.2166/wst.2007.401.
11. Kisch, H. *Semiconductor Photocatalysis: Principles and Applications*; John

- Wiley & Sons: Germany, 2015; ISBN 978-3-527-33553-4.
12. Fujishima, A.; Honda, K. Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode. *Nature* **1972**, *238*, 37–38.
  13. Schneider, J.; Matsuoka, M.; Takeuchi, M.; Zhang, J.; Horiuchi, Y.; Anpo, M.; Bahnemann, D. W. Understanding TiO<sub>2</sub> photocatalysis: mechanisms and materials. *Chem Rev* **2014**, *114*, 9919–9986, doi:10.1021/cr5001892.
  14. Freitag, J.; Bahnemann, D. W. Influence of the metal work function on the photocatalytic properties of TiO<sub>2</sub> layers on metals. *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 2670–2679, doi:10.1002/cphc.201500281.
  15. Hashimoto, K.; Irie, H.; Fujishima, A. TiO<sub>2</sub> Photocatalysis: A Historical Overview and Future Prospects. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2005**, *44*, 8269–8285, doi:10.1143/jjap.44.8269.
  16. Gupta, S. M.; Tripathi, M. A review of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Chinese Sci. Bull.* **2011**, *56*, 1639–1657, doi:10.1007/s11434-011-4476-1.
  17. Diebold, U. The surface science of titanium dioxide. *Surf. Sci. Rep.* **2003**, *48*, 53–229, doi:10.1016/S0167-5729(02)00100-0.
  18. Zaleska-Medynska, A.; Marchelek, M.; Diak, M.; Grabowska, E. Noble metal-based bimetallic nanoparticles: the effect of the structure on the optical, catalytic and photocatalytic properties. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2016**, *229*, 80–107, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2015.12.008.
  19. Ibhadon, O. A.; Fitzpatrick, P. Heterogeneous Photocatalysis: Recent Advances and Applications. *Catalysts* **2013**, *3*, 189–218, doi:10.3390/catal3010189.
  20. Linic, S.; Christopher, P.; Ingram, D. B. Plasmonic-metal nanostructures for efficient conversion of solar to chemical energy. *Nat Mater* **2011**, *10*, 911–921.
  21. Gomes Silva, C.; Juárez, R.; Marino, T.; Molinari, R.; García, H. Influence of Excitation Wavelength (UV or Visible Light) on the Photocatalytic Activity of Titania Containing Gold Nanoparticles for the Generation of Hydrogen or Oxygen from Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 595–602, doi:10.1021/ja1086358.
  22. Couselo, N.; García Einschlag, F. S.; Candal, R. J.; Jobbágy, M. Tungsten-Doped TiO<sub>2</sub> vs Pure TiO<sub>2</sub> Photocatalysts: Effects on Photobleaching Kinetics and Mechanism. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 1094–1100, doi:10.1021/jp0769781.
  23. Gomathi, Devi, L.; Kottam, N.; Girish, Kumar, S.; Eraiah, Rajashekhar, K. Preparation, characterization and enhanced photocatalytic activity of Ni<sup>2+</sup> doped titania under solar light. *Cent. Eur. J. Chem.* **2010**, *8*, 142–148, doi:10.2478/s11532-009-0115-y LB - Gomathi Devi2010.

24. Ghasemi, S.; Rahimnejad, S.; Setayesh, S. R.; Rohani, S.; Gholami, M. R. Transition metal ions effect on the properties and photocatalytic activity of nanocrystalline TiO<sub>2</sub> prepared in an ionic liquid. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *172*, 1573–1578, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.029.
25. Etacheri, V.; Di Valentin, C.; Schneider, J.; Bahnemann, D.; Pillai, S. C. Visible-light activation of TiO<sub>2</sub> photocatalysts: Advances in theory and experiments. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2015**, *25*, 1–29, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2015.08.003.
26. Kafizas, A.; Parkin, I. P. Combinatorial Atmospheric Pressure Chemical Vapor Deposition (cAPCVD): A Route to Functional Property Optimization. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20458–20467, doi:10.1021/ja208633g.
27. Liu, Y.; Wang, H.; Wu, Z. Characterization of metal doped-titanium dioxide and behaviors on photocatalytic oxidation of nitrogen oxides. *J. Environ. Sci.* **2007**, *19*, 1505–1509, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60245-9.
28. Friehs, E.; AlSalka, Y.; Jonczyk, R.; Lavrentieva, A.; Jochums, A.; Walter, J. G.; Stahl, F.; Scheper, T.; Bahnemann, D. Toxicity, phototoxicity and biocidal activity of nanoparticles employed in photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2016**, *29*, 1–28, doi:10.1016/j.jphotochemrev.2016.09.001.
29. Wörle-Knirsch, J. M.; Krug, H. F. Risikoforschung und Toxikologische Bewertung von Nanomaterialien. In *Nano - Chancen und Risiken aktueller Technologien*; Gázsó, A., Greßler, S., Schiemer, F., Eds.; Springer Vienna: Wien, 2007; p. 14 ISBN 978-3-211-48644-3.
30. Zaki, N. M.; Tirelli, N. Gateways for the intracellular access of nanocarriers: a review of receptor-mediated endocytosis mechanisms and of strategies in receptor targeting. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 895–913, doi:10.1517/17425247.2010.501792.
31. Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **2003**, *422*, 37–44, doi:10.1038/nature01451.
32. Yameen, B.; Choi, W. Il; Vilos, C.; Swami, A.; Shi, J.; Farokhzad, O. C. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 485–499, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.038.
33. Qiu, Y.; Liu, Y.; Wang, L.; Xu, L.; Bai, R.; Ji, Y.; Wu, X.; Zhao, Y.; Li, Y.; Chen, C. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* **2010**, *31*, 7606–7619, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.06.051.
34. Suzuki, H.; Toyooka, T.; Ibuki, Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 3018–3024,

- doi:10.1021/es0625632.
35. Chithrani, B. D.; Chan, W. C. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1542–1550, doi:10.1021/nl070363y.
  36. Simon, M.; Barberet, P.; Delville, M. H.; Moretto, P.; Sez nec, H. Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. *J. Biomed. Nanotechnol. TA - Nanotoxicology* **2011**, *7*, 125–139, doi:10.3109/17435390.2010.502979.
  37. Clift, M. J.; Rothen-Rutishauser, B.; Brown, D. M.; Duffin, R.; Donaldson, K.; Proudfoot, L.; Guy, K.; Stone, V. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *232*, 418–427, doi:10.1016/j.taap.2008.06.009.
  38. Aaron, J.; Nitin, N.; Travis, K.; Kumar, S.; Collier, T.; Park, S. Y.; José-Yacamán, M.; Coghlan, L.; Follen, M.; Richards-Kortum, R.; Sokolov, K. Plasmon resonance coupling of metal nanoparticles for molecular imaging of carcinogenesis in vivo. *J. Biomed. Opt.* **2007**, *12*, 34007, doi:10.1117/1.2737351.
  39. Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238–7248, doi:10.1021/jp057170o.
  40. Aslan, K.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. Plasmon light scattering in biology and medicine: new sensing approaches, visions and perspectives. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 538–544, doi:10.1016/j.cbpa.2005.08.021.
  41. Stringer, B.; Imrich, A.; Kobzik, L. Flow cytometric assay of lung macrophage uptake of environmental particulates. *Cytometry* **1995**, *20*, 23–32, doi:10.1002/cyto.990200106.
  42. Zhu, M.; Nie, G.; Meng, H.; Xia, T.; Nel, A.; Zhao, Y. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 622–631, doi:10.1021/ar300031y.
  43. Fröhlich, E. Cytotoxic Action of Non-biodegradable Engineered Nanoparticles. *Curr Drug Metab* **2013**, *14*, 976–988.
  44. Krug, H. F. Nanosafety Research-Are We on the Right Track? *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, n/a-n/a, doi:10.1002/anie.201403367.
  45. Nohynek, G. J.; Lademann, J.; Ribaud, C.; Roberts, M. S. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit Rev Toxicol* **2007**, *37*,

- 251–277, doi:10.1080/10408440601177780.
46. Fröhlich, E. Cellular Targets and Mechanisms in the Cytotoxic Action of Non-biodegradable Engineered Nanoparticles. *Curr. Drug Metab.* **2013**, *14*, 976–988.
  47. Durán, N.; Durán, M.; de Jesus, M. B.; Seabra, A. B.; Fávaro, W. J.; Nakazato, G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2016**, *12*, 789–799, doi:10.1016/j.nano.2015.11.016.
  48. Lin, J.; Zhang, H.; Chen, Z.; Zheng, Y. Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship. *ACS Nano* **2010**, *4*, 5421–5429, doi:10.1021/nn1010792.
  49. Natarajan, V.; Wilson, C. L.; Hayward, S. L.; Kidambi, S. Titanium Dioxide Nanoparticles Trigger Loss of Function and Perturbation of Mitochondrial Dynamics in Primary Hepatocytes. *PLoS One* **2015**, *10*, e0134541, doi:10.1371/journal.pone.0134541.
  50. Li, N.; Sioutas, C.; Cho, A.; Schmitz, D.; Misra, C.; Sempf, J.; Wang, M.; Oberley, T.; Froines, J.; Nel, A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.* **2003**, *111*, 455–460.
  51. Oberdörster, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 823–839, doi:10.1289/ehp.7339.
  52. Zamzami, N.; Susin, S. A.; Marchetti, P.; Hirsch, T.; Gómez-Monterrey, I.; Castedo, M.; Kroemer, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 1533–1544.
  53. Petit, P. X.; Susin, S.-A.; Zamzami, N.; Mignotte, B.; Kroemer, G. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett.* **1996**, *396*, 7–13, doi:10.1016/0014-5793(96)00988-X.
  54. Selim, M. E.; Hendi, A. A. Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev TA - Asian Pac, J. Cancer Prev* **2012**, *13*, 1617–1620.
  55. Siddiqui, M. A.; Alhadlaq, H. A.; Ahmad, J.; Al-Khedhairi, A. A.; Musarrat, J.; Maqsood; Ahamed, M. Copper oxide nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *PLoS One TA - One, P. LoS* **2013**, *8*, e69534, doi:10.1371/journal.pone.0069534.
  56. Nabiev, I.; Mitchell, S.; Davies, A.; Williams, Y.; Kelleher, D.; Moore, R.; Gun'ko, Y. K.; Byrne, S.; Rakovich, Y. P.; Donegan, J. F.; Sukhanova, A.; Conroy, J.; Cottell, D.; Gaponik, N.; Rogach, A.; Volkov, Y. Nonfunctionalized nanocrystals can exploit a cell's active transport machinery delivering them to specific nuclear and cytoplasmic compartments. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3452–3461,

- doi:10.1021/nl0719832.
57. Singh, N.; Manshian, B.; Jenkins, G. J. S.; Griffiths, S. M.; Williams, P. M.; Maffei, T. G. G.; Wright, C. J.; Doak, S. H. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3891–3914, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.009.
  58. Waisberg, M.; Joseph, P.; Hale, B.; Beyersmann, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* **2003**, *192*, 95–117.
  59. Nel, A.; Xia, T.; Mädler, L.; Li, N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science (80-. )*. **2006**, *311*, 622–627, doi:10.1126/science.1114397.
  60. Fubini, B. Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environ. Health Perspect.* **1997**, *105*, 1013–1020.
  61. Liu, S.; Zeng, T. H.; Hofmann, M.; Burcombe, E.; Wei, J.; Jiang, R.; Kong, J.; Chen, Y. Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6971–6980, doi:10.1021/nn202451x.
  62. Yang, H.; Liu, C.; Yang, D.; Zhang, H.; Xi, Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.* **2009**, *29*, 69–78, doi:10.1002/jat.1385.
  63. Dasari, T. P.; Pathakoti, K.; Hwang, H.-M. Determination of the mechanism of photoinduced toxicity of selected metal oxide nanoparticles (ZnO, CuO, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and TiO<sub>2</sub>) to *E. coli* bacteria. *J. Environ. Sci.* **2013**, *25*, 882–888, doi:10.1016/s1001-0742(12)60152-1.
  64. Dalai, S.; Pakrashi, S.; Kumar, R. S. S.; Chandrasekaran, N.; Mukherjee, A. A comparative cytotoxicity study of TiO<sub>2</sub> nanoparticles under light and dark conditions at low exposure concentrations. *Toxicol. Res. (Camb)*. **2012**, *1*, 116–130, doi:10.1039/c2tx00012a.
  65. Adams, L. K.; Lyon, D. Y.; Alvarez, P. J. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions. *Water Res* **2006**, *40*, 3527–3532, doi:10.1016/j.watres.2006.08.004.
  66. Tong, T.; Binh, C. T.; Kelly, J. J.; Gaillard, J. F.; Gray, K. A. Cytotoxicity of commercial nano-TiO<sub>2</sub> to *Escherichia coli* assessed by high-throughput screening: effects of environmental factors. *Water Res* **2013**, *47*, 2352–2362, doi:10.1016/j.watres.2013.02.008.
  67. Lipovsky, A.; Nitzan, Y.; Gedanken, A.; Lubart, R. Antifungal activity of ZnO nanoparticles - the role of ROS mediated cell injury. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 105101, doi:10.1088/0957-4484/22/10/105101.
  68. Lee, W. M.; An, Y. J. Effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles

- on green algae under visible, UVA, and UVB irradiations: no evidence of enhanced algal toxicity under UV pre-irradiation. *Chemosphere* **2013**, *91*, 536–544, doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.033.
69. Miller, R. J.; Bennett, S.; Keller, A. A.; Pease, S.; Lenihan, H. S. TiO<sub>2</sub> nanoparticles are phototoxic to marine phytoplankton. *PLoS One* **2012**, *7*, e30321, doi:10.1371/journal.pone.0030321.
70. Kim, J.; Lee, S.; Kim, C. M.; Seo, J.; Park, Y.; Kwon, D.; Lee, S. H.; Yoon, T. H.; Choi, K. Non-monotonic concentration-response relationship of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in freshwater cladocerans under environmentally relevant UV-A light. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2014**, *101*, 240–247, doi:10.1016/j.ecoenv.2014.01.002.
71. Mansfield, C. M.; Alloy, M. M.; Hamilton, J.; Verbeck, G. F.; Newton, K.; Klaine, S. J.; Roberts, A. P. Photo-induced toxicity of titanium dioxide nanoparticles to *Daphnia magna* under natural sunlight. *Chemosphere* **2015**, *120*, 206–210, doi:10.1016/j.chemosphere.2014.06.075.
72. Amiano, I.; Olabarrieta, J.; Vitorica, J.; Zorita, S. Acute toxicity of nanosized TiO<sub>2</sub> to *Daphnia magna* under UVA irradiation. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 2564–2566, doi:10.1002/etc.1981.
73. Ma, H.; Brennan, A.; Diamond, S. A. Phototoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles under solar radiation to two aquatic species: *Daphnia magna* and Japanese medaka. *Env. Toxicol Chem* **2012**, *31*, 1621–1629, doi:10.1002/etc.1858.
74. Marccone, G. P.; Oliveira, A. C.; Almeida, G.; Umbuzeiro, G. A.; Jardim, W. F. Ecotoxicity of TiO<sub>2</sub> to *Daphnia similis* under irradiation. *J Hazard Mater* **2012**, *211–212*, 436–442, doi:10.1016/j.jhazmat.2011.12.075.
75. Ma, H.; Brennan, A.; Diamond, S. A. Photocatalytic reactive oxygen species production and phototoxicity of titanium dioxide nanoparticles are dependent on the solar ultraviolet radiation spectrum. *Env. Toxicol Chem* **2012**, *31*, 2099–2107, doi:10.1002/etc.1916.
76. Ma, H.; Wallis, L. K.; Diamond, S.; Li, S.; Canas-Carrell, J.; Parra, A. Impact of solar UV radiation on toxicity of ZnO nanoparticles through photocatalytic reactive oxygen species (ROS) generation and photo-induced dissolution. *Env. Pollut* **2014**, *193*, 165–172, doi:10.1016/j.envpol.2014.06.027.
77. Vevers, W. F.; Jha, A. N. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on fish cells in vitro. *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 410–420, doi:10.1007/s10646-008-0226-9.
78. Bar-Ilan, O.; Louis, K. M.; Yang, S. P.; Pedersen, J. A.; Hamers, R. J.; Peterson, R. E.; Heideman, W. Titanium dioxide nanoparticles produce phototoxicity in the developing zebrafish. *Nanotoxicology* **2012**, *6*, 670–679, doi:10.3109/17435390.2011.604438.

79. Shukla, R. K.; Kumar, A.; Pandey, A. K.; Singh, S. S.; Dhawan, A. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress-mediated apoptosis in human keratinocyte cells. *J. Biomed. Nanotechnol. TA - Nanotechnol, J. Biomed* **2011**, *7*, 2.
80. Xue, C.; Wu, J.; Lan, F.; Liu, W.; Yang, X.; Zeng, F.; Xu, H. Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *J. Nanosci. Nanotechnol. TA - Nanotechnol, J. Nanosci* **2010**, *10*, 8500.
81. Yin, J. J.; Liu, J.; Ehrenshaft, M.; Roberts, J. E.; Fu, P. P.; Mason, R. P.; Zhao, B. Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes - generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicol Appl Pharmacol* **2012**, *263*, 81–88, doi:10.1016/j.taap.2012.06.001.
82. Dalai, S.; Pakrashi, S.; Chandrasekaran, N.; Mukherjee, A. Acute toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to *Ceriodaphnia dubia* under visible light and dark conditions in a freshwater system. *PLoS One* **2013**, *8*, e62970, doi:10.1371/journal.pone.0062970.
83. Faria, M.; Navas, J. M.; Raldua, D.; Soares, A. M.; Barata, C. Oxidative stress effects of titanium dioxide nanoparticle aggregates in zebrafish embryos. *Sci. Total Environ.* **2014**, *470–471*, 379–389, doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.055.
84. Uchino, T.; Tokunaga, H.; Ando, M.; Utsumi, H. Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO<sub>2</sub>-UVA treatment. *Toxicol. Vitr.* **2002**, *16*, 629–635, doi:0887-2333/02.
85. Mueller, N. C.; Nowack, B. Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 4447–4452, doi:10.1021/es7029637.
86. Gottschalk, F.; Sonderer, T.; Scholz, R.; Nowack, B. Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environ. Sci. Technol.* *43*, 7, doi:10.1021/es9015553.
87. Moan, J. Visible light and UV irradiation. In *Radiation at Home, Outdoors and in the Workplace*; Brune, D., Hellborg, R., Persson, B. R. R., Pääkönen, R., Eds.; Scandinavian Science Publisher: Oslo, Norway, 2001; pp. 69–85.
88. Elisseeff, J.; Anseth, K.; Sims, D.; McIntosh, W.; Randolph, M.; Langer, R. Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *96*, 3104–3107.
89. SCCNFP *Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products concerning Titanium Dioxide*; 2000;
90. Matsunaga, T.; Tomoda, R.; Nakajima, T.; Wake, H. Photoelectrochemical

- sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiol. Lett.* **1985**, *29*, 211–214.
91. Ireland, J. C.; Klostermann, P.; Rice, E. W.; Clark, R. M. Inactivation of *Escherichia coli* by Titanium Dioxide Photocatalytic Oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 1668–1670, doi:0099-2240/93/051668-03.
  92. Sjogren, J. C.; Sierka, R. A. Inactivation of Phage MS2 by Iron-Aided Titanium Dioxide Photocatalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 344–347, doi:0099-2240/94.
  93. Roldan, M. V; de Ona, P.; Castro, Y.; Duran, A.; Faccendini, P.; Lagier, C.; Grau, R.; Pellegrini, N. S. Photocatalytic and biocidal activities of novel coating systems of mesoporous and dense TiO<sub>2</sub>-anatase containing silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2014**, *43*, 630–640, doi:10.1016/j.msec.2014.07.053.
  94. Diamond, I.; McDonagh, A.; Wilson, C.; Granelli, S.; Nielsen, S.; Jaenicke, R. Photodynamic Therapy of Malignant Tumors. *Lancet* **1972**, *300*, 1175–1177, doi:10.1016/S0140-6736(72)92596-2.
  95. Lucky, S. S.; Soo, K. C.; Zhang, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chem Rev* **2015**, *115*, 1990–2042, doi:10.1021/cr5004198.
  96. Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. How does Photodynamic Therapy work? *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 145–157, doi:10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x.
  97. Boyle, R. W.; Dolphin, D. Structure and Biodistribution Relationships of Photodynamic Sensitizers. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 469–485, doi:003 1-8655/96.
  98. Cai, R.; Hashimoto, K.; Itoh, K.; Kubota, Y.; Fujishima, A. Photokilling of Malignant Cells with Ultrafine TiO<sub>2</sub> Powder. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 1268–1273, doi:10.1246/bcsj.64.1268.
  99. Cai, R.; Hashimoto, K.; Kubota, Y.; Fujishima, A. Increment of Photocatalytic Killing of Cancer Cells Using TiO<sub>2</sub> with the Aid of Superoxide Dismutase. *Chem. Lett.* **1992**, *21*, 427–430, doi:10.1246/cl.1992.427.
  100. Kubota, Y.; Shuin, T.; Kawasaki, C.; Hosakal, M.; Kitamura, H.; R. Cail, H. S.; Hashimoto, K.; Fujishima, A. Photokilling of T-24 human bladder cancer cells with titanium dioxide. *Br. J. Cancer* **1994**, *70*, 1107–1111.
  101. Huang, N.; Xu, M.; Yuan, C.; Yu, R. The study of the photokilling effect and mechanism of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles on U937 cells. *J. Photochemistry Photobiol. A Chem.* **1997**, *108*, 229–233, doi:1010-6030/97.
  102. Xu, M.; Huang, N.; Xiao, Z.; Lu, Z. Photoexcited TiO<sub>2</sub> nanoparticles through •OH-radicals induced malignant cells to necrosis. *Supramol. Sci.* **1998**, *5*,

- 449–451, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0968-5677\(98\)00048-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-5677(98)00048-0).
103. Zhang, A.; Sun, Y. Photocatalytic killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *J. Gastroenterol.* **2004**, *10*, 3191–3193.
  104. Lagopati, N.; Kitsiou, P. V.; Kontos, A. I.; Venieratos, P.; Kotsopoulou, E.; Kontos, A. G.; Dionysiou, D. D.; Pispas, S.; Tsilibary, E. C.; Falaras, P. Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2010**, *214*, 215–223, doi:10.1016/j.jphotochem.2010.06.031.
  105. Lagopati, N.; Tsilibary, E. P.; Falaras, P.; Papazafiri, P.; Pavlatou, E. A.; Kotsopoulou, E.; Kitsiou, P. Effect of nanostructured TiO<sub>2</sub> crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 3219–3230, doi:10.2147/IJN.S62972.
  106. Yamaguchi, S.; Kobayashi, H.; Narita, T.; Kanehira, K.; Sonezaki, S.; Kubota, Y.; Terasaka, S.; Iwasaki, Y. Novel Photodynamic Therapy Using Water-dispersed TiO<sub>2</sub>-Polyethylene Glycol Compound: Evaluation of Antitumor Effect on Glioma Cells and Spheroids In Vitro. *Photochem. Photobiol.* **86**, *8*, doi:10.1111 / j.1751-1097.2010.00742.x.
  107. Wang, C.; Cao, S.; Tie, X.; Qiu, B.; Wu, A.; Zheng, Z. Induction of cytotoxicity by photoexcitation of TiO<sub>2</sub> can prolong survival in glioma-bearing mice. *Mol Biol Rep* **2011**, *38*, 523–530, doi:10.1007/s11033-010-0136-9.
  108. Hackenberg, S.; Scherzed, A.; Kessler, M.; Froehlich, K.; Ginzkey, C.; Koehler, C.; Burghartz, M.; Hagen, R.; Kleinsasser, N. Zinc oxide nanoparticles induce photocatalytic cell death in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines in vitro. *Int. J. Oncol.* **2010**, *37*, 1590–1593, doi:10.3892/ijo\_00000812.
  109. Li, J.; Guo, D.; Wang, X.; Wang, H.; Jiang, H.; Chen, B. The Photodynamic Effect of Different Size ZnO Nanoparticles on Cancer Cell Proliferation In Vitro. *Nanoscale Res Lett* **2010**, *5*, 1063–1071, doi:10.1007/s11671-010-9603-4.
  110. Kalluru, P.; Vankayala, R.; Chiang, C.-S.; Hwang, K. C. Photosensitization of Singlet Oxygen and In Vivo Photodynamic Therapeutic Effects Mediated by PEGylated W18049 Nanowires. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 12332–12336, doi:10.1002/anie.201307358.
  111. Vandebriel, R. J.; De Jong, W. H. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl* **2012**, *5*, 61–71, doi:10.2147/NSA.S23932.
  112. Matsui, K.; Karasaki, M.; Segawa, M.; Hwang, S. Y.; Tanaka, T.; Ogino, C.; Kondo, A. Biofunctional TiO<sub>2</sub> nanoparticle-mediated photokilling of cancer cells using UV irradiation. *Medchemcomm* **2010**, *1*, 209–211, doi:10.1039/c0md00027b.

113. Seo, J. W.; Chung, H.; Kim, M. Y.; Lee, J.; Choi, I. H.; Cheon, J. Development of water-soluble single-crystalline TiO<sub>2</sub> nanoparticles for photocatalytic cancer-cell treatment. *Small* **2007**, *3*, 850–853, doi:10.1002/sml.200600488.
114. Sette, A.; Spadavecchia, J.; Landoulsi, J.; Casale, S.; Haye, B.; Crociani, O.; Arcangeli, A. Development of novel anti-Kv 11.1 antibody-conjugated PEG-TiO<sub>2</sub> nanoparticles for targeting pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *J Nanopart Res* **2013**, *15*, 2111, doi:10.1007/s11051-013-2111-6.
115. Lucky, S. S.; Idris, N. M.; Li, Z.; Huang, K.; Soo, K. C.; Al, L. E. T. Titania Coated Upconversion Nanoparticles for Near-Infrared Light Triggered Photodynamic Therapy. **2015**, 191–205.
116. Feng, X.; Zhang, S.; Lou, X. Controlling silica coating thickness on TiO<sub>2</sub> nanoparticles for effective photodynamic therapy. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2013**, *107*, 220–226, doi:10.1016/j.colsurfb.2013.02.007.
117. Feng, X.; Zhang, S.; Wu, H.; Lou, X. A novel folic acid-conjugated TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> photosensitizer for cancer targeting in photodynamic therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, *125*, 197–205, doi:10.1016/j.colsurfb.2014.11.035.
118. Cai, R.; Kubota, Y.; Shuin, T.; Sakai, H.; Hashimoto, K.; Fujishima, A. Induction of Cytotoxicity by Photoexcited TiO<sub>2</sub> Particles. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2346–2348.
119. Huang, Z.; Xu, H.; Meyers, A. D.; Musani, A. I.; Wang, L.; Tagg, R.; Barqawi, A. B.; Chen, Y. K. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors--potential and technical challenges. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2008**, *7*, 309–20, doi:10.1177/153303460800700405.
120. Janczyk, A.; Wolnicka-Glubisz, A.; Urbanska, K.; Kisch, H.; Stochel, G.; Macyk, W. Photodynamic activity of platinum(IV) chloride surface-modified TiO<sub>2</sub> irradiated with visible light. *Free Radic Biol Med* **2008**, *44*, 1120–1130, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.019.
121. Rozhkova, E. A.; Ulasov, I.; Lai, B.; Dimitrijevic, N. M.; Lesniak, M. S.; Rajh, T. A High-Performance Nanobio Photocatalyst for Targeted Brain Cancer Therapy. *Nano Lett* **2009**, *9*, 3337–3342, doi:10.1021/nl901610f.
122. George, S.; Pokhrel, S.; Ji, Z.; Henderson, B. L.; Xia, T.; Li, L.; Zink, J. I.; Nel, A. E.; Mädler, L. Role of Fe-Doping in Tuning the Band Gap of TiO<sub>2</sub> for the Photo-Oxidation-Induced Cytotoxicity Paradigm. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11270–11278, doi:10.1021/ja202836s.
123. Li, Z.; Mi, L.; Wang, P.-N.; Chen, J.-Y. Study on the visible-light-induced photokilling effect of nitrogen-doped TiO<sub>2</sub> nanoparticles on cancer cells. *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6*, 356, doi:10.1186/1556-276X-6-356.

124. Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620–40, doi:10.1021/cr900263j.
125. Anderson, R. R.; Parrish, J. A. Optical Properties of Human Skin. In *The Science of Photomedicine*; Springer US: Boston, MA, 1982; pp. 147–194.
126. Hassan, S.; Prakash, G.; Bal Ozturk, A.; Saghadzadeh, S.; Farhan Sohail, M.; Seo, J.; Remzi Dokmeci, M.; Zhang, Y. S.; Khademhosseini, A. Evolution and clinical translation of drug delivery nanomaterials. *Nano Today* **2017**, *15*, 91–106, doi:10.1016/j.nantod.2017.06.008.
127. Chou, L. Y. T.; Ming, K.; Chan, W. C. W. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 233–245, doi:10.1039/C0CS00003E.
128. Babu, A.; Templeton, A. K.; Munshi, A.; Ramesh, R. Nanodrug delivery systems: a promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer. *AAPS PharmSciTech* **2014**, *15*, 709–21, doi:10.1208/s12249-014-0089-8.
129. Zeng, L.; Pan, Y.; Tian, Y.; Wang, X.; Ren, W.; Wang, S.; Lu, G.; Wu, A. Doxorubicin-loaded NaYF<sub>4</sub>:Yb/Tm-TiO<sub>2</sub> inorganic photosensitizers for NIR-triggered photodynamic therapy and enhanced chemotherapy in drug-resistant breast cancers. *Biomaterials* **2015**, *57*, 93–106, doi:10.1016/j.biomaterials.2015.04.006.
130. Zhang, L.; Zeng, L.; Pan, Y.; Luo, S.; Ren, W.; Gong, A.; Ma, X.; Liang, H.; Lu, G.; Wu, A. Inorganic photosensitizer coupled Gd-based upconversion luminescent nanocomposites for in vivo magnetic resonance imaging and near-infrared-responsive photodynamic therapy in cancers. *Biomaterials* **2015**, *44*, 82–90, doi:10.1016/j.biomaterials.2014.12.040.
131. Hu, Z.; Li, J.; Li, C.; Zhao, S.; Li, N.; Wang, Y.; Wei, F.; Chen, L.; Huang, Y. Folic acid-conjugated graphene–ZnO nanohybrid for targeting photodynamic therapy under visible light irradiation. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 5003, doi:10.1039/c3tb20849d.
132. Campbell, I. G.; Jones, T. A.; Foulkes, W. D.; Trowsdale, J. Folate-binding Protein Is a Marker for Ovarian Cancer. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 5329–5338.
133. Reinemann, C.; Strehlitz, B. Aptamer-modified nanoparticles and their use in cancer diagnostics and treatment. *Swiss Med. Wkly.* **2014**, *144*, w13908, doi:10.4414/smw.2014.13908.
134. Song, M. Y.; Jurng, J.; Park, Y. K.; Kim, B. C. An aptamer cocktail-functionalized photocatalyst with enhanced antibacterial efficiency towards target bacteria. *J. Hazard. Mater.* **2016**, *318*, 247–254, doi:10.1016/j.jhazmat.2016.07.016.
135. Walter, J.-G.; Modrejewski, J.; Scheper, T.; Urmann, K. Aptamer-modified

- nanomaterials: principles and applications. *BioNanoMat* **2017**, *18*, doi:10.1515/bnm-2016-0012.
136. Yang, L.; Zhang, X.; Ye, M.; Jiang, J.; Yang, R.; Fu, T.; Chen, Y.; Wang, K.; Liu, C.; Tan, W. Aptamer-conjugated nanomaterials and their applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 1361–1370, doi:10.1016/j.addr.2011.10.002.
137. Farokhzad, O. C.; Jon, S.; Khademhosseini, A.; Tran, T. T.; Lavan, D. a; Langer, R. Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates : A New Approach for Targeting Prostate Cancer Cells Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates : A New Approach for Targeting Prostate Cancer Cells. **2004**, 7668–7672, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2550.
138. Haase, M.; Schäfer, H. Upconverting nanoparticles. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 5808–5829, doi:10.1002/anie.201005159.
139. Li, C.; Lin, J. Rare earth fluoride nano-/microcrystals: synthesis, surface modification and application. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6831–6847, doi:10.1039/C0JM00031K.
140. Dong, H.; Sun, L. D.; Yan, C. H. Energy transfer in lanthanide upconversion studies for extended optical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1608–1634, doi:10.1039/c4cs00188e.
141. Idris, N. M.; Lucky, S. S.; Li, Z.; Huang, K.; Zhang, Y. Photoactivation of core-shell titania coated upconversion nanoparticles and their effect on cell death. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 7017–7026, doi:10.1039/C4TB01169D 10.1039/c4tb01169d.
142. Hou, Z.; Zhang, Y.; Deng, K.; Chen, Y.; Li, X.; Deng, X.; Cheng, Z.; Lian, H.; Li, C.; Lin, J. UV-Emitting Upconversion-Based TiO<sub>2</sub> Photosensitizing Nanoplatform: Near-Infrared Light Mediated in Vivo Photodynamic Therapy via Mitochondria-Involved Apoptosis Pathway. *ACS Nano* **2015**, *9*, 2584–2899, doi:10.1021/nn506107c.
143. Yu, Z.; Sun, Q.; Pan, W.; Li, N.; Tang, B. A Near-Infrared Triggered Nanophotosensitizer Inducing Domino Effect on Mitochondrial Reactive Oxygen species Burst for Cancer Therapy. *ACS Nano* **2015**, *9*, 11064–11074, doi:10.1021/acsnano.5b04501.
144. Xu, Q. C.; Zhang, Y.; Tan, M. J.; Liu, Y.; Yuan, S.; Choong, C.; Tan, N. S.; Tan, T. T. Y. Anti-cAngptl4 Ab-conjugated N-TiO<sub>2</sub>/NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm Nanocomposite for Near Infrared-Triggered Drug Release and Enhanced Targeted Cancer Cell Ablation. *Adv. Healthc. Mater.* **2012**, *1*, 470–474, doi:10.1002/adhm.201200055.
145. Chen, G.; Qiu, H.; Prasad, P. N.; Chen, X. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5161–5214, doi:10.1021/cr400425h.

146. Lindner, M.; Bahnemann, D. W.; Hirthe, B.; Griebler, W.-D. Solar Water Detoxification: Novel TiO<sub>2</sub> Powders as Highly Active Photocatalysts. *J. Sol. Energy Eng.* **1997**, *119*, 120, doi:10.1115/1.2887890.
147. Jochums, A.; Friehs, E.; Sambale, F.; Lavrentieva, A.; Bahnemann, D.; Scheper, T. Revelation of Different Nanoparticle-Uptake Behavior in Two Standard Cell Lines NIH/3T3 and A549 by Flow Cytometry and Time-Lapse Imaging. *Toxics* **2017**, doi:10.3390/toxics5030015.
148. Tedja, R.; Marquis, C.; Lim, M.; Amal, R. Biological impacts of TiO<sub>2</sub> on human lung cell lines A549 and H1299: Particle size distribution effects. *J. Nanoparticle Res.* **2011**, *13*, 3801–3813, doi:10.1007/s11051-011-0302-6.
149. Thurn, K. T.; Arora, H.; Paunesku, T.; Wu, A.; Brown, E. M. B.; Doty, C.; Kremer, J.; Woloschak, G. Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2011**, *7*, 123–130, doi:10.1016/j.nano.2010.09.004.
150. Lanz, E.; Gregor, M.; Slavík, J.; Kotyk, A. Use of FITC as a Fluorescent Probe for Intracellular pH Measurement. *J. Fluoresc.* **1997**, *7*, 317–319, doi:10.1023/A:1022586127784.
151. Vranic, S.; Boggetto, N.; Contremoulins, V.; Mornet, S.; Reinhardt, N.; Marano, F.; Baeza-Squiban, A.; Boland, S. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part. Fibre Toxicol.* **2013**, *10*, 2, doi:10.1186/1743-8977-10-2.
152. Caballero-Díaz, E.; Pfeiffer, C.; Kastl, L.; Rivera-Gil, P.; Simonet, B.; Valcárcel, M.; Jiménez-Lamana, J.; Laborda, F.; Parak, W. J. The toxicity of silver nanoparticles depends on their uptake by cells and thus on their surface chemistry. *Part. Part. Syst. Charact.* **2013**, *30*, 1079–1085, doi:10.1002/ppsc.201300215.
153. Saltan, N.; Kutlu, H. M.; Hür, D.; Işcan, A.; Say, R. Interaction of cancer cells with magnetic nanoparticles modified by methacrylamido-folic acid. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 477–484, doi:10.2147/IJN.S16803.
154. Hazel, A. L.; Pedley, T. J. Vascular endothelial cells minimize the total force on their nuclei. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 47–54, doi:10.1016/S0006-3495(00)76571-4.
155. Kim, D.-H.; Li, B.; Si, F.; Phillip, J. M.; Wirtz, D.; Sun, S. X. Volume regulation and shape bifurcation in the cell nucleus. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 457–457, doi:10.1242/jcs.185173.
156. Balayeva, N. O.; Fleisch, M.; Bahnemann, D. W. Surface-grafted WO<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> photocatalysts: Enhanced visible-light activity towards indoor air purification. *Catal. Today* **2018**, *313*, 63–71, doi:10.1016/j.cattod.2017.12.008.

157. Gstraunthaler, G.; Lindl, T.; Van Der Valk, J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology* **2013**, *65*, 791–793, doi:10.1007/s10616-013-9633-8.
158. Brar, S. S.; Kennedy, T. P.; Whorton, A. R.; Murphy, T. M.; Chitano, P.; Hoidal, J. R. Requirement for reactive oxygen species in serum-induced and platelet-derived growth factor-induced growth of airway smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20017–26.
159. Shang, H.; Han, D.; Ma, M.; Li, S.; Xue, W.; Zhang, A. Enhancement of the photokilling effect of TiO<sub>2</sub> in photodynamic therapy by conjugating with reduced graphene oxide and its mechanism exploration. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2017**, *177*, 112–123, doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.10.016.
160. Zhang, L.; Qin, M.; Yu, W.; Zhang, Q.; Xie, H.; Sun, Z.; Shao, Q.; Guo, X.; Hao, L.; Zheng, Y.; Guo, Z. Heterostructured TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub> Nanocomposites for Photocatalytic Degradation of Toluene under Visible Light. *J. Electrochem. Soc.* **2017**, *164*, H1086–H1090, doi:10.1149/2.0881714jes.
161. Smith, W.; Wolcott, A.; Fitzmorris, R. C.; Zhang, J. Z.; Zhao, Y. Quasi-core-shell TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub> nanorod arrays fabricated by glancing angle deposition for solar water splitting. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 10792, doi:10.1039/c1jm11629k.
162. Huang, K.; Chen, L.; Liao, M.; Xiong, J. The Photocatalytic Inactivation Effect of Fe-Doped TiO<sub>2</sub> Nanocomposites on Leukemic HL60 Cells-Based Photodynamic Therapy. *Int. J. Photoenergy* **2012**, *2012*, 1–8, doi:10.1155/2012/367072.
163. LeBel, C. P.; Ischiropoulos, H.; Bondy, S. C. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 227–231, doi:0893-228x/92/2705-02.
164. Vile, G. F.; Tyrrell, R. M. UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 721–30.
165. Chen, J.; Zhou, H.; Santulli, A. C.; Wong, S. S. Evaluating Cytotoxicity and Cellular Uptake from the Presence of Various Processed TiO<sub>2</sub> Nanostructured Morphologies. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 871–879, doi:10.1021/tx900418b.
166. Artymovich, K.; Appledorn, D. M. A multiplexed method for kinetic measurements of apoptosis and proliferation using live-content imaging. In *Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols: Second Edition*; 2014 ISBN 9781493916610.
167. IncuCyte Cell Health & Viability Assay Kit. Available online: <https://www.essenbioscience.com/en/communications/applications/cell->

- health-viability-assays/ (accessed on Jun 19, 2018).
168. Yoo, K.-C.; Yoon, C.-H.; Kwon, D.; Hyun, K.-H.; Woo, S. J.; Kim, R.-K.; Lim, E.-J.; Suh, Y.; Kim, M.-J.; Yoon, T. H.; Lee, S.-J. Titanium dioxide induces apoptotic cell death through reactive oxygen species-mediated Fas upregulation and Bax activation. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 1203–14, doi:10.2147/IJN.S28647.
  169. Kanehira, K.; Banzai, T.; Ogino, C.; Shimizu, N.; Kubota, Y.; Sonezaki, S. Properties of TiO<sub>2</sub>-polyacrylic acid dispersions with potential for molecular recognition. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2008**, *64*, 10–15, doi:10.1016/j.colsurfb.2007.12.018.
  170. Couto, D. M. M. de B. Biological effects of polyacrylic acid-coated and non-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in in vitro and in vivo experimental models, Universidade do Porto (Portugal), 2015.
  171. Eilers, A. Etablierung von in vitro-Testsystemen für die Anwendung photokatalytisch aktiver Nanopartikel in der Krebstherapie, Leibniz Universität Hannover, 2017.
  172. Nash, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* **1953**, *55*, 416–421, doi:10.1042/bj0550416.
  173. Melcher, J. W. Photokatalytische Oxidation niedermolekularer Alkohole, Naturwissenschaftliche Fakultät, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover: Hannover, 2017.
  174. Song, M. Y.; Jung, H. D.; Jurng, J.; Kim, B. C. Bacterial target-specific photocatalyst for the enhancement of antibacterial property to targets. *Appl. Catal. B Environ.* **2014**, *148–149*, 568–572, doi:10.1016/j.apcatb.2013.11.038.
  175. Tonigold, M.; Simon, J.; Estupiñán, D.; Kokkinopoulou, M.; Reinholz, J.; Kintzel, U.; Kaltbeitzel, A.; Renz, P.; Domogalla, M. P.; Steinbrink, K.; Lieberwirth, I.; Crespy, D.; Landfester, K.; Mailänder, V. Pre-adsorption of antibodies enables targeting of nanocarriers despite a biomolecular corona. *Nat. Nanotechnol.* **2018**, doi:10.1038/s41565-018-0171-6.
  176. Song, Y.; Zhu, Z.; An, Y.; Zhang, W.; Zhang, H.; Liu, D.; Yu, C.; Duan, W.; Yang, C. J. Selection of DNA Aptamers against Epithelial Cell Adhesion Molecule for Cancer Cell Imaging and Circulating Tumor Cell Capture. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4141–4149, doi:10.1021/ac400366b.
  177. Breyer, A.-L. Charakterisierung verschiedener Aptamere zur Detektion von Lungenkrebszellen, Hochschule Emden/Leer, 2017.
  178. Mendive, C. B.; Bredow, T.; Schneider, J.; Blesa, M.; Bahnemann, D. Oxalic acid at the TiO<sub>2</sub>/water interface under UV(A) illumination: Surface reaction mechanisms. *J. Catal.* **2015**, *322*, 60–72, doi:10.1016/j.jcat.2014.11.008.

179. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 5577–91, doi:10.2147/IJN.S36111.
180. Oh, N.; Park, J.-H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9 Suppl 1*, 51–63, doi:10.2147/IJN.S26592.
181. Klier, D. T.; Kumke, M. U. Upconversion NaYF<sub>4</sub>:Yb:Er nanoparticles co-doped with Gd<sup>3+</sup> and Nd<sup>3+</sup> for thermometry on the nanoscale. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 67149–67156, doi:10.1039/C5RA11502G.
182. Yi, G.-S.; Chow, G.-M. Water-Soluble NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er(Tm)/NaYF<sub>4</sub>/Polymer Core/Shell/Shell Nanoparticles with Significant Enhancement of Upconversion Fluorescence. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 341–343, doi:10.1021/CM062447Y.
183. Qin, W.; Zhang, D.; Zhao, D.; Wang, L.; Zheng, K. Near-infrared photocatalysis based on YF<sub>3</sub>:Yb<sup>3+</sup>,Tm<sup>3+</sup>/TiO<sub>2</sub> core/shell nanoparticles. *Chem. Commun. (Camb)*. **2010**, *46*, 2304–2306, doi:10.1039/b924052g.
184. Dai, Y.; Bi, H.; Deng, X.; Li, C.; He, F.; Ma, P.; Yang, P.; Lin, J. 808 nm near-infrared light controlled dual-drug release and cancer therapy in vivo by upconversion mesoporous silica nanostructures. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 2086–2095, doi:10.1039/C7TB00224F.
185. Kurtz-Chalot, A.; Klein, J.-P.; Pourchez, J.; Boudard, D.; Bin, V.; Sabido, O.; Marmuse, L.; Cottier, M.; Forest, V. Quantification of nanoparticle endocytosis based on double fluorescent pH-sensitive nanoparticles. *Biomed. Microdevices* **2015**, *17*, 42, doi:10.1007/s10544-015-9947-8.
186. Krug, H. F. Nanosafety Research - Are We on the Right Track? *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 12304–12319, doi:10.1002/anie.201403367.
187. Sambale, F.; Stahl, F.; Rüdinger, F.; Seliktar, D.; Kasper, C.; Bahnemann, D.; Scheper, T. Iterative Cellular Screening System for Nanoparticle Safety Testing. *J. Nanomater.* **2015**, *2015*, 1–16, doi:10.1155/2015/691069.
188. Pelaez, M.; Nolan, N. T.; Pillai, S. C.; Seery, M. K.; Falaras, P.; Kontos, A. G.; Dunlop, P. S. M.; Hamilton, J. W. J.; Byrne, J. A.; O'Shea, K.; Entezari, M. H.; Dionysiou, D. D. A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. *Appl. Catal. B Environ.* **2012**, *125*, 331–349, doi:10.1016/J.APCATB.2012.05.036.
189. Devanand Venkatasubbu, G.; Ramasamy, S.; Ramakrishnan, V.; Kumar, J. Folate targeted PEGylated titanium dioxide nanoparticles as a nanocarrier for targeted paclitaxel drug delivery. *Adv. Powder Technol.* **2013**, *24*, 947–954, doi:10.1016/J.APT.2013.01.008.
190. Cui, S.; Yin, D.; Chen, Y.; Di, Y.; Chen, H.; Ma, Y.; Achilefu, S.; Gu, Y. In Vivo Targeted Deep-Tissue Photodynamic Therapy Based on Near-Infrared Light

- Triggered Upconversion Nanoconstruct. *ACS Nano* **2013**, *7*, 676–688, doi:10.1021/nn304872n.
191. DSMZ: Catalogue Human and Animal Cell Lines Available online: <https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-human-and-animal-cell-lines.html> (accessed on Jun 20, 2018).
192. Pu, Y.; Liu, Z.; Lu, Y.; Yuan, P.; Liu, J.; Yu, B.; Wang, G.; Yang, C. J.; Liu, H.; Tan, W. Using DNA Aptamer Probe for Immunostaining of Cancer Frozen Tissues. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1919–1924, doi:10.1021/ac504175h.
193. Promega CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Technical Bulletin. *Tech. Bull.* **2016**.
194. Corporation, P. CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay Instructions for Use of Products G7890, G7891 and G7892. *Tech. Bull.* **2009**, *306*, 608–277.
195. Li, Z.; Zhang, Y. An efficient and user-friendly method for the synthesis of hexagonal-phase NaYF<sub>4</sub>:Yb, Er/Tm nanocrystals with controllable shape and upconversion fluorescence. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 345606, doi:10.1088/0957-4484/19/34/345606.
196. Johnson, N. J. J.; Sangeetha, N. M.; Boyer, J.-C.; van Veggel, F. C. J. M. Facile ligand-exchange with polyvinylpyrrolidone and subsequent silica coating of hydrophobic upconverting  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup> nanoparticles. *Nanoscale* **2010**, *2*, 771–777, doi:10.1039/b9nr00379g.

## A Anhang

### A.1 Materialien

#### A.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller, Ort, Land</b>
10x Trypsin-EDTA-Ablöselösung (0,5%/0,2%)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Accutase®	Sigma-Aldrich, München, DE
Agarose Standard	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ammoniumfluorid	Sigma-Aldrich, München, DE
Cyclohexan	Sigma-Aldrich, München, DE
Dichlorodihydrofluoresceindiacetate (H <sub>2</sub> DCF-DA)	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich, München, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, DE
Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich, München, DE
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Ladepuffer 5x Green GoTaq®	Promega Corporation, Madison, USA
L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin, DE
MEM nicht-essentielle Aminosäure-Lösung	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco® by life technologies™, Waltham, USA
Natriumhydrogencarbonat	Fluka Chemie AG
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Octadecene	Sigma-Aldrich, München, DE
Ölsäure	Sigma-Aldrich, München, DE
PBS Tabletten	Gibco® by life technologies™, Waltham USA
Penicillin/ Streptomycin (P/S)	Biochrom GmbH, Berlin, DE

Poly(acrylic) acid sodium salt, MW ~5.100	Sigma-Aldrich, München, DE
Polyacryl-Säure (PAA) Average $M_v$ ~1.250.000	Sigma-Aldrich, München, DE
Roti® Safe Gelstain	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Thulium(III)-Chlorid	Sigma-Aldrich, München, DE
Titandioxid	AEROXIDE® TiO <sub>2</sub> P 25 von Evonik Resource Efficiency GmbH
Trypanblau-Lösung (0,4%)	VWR international GmbH, Darmstadt, DE
Ytterbiun(III)-Chlorid -Hexahydrat	Sigma-Aldrich, München, DE
Yttrium(III)-Chlorid	Sigma-Aldrich, München, DE

### A.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller, Ort, Land</b>
24-Well-Platte TC Platte 24 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
6-Well-Platte TC Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
96-Well-Platte TC Platte 96 Well Standard, F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Dispenser Multipipette® E3	Eppendorf, Hamburg, DE
Dispenser-Spitzen, 5 und 10 mL Combitips	Eppendorf, Hamburg, DE
Einmalspritzen Injekt® Solo, 5 ml	B.Braun AG, Melsungen, DE
Einwegpipette 50 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Einwegpipetten Costar® Stripette (2; 5; 10 und 25 mL)	Corning, Inc., New York, USA
Kryoröhrchen CryoPure Gefäß 1,6 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Nitrilhandschuhe Rotiprotect®-Nitril light	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Pipettenspitzen (10; 200 und 1000 µL)	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, DE
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Spritzenfilter Rotilabo®-Spritzenfilter, PTFE, unsteril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Sterilfilter Minisart High-flow, single use srynge filter 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Sterilfilter klein 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Sterilfilter Minisart 0,2 µm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Vivaspin 0,5 mL 50 kDa MWCO	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Zellkulturflaschen (T-75 und T-175-Flaschen)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml CentriStar™)	Corning, Inc., New York, USA

### A.1.3 Laborgeräte

Tabelle 3: Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller, Stadt, Land
Bio-Link 365	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, DE
DLS Gerät, Litesizer™ 500	Anton Paar GmbH, Ostfildern-Scharnhausen, DE
Durchflusszytometer BD Accuri™ C6	Becton Dickinson (BD) Biosciences, Franklin Lakes, USA
Feinwaage	VWR international GmbH, Darmstadt, DE
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX 50	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Gefrierbehälter Cryo 1°C Freezing Container	NALGENE, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System	Essen BioScience, Sartorius Brand, Göttingen, DE
Inkubationsschrank Hera cell 240, Heraeus	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Kondensator Findenser™ Super Air Condenser	Radleys, Saffron Walden, UK
LumaScope 600	Etaluma Inc., Carlsbad, USA
Magnetrührer C-MAG HS 7	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, ST taufen DE
Magnetrührer mit Heizung MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Mikrotiterplatten-Fluorometer Fluoroskan Ascent®	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Mupid®-One electrophoresis System	Advance Co., Ltd., Tokyo, Japan

Neubauer Zählkammer	Assistent®, Sondheim, DE
Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-100µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, DE
Pumpe Laborport	Knf-Lab, Trenton, USA
RLCO-980-1000-F Laser	Roithner LaserTechnik GmbH, Wien, AUT
Spektralphotometer Epoch™	BioTek Instruments, Inc. Vermont, USA
Spektrfluorometer RF-540	Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan
Sterilbank HERA safe	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Sterilbank Tecnoflow	INTEGRA Biosciences, Hudson, USA
Transmissionselektronenmikroskop	Ames Laboratory Sensitive Instrument Facility, USA
Ultraschallbad Sonorex Super	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Ultraschallhomogenisator Labsonic® M	Sartorius, Göttingen, DE
UV-A-Meter	Lutron Electronics, Co., Inc., Coopersburg, USA
UV-Lampe (Gesichtsbräuner GB 838)	Efbe-Schott Elektrogeräte GmbH, Bad-Blankenburg, DE
UV-Vis Spektrophotometer GENESYS 10S	Thermo Scientific™, Waltham, USA
UV-Vis-Spektrometer Cary 100	Varian Medical Systems, Palo Alto, USA
Vortexer Analog Vortex Mischer	VWR international GmbH, Darmstadt, DE
Wasserbad WNB	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
XRD D8 Advance System	Bruker, Billerica, USA
Zählkammer Blaubrand® nach Neubauer	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, DE
Zentrifugen: - Centrifuge 5702 miniSpin Plus Heraeus™ Megafuge 10	Eppendorf, Hamburg, DE Eppendorf, Hamburg, DE Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA

### A.1.4 Puffer, Lösungen, und Medien

Tabelle 4: Puffer, Lösungen und Medien

Lösung	Zusammensetzung
DAPI-Färbepuffer	100 mM Tris, pH 7 150 mM NaCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 % Nonident-P40 sterilfiltriert
DMEM-Basal	13,4 g/L DMEM-Pulver mit 3,7 g/L Natriumhydrogencarbonat, pH 7,4
H <sub>2</sub> DCFDA-Lösung	20 mM H <sub>2</sub> DCFDA in DMSO
Inkubationspuffer	MgCl <sub>2</sub> 5 mM Glukose 4,5 g/L BSA 1mg/mL In PBS, pH 7,4 20 % FKS
Kryo-Medium	70 % DMEM-Basal, 20% FKS, 10% DMSO
Medium	89 % DMEM-Basal, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
MEM +	MEM ohne Phenolrot, flüssig 1% nicht-essentielle Aminosäuren 1 % P/S 10 % FKS 2 % L-Glutamin
NASH-Reagenz	2 M Ammoniumacetat  0,05 M Essigsäure  0,02 M Acetylaceton in ddH <sub>2</sub> O
Natriumboratpuffer, 10 mM (SBB I)	10 mM Borsäure Mit NaOH auf pH 7,4
Natriumboratpuffer, 50 mM (SBB II)	50 mM Borsäure Mit NaOH auf pH 8,3
Phosphat-Saline Puffer (PBS)	Natriumphosphat 0,95 g/L Kaliumchlorid 0,0201 g/L Natriumchlorid 8,12 g/L, pH 7,4
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE)	40 mM Tris-Base 20 mM Eisessig 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure pH 8,0

### A.1.5 Verwendete Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits

Kit	Hersteller, Ort, Land
CellTiter-Blue®	Promega Corporation, Madison, USA
CytoTox-ONE™	Promega Corporation, Madison, USA
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	Becton Dickinson (BD) Biosciences, Franklin Lakes, USA

### A.1.6 Eukaryotische Zelllinien

Alle während den hier durchgeführten Arbeiten verwendeten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben. Im Folgenden werden die verwendeten Zelllinien kurz nach den Beschreibungen des DSMZ charakterisiert [191].

#### ***A549 (humane Lungenkarzinomzelllinie, DSMZ-Nr. ACC-107)***

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um immortale Zellen des Lungenkarzinoms eines 58-jährigen Mannes, die 1972 isoliert wurden. Diese adhären, epithelialen Zellen wachsen als Monolayer und besitzen eine Verdopplungszeit von ca. 40 h.

#### ***HeLa (humane Gebärmutterhalskrebszelllinie, DSMZ-Nr. ACC-57)***

HeLa-Zellen waren die erste kontinuierlich kultivierten, immortalisierten Zellen. Das epitheloide Gebärmutterhalskarzinom wurde aus einer 31-jährigen Frau im Jahre 1951 isoliert und mit Papillomaviren Typ 18 (HPV-18) infiziert. Auch hierbei handelt es sich um adhären wachsende Zellen, die auf geeignetem Kulturuntergrund einfache Schichten bilden. Verdopplungszeit beträgt laut DSMZ ca. 48 h.

#### ***NIH-3T3 (Mäusefibroblastenzelllinie, DSMZ-Nr. ACC-59)***

Zellen dieser Zelllinie wurden aus einem kontakt-inhibierten NIH *Swiss mouse Embryo* um 1962 entnommen, die spontan immortalisierten Fibroblasten wachsen adhären im Monolayer, haben jedoch eine verkürzte Verdopplungszeit von ca. 20 h.

### **A.1.7 Verwendete Nanopartikel**

Für die Versuche zur Nanopartikelaufnahme in NIH/3T3 und A549-Zellen wurden TiO<sub>2</sub> UV100 NP verwendet (Hombikat). Sie weisen eine primäre Partikelgröße von <10nm und eine pure Anatas-Phase auf [146].

Für die Phototoxizitätsanalyse von TiO<sub>2</sub> NP wurden AEROXIDE® TiO<sub>2</sub> P25 NP (Evonik) verwendet (30 % Rutil, 70 % Anatas, 10-30 nm).

Als alternatives Material wurden Eisen-veredelte TiO<sub>2</sub> P25 NP mit 2,5 % WO<sub>3</sub> verwendet, welche freundlicherweise von Narmina Balayeva bereitgestellt wurden und in [156] ausführlich charakterisiert wurden.

### **A.1.8 Verwendete Oligonukleotide**

Für die zielgerichtete Aufnahme der NP in die Zellen wurden die NP mit dem Aptamer Syl3C modifiziert, welches 2013 von der Arbeitsgruppe um Song *et al.* gegen den Tumormarker EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) selektiert wurde [176,192].

Es wurde eine 5'-Aminomodifizierung mit C6 Spacer zur kovalenten Kopplung an die NP-Oberfläche verwendet. Die Nukleotidsequenz lautet:

5'-CAC TAC AGA GGT TGC GTC TGT CCC ACG TTG TCA TGG GGG GTT GGC CTG-3'.

Das in dieser Arbeit verwendete Aptamer wurde von der Firma BIOSPRING synthetisiert.

## **A.2 Methoden**

### **A.2.1 Kultivierung von Säugerzellen**

Die verwendeten Zelllinien A549, HeLa und NIH/3T3 wurden in Kulturmedium (DMEM, 10 % FKS, 1 % P/S) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte nach Erreichen von ca. 80 % Konfluenz. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (1x in PBS, 0,02 % EDTA) für ca. 10 min inkubiert. Alle Lösungen, die direkt mit den Zellen in Verbindung kamen, wurden zuvor auf 37 °C erwärmt. Je nach Größe des Kulturgefäßes wurde das Volumen der Trypsin-Lösung variiert, sodass der Boden vollständig bedeckt war. Der Fortschritt des Ablösevorgangs wurde mittels

Durchlichtmikroskopie kontrolliert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1:1 Kulturmedium. Die Zellen wurden anschließend in ein 15-mL Röhrchen überführt und bei 300 *g* für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20  $\mu$ L der Zellsuspension zu 20  $\mu$ L Trypanblau-Lösung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und ausgezählt. Zur Weiterkultivierung wurden 11 mL Medium in eine neue T-Flasche (75 cm<sup>2</sup>) gegeben und etwa 150.000 Zellen zugegeben. Für weiterführende Versuche wurden an diesem Punkt die gewünschte Zellzahl in die entsprechenden Kulturgefäße überführt. Weiteres Passagieren der Zellen erfolgte nach 3-4 Tagen. In dieser Arbeit wurden nur Zellen mit einer Passagenzahl <20 verwendet..

### **A.2.2 Herstellung der Kryokulturen von Säugerzellen**

Zur Kryokonservierung von Säugerzellen wurde 10<sup>6</sup> Zellen/mL in Kryo-Medium (70 % DMEM-Basal, 10 % DMSO und 20 % FKS) resuspendiert und in 1 mL Kryoröhrchen überführt. Die Kryogefäße wurden zunächst in ein mit Isopropanol gefülltes Einfriergefäß überführt, welches das schrittweise Abkühlen auf -80 °C über einen Zeitraum von mind. 24 h gewährleistete. Danach wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bis zur erneuten Revitalisierung gelagert.

### **A.2.3 Revitalisierung von kryokonservierten Säugerzellen**

Die Säugerzellen wurden in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert und zur Revitalisierung im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Der aufgetaute Inhalt wurde schnellstmöglich in eine T-175 Kulturflasche mit 25 mL Kulturmedium (37°C) gegeben. Nach Kultivierung für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Medium aus der Flasche gesaugt und neues Medium zugegeben. Die Kultivierung erfolgte bis zur Weiterverwendung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **A.2.4 Untersuchungen zur Aufnahme von TiO<sub>2</sub> NP in A549- und NIH/3T3-Zellen**

Um eine ausreichende Zellzahl für die Analyse im Durchflusszytometer zu gewährleisten, wurden 200.000 NIH/3T3-Zellen, beziehungsweise 300.000 A549-Zellen pro Well in 6-Well Platten mit jeweils 2 mL Kulturmedium bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> für 24 h kultiviert, bis ca. 80 % Konfluenz erreicht waren. Anschließend wurde das Medium entfernt und frisches Medium mit dem gewünschten Anteil an FITC-TiO<sub>2</sub> NP (A.2.13) zugegeben (0, 5, 10, 15, 20, 25 µg mL<sup>-1</sup>). Die geringen NP-Konzentrationen wurden aufgrund der hohen Lichtstreuung des TiO<sub>2</sub> und zur besseren Beurteilung der Sensitivität gewählt. Die Zellen wurden 24 h mit den Nanopartikeln im Inkubator inkubiert. Für die Aufzeichnung der Aufnahme-Kinetik wurden die Zellen für bestimmte Zeiträume (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 und 24 h) mit 12,5 µg mL<sup>-1</sup> FITC-TiO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die Durchflusszytometer-Analyse vorbereitet (A.2.6).

#### **A.2.5 Phototoxizitäts-Testung von Nanopartikeln auf Säugerzellen**

Zur Testung der Phototoxizität von TiO<sub>2</sub> NP wurden die Zellen zunächst in 96-Well- oder 24-Wellplatten ausgesiedelt, sodass nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ca. eine 80 %ige Konfluenz erreicht wurde (96-Well: 8000-12000 Zellen/Well; 24-Well: 50.000 Zellen/Well). Nach Erreichen der erwünschten Zelldichte wurde das Medium abgenommen und eine NP-Medium-Suspension zugegeben (96-Well: 100 µL/Well; 24-Well: 500 µL/Well). Die Suspension wurden zuvor aus einer Stammlösung (1 mg mL<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> NP in PBS) angesetzt, welche zunächst 1:10 im Kulturmedium verdünnt wurde. Für Versuche mit Aptamer-modifizierten NP wurde anstatt Kulturmedium ein Inkubationspuffer verwendet (Tabelle 4). Die verdünnte Medium-NP Suspension wurde für 15-30 min im Ultraschallbad homogenisiert, um größere Agglomerate zu lösen. Anschließend wurden die gewünschten Konzentrationen angesetzt und auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Zugabe zu den Zellen erfolgte unter möglichst lichtarmen Bedingungen. Die Inkubationszeit betrug je nach Versuch 4-24 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Die verschiedenen Konzentrationen wurden in 4-fach Bestimmung auf die Well-Platten verteilt. Es wurde stets ein Teil der Well-Platte als Dunkelkontrolle mit

Alufolie abgeschirmt, um den alleinigen Einfluss von UV-A-Licht auf die Zellen zu beurteilen. Vor der Bestrahlung wurde das Medium abgesaugt und PBS zu den Zellen gegeben. Bestrahlt wurde zunächst mit einer UV-A-Lampe (Efbe-Schott GB 838), die Intensität wurde mittels UV-A-Meter (Lutron) kontrolliert. Es wurde je nach Experiment mit 2-4 mW cm<sup>-2</sup> für 20-30 min Bestrahlt. Die Berechnung der Bestrahlung in J cm<sup>-2</sup> erfolgte nach der folgenden Formel (6):

$$\text{Bestrahlung [J cm}^{-2}\text{]} = \text{Bestrahlungsdauer [s]} \cdot \text{Strahlungsintensität [W cm}^{-2}\text{]} \quad (6)$$

Zu späteren Zeitpunkten wurden die Well-Platten zur Bestrahlung in einer UV-A-Bestrahlungskammer (Bio-Link 365, Vilber) platziert, bei der die gewünschte Strahlungsintensität am Gerät eingestellt wurde (2,5-7,5 J cm<sup>-2</sup>). Die Bestrahlungsintensitäten können den jeweiligen Bildunterschriften entnommen werden. Nach Bestrahlung wurde das PBS aus den Wells abgesaugt, frisches Kulturmedium zugegeben und die Zellen zur Regenerierung über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am dritten Tag erfolgten die jeweiligen Untersuchungen bezüglich Zellviabilität, ROS-Gehalt, LDH-Aktivität etc. Für die Versuche mit sichtbarem Licht wurde ein 405 nm LED-Array verwendet. Der Abstand war so gewählt, dass mit ca. 1 mW cm<sup>-2</sup> bestrahlt wurde (ca. 30 min).

### **A.2.6 Durchflusszytometrie**

Für verschiedene Analysen wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Streuungs- und Fluoreszenzeigenschaften im Durchflusszytometer (BD Acuri B6) analysiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Accutase® vom jeweiligen Kulturgefäßboden abgelöst. Die Zellen wurden bei 300 rcf für 5 min abzentrifugiert und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Nach Resuspension in 500 µL PBS wurden die Zellen im Durchflusszytometer mit einem 488 nm Argon-Laser analysiert. Rote Fluoreszenz wurde mittels eines 670-Langpassfilter, grüne Fluoreszenz mittels 533/20 Bandpassfilter detektiert. Es wurden mindestens 10.000 Ereignisse/Probe analysiert. Die Analyse der Daten erfolgte mit der BD Acuri C6 Software (v. 1.0).

## **A.2.7 Mikroskopische Untersuchungen**

### ***Fluoreszenzmikroskopie***

Zur Visualisierung der fluoreszenzmarkierten FITC-TiO<sub>2</sub> NP wurden die Zellen mit 50 µg mL<sup>-1</sup> NP inkubiert und anschließend mit 100%igen Ethanol (-20°C) fixiert (30 min bei 4°C). Nach waschen mit PBS wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI, 1:1000 in DAPI-Färbepuffer, Tabelle 4) für 10 min unter Lichtausschluss angefärbt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen unterm Fluoreszenzmikroskop (LumaScope 600) beobachtet. Für die blaue Fluoreszenz der gefärbten Zellkerne wurde der UV-Kanal verwendet, das FITC der NP wurde mit dem blauen Fluoreszenzkanal angeregt.

### ***Time-Lapse Mikroskopie***

Für die Zeitraffer-Aufnahmen der mit FITC-TiO<sub>2</sub> inkubierten A549 und NIH/3T3-Zellen wurden die Zellen in 8-Well PCA Kammern mit 100.000 Zellen/Kammer in 400 µL Medium ausgesiedelt und zur vollständigen Adhäsion über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und eine 12,5 µg mL<sup>-1</sup> FITC-TiO<sub>2</sub>-NP-Lösung zugegeben. Es wurde über 24 h alle 60 sec ein Bild aufgenommen und diese anschließend zu einem Film mit ca. 13 Bildern/Sekunde zusammengefügt (Anhang A.3.1).

Bei der späteren Untersuchung der HeLa-Zellen wurden diese zuvor in 6-Well-Platten kultiviert (150.000 Zellen/Well) und mit 10 µg mL<sup>-1</sup> FeWT inkubiert. Die Aufnahmen wurden in 20-facher Vergrößerung gemacht, das Mikroskop (LumaScope 600) befand sich die ganze Zeit über im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Es wurde über 24 h alle 60 sec ein Bild aufgenommen und diese anschließend zu einem Film mit 0,08 sec./Bild zusammengefügt (Anhang A.3.1).

### ***IncuCyte™ Lebendzellanalyse***

Zur weiteren morphologischen Untersuchung sowie Nekrose- und Apoptose-Testung wurden die Zellen über einen Zeitraum von 12-48 h mit dem Lebenszell-Imaging-System IncuCyte™ (Essen BioScience, jetzt Sartorius) beobachtet und optisch analysiert. Das IncuCyte™ nimmt zu vorher festgelegten Zeitpunkten selbstständig Bilder von Kulturgefäßen im Phasenkontrast, grünem oder rotem

Fluoreszenzspektrum auf und ermöglicht eine komplexe Bildanalyse mit zugehöriger Software. Für die Analyse der Apoptose und Nekrose wurden Fluoreszenzmarker für Caspase 3/7 Aktivität (IncuCyte™ *Caspase 3/7 green reagent*), Phosphatidylserin-Delokalisierung (IncuCyte™ *Annexin V green reagent*) und Membranintegrität (IncuCyte™ *Cytotox red reagent*) verwendet.

In einem typischen Experiment wurden zunächst HeLa und A549-Zellen in 96-Well Platten (5000 Zellen/Well) oder 48-Well-Platten (20.000 Zellen/Well) ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in MEM+ Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) ohne Phenolrot inkubiert. Es folgte die Zugabe der Nanopartikel-Medium-Suspension, welche zudem die jeweiligen Fluoreszenzmarker enthielt (Caspase 3/7 reagent 1:1000, Cytotox red reagent: 1:4000, Annexin V reagent: 1:200 + 2 mM CaCl<sub>2</sub>). Nach Inkubation für ca. 4 h, wurden die Platten mit PBS befüllt, im BioLink bei 5 J cm<sup>-2</sup> bestrahlt und weitere 15-20 h im Medium bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dabei wurden automatisch soweit möglich stündlich mikroskopische Aufnahmen der Wells gemacht (4 Bilder pro Well, 10x oder 20x Vergrößerung). Die Kultivierungsbedingungen variierten je nach Zelltyp, Nanomaterial und Nanopartikelkonzentration, wurden jedoch stets in Triplikaten angewendet. Die Auswertung erfolgte über die zugehörige Bildanalyse-Software, mit der individuelle Masken je nach Kultivierungsbedingung selbstständig erstellt wurden. So war es möglich, die Fluoreszenzsignale der einzelnen Zellen zu quantifizieren. Die Erkennung der Signale wurde für verschiedene Zeitpunkte kontrolliert und die Größenfilter und Fluoreszenzsignal-Grenzwerte dementsprechend angepasst, dass für die Zellen nur einzelne Signale detektiert und zufällig angefärbte Störobjekte ausgefiltert wurden. Für die Auswertung wurden nur Bilder mit ähnlicher Konfluenz der Zellen verwendet, um den Standardfehler zu minimieren. Es wurden für die selektierten Bilder der Wells mit identischen Kultivierungsbedingungen Mittelwerte und Standardabweichung der ermittelten Fluoreszenzsignale berechnet.

### A.2.8 Viabilitäts-Testung mittels CellTiter-Blue®-Assay

Der CellTiter-Blue®-Assay (CTB-Assay) ist ein Viabilitätstest, mit dem aufgrund der metabolischen Aktivität der Zellen indirekt die Viabilität bestimmt werden kann. Das CTB-Reagenz enthält den dunkelblauen Farbstoff Resazurin, der von metabolisch aktiven Zellen zum pinken fluoreszierenden Resorufin reduziert wird (Abbildung 60). Das Resorufin absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 579 nm und emittiert Licht bei 584 nm. Dabei ist Fluoreszenzintensität des Resorufins proportional zur Anzahl vitaler Zellen [193].

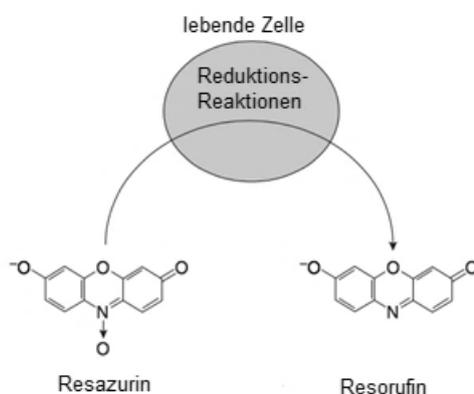


Abbildung 60: Umsetzung von Resazurin zu Resorufin durch metabolisch aktive Zellen. Modifiziert nach [193].

Es wurde jeweils ca. 18 h nach UV-A-Bestrahlung der CTB-Assay durchgeführt. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und eine 10 %ige CTB-Lösung zugegeben (CTB-Reagenz in Basal DMEM). Nach 0,5-4 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Fluoreszenz bei einer Extinktion von 544 nm und Emission von 590 nm im Mikrotiterplatten-Fluorometer (Fluoroskan Ascent, ThermoFisher™) gemessen. Zur Auswertung wurde der Blank-Wert der CTB-Lösung von den jeweiligen Messwerten abgezogen und Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Viabilität der Zellen wurde stets in Bezug auf die Dunkel-Kontrolle der jeweiligen Wellplatte berechnet (7):

$$Viabilität (\%) = \frac{100}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Messwert_{Dunkelkontrolle_i}} \cdot \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Messwert_i$$

$n$ =Anzahl Messwerte;  $>3$

(7)

### A.2.9 Berechnung der mittleren effektiven Dosis von FeWT NP

Die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte, also die mittlere inhibitorische Konzentration, der FeWT NP, erfolgte über einen nicht-linearen Fit der ermittelten Viabilitäten bei verschiedenen Bestrahlungsdosen (Abbildung 26). Verwendet wurde das Programm OriginPro 2018G (Version b9.5.0.193). Es handelte sich um eine Dosis-Wirkungskurve mit folgender Gleichung (8):

$$y = a + \frac{(b - a)}{1 + 10^{(LOGx0 - x) \cdot p}} \quad (8)$$

Die folgenden Parameter wurden für die jeweiligen Kurven ermittelt:

Tabelle 6: Parameter der jeweiligen Dosis-Wirkungs-Kurven, erstellt mit Origin.

Zelllinie Dosis [J cm <sup>-2</sup> ]	A549			HeLa		
	2,5	5	7,5	2,5	5	7,5
<b>a</b>	-	4,3	1,01	48,07	15,02	2,7
<b>b</b>	5014,43	129,01	200,12	94,68	95,74	89,12
<b>LOGx0</b>	76,87	5,45	-0,72	9,63	6,31	5,38
<b>P</b>	-0,04	-0,08	-0,08	-0,2	-0,22	-0,2
<b>IC<sub>50</sub> [µg mL<sup>-1</sup>]</b>	>25	8,6	5,4	16,2	6,8	4,9

Die Kurven sind in A.3.3 (Abbildung 64, Abbildung 65) zu finden. Als IC<sub>50</sub>-Wert wurde die jeweilige NP-Konzentration bei einer Viabilität von 50 % angenommen.

### A.2.10 DCF-Assay zur Detektion reaktiver Sauerstoffspezies

Mit dem DCF-Assay kann die relative Menge intrazellulärer ROS ermittelt werden. Das Substrat H<sub>2</sub>DCF-DA (2,7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat) wird von den Zellen aufgenommen und durch zelluläre Esterasen zunächst zu DCF-H<sub>2</sub> deacetyliert. Durch zelluläre ROS wird das DCF-H<sub>2</sub> zum fluoreszierenden DCF (2,7-Dichlorofluorescein) oxidiert. Das Fluoreszenz-Signal ist proportional zur Menge intrazellulärer ROS und kann direkt im Mikrotiterplatten-Format bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm ausgelesen werden.

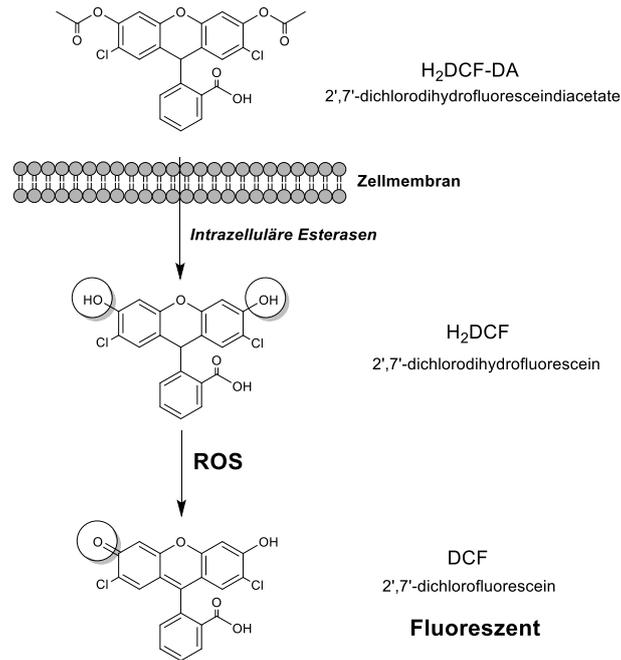


Abbildung 61: Prinzip des DCFDA-Assays zur Detektion interzellulärer oxidativer Spezies.

Die Zellen wurden wie in A.2.5 beschrieben in 96-Well-Platten ausplattiert und mit TiO<sub>2</sub>-NP-Medium-Suspensionen verschiedener Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µL PBS gewaschen und eine H<sub>2</sub>DCF-DA-Lösung (10 µM in PBS aus 20 mM Stammlösung in DMSO) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter Lichtausschluss inkubiert. Schließlich wurde die H<sub>2</sub>DCF-DA-Medium-Lösung abgesaugt, und die Zellen in PBS mit UV-A-Licht bei 3,5 J cm<sup>-2</sup> bestrahlt. Die geringe Strahlungsintensität wurde gewählt, um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern sowie den Stress der Zellen zu reduzieren, die während Bestrahlung und H<sub>2</sub>DCFDA-Inkubation nur mit PBS und nicht mit Medium inkubiert wurden. Unmittelbar nach der UV-A-Bestrahlung wurde das Fluoreszenzsignal des DCF bei 538 nm im Plattenleser vermessen (Exzitationswellenlänge 485 nm). Falls sich die Zellen im Laufe des Assays abgelöst hatten (im Durchlichtmikroskop überprüft), wurden die Well-Inhalte zusätzlich im Zytometer vermessen.

### A.2.11 Untersuchung der Membran-Integrität mittels LDH-Assay

Die Freisetzung der Lactatdehydrogenase aus dem Zellplasma von Säugerzellen ist ein Zeichen für den Verlust der Membranintegrität, welcher durch Nekrose oder

direkten Angriff der Zellmembran verursacht werden kann. Der LDH-Assay dient der Bestimmung der Aktivität der freigesetzten Lactatdehydrogenase im Zellüberstand (Abbildung 62). Dafür werden die Zellen mit LDH-Substrat inkubiert, welches in Pyruvat umgewandelt und infolgedessen das Coenzym  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  reduziert wird. Für die Regenerierung des  $\text{NAD}^+$  überträgt die Diaphorase das Hydrid-Ion des  $\text{NADH}$  auf den Farbstoff Resazurin, wobei das fluoreszierende Resorufin entsteht. Die Fluoreszenz kann anschließend wie beim CTB-Assay bei 590 nm ( $\lambda_{\text{Ex}}=544$  nm) ausgelesen werden.

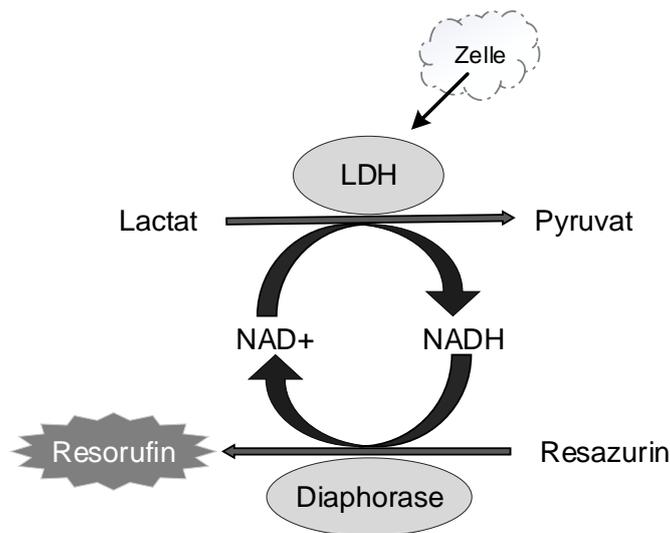


Abbildung 62: Schema des LDH-Assays; modifiziert nach [194].

Um den Einfluss der photokatalytischen Aktivität der  $\text{TiO}_2$  NP auf die Membranintegrität zu untersuchen wurden die Zellen zunächst wie in A.2.1 beschrieben in 96-Well-Platten ausplattiert, mit den NP inkubiert und bestrahlt. Nach ca. 18 h Regeneration der Zellen wurden 50  $\mu\text{L}$  des Kulturüberstandes abgenommen und in eine frische 96-Well-Platte transferiert. Die ursprünglichen Platten wurden für weitere Untersuchungen (z.B. CTB-Assay) weiter bei 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Es wurde nun 50  $\mu\text{L}$  pro Well LDH-Substratlösung zugegeben und für ca. 20 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Als Positivkontrolle diente der Überstand eines Wells, in welchem unbehandelte Zellen zuvor mit 5  $\mu\text{L}$  Lyse-Lösung für 15 min inkubiert worden waren. Nach der Inkubation mit LDH-Substratlösung wurde jeweils 25  $\mu\text{L}$  Stopp-Lösung in derselben Reihenfolge zugefügt, wie zuvor die Substratlösung. Anschließend wurde die Fluoreszenz des Resorufins im Plattenleser vermessen.

### **A.2.12 Apoptose-Messungen**

Zur Detektion der Apoptose wurden die Zellen 24 h nach Bestrahlung wie in A.2.5 beschrieben für die Vermessung im Durchflusszytometer vorbereitet und anschließend mittels eines Apoptose-Kits (BD Pharmingen™) hinsichtlich Apoptose und Nekrose untersucht. Dafür wurden die Zellen in 100  $\mu\text{L}$  Färbepuffer resuspendiert und mit 5  $\mu\text{L}$  Annexin V und 5  $\mu\text{L}$  7-Amino-Actinomycin (7-AAD) für 15 min bei RT unter schütteln inkubiert. Danach wurden weitere 400  $\mu\text{L}$  Färbepuffer zugegeben und die Zellen im Zytometer hinsichtlich grüner und roter Fluoreszenz untersucht.

### **A.2.13 Modifizierung von $\text{TiO}_2$ Nanopartikeln**

#### ***FITC-Labeling von $\text{TiO}_2$ Nanopartikeln***

Für die Fluoreszenzmarkierung von  $\text{TiO}_2$  NP wurden 200  $\mu\text{L}$  einer UV100 Suspension (19 % in MeOH/EtOH) in 500  $\mu\text{L}$  FITC-Lösung (5 mg  $\text{mL}^{-1}$  in Ethanol) und über Nacht bei 1000 rpm, Raumtemperatur (RT) geschüttelt. Die Suspension wurde anschließend bei 7000 rcf für 5 min abzentrifugiert und solange mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, bis der Überstand farblos wurde. Die erhaltenen FITC- $\text{TiO}_2$  NP wurden in PBS auf 1 mg  $\text{mL}^{-1}$  verdünnt und im Dunkeln bei  $-4^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### ***PAA-Beschichtung von $\text{TiO}_2$ Nanopartikeln***

Zur Synthese von PAA@ $\text{TiO}_2$  P25 NP wurden 0,1 g  $\text{TiO}_2$  NP P25 in 20 mL DMF gelöst und anschließend 2 mL DMF mit 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  PAA ( $M_w \sim 1.250.000$ ) zugegeben. Die Suspension wurde unter ständigem Rühren in einem Dreihalskolben (100 mL) auf  $150^\circ\text{C}$  erhitzt und die Temperatur für 5 h konstant gehalten. Anschließend wurde die Suspension auf RT abgekühlt, 38 mL Aceton zugegeben und für eine weitere Stunde gerührt. Für die Isolierung der NP wurde die Suspension bei 4000 rpm für 20 min bei RT zentrifugiert und anschließend zweimal mit 20 mL Ethanol gewaschen. Die erhaltenen PAA@ $\text{TiO}_2$  NP wurden für 48 h bei RT getrocknet. Im Falle der FeWT NP wurden 50 mg PAA-Natriumsalz ( $M_w = 5.100$ ) verwendet (10 mg  $\text{mL}^{-1}$  in DMF) und weiter wie oben beschrieben verfahren. Um zu gewährleisten, dass sich die NP für die Verwendung in der Zellkultur eignen,

wurden sie anschließend in ein steriles Gefäß überführt, erneut mit sterilfiltriertem EtOH gewaschen und zum Trocknen über Nacht lichtgeschützt unter die Sicherheitswerkbank gestellt.

### ***Synthese von Syl3C-PAA@TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln***

Um möglichst sterile NP zu erhalten, wurden alle Lösungen falls möglich sterilfiltriert, bzw. die verwendeten Gefäße mit Isopropanol desinfiziert. Zunächst wurden 2,5 mg der PAA@TiO<sub>2</sub> NP in PBS mit einer Vivaspin (50 kDa) auf ein Endvolumen von 250 µL aufkonzentriert. Diese wurden anschließend mit 250 µL der Aptamer-Lösung (Syl3C-NH<sub>2</sub>, 219 µM, 1:10 in Natriumboratpuffer 10 mM, pH 7,4 (SBB I)) bei RT für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 30 µL EDC (10 mg mL<sup>-1</sup>) zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 600 rpm unter Lichtausschluss inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden zum Abstoppen der Reaktion 500 µL Natriumboratpuffer (50 mM, pH 8,3, SBB II) zugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf eine neue Säule (Vivaspin 50 kDa MWCO) gegeben und 8 mal mit SBB II gewaschen (jeweils 4 min bei 7000 rcf). Die erhaltenen Syl3C-PAA@TiO<sub>2</sub> NP wurden mit SBB II von der Membran gelöst und auf eine Endkonzentration von 1 mg mL<sup>-1</sup> verdünnt und bis auf weiteres bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

#### **A.2.14 Charakterisierung von Syl3C-PAA@TiO<sub>2</sub> NP**

##### ***Gelelektrophorese***

Zur Detektion von Oligonukleotiden auf der NP-Oberfläche wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein 1,2 %iges Agarose-Gel in TAE-Puffer angesetzt, in der Mikrowelle bei 800 W für 2 min erhitzt und mit 5 µL Roti® GelStain versetzt, um DNA-Moleküle unter UV-Beleuchtung sichtbar zu machen. Anschließend wurde das Gel in die Elektrophorese-Kammer gegossen und mit einem Kamm versetzt. Die Kammer wurde anschließend mit TAE-Puffer geflutet und die Proben zugegeben. Dabei wurden 10 µL mit jeweils 5 µL Ladepuffer versetzt. Es wurden sowohl die Überstände der Waschschriffe als auch die erhaltenen NP, PAA@TiO<sub>2</sub> NP und die verwendete Aptamer-Lösung (1:10 in SBB II) auf das Gel aufgetragen. Der Gel-Lauf erfolgte ca. 45 min bei 100 V.

### ***Bestimmung des Hydrodynamischen Durchmessers und des Zeta-Potentials***

Der Hydrodynamische Durchmesser wurde mittels Analyse der dynamischen Lichtstreuung (*dynamic light scattering*, DLS) bestimmt. Verwendet wurde der Litesizer™ 500 (Anton Paar, Software Version 1.8.4), gemessen wurde in Omega-Küvetten. Für die TiO<sub>2</sub> NP wurde ein Brechungsindex von 2,3 gewählt. Gemessen wurde in PBS (Brechungsindex 1,33; Viskosität 0,0010019 PaS)

### ***Absorptionsspektrum von modifizierten FeWT-NP***

Um das Absorptionsspektrum der FeWT NP zu vermessen, wurden FeWT NP, Syl3C-PAA@FeWT NP und PAA@FeWT NP jeweils 1:100 in PBS verdünnt und in einer Quarzküvette im Spektrophotometer (GENYSIS™ 10S) im Bereich von 190-1100 nm vermessen.

### ***Abgeschwächte Totalreflexions-Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (ATR-FTIR)***

ATR-FTIR-Spektren wurden mit einem Bruker IFS 66 Spektrometer, ausgestattet mit einem deuterierten Triglycinsulfat (DTGS)-Detektor und einem internen Reflexionselement aus Zinkselenid, mit einem Einfallswinkel von 45° und 9 Oberflächenreflexionen aufgezeichnet. Das Interferometer und der Infrarot-Strahlengang wurden konstant mit Argon durchströmt um Wasser- oder Kohlenstoffdioxid-Kontaminationen zu verhindern. Jedes Spektrum stellt einen Durchschnitt aus 300 Scans mit einer Auflösung von 4 cm<sup>-1</sup> dar.

#### **A.2.15 Aldehyd-Detektion mittels NASH-Reagenz**

Zur Ermittlung der photokatalytischen Aktivität der TiO<sub>2</sub> P25 und PAA@TiO<sub>2</sub> NP wurde die Aldehyd-Detektion mittels NASH-Reagenz (Tabelle 4) und UV-VIS-Spektroskopie durchgeführt. Prinzip und Ablauf der Methode sind in Kapitel 3.4.1 erläutert. Es wurden 20 mg TiO<sub>2</sub> P25 bzw. PAA@TiO<sub>2</sub> NP in 10 mL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und mittels Ultraschallbad (2 h) und Ultraschall-Homogenisator (15 min) homogenisiert. Zu den Suspensionen wurden 10 mL ddH<sub>2</sub>O mit 60 mM MeOH hinzugefügt (finale MeOH-Konzentration: 30 mM).

Als Kontrolle wurde eine MeOH-Lösung ohne TiO<sub>2</sub> NP angesetzt. Die Suspensionen wurden in 50 mL Bechergläser überführt und stetig gerührt. Zunächst erfolgte die Dunkeladsorption für 2 h, danach wurden die Suspensionen mit ca. 0,7 mW cm<sup>-2</sup> UV-A-Licht (365 nm) bestrahlt. Die Probenahme (ca. 0,5 - 1 mL) erfolgte 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180 und 240 min nach Beginn der Bestrahlung. Die Proben wurden direkt durch 0,2 µm Spritzenfilter in 2 mL-Gefäße filtriert und im Dunkeln gelagert. Das NASH-Reagenz wurde nach der letzten Probenahme hinzugefügt (600 µL NASH-Reagenz auf 300 µL Probe) und die Proben über Nacht im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach ca. 18 h erfolgte die Vermessung der Absorption Lösungen im UV-VIS-Spektrometer (Cary 100, Varian) gegen ddH<sub>2</sub>O.

#### **A.2.16 Synthese von Upconversion-Nanopartikeln**

Die Synthese der Upconversion-Nanopartikel (UCNP) erfolgte angelehnt an verschiedene etablierte Protokolle [115,141,195,196]. Zunächst wurde eine homogene Lösung der Vorläufer-Moleküle hergestellt. Dazu wurden 242,7 mg YCl<sub>3</sub> Hexahydrat, 77,5 mg YbCl<sub>3</sub> Hexahydrat und 1,4 mg TmCl<sub>3</sub> (ca. 80:20:0,5) in 6 mL Ölsäure und 15 mL Octadecene in einem 100 mL Dreihals-Kolben auf 160 °C erhitzt und 40 min gerührt bis eine klare, leicht gelbliche Lösung entstand. Nach Abkühlung der Lösung auf RT wurde das Trägermaterial langsam unter Rühren hinzugefügt (2,5 mmol NaOH, 4 mmol NH<sub>4</sub>F in 10 mL MeOH) und für 120 min weiter bei RT gerührt. Zur Entfernung des MeOH wurde die Lösung zunächst auf 70 °C erhitzt. Danach erfolgte die thermische Zersetzung bei 300°C im Sandbad für 1,5 h unter Argon. Nach erneuter Abkühlung auf RT wurden die synthetisierten Nanopartikel mit EtOH gefällt und bei 4000 rcf für 20 min abzentrifugiert. Die erhaltenen UCNP wurden dreimal mit EtOH (50 % in ddH<sub>2</sub>O) gewaschen. Die Lagerung erfolgte in Cyclohexan bei 4°C unter Lichtausschluss.

### **A.2.17 Charakterisierung von Upconversion-Nanopartikeln**

#### ***Transmission Elektronenmikroskopie (TEM)***

Elektronenmikroskop-Aufnahmen der UCNP wurden mit einem FEI Tecnai G2 F20 Elektronenmikroskop aufgenommen (200 kV).

#### ***Kristallstrukturanalyse***

Die Kristallstruktur der Synthetisierten Partikel wurde mittels XRD analysiert (D8 Advance System, Bruker). Es wurde eine Fe K $\alpha$  Bestrahlungsquelle mit einer Wellenlänge von 1,93730 Å über einen 2 $\theta$ -Bereich von 10°-135° mit einer Schrittweite von 0,01° verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 66 dargestellt (A.3).

#### ***UV-Vis-Spektroskopie***

Für die Messung der Emission der UCNP wurde eine 0,25%ige UCNP-Lösung in Cyclohexan erstellt. Das Emissionsspektrum der UCNP wurde mit einem Spektrofluorimeter (Shimadzu RF-540) aufgenommen und die Signale mit einem DR-3 Data Detektor in digitale Form übertragen. Die Anregung erfolgte mit einer externen Lichtquelle bei 980 nm (RLCO-980-1000-F) bei höchster Intensität.

### **A.3 Ergänzende Daten**

#### **A.3.1 Videomaterialien zu Säugerzellen inkubiert mit TiO<sub>2</sub> NP**

Die aus der in Kapitel 3.1.3 und Kapitel 3.3.1 beschriebenen Time-Lapse Mikroskopie resultierenden Videos können unter folgenden Links eingesehen werden.

A549-Zellen inkubiert mit 12,5 µg mL<sup>-1</sup> FITC-TiO<sub>2</sub> NP, 1 Bild pro Minute, über 24 Stunden, 13 Bilder pro Sekunde

[https://www.tci.uni-hannover.de/fileadmin/institut/TCI\\_bilder/Friehs\\_S1\\_A549\\_24h\\_TiO2.mp4](https://www.tci.uni-hannover.de/fileadmin/institut/TCI_bilder/Friehs_S1_A549_24h_TiO2.mp4)

NIH/3T3-Zellen inkubiert mit 12,5 µg mL<sup>-1</sup> FITC-TiO<sub>2</sub> NP, 1 Bild pro Minute, über 24 Stunden, 13 Bilder pro Sekunde

[https://www.tci.uni-hannover.de/fileadmin/institut/TCI\\_bilder/Friehs\\_S2\\_NIH\\_3T3\\_24h\\_TiO2.mp4](https://www.tci.uni-hannover.de/fileadmin/institut/TCI_bilder/Friehs_S2_NIH_3T3_24h_TiO2.mp4)

HeLa-Zellen inkubiert mit 15 µg mL<sup>-1</sup> FITC-TiO<sub>2</sub> NP, 1 Bild pro Minute, über 24 Stunden, 13 Bilder pro Sekunde

[https://www.tci.uni-hannover.de/fileadmin/institut/TCI\\_bilder/Friehs\\_HeLa\\_Fe\\_NPs\\_2018.mp4](https://www.tci.uni-hannover.de/fileadmin/institut/TCI_bilder/Friehs_HeLa_Fe_NPs_2018.mp4)

### A.3.2 Absorptionsspektrum Kultivierungsmedium

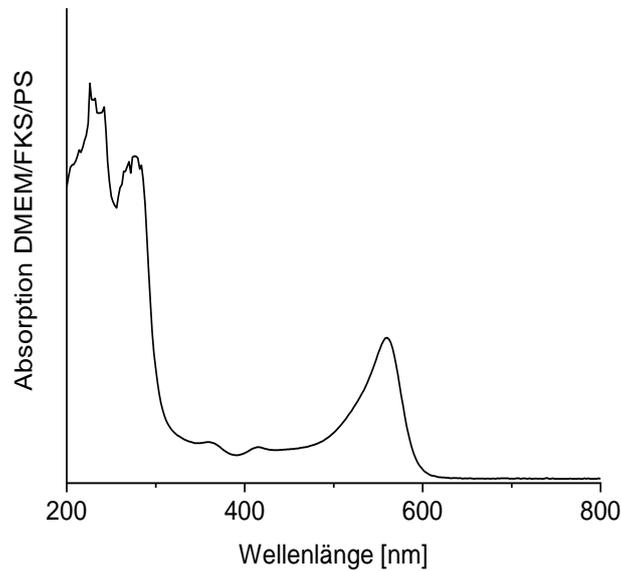


Abbildung 63: Absorptionsspektrum von DMEM mit 10 % FKS und 1 % P/S (Tabelle 4).

### A.3.3 Dosis-Wirkungs-Kurven der FeWT NP

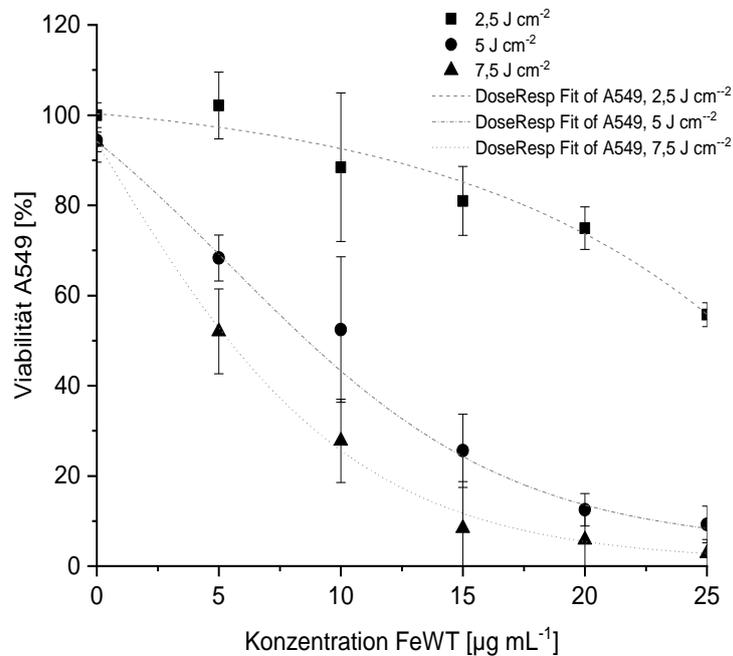


Abbildung 64: Zellviabilität von A549-Zellen nach Inkubation mit FeWT NP und Bestrahlung. Dosis-Wirkungskurve ermittelt mit Origin, nicht-linearer Fit (A.2.9). Dargestellt sind die Mittelwerte bezogen auf die Dunkelkontrolle bei 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  NP nach Dreifachmessung  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

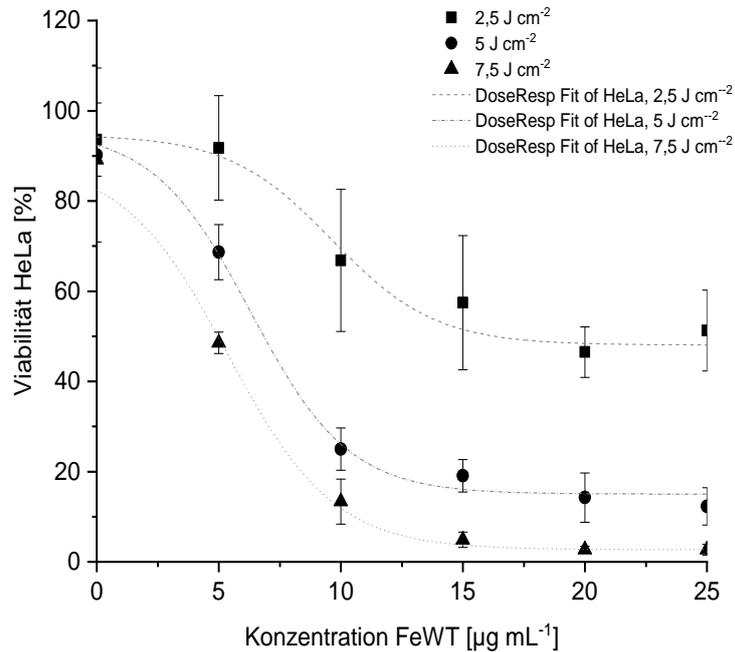


Abbildung 65: Zellviabilität von HeLa-Zellen nach Inkubation mit FeWT NP und Bestrahlung. Dosis-Wirkungskurve ermittelt mit Origin, nicht-linearer Fit (A.2.9). Dargestellt sind die Mittelwerte bezogen auf die Dunkelkontrolle bei  $0 \mu\text{g mL}^{-1}$  NP nach Dreifachmessung  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

### A.3.4 XRD-Spektrum der synthetisierten UCNP

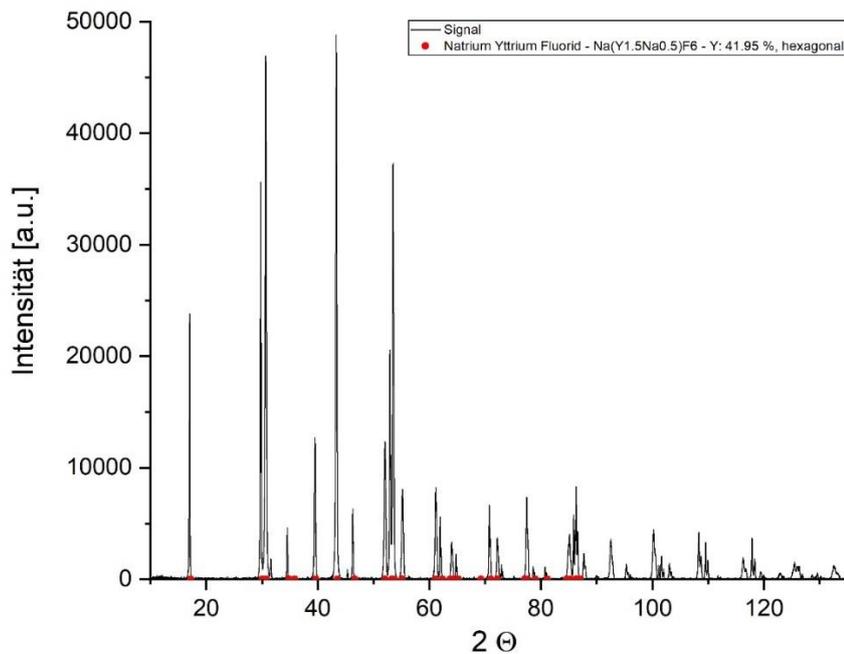


Abbildung 66: Kristallstrukturanalyse der synthetisierten UCNP. Rote Punkte markieren die Übereinstimmungen mit hexagonalen NaFY-Signalen.

## **Unterstützende Arbeiten**

Teile der experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden in einer studentischen Abschlussarbeit unter Anleitung und in Zusammenarbeit mit der Autorin der Dissertation durchgeführt.

### Masterarbeit

Alina Eilers: Etablierung von in vitro-Testsystemen für die Anwendung photokatalytisch aktiver Nanopartikel in der Krebstherapie. Dezember 2016 – Juni 2017. Teilergebnisse sind in Kapitel 3.2.1 und 3.4.1 verwendet worden.

## Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

### Veröffentlichungen (chronologisch, peer reviewed)

**Friebs, E.** (65 %), AlSalka, Y., Jonczyk, R., Lavrentieva, A., Jochums, A., Walter, J.-G., Stahl, F., Scheper, T., Bahnemann, D.:

Toxicity, phototoxicity and biocidal activity of nanoparticles employed in photocatalysis, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2016, 29, doi:10.1016/j.jphotochemrev.2016.09.001

**Dhayabaran, V. V.**, Prakash, T.D., Renganathan, R., **Friebs, E.** (15 %), Bahnemann, D. W.: Novel Bioactive Co(II), Cu(II), Ni(II) and Zn(II) Complexes with Schiff Base Ligand Derived from Histidine and 1,3-Indandione: Synthesis, Structural Elucidation, Biological Investigation and Docking Analysis, *Journal of Fluorescence*, 2017, 27 (1), 135-150, doi: 10.1007/s10895-016-1941-x

**Jochums, A.**, **Friebs, E.** (50 %), Sambale, F., Lavrentieva, A., Bahnemann, D. W., Scheper, T.: Revelation of Different Nanoparticle-Uptake Behavior in Two Standard Cell Lines NIH/3T3 and A549 by Flow Cytometry and Time-Lapse Imaging, *Toxics*, 2017, 5 (3), 15, doi:10.3390/toxics5030015

### Konferenzen und Workshops (chronologisch)

- 03/2015 **Modrejewski, J.**, **Friebs, E.**, Walter, J.-G., Stahl, F., Scheper, T.: Aptamer-functionalized Nanoparticles for Targeted Drug Delivery (Poster), Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel, Hannover, Deutschland
- 06/2015 **Friebs, E.**: Targeting Upconversion Nanoparticles for Cancer Therapy (Vortrag), 3<sup>rd</sup> Russian-German Workshop "Photoactive Nanocomposite Materials", St. Petersburg, Russia
- 08/2016 **Thoms, S.**, **Friebs, E.**, Jonczyk, R., Lavrentieva, A., Scheper, T., Blume, C.: Impedance Sensing of HUVECs after Tacrolimus Treatment (Poster), 3<sup>rd</sup> Conference on Impedance Based Cellular Assays, Regensburg, Deutschland
- 11/2016 Sino-German Summer School on "Bioprocess and Biosystems Engineering for Industrial Biotechnology", Hangzhou, China
- 10/2017 **Friebs, E.**: Photocatalytic Nanoparticles for Cancer Therapy (Vortrag), 5<sup>th</sup> Russian-German Workshop "Photoactive Nanocomposite Materials", St. Petersburg, Russland
- 10/2017 **Friebs, E.**, Jochums, A., Scheper, T., Bahnemann, D. W.: Photocatalytic Nanoparticles for Cancer Therapy (Poster) , Baltic Conference Series for new age technology and innovation, Stockholm, Schweden

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Elsa Friehs  
Geburtstag und -ort: 23.02.1990 in Hannover, Deutschland  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

- 01/2015 – 11/2018      **Leibniz Universität Hannover (LUH), Promotion  
in Technischer Chemie**  
Hannover, Deutschland
- 10/2012 – 10/2014      **LUH, Master of Science in Life Science**  
Hannover, Deutschland  
Schwerpunktfächer: Bioprozesstechnik und  
Naturstoffchemie
- 10/2009 – 09/2012      **LUH, Bachelor of Science in Life Science**  
Hannover, Deutschland
- 08/2000 – 06/2009      **Kooperative Gesamtschule Sehnde, Allgemeine  
Hochschulreife**  
Sehnde, Deutschland