

Molekulare Grundlagen der durch blaues Licht induzierten Differenzierungshemmung humaner Fibroblasten zu Myofibroblasten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Marie Krassovka
aus Neuss

Düsseldorf, Januar 2017

aus dem Institut für Unfall- und Handchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Christoph V. Suschek

Korreferent: Prof. Dr. Henrike Heise

Tag der mündlichen Prüfung:

I was asked once,
“You’re a smart man.
Why aren’t you rich?”

I replied,
“You’re a rich man.
Why aren’t you smart?”

Jacques Fresco

*Meinen Liebsten
und Rambo*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	III
Summary.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Aufbau der Haut.....	1
1.1.1 Epidermis	1
1.1.2 Dermis	3
1.1.3 Subkutis.....	4
1.2 Wundheilung.....	4
1.2.1 Phasen der Wundheilung.....	4
1.2.2 Keloide und hypertrophe Narben: Pathogenese und Therapie.....	7
1.3 Fibroblasten und Myofibroblasten	9
1.3.1 Die Differenzierung	11
1.3.2 Der TGF- β -Signalweg.....	13
1.3.4 Die Rolle der NADPH-Oxidase 4	15
1.4 Licht	17
1.4.2 Effekte von Licht auf zelluläre Prozesse der Haut	20
1.4.3 Effekte von blauem Licht auf zelluläre Prozesse	21
1.4.4 Licht in der medizinischen Anwendung	23
2 Ziele der Arbeit	24
3 Material.....	25
3.1 Verbrauchsmaterial	25
3.2 Material	26
3.3 Geräte	26
3.4 Substanzen und Lösungen	27
3.5 Antikörper, KIT-Systeme und Primer	29
3.6 Medien, Lösungen und Puffer	30
3.7 Software.....	31
4 Methoden	32
4.1 Zellkultur.....	32
4.1.1 Isolierung von Fibroblasten aus <i>preputium penis</i> und Abdomen.....	32
4.1.2 Subkultivierung von Fibroblasten	33
4.1.3 Kryokonservierung von Fibroblasten.....	34
4.1.4 Auftauen von Fibroblasten.....	34
4.1.5 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämozytometer	34
4.2 Bestrahlung	35
4.2.1 Bestrahlung von Fibroblasten	36
4.2.2 Bestrahlung von Flavin-Adenin-Dinukleotiden.....	36
4.3 Differenzierung und Inkubation mit weiteren Zusätzen	37
4.4 Proteinbestimmung	37
4.5 Bestimmung der Aktivität von NADPH-abhängigen Oxidoreduktasen (NOX4).....	39
4.5.1 Prinzip des NADP/NADPH-Assay-Kits	39
4.5.2 Bestimmung des NADP(H)-Umsatzes in TGF β -aktivierten Zellen eine, vier und 24 Stunden nach einmaliger Bestrahlung mit 80 J/cm ²	39
4.6 Flavin-Adenin-Dinukleotid-Analyse	40
4.6.1 Bestimmung der intrazellulären Flavinkonzentration	40

4.7 Western Blot-Analyse.....	41
4.7.1 Prinzip der Western Blot-Analyse	41
4.7.2 Die Probenvorbereitung und das Gießen der Gele.....	42
4.7.3 Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
4.7.4 Das <i>Blotting</i>	43
4.7.5 Die Ponceau-S-Färbung	44
4.7.6 Die Immunmarkierung und Detektion	44
4.8 Prinzip der ROS-Bestimmung.....	45
4.8.1 Detektion von ROS nach Bestrahlung	45
4.9 RT-PCR	45
4.9.1 Bestimmung der NOX4-Genexpression mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR)	45
4.9.2 RNA-Isolierung aus Fibroblasten und photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	46
4.9.3 Reverse Transkription der Total-RNA in cDNA	46
4.10 ATP-Analyse	48
4.10.1 Prinzip der ATP-Bestimmung und Messung an intrazellulärem ATP nach Bestrahlung und Aktivierung von Fibroblasten mit TGF- β	48
4.11 Bestimmung der TGF-β-Rezeptorexpression	49
4.11.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	49
4.11.2 Bestimmung der TGF- β -Rezeptorexpression nach 3/6-tägiger Betrahlung und/oder Aktivierung mit TGF- β	49
4.12 Statistische Auswertung	50
5 Ergebnisse.....	51
5.1 Vorarbeit: Proliferation und Differenzierung	51
5.2 Expression von α -SMA nach 3/6-tägiger Bestrahlung und/oder TGF- β - Aktivierung.....	51
5.3 Die Generierung von ROS und deren Effekte auf die Differenzierung	53
5.4 Die Reduktion von Flavinen durch blaues Licht.....	60
5.5 Der Einfluss von blauem Licht auf NADPH-abhängige Oxidoreduktasen am Beispiel der NOX4	62
5.6 Der Einfluss von blauem Licht auf Bestandteile des TGF- β -Signalwegs	69
5.7 Die ATP-Generierung	78
6 Diskussion	79
6.1 Die Rolle von ROS während der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten.....	80
6.2 Die Rolle von Flavinen als Photoakzeptoren für blaues Licht	84
6.2 Der Einfluss von blauem Licht auf weitere Parameter der TGF- β -Signalkaskade	90
7 Literatur.....	97
8 Anhang	110
8.1 Die Zellproliferation und α -SMA-Expression unter Einfluss von 453 nm.....	110
Danksagung	111
Wissenschaftliche Beiträge.....	112
Eidesstattliche Erklärung.....	113

Zusammenfassung

Fibrotische Störungen der Haut als Folge eines Wundheilungsprozesses, wie die Entstehung von Keloiden und hypertrophen Narben, korrelieren mit einer defekten Regulation der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Ursächlich sind mitunter eine vermehrte Einwanderung und/oder Proliferationsrate von Fibroblasten, eine vermehrte Differenzierungsrate von Fibroblasten zu Myofibroblasten und/oder eine verringerte Apoptoserate von Fibroblasten und Myofibroblasten. Für den Prozess der Differenzierung ist der *Transforming growth factor β* (TGF- β)-Signalweg von essenzieller Bedeutung, da TGF- β den potentesten Wachstumsfaktor in der Differenzierungseinleitung darstellt. Diese Signalkaskade verläuft über die Phosphorylierung der sogenannten SMAD-Proteine, welche in den Zellkern translozieren und an die Promoterregion der Zielgene binden. Im Fall der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist der bis *dato* verlässlichste Marker das Protein *alpha smooth muscle actin* (α -SMA), welches während der Fibroblastendifferenzierung exprimiert wird. Neben der Signalweiterleitung über die SMAD-Proteine spielen auch *mitogen activated protein kinase* (MAPK)-Signalwege sowie die erhöhte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* - ROS) in der Fibroblastendifferenzierung eine entscheidende Rolle.

In Vorarbeiten konnten wir bereits belegen, dass die Bestrahlung von Fibroblasten mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm zu einer dosisabhängigen Inhibition der Proliferation und einer dosisabhängigen Differenzierungshemmung führt. Vor diesem Hintergrund sollte mit der vorliegenden Arbeit der molekulare Mechanismus der Differenzierungshemmung aufgeklärt werden, mit einem besonderen Fokus auf die essenzielle Rolle der TGF- β -gesteuerten Signaltransduktion sowie der Rolle des ROS-induzierten oxidativen Stresses. Ein besonderes Augenmerk galt hierbei der NADPH-Oxidase 4 (NOX4), die als ein fundamentales flavinhaltiges Enzym in der Myofibroblastendifferenzierung ROS generieren kann. Flavine absorbieren Licht im blauen Wellenlängenbereich und stellen somit Photoakzeptoren für blaues Licht dar.

In diesem Zusammenhang untersuchte ich, ob die Hemmung der Myofibroblastendifferenzierung in Korrelation zur NOX4-abhängigen ROS-Generierung steht. Ich detektierte, dass die Bestrahlung mit blauem Licht der subletalen Höchstdosis von 80 J/cm² zu einer signifikanten Steigerung der intrazellulären ROS-Produktion führte. Die Behandlung von TGF- β -aktivierten Fibroblasten mit ROS in Form von H₂O₂ führte analog zur Blaulichtexposition ebenfalls zu einer Hemmung der α -SMA-Expression und somit auch zu einer Hemmung der Differenzierung. Mithilfe der Bestimmung des NADP⁺-Umsatzes sowie der Analyse von Flavinen in wässriger Lösung und in Fibroblasten nach Bestrahlung, stelle ich die Hypothese auf, dass blaues Licht in der Lage ist, eine Reduktion von Flavinen herbeizuführen und somit eine Entkopplung der NOX4 bewirkt. Ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt lag in der Lokalisation der Rolle

der NOX4 innerhalb der TGF- β -Signalkaskade. Die Bestrahlung von TGF- β -aktivierten Fibroblasten hat widererwartend einen induzierenden Einfluss auf die TGF- β -Rezeptor-Typ-I-(ALK 5)-Expression, was auf eine Redoxsensitivität von latentem TGF- β oder auch auf die Inaktivierung der ALK 5-regulierenden Protein Phosphatase-I (PP1) und PP2A zurückgeführt werden könnte. Auf die Expression des Proteins SMAD3 hat die Bestrahlung nur einen tendenziell inhibierenden Effekt. Welche Rolle eine von mir detektierte trunkierte SMAD3 Isoform spielt, die nach Bestrahlung signifikant hoch exprimiert wurde, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Die Proteinexpression von *Extracellular signal-regulated kinase* ((p)ERK1/2) und (p-)p38, welche weitere Schaltstellen der MAPK-kontrollierten Signalwege der Fibroblastendifferenzierung darstellen, werden durch die Blaulichtexposition ebenfalls gehemmt. Diese Expressionskontrolle könnte in Zusammenhang mit der signifikant verringerten Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion in bestrahlten Fibroblasten stehen, da sowohl die ERK1/2 als auch p38 ATP als Substrat benötigen. Die durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten in Zukunft zur Entwicklung einer alternativen und sehr effektiven, dabei pharmafreien und nebenwirkungsarmen Therapieform von fibrotischen Erkrankungen beihelfen.

Summary

Fibrotic disorders of the skin like keloids and hypertrophic scars correlate with a defective regulation of the differentiation from fibroblasts to myofibroblasts during wound healing. The main reasons are occasionally an increased migration and/or proliferation rate of fibroblasts, an increased differentiation rate of fibroblasts to myofibroblasts as well as a decreased apoptosis rate of those. The TGF- β signaling pathway has an essential meaning in the process of differentiation based on the fact that TGF- β is the most potent growth factor for the induction of myofibroblast differentiation. This signaling cascade proceeds through phosphorylation of the SMAD proteins which translocate into the nucleus for binding to the promoter region of the target genes. To date, the most reliable marker for myofibroblasts is the protein α -SMA, which expression is increased during differentiation. Beside of the signal transduction via SMAD's, the MAPK signaling pathways and the generation of ROS became more notable.

In our preliminary work we were able to proof, that irradiation of fibroblasts with blue light (453 nm) leads to a dose-dependent inhibition of proliferation and differentiation. With reference to those observations, I analyzed in this work the molecular mechanism of inhibition with focus on essential enzymes/proteins of the TGF- β signaling pathway as well as the role of ROS-induced oxidative stress. The NOX4 is known to be a fundamental enzyme during differentiation to myofibroblasts, which requires an integrated Flavin for ROS generation. Flavins absorb light of the blue wavelength and act therefor as a photo-acceptor for blue light.

In this context I examined if the inhibition of differentiation correlates with the ROS generation and consequently with the NOX4 activity. A single irradiation with the highest sublethal dose of 80 J/cm² led to a significant increase of the intracellular ROS amount. An administration of ROS in the form of H₂O₂ in TGF- β -activated fibroblasts led to a similar inhibitory effect like the blue light irradiation. I detected a lower amount of expressed α -SMA. With the determination of the NADP⁺ turnover and the analysis of FAD in water solution and in fibroblasts, I hypothesize that blue light is able to reduce flavins and consequently uncouples the NOX4. Another focus was to observe where the NOX4 is located within the TGF- β signaling pathway. Against my expectations, irradiation of TGF- β -activated fibroblasts induced a higher expression of the TGF- β receptor type I (ALK 5). This observation could be reducible to the redox-sensitivity of latent TGF- β or to the inactivation of ALK 5-regulating proteins named protein phosphatase I (PP1) and PP2A. The irradiation of Fibroblasts has a tendicially low influence on the expression of SMAD3 (52 kDa). The role of a truncated isoform of SMAD 3, which was highly expressed after irradiation still has to be investigated. The expression of the MAPK switchpoints (p)ERK1/2 and (p-)p38 were both decreased after single irradiation. This observation

could be related to the lower amount of ATP after irradiation, since ATP is known as a substrate for ERK1/2 and p38. The achieved findings about the molecular effects of blue light could offer an alternative form of therapy with low side effects for the treatment of local fibrotic disorders.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Haut im Querschnitt.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Differenzierung eines Fibroblasts zum Myofibroblast.	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung des TGF- β -Signalwegs über SMAD-Proteine.....	13
Abbildung 4: Schematischer Aufbau der NOX4.	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Eindringtiefe von elektromagnetischer Strahlung in die Haut.	18
Abbildung 6: Das LED Array mit einer Wellenlänge von 453 nm	35
Abbildung 7: Die Irradianz und Intensität des LED Arrays (453 nm) bei verschiedenen Abständen zur bestrahlten Fläche	36
Abbildung 8: Aufbau der Blot Kassette.....	43
Abbildung 9: Die relative Expression des Proteins α -SMA in Relation zum Kontrollprotein GAPDH	52
Abbildung 10: Western Blot des Proteins α -SMA und des Kontrollproteins GAPDH nach drei- und sechstägiger Bestrahlung und/oder Aktivierung mit 5 ng/ml TGF- β	53
Abbildung 11: Die relative ROS-Zunahme in einem Messzeitraum von bis zu 24 Stunden	53
Abbildung 12: Die relative Expression des Proteins α -SMA in Relation zum Kontrollprotein GAPDH.	54
Abbildung 13: Western Blot-Analyse des Proteins α -SMA und des Kontrollproteins GAPDH nach drei- und sechstägiger Bestrahlung und/oder Aktivierung mit 5 ng/ml TGF- β	55
Abbildung 14: Die relative Expression des Proteins α -SMA in Relation zum Kontrollprotein GAPDH	56
Abbildung 15: Die relative Expression des Proteins α -SMA in Relation zum Kontrollprotein GAPDH	58
Abbildung 16: Die relative Expression des Proteins Catalase in Relation zum Kontrollprotein GAPDH.	59
Abbildung 17: Western Blot-Analyse des Proteins Catalase und des Kontrollproteins GAPDH eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende.....	59
Abbildung 18: Das Absorptionsspektrum von FAD in demineralisiertem Wasser nach der Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 453 nm und den Dosen 0 J/cm ² –100 J/cm ²	60
Abbildung 19: Die relative Menge an FAD in Fibroblasten nach Bestrahlung und/oder Aktivierung	61
Abbildung 20: Die relative NOX4-Genexpression nach Bestrahlung und/oder Aktivierung.....	62
Abbildung 21: Die relative Menge an NADP(H) nach Bestrahlung und/oder Aktivierung	63
Abbildung 22: Die relative Menge an NADP(H) nach Bestrahlung und/oder Aktivierung	64
Abbildung 23: Die relative Menge an NADPH nach Bestrahlung und/oder Aktivierung.....	65
Abbildung 24: Die relative Menge an NADPH nach Bestrahlung und/oder Aktivierung.....	65

Abbildung 25: Die relative Menge an NADP^+ nach Bestrahlung und/oder Aktivierung.....	66
Abbildung 26: Die relative Menge an NADP^+ nach Bestrahlung und/oder Aktivierung.....	67
Abbildung 27: Die relative Ratio von $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ nach Bestrahlung und/oder Aktivierung	67
Abbildung 28: Die relative Ratio von $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ nach Bestrahlung und/oder Aktivierung	68
Abbildung 29: Die relative Anzahl an TGF- β RI-positiven Zellen.	69
Abbildung 30: Die TGF- β RI-Expression im Histogramm Overlay	70
Abbildung 31: Die TGF- β RII Expression im Histogramm Overlay.....	70
Abbildung 32: Die relative Anzahl an TGF- β RII-positiven Zellen.....	71
Abbildung 33: Die relative Expression des Proteins EDA-FN in Relation zum Kontrollprotein α - Tubulin	72
Abbildung 34: Die relative Expression des Proteins (p)SMAD3 (52 kDa) und dessen Ratio in Relation zum Kontrollprotein GAPDH	73
Abbildung 35: Die relative Expression des Proteins (p)SMAD3 (30 kDa) und dessen Ratio in Relation zum Kontrollprotein GAPDH	74
Abbildung 36: Die relative Expression des Proteins (p)ERK1/2 und dessen Ratio in Relation zum Kontrollprotein GAPDH.....	75
Abbildung 37: Die relative Expression des Proteins (p-)p38 und dessen Ratio in Relation zum Kontrollprotein GAPDH	76
Abbildung 38: Die relative Menge an ATP nach Bestrahlung und/oder Aktivierung	78
Abbildung 39: Die Induktion der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten über die NOX4.....	81
Abbildung 40: Der Effekt von blauem Licht auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten	83
Abbildung 41: Der mögliche Effekt einer Blaulichtbestrahlung von 453 nm auf Oxidoreduktasen am Beispiel der NADPH-Oxidase 4	86
Abbildung 42: Der Effekt von blauem Licht auf die TGF- β -Rezeptorexpression.....	91
Abbildung 43: Der Einfluss von blauem Licht auf Proteine der TGF- β -Signalkaskade	96
Abbildung 44: Die relative Zellproliferation von Fibroblasten nach Bestrahlung.....	110
Abbildung 45: Die relative Expression des Proteins α -SMA in Relation zum Kontrollprotein GAPDH	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 2: Auflistung des verwendeten Materials.....	26
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte	26
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Substanzen und Lösungen	27
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antikörper.....	29
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten KIT-Systeme	29
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer.....	30
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Medien, Lösungen und Puffer	30
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Software.....	31
Tabelle 10: Auflistung der eingesetzten Zusätze inklusive der Konzentrationen, den Zeitpunkten der Applikation und der Inkubationsdauer.	37
Tabelle 11: Pipettierschema des BSA-Standards zur Ermittlung der Proteinkonzentration.	38
Tabelle 12: Aufstellung der unterschiedlichen Zusätze und Erntezeitpunkte bei einer einmaligen Bestrahlung mit 0 J/cm² bzw. 80 J/cm²	39
Tabelle 13: Auflistung der eingesetzten Antikörper Bezug nehmend auf die Analysezeitpunkte der behandelten Zellen.	41
Tabelle 14: Mengenangaben für die Zusammensetzung der eingesetzten SDS-Gele.	42
Tabelle 15: Pipettierschema für die Herstellung des Mastermixes für einen Ansatz.....	46
Tabelle 16: Zusammensetzung eines einfachen Ansatzes der reversen Transkription.	47

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
ALA	Delta-Amino-Lävulinsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2-assoziiertes X Protein
BCA	Bioinonic-Assay
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CIE	International Comission on Illumination
cm	Centimeter
CPD	Cyclobutan-Dimere
Da	Dalton = atomare Masseneinheit
DHR	Dihydrorhodamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, mit Calcium und Magnesium
DPI	Diphenyleneiodonium
DUOX	Dual Oxidase
ED-A	Extra domain A
ED-B	Extra domain B
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Fokale Adhäsionen
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fetal Calf Serum
FN	Fibronektin
FSC	Forward scatter
GAG	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPD	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
HPR	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IGF	Insulin like growth factor
IL-1	Interleukin-1
In vitro	unter kontrollierten Bedingungen, hier: in Zellkulturschalen

in vivo	im lebenden Organismus
IPL	Intense Pulsed Light
I-Smad	Inhibitorisches Smad
J	Joule
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LAP	Latency-Associated Peptid
LED	Light-Emitting Diode
LIMK1	LIM-Kinase-1
LLC	Large Latent Complex
LLLT	Low-Level Light Therapy
LTBP	Latent-TGF- β -Binding Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
Min.	Minuten
MKK3	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3
MKP	MAP-Kinase Phosphatase
ml	Milliliter
MLC	Myosin Light Chain
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NAC	N-Acetylcystein
NAD	Nicotinamadenindinukleotid
NADP	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NOX	NADPH Oxidase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS2-	Phosphate-Buffered Saline, ohne Calcium und Magnesium
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDL	Gepulste Farblaser (engl.
PDT	Photodynamische Therapie
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PKC	Protein-Kinase-C
PP	Protein Phosphatase
PpIX	Protoporphyrin IX
PUVA	Psoralen plus Ultraviolet A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay (Lysispuffer für Western Blot)
ROS	Reactive Oxygen Species
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
R-Smad	Rezeptor-aktiviertes Smad
RT-PCR	Real-Time PCR

SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumlaurylsulfat
SLC	Small Latent Complex
SMAD	Namenskombination aus den diese Proteine kodierenden Genen (benannt nach ihrer ersten Identifizierung): Small Body Size = SMA (Gen aus <i>Caenorhabditis elegans</i>), Mothers Against Decapentaplegic = MAD (Gen aus <i>Drosophila</i>)
SOD	Superoxid Dismutase
SSC	Side scatter
Std.	Stunde(n)
SuFAs	Supermature Focal Adhesions
TAK1	TGF- β -associated kinase 1
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
T β R-I/-II	TGF- β -Rezeptor Typ-I/-II
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
α -SMA	alpha-Smooth Muscle Actin

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut (Kutis) ist das größte Organ des menschlichen Körpers und bildet mit einer Gesamtfläche von 1,5–2 m² und einem Gewicht von 3,5–10 kg die Körperoberfläche. In der anatomischen Nomenklatur besteht die Haut aus den beiden obersten Schichten, welche als Oberhaut (Epidermis) und Lederhaut (Dermis) bezeichnet werden. Bei der Schicht unter der Lederhaut handelt es sich um die Subkutis (Hypodermis = Unterhaut). Zusammengefasst bilden die Kutis und die Subkutis die sogenannte Hautdecke (Integumentum commune). Der Haut zugehörig sind ebenfalls Haare, Nägel und Drüsen, welche als Anhangsgebilde bezeichnet werden. Aufgrund ihres spezifischen Musters wird die Region der Hand- und Fußsohlen (Palmae und Plantae) Leistenhaut genannt und alle anderen Regionen des Körpers Felderhaut, wobei Haarwuchs ausschließlich auf der Felderhaut erfolgt, welche in den Schnittpunkten der feinen Furchen ihren Ursprung haben. Neben der Sinneswahrnehmung erstreckt sich der Aufgabenbereich der Haut über ein vielfältiges Spektrum. So bietet sie zum einen Schutz vor mechanischen, thermischen, mikrobiellen und chemisch-toxischen Schäden. Zum anderen schützt sie vor Wasserverlust, reguliert die Körpertemperatur und absorbiert Strahlung (Welsch 2010; Moll 2016).

1.1.1 Epidermis

Die Oberfläche des Körpers wird von der Epidermis gebildet, welche in Abhängigkeit von der Hautregion eine Dicke zwischen 0,004–0,4 mm aufweist und aus einem verhornten Plattenepithel besteht. Sie bildet die Grenze zwischen Körper und Umwelt und besteht aus mehreren Zellschichten (Rassner 2007).

Das Stratum corneum stellt die äußerste Zellschicht dar, besteht aus ein bis drei verhornten Zellschichten und wird u. a. auch als Körnerschicht bezeichnet. Charakteristisch für diese Zellschicht ist der Gehalt an basophilen Keratinyalingranula. Diese entstehen bei fortgeschrittener Differenzierung und sind amorphe Partikel mit einem Durchmesser bis einige μm . Zu ihren Bestandteilen gehören im Wesentlichen Proteine, wobei das histidinreiche Filaggrin dominiert und für die Bündelung der Keratine verantwortlich ist. Angrenzend an dem Stratum granulosum befindet sich das Stratum spinosum, welches auch als Stachelschicht bezeichnet wird. Die Namensgebung ergibt sich aus der hohen Anzahl an Desmosomen und Keratinfilamenten. Diese durchziehen die Keratinozyten und erscheinen unter mikroskopischer Betrachtung "stachelig". Das Stratum basale repräsentiert mit seinen kubisch geformten Keratinozyten die innerste Zellschicht der

Epidermis. Neben den Keratinozyten sind in der Epidermis auch Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen lokalisiert. Wie der Name bereits impliziert, sind die Melanozyten für die Synthesisierung des Pigments Melanin verantwortlich, welches an die Keratinozyten über Cadherine weitergegeben wird und für einen UV-Schutz der Keratinozyten sorgt. Bei einem verhornten Plattenepithel unterscheidet man zwischen einem orthokeratinisierten Epithel und einem parakeratinisierten Epithel, wobei es sich bei der Orthokeratinisierung um eine "normale" Verhornung des Epithels handelt, bei der sich kernhaltige Epithelzellen schrittweise in tote, kernlose Korneozyten umwandeln. Auf der Zunge und dem Zahnfleisch ist hingegen das parakeratinisierte Plattenepithel lokalisiert (Moll 2005; Moll 2016; Benninghoff und Drenckhahn 2008; Welsch 2010; Rassner 2007).

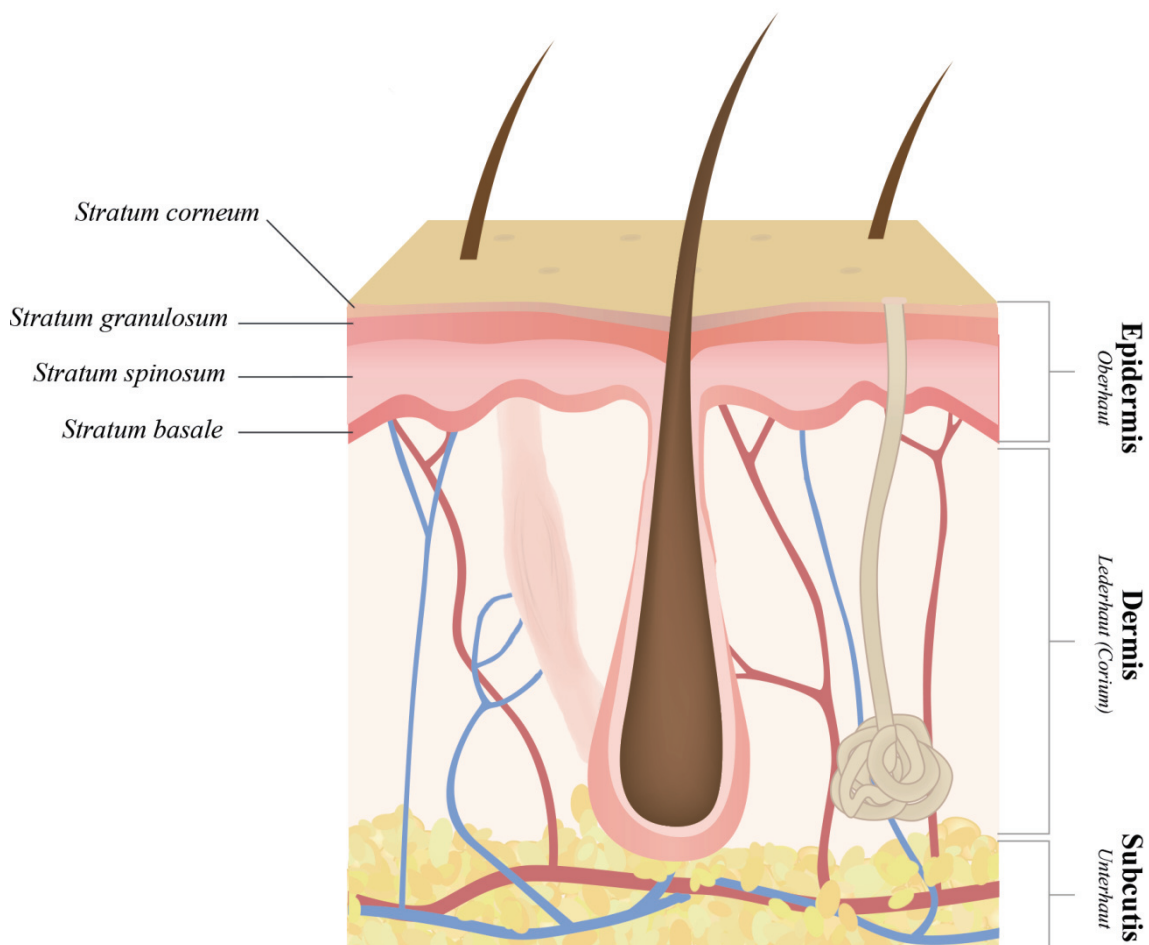


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Haut im Querschnitt. Die detaillierte Beschreibung ist dem Text zu entnehmen.

1.1.2 Dermis

Die Dermis befindet sich unterhalb der Epidermis und erstreckt sich bis zum subkutanen Fett. In Abhängigkeit von ihrer Lokalisation beträgt ihre Dicke 2–4 mm und wird zusammen mit der Epidermis auch als Kutis bezeichnet. Charakteristisch für sie ist der hohe Bindegewebsanteil, welcher der Haut ihre Elastizität und Festigkeit verleiht. Zu den weiteren Funktionen der Dermis gehören die Speicherung von Wasser und der Schutz vor Verletzungen. Eingeteilt werden die Schichten der Dermis in das Stratum papillare (außen) und das Stratum reticulare (innen). Bei dem Stratum papillare handelt es sich um eine dünne Bindegewebsschicht, die aufgrund ihres hohen Aufkommens an Kapillaren an ihrer Oberfläche ein Papillenrelief aufzeigt. Dieses dient der Verbindung zur anliegenden Epidermis. Eine dickere Bindegewebsschicht stellt das Stratum reticulare dar. Dieses ist reich an Kollagen- und elastischen Fasern und verleiht der Dermis ihre Festigkeit (Rassner 2007; Welsch 2010; Moll 2016)

In Bezug auf die zellulären Bestandteile dominieren in der Dermis die Fibroblasten, welche in ihrem inaktiven Zustand auch als Fibrozyten bezeichnet werden. Sie weisen eine spindelförmige Form mit langen Fortsätzen auf und sind für die Synthetisierung von Kollagen verantwortlich, synthetisieren jedoch nicht Desmin oder α -SMA (Li und Wang 2011). Bei diesen in der Dermis vorkommenden Kollagenen handelt es sich um die Typen I, III, IV, V, VI und VII. Nachdem das Prokollagen intrazellulär synthetisiert und aus der Zelle freigesetzt wurde, entsteht durch enzymatische Spaltung das Kollagen, welches zu Fibrillen vernetzt wird. Neben diesen Fasern befinden sich in der Dermis auch elastische Fasern. Diese sind verglichen mit den Kollagenfasern (welche sich meist parallel zur Hautoberfläche anordnen) unstrukturiert und bestehen aus dem Protein Elastin. Neben Fibroblasten sind in der Dermis auch Makrophagen lokalisiert. Ihre Funktion besteht in der Phagozytose und der Speicherung von Zellresten, Fetten sowie von Proteinen und Antigenen. Darüber hinaus sind sie in immunologischen Reaktionen involviert, wie der Wundheilung (Abschnitt 1.2). Die Mastzellen sind ebenfalls in der ganzen Dermis aufzufinden und spielen aufgrund ihrer charakteristischen Granula eine substantielle Rolle bei allergischen und entzündlichen Prozessen. Außerdem sind Melanozyten, Langerhans-Zellen und Lymphozyten in der Dermis lokalisiert. Die Zellen und Fasern der Dermis sind in eine Grundsubstanz integriert, welche aus Glykosaminoglykane, Proteoglykane und Glykroteinen aufgebaut ist und als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet wird. (Benninghoff und Drenckhahn 2008; Moll 2016; Rassner 2007)

1.1.3 Subkutis

Die Subkutis besteht vorwiegend aus Fettzellen (Lipozyten) und Bindegewebe und befindet sich basal zur Dermis. Neben den läppchenartig angeordneten Fettzellen durchlaufen auch Blutgefäße und Nerven die Subkutis in bindegewebigen Septen. Die wesentliche Aufgabe der Subkutis besteht in dem Schutz vor Kälte. Neben dieser Aufgabe erfüllt das Fettgewebe eine mechanische Funktion (Baufett) sowie eine Speicherfunktion (Speicherfett). Fettgewebe wird in zwei Typen kategorisiert: braunes Fettgewebe und weißes Fettgewebe, wobei das weiße Fettgewebe subkutan lokalisiert ist (Benninghoff und Drenckhahn 2008; Rassner 2007; Rassner 2013).

1.2 Wundheilung

Wie in dem vorangegangenen Kapitel bereits beschrieben, besteht die Kutis aus zwei Schichten: der keratinisierten Epidermis und der sich unterhalb befindenden kollagenreichen Dermis (Martin 1997). Als außenliegendes Organ des menschlichen Körpers besteht ihre Aufgabe darin, als Barriere zu fungieren und den Organismus vor schädlichen Umwelteinflüssen zu schützen. Sowohl durch Krankheiten als auch durch Verletzungen kann es zu einer Instabilität dieser Barriere und, im äußersten Fall, zum Tod führen. (Singer *et al.* 1999). In adulten Organismen repräsentiert die Narbenbildung eine abgeschlossene Heilung der vorangegangenen Verletzung (Bullard *et al.* 2003). Die Fähigkeit das Originalgewebe narbenlos wiederherzustellen, konnte bisher nur in wenigen eukaryotischen Organismen und in der pränatalen Entwicklung von Menschen und nicht-humanen Primaten beobachtet werden (Rowlatt 1979; Lorenz *et al.* 1993). Unmittelbar nach einer Verletzung werden sowohl intrazellulär als auch interzellulär Signalwege aktiviert und koordiniert, was den Wundheilungsprozess als einen komplexen Vorgang charakterisiert. Eine Vielzahl an Zellen sind an diesem Prozess beteiligt, wie Immunzellen (Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Dendritische Zellen), Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten (Gurtner *et al.* 2008). Traditionell wird die Wundheilung in drei Phasen unterteilt: eine physiologische Entzündung (exsudative Phase), die Bildung von Granulationsgewebe (proliferative Phase) und die Kollagensynthese und Gewebemodellierung. Diese Phasen sind zeitlich nicht abgegrenzt, sondern überschneiden sich (Schilling 1976; Scheithauer *et al.* 2003; Clark 1996).

1.2.1 Phasen der Wundheilung

Bei der ersten Phase der Wundheilung handelt es sich um die sogenannte exsudative Phase (oder auch Entzündungsphase), welche vier bis sechs Tage nach der Verletzung eingeleitet wird (Broughton *et al.* 2006). Hier kommt es primär durch Thrombozytenaggregation zu einer Hämostase im Wundbereich mit dem Ziel, den

Blutverlust zu stoppen. Dabei wird eine Kaskade von Ereignissen eingeleitet, die zu der Bildung eines Fibrin-Verschlusses führt, welcher als Leitschiene für einwandernde Zellen wie Monozyten und Neutrophile dient (Clark 1996; Martin 1997). Die Thrombozyten liefern mit *Plated-derived growth factor* (PDGF) und TGF- β zwei der wichtigsten Signale für die Initiierung des Heilungsprozesses (Singer *et al.* 1999). Die Funktion von PDGF ist es zum einen chemotaktisch für die Migration von Neutrophilen, Monozyten und Fibroblasten zu sorgen und zum anderen proliferationsfördernd auf Fibroblasten zu wirken (Werner und Grose 2003). Neben der Phagozytose besteht die Aufgabe von neutrophilen Granulozyten auch in der Beseitigung von Fremdkörpern und zerstörten Matrixkomponenten. Ihre Depletion erfolgt durch Makrophagen, welche durch die Aktivierung von Monozyten ca. 48 Stunden nach der Verletzung gebildet werden (Gurtner *et al.* 2008). TGF- β stellt ein weiteres essenzielles Signalmolekül im Wundheilungsprozess dar, indem es die Einwanderung und Stimulation von Makrophagen induziert, welche ihrerseits Zytokine wie *Fibroblast growth factor* (FGF), *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) PDGF und Interleukin-1 (IL-1) sekretieren. Zusätzlich erhöht TGF- β die Chemotaxis der Fibroblasten und moduliert die Kollagen- und Kollagenase-Expression. Die Anwesenheit von Makrophagen deutet auf eine späte exsudative Phase und den Beginn der proliferativen Phase hin (Leibovich *et al.* 1987; Nissen *et al.* 1996; Diegelmann und Evans 2004).

In der zweiten Phase der Wundheilung, der proliferativen Phase, findet die Migration von Zellen in das Wundmilieu statt. Nach ca. zwei bis zehn Tagen sind Keratinozyten die ersten Zellen, die in das Wundgewebe einwandern, reifen und die Barrierefunktion des Epithels wiederherstellen (Gurtner *et al.* 2008). Des Weiteren proliferieren Fibroblasten durch die von Makrophagen synthetisierten Zytokine PDGF und TGF- β in das Wundgewebe und migrieren Richtung extrazellulären Matrix des Granulationsgewebes (Clark 1996). Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Kollagen zu synthetisieren und somit die extrazelluläre Matrix zu bilden (Diegelmann und Evans 2004). Ein fehlender Kontakt zur Nachbarzelle soll mitunter ein induzierender Faktor sein, welcher zu der Proliferation und Migration von Epithelzellen zum Wundrand und somit zur Reepithelisation führt (Scheithauer und Riechelmann 2003; Singer *et al.* 1999). Neben der Gewebsneubildung ist auch die Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese) Teil des Wundheilungsprozesses. Eine maßgebliche Rolle spielen dabei Makrophagen und der von ihnen synthetisierte Wachstumsfaktor *Vascular endothelial growth factor* (VEGF). Bereits vor vier Jahrzehnten wurde ihr pro-angiogenetisches Potenzial in einer Vielzahl experimenteller Studien beschrieben (Polverini *et al.* 1977; Danon *et al.* 1989; Nissen *et al.* 1998). Neben Makrophagen sind es auch Keratinozyten, welche VEGF am Wundrand synthetisieren und den Prozess der Angiogenese triggern. Sobald die Wunde mit genügend Granulationsgewebe gefüllt ist, endet die Angiogenese und

einige der neu gebildeten Blutgefäße bilden sich durch Apoptose zurück. Dieser Vorgang wird möglicherweise durch die Matrixmoleküle Thrombospondin 1 und 2 sowie den Anti-Angiogenesefaktoren Angiostatin, Angiopoietin und Endostatin induziert (Singer *et al.* 1999).

Die reparative Phase beginnt zwei bis drei Wochen nach der Verletzung und ist durch den Abbau des Granulationsgewebes sowie der Umstrukturierung der Kollagenvorstufen charakterisiert (Scheithauer und Riechelmann 2003). In der dermalen EZM dominiert Typ-I-Kollagen als strukturelles Protein (Nimni 1983). Während der Wundheilung wird die temporäre Matrix, welche zu 30 % aus Kollagen Typ-III besteht, durch eine stärkere und strukturierte Matrix ersetzt, wobei der Anteil an Kollagen Typ-III dann auf 10 % herunterreguliert wird (Broughton *et al.* 2006). Diese Remodellierung wird durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) kontrolliert, welche von Makrophagen, Endothelzellen sowie Fibroblasten synthetisiert werden (Singer *et al.* 1999). Bei Metalloproteinasen handelt es sich um Endopeptidasen mit einem Zink- oder Kupferion in ihrer aktiven Domäne. Zum jetzigen Zeitpunkt sind 25 MMPs bekannt, wovon 24 in Säugetieren detektiert wurden (Gill und Parks 2008). Wie bei allen sekretierten Proteinasen, wird die katalytische Aktivität der MMPs an vier Zeitpunkten reguliert: Genexpression, Kompartimentalisation, Proenzym-Aktivierung und die Enzym-Inaktivierung, welche wiederum von der Substratverfügbarkeit und –affinität kontrolliert wird (Ra und Parks 2007). Klassifiziert werden die MMPs in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und membrangebundene MMPs gemäß ihrer Substratspezifität und in Abhängigkeit davon, ob sie als lösliche Proteine sekretiert werden oder an der Oberfläche der Zellmembran gebunden sind (Quan *et al.* 2009). Reguliert werden sie über die sogenannten *Tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs). In den Jahren von 1985 bis 1996 wurden vier Mitglieder dieser Proteinfamilie in Säugern identifiziert und genetisch sequenziert (Docherty *et al.* 1984; Pavloff *et al.* 1992; Greene *et al.* 1996). Ihre Aufgabe besteht darin, die Aktivität der MMPs und auch weiterer Metalloproteinasen wie die *A disintegrin and metalloproteinase* (ADAM) und *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* (ADAMTS) mit einer 1:1 Stöchiometrie zu inhibieren (Murphy 2011). Neben der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix, differenzieren sich Fibroblasten durch TGF- β und einen mechanischen Zug zu Myofibroblasten. Diese Zellen besitzen eine hohe kontraktile Kraft, welche die Wundränder zusammenführt und die Wunde letztlich verschließt (Hinz 2007; Li und Wang 2011). Dieser Prozess der Differenzierung wird in Kapitel 1.3.1 ausführlicher beschrieben. Im weiteren Verlauf der reparativen Phase wird die Mehrzahl an Endothelzellen, Makrophagen und Myofibroblasten apoptotisch oder verlassen den Wundbereich, sobald der Vorgang der Kontraktion beendet ist und die Wundoberfläche durch Epithelisation geschlossen wird (Gurtner *et al.* 2008; Desmoulière *et al.* 1995).

1.2.2 Keloide und hypertrophe Narben: Pathogenese und Therapie

Wie bereits zuvor beschrieben, ist die Wundheilung im Regelfall ein sehr komplexer und effizienter Prozess. Störungen in diesem Prozess können zu fibrotischen Erkrankungen führen, die eine Vielzahl von Organen betreffen können. Keloide und Hypertrophe Narben stellen dabei dermatologische Beispiele dar und werden im Folgenden genauer beschrieben.

Hypertrophe Narben und Keloide sind abnormale Hautveränderungen, welche auf eine gestörte Wundheilung infolge von Trauma, Entzündung oder Verbrennung zurückzuführen sind (Wolfram *et al.* 2009). Dabei sind hypertrophe Narben typischerweise erhaben, rot oder rosafarben und gelegentlich juckend. Ihr Wachstum überschreitet nicht die Grenze des ursprünglichen Verletzungsgebiets, was sie spezifisch von Keloiden unterscheidet. Keloide hingegen sind Hautveränderungen, welche sowohl das Hautniveau überragen als auch die gesunden Hautareale überwachsen. Basierend auf dem Umstand, dass dunklere Hauttypen 15 Mal häufiger von der Keloidentstehung betroffen sind als hellhäutige Personen, wird eine genetische Disposition präsumiert. Histologisch lassen sich zwischen Keloiden und hypertrophen Narben eine Vielzahl von Unterschieden feststellen. In der gesunden Haut verlaufen die Kollagenbündel parallel zur Hautoberfläche, wohingegen in hypertrophen Narben die Typ-III-Kollagenbündel eine flachere Struktur aufweisen und die Fasern in einem welligen Muster angeordnet sind. Des Weiteren sind noduläre Strukturen mit kleinen Gefäßen, feinen Kollagenfasern und α -SMA-exprimierenden Myofibroblasten charakteristisch für hypertrophes Narbengewebe. Diese Strukturen sind in gesunder Haut und in Keloiden nicht detektierbar. Die Kollagenfasern sind in Keloiden überproportional breit und parallel in Reihen angeordnet (Ehrlich *et al.* 1994; Skalli *et al.* 1989). Ihre Synthese ist ca. 20 Mal höher als in unvernarbter Haut und dreimal höher als in hypertrophen Narben (Wolfram *et al.* 2009). Neben der hohen Kollagensynthese und der erhöhten Fibroblastenproliferation in Keloiden, detektierten die Arbeitsgruppen um Babu (1989) und Oliver (1992) eine erhöhte Gen- und Proteinexpression von Fibronectin in Keloidfibroblasten (Babu *et al.* 1989; Oliver *et al.* 1992). Eine zentrale Rolle bei der Ausbildung dieser dermalen Krankheitsbilder spielen Wachstumsfaktoren, deren Einflüsse in einer Vielzahl von Studien untersucht wurden. Wie in Abschnitt 1.2.1 bereits beschrieben, spielt TGF- β bei der Rekrutierung von Fibroblasten und der Kollagenproduktion im Wundheilungsprozess eine entscheidende Rolle, da nach Abschluss der Wundheilung dessen Aktivität herunterreguliert wird. In keloidalem Gewebe herrscht eine Überproduktion von TGF- β sowie eine geringe Regulation durch autokrine Signalmechanismen (Wolfram *et al.* 2009). Zusätzlich ist die Menge an Wachstumsfaktor-Rezeptoren in Keloifibroblasten erhöht. So zeigten die Gruppen um Bock (2005) und Chin (2001), im Vergleich zu Fibroblasten aus hypertrophem Narbengewebe und gesundem Gewebe, eine erhöhte TGF- β -Rezeptor-I-II-mRNA-

Ratio in Keloidfibroblasten, was die Überexpression von Kollagen begründen könnte (Bock *et al.* 2005; Chin *et al.* 2001).

Auch die Expression der für die Umstrukturierung der EZM verantwortlichen MMPs und deren Gegenspielern – die TIMPs – nehmen eine integrale Rolle in der Ausbildung von Keloiden und hypertrophen Narben ein. So soll eine verringerte Ratio zwischen MMPs und TIMPs für die Keloidbildung mitunter charakteristisch sein (Ulrich *et al.* 2010).

Die bisherigen Therapieoptionen zur Behandlung von Keloiden und hypertrophen Narben sind vielfältig. So ist bei hypertrophen Narben, verursacht durch kompliziert verlaufende Wunden sowie einen verzögerten Wundverschluss, der chirurgische Eingriff bisher die Therapie der Wahl (Wolfram *et al.* 2009). Auch eine Therapiekombination zusammen mit Steroiden oder Silikongel kann als effektive Methode eingesetzt werden (Karagoz *et al.* 2012). Neben den chirurgischen Maßnahmen können auch nichtinvasive Therapieansätze in Betracht gezogen werden. So wurde die „*pressure garments therapy*“ (PGT) in den 70er Jahren durch Berichte von Larson und Mitarbeitern populär und war in vielen Behandlungszentren die erste Wahl in der Therapie von hypertrophen Narben (Larson *et al.* 1971; Larson *et al.* 1974). Der Mechanismus ist bisher noch nicht völlig aufgeklärt, jedoch wird angenommen, dass Druck die Kollagenproduktion reduziert oder durch die Limitierung der Blut-, Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr die Kollagensynthese gezielt kontrolliert wird (Ward 1991; Puzey 2002). Neben Druck zeigte der Einsatz von Silikongel und -auflagen (auch in Kombination) Erfolge bei der Therapie und Prävention von hypertrophen Narben und Keloiden (Berman und Flores 1999; Berman *et al.* 2007). Auf molekularer Ebene zeigten beispielsweise Kuhn und Mitarbeiter, dass Silikonauflagen die Fibroblastenaktivität reduzieren und die Menge an TGF- β folglich herunterreguliert wird (Kuhn *et al.* 2000). Eine weitere Behandlungsmethode stellt die intraläsionale Injektion von antimitotischen Arzneimitteln wie Corticosteroiden, 5-Fluorouracil (5-FU), Bleomycin oder Interferonen dar. Diese haben inhibierende Effekte auf die Fibroblastenproliferation, die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und/oder auf die Kollagenproduktion/-aktivität (Karagoz *et al.* 2012). Oftmals wird die Verabreichung von Corticosteroiden und der Einsatz eines Lasers kombiniert, da dies den Therapieerfolg steigern kann (Goldman und Fitzpatrick 1995). Die Verwendung von Lasern in der Behandlung von Narbengewebe begann mit Kohlendioxid-, Argon- und Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Lasern (Nd:YAG). Bereits im Jahr 1983 beschrieb Castro die inhibierende Wirkung durch Bestrahlung von Fibroblasten mittel eines Nd:YAG-Lasers. Dabei detektierte er eine verringerte Kollagenproduktion in diesen Zellen (Castro *et al.* 1983). Ein Jahr später wurde in diesem Zusammenhang auch eine Studie zu der Behandlung von hypertrophen

Narben und Keloiden mittels Argon- und Kohlendioxidlasern von Henderson veröffentlicht, in welcher die betroffenen Patienten durch die periodische Bestrahlung eine deutliche Verbesserung des Gewebes registrierten (Henderson *et al.* 1984). Daraufhin wurde der Effekt von gepulsten Farblasern (PDL) untersucht und diese erzielten im Hinblick auf eine Verbesserung des Narbengewebes, Rötung, Größe und Flexibilität sowie präventiv, vielversprechende Erfolge (Gaston *et al.* 1996; Shakespeare *et al.* 2000), woraufhin weitere Studien folgten. In der Keloidbehandlung war es die Gruppe um Apfelberg (1984), welche als Erste über den Einsatz von Kohlenstoff- und Argonlasern berichtete und deren Ergebnisse keine Verbesserung des Gewebes dokumentierten (Apfelberg *et al.* 1984). Es folgten daraufhin weitere Untersuchungen sowie die Evaluation der Effizienz von Nd:YAG-Lasern und PDLs, welche vielversprechender ausfielen (Bouzari *et al.* 2007). Eine weitere Behandlungsmethode stellt die Kryotherapie dar. Im Jahr 1982 waren es Shepherd und Dawber die diese Methode als Monotherapie bei hypertrophen Narben und Keloiden anwandten (Shepherd und Dawber 1982). Dabei zeigte sich zunächst eine deutliche Verbesserung der Narben, wobei im Verlauf jedoch eine hohe Rezidivrate beobachtet werden konnte. Die Durchführung von repetitiven Behandlungen sowie die Kombination der Kryotherapie mit intraläsionalen Injektionen von Triamcinolon, führte schließlich zu einer erfolgreichen Behandlung ohne wiederkehrende Symptome (Zouboulis *et al.* 2002; Karagoz *et al.* 2012).

1.3 Fibroblasten und Myofibroblasten

Wie bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben, spielen Fibroblasten und Myofibroblasten eine essenzielle Rolle bei der Wundheilung. Fibroblasten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs und sind in nahezu allen Geweben des Organismus lokalisiert. Sie exprimieren Vimentin, jedoch nicht Desmin oder α -SMA und spielen in der Regulation des Umbaus der EZM eine kritische Rolle, da sie die meisten Komponenten der EZM synthetisieren (Li und Wang 2011). Dazu gehören Kollagene, Proteoglykane, Fibronectin sowie Proteasen, welche zu den MMPs gehören und die Fähigkeit besitzen die EZM abzubauen (McAnulty 2007). So synthetisieren sie kontinuierlich EZM-Proteine. In diesem Zusammenhang wurde von der Arbeitsgruppe um McAnulty (1991) ermittelt, dass eine Zelle pro Tag ca. 3,5 Millionen Prokollagenmoleküle produziert (McAnulty *et al.* 1991). Die sekretierten Moleküle werden von lysosomalen Enzymen wie Cathepsin B, D und L reguliert. In Abhängigkeit vom Gewebetypus und dem Alter werden 10–90 % intrazellulär abgebaut, noch bevor sie sekretiert werden (McAnulty 2007). Fibroblasten sind morphologisch von spindelförmiger Form, aber ihre phänotypischen Untereinheiten reichen von den nicht-kontraktilen Fibroblasten zu den kontraktilen Myofibroblasten mit einer Vielzahl von intermediären Phänotypen; unter anderem den Proto-

Myofibroblast (Desmoulière *et al.* 2003). Lange Zeit wurde angenommen, dass die Erneuerung und Expansion von Fibroblasten- und Myofibroblastenpopulationen im Wundheilungsprozess auf residente Zellen zurückzuführen ist. In den letzten 20 Jahren nahmen jedoch die Anzeichen dafür zu, dass Fibroblasten/Myofibroblasten nach Verletzungen und bei fibrotischen Erkrankungen aus diversen Quellen hervorgehen. Dies inkludiert die Dedifferenzierung von Epithelzellen durch einen Vorgang der als Epithelial-mesenchymale Transition bezeichnet wird sowie die Herkunft aus Stammzellen des Knochenmarks und anderen Gewebstypen (Zavadić und Böttinger 2005; Abe *et al.* 2001; Li und Huard 2002).

Myofibroblasten wurden in den frühen 1970er Jahren von Majno und Mitarbeitern entdeckt und ihre Fähigkeit, die Wundheilung aktiv zu fördern, aufgezeigt (Majno *et al.* 1971). Sie werden phänotypisch zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen eingeordnet und ihre Synthese beginnt während der Wundheilung in der frühen Phase der Granulationsgewebsbildung durch die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und endet in der späten Heilungsphase durch Zelltod via Apoptose (Li und Wang 2011). Sie unterscheiden sich von Fibroblasten morphologisch aufgrund ihres kontraktile Apparats, welcher aus Aktinbündeln mit assoziierenden kontraktile Proteinen (Myosin) besteht sowie aus dem Protein α -SMA und einer Splicevariante des Fibronektin – das *Extra domain A Fibronektin* (EDA-Fn). Myofibroblasten sind in der Lage die kontraktile Kräfte über eine lange Zeitperiode aufrechtzuerhalten und werden über Myosin-Leichtketten (*myosin light chain* [MLC]) durch Tyrosin-Phosphorylierung reguliert (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge 1996; Kolodney und Elson 1993). Im Bereich Forschung und klinische Diagnostik gilt das durch die TGF- β -Induktion exprimierte Protein α -SMA zurzeit als verbindlichster Marker für ausdifferenzierte Myofibroblasten (Tomasek *et al.* 2002; Hinz 2010). Zur Unterscheidung von glatten Muskelzellen werden Desmin, Muskelmyosin-Schwerkette, h-Caldesmon und *Smoothelin* als Negativmarker verwendet (Schürch *et al.* 2006). Ein weiteres Charakteristikum von Myofibroblasten (wie auch bei glatten Muskelzellen) ist die direkte Verbindung zueinander durch sogenannte *Gap junctions* (Tomasek *et al.* 2002). Diese wurden morphologisch zwischen Myofibroblasten in dermalen Wunden identifiziert (Gabbiani *et al.* 1978) sowie in der Cornea zwischen Myofibroblasten fibroblastären Ursprungs (Spanakis *et al.* 1998). Sie sind aus mehreren Hemikanälen zusammengesetzt und sind an der Plasmamembran einer Zelle lokalisiert. Die benachbarte Zelle verfügt über dieselbe Anzahl an Hemikanälen, welche jedoch spiegelverkehrt an der Membran angeordnet sind und so die Zell-Zell-Verbindungen herstellen. Diese Kanäle verfügen über verschiedene, jedoch funktionell verbundene Proteine, welche als Connexine bezeichnet werden und die bisher noch weitestgehend unerforscht sind (Tomasek *et al.* 2002). Neben der Kontraktilität, welche zum Wundverschluss beiträgt, besteht eine weitere Hauptfunktion von Myofibroblasten darin, die EZM-Proteine Kollagen

Typ-I–VI und XVIII, Glykoproteine und Proteoglykane zu synthetisieren. Außerdem sekretieren sie auch andere Komponenten der EZM wie Laminin, Thrombospondin, Glykosaminoglykane (GAGs) und Hyaluronsäure. Wie auch Fibroblasten, stellen sie ebenfalls MMPs und TIMPs her, welche regulatorisch auf den Metabolismus der EZM wirken (Li und Wang 2011).

1.3.1 Die Differenzierung

Der Prozess der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten folgt einer gut etablierten Sequenz von Ereignissen. Unter Normalbedingungen weisen Fibroblasten nur eine geringe bis keine Anzahl von Aktin-assoziierten Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakten auf sowie eine verringerte Synthese der EZM-Komponenten (Hinz *et al.* 2007). Nach einer Gewebsverletzung werden sie durch Zytokine aktiviert, migrieren in das Verletzungsgebiet und synthetisieren EZM-Komponenten (Werner und Grose 2003). Ein weiterer wichtiger Stimulus für die phänotypische Transition ist die Änderung des mechanischen Mikroumfelds. Aufgrund einer Verletzung entsteht ein mechanischer Stress auf Fibroblasten, welche im intakten Gewebe in der Regel durch die strukturierte EZM geschützt werden. Als Antwort auf den mechanischen Stress entsteht der Proto-Myofibroblast mit den sogenannten *Stress fibres*, fokalen Adhäsionen und extrazellulären Fibronectinfibrillen (Hinz *et al.* 2001). Um die Fibronectinmenge zusätzlich zu erhöhen, ändern Fibroblasten das Repertoire an Fibronectintranskripten, um dem Zustand der frühen Embryogenese möglicherweise nahezukommen. In der gesunden Dermis produzieren sie Fibronectin mRNA, jedoch exklusive der zwei Splice-Segmente ED-A und ED-B (Ffrench-Constant *et al.* 1989). Während der Wundheilung werden diese Proteine jedoch vermehrt exprimiert und die Arbeitsgruppe um Serini konnte zeigen, dass EDA-FN für die TGF- β -induzierte Myofibroblastendifferenzierung von essenzieller Bedeutung ist (Serini *et al.* 1998). *In vitro* handelt es sich bei dem Proto-Myofibroblast um einen stabilen Phänotyp, der einen Zwischenschritt zum ausdifferenzierten Myofibroblast darstellt, welcher durch die *de novo* Expression des mechanosensitiven Proteins α -SMA charakterisiert ist. Nur wenn die Substratsteifigkeit zu der Bildung von sogenannten „*Supermature focal adhesions*“ (8–30 μ m lang) führt und folglich zur Generierung von einem annähernd 4-fach größeren Stress – verglichen mit den üblichen fokalen Adhäsionen (2–6 μ m lang) – wird α -SMA in präexistierenden β -zytoplasmatischen *Stress fibres* inkorporiert (Goffin *et al.* 2006). Zusammenfassend sind drei lokale Ereignisse für die Generierung von α -SMA-positiven Myofibroblasten obligatorisch: die Akkumulation von biologisch aktivem TGF- β , die Präsenz von speziellen Proteinen der EZM, wie das EDA-FN und ein erhöhter extrazellulärer Stress (Hinz *et al.* 2007). Dabei ist die autokrine Produktion von TGF- β durch undifferenzierte Fibroblasten von hoher Wichtigkeit, um die fibrotische Aktivität bei Eintritt eines

inflammatorischen Stimulus zu fördern (Schmid *et al.* 1998). Bisher wird angenommen, dass Myofibroblasten nach Beendigung des Wundverschlusses apoptotisch werden, aber auch andere Ursachen können für die Reduktion der Myofibroblastenanzahl verantwortlich sein. So wurde bereits in mehreren Studien von einer Umkehrung des Myofibroblasten-Phänotyps durch bFGF berichtet (Mattey *et al.* 1997; Desai *et al.* 2014).

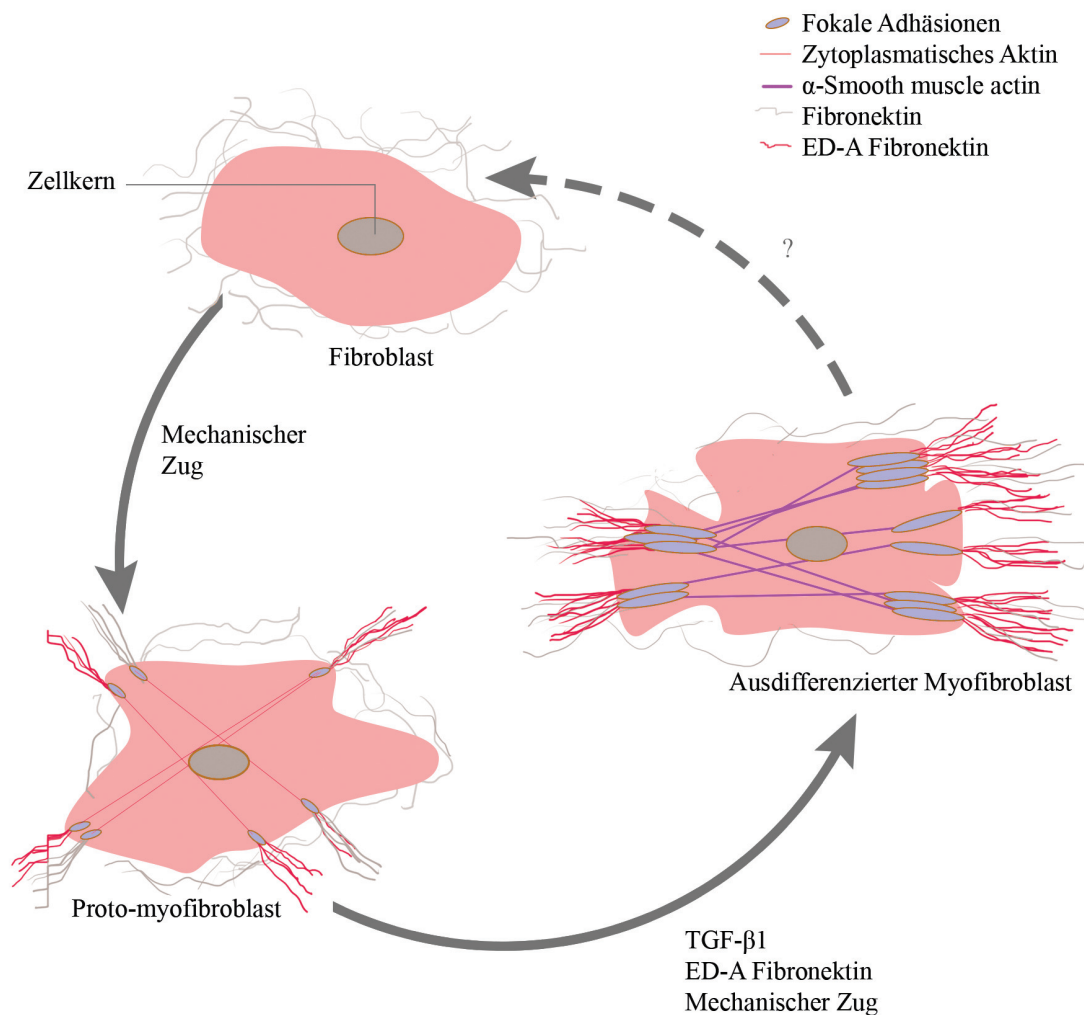


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Differenzierung vom Fibroblast zum Myofibroblast. Die detaillierte Beschreibung ist dem Text zu entnehmen.

1.3.2 Der TGF- β -Signalweg

Wie schon in den vorausgegangenen Kapiteln erläutert und durch viele Experimente und klinische Studien beobachtet, spielt TGF- β eine Schlüsselrolle in der *in vivo* und *in vitro* Differenzierung des Myofibroblasten-Phänotyps (Vaughan *et al.* 2000).

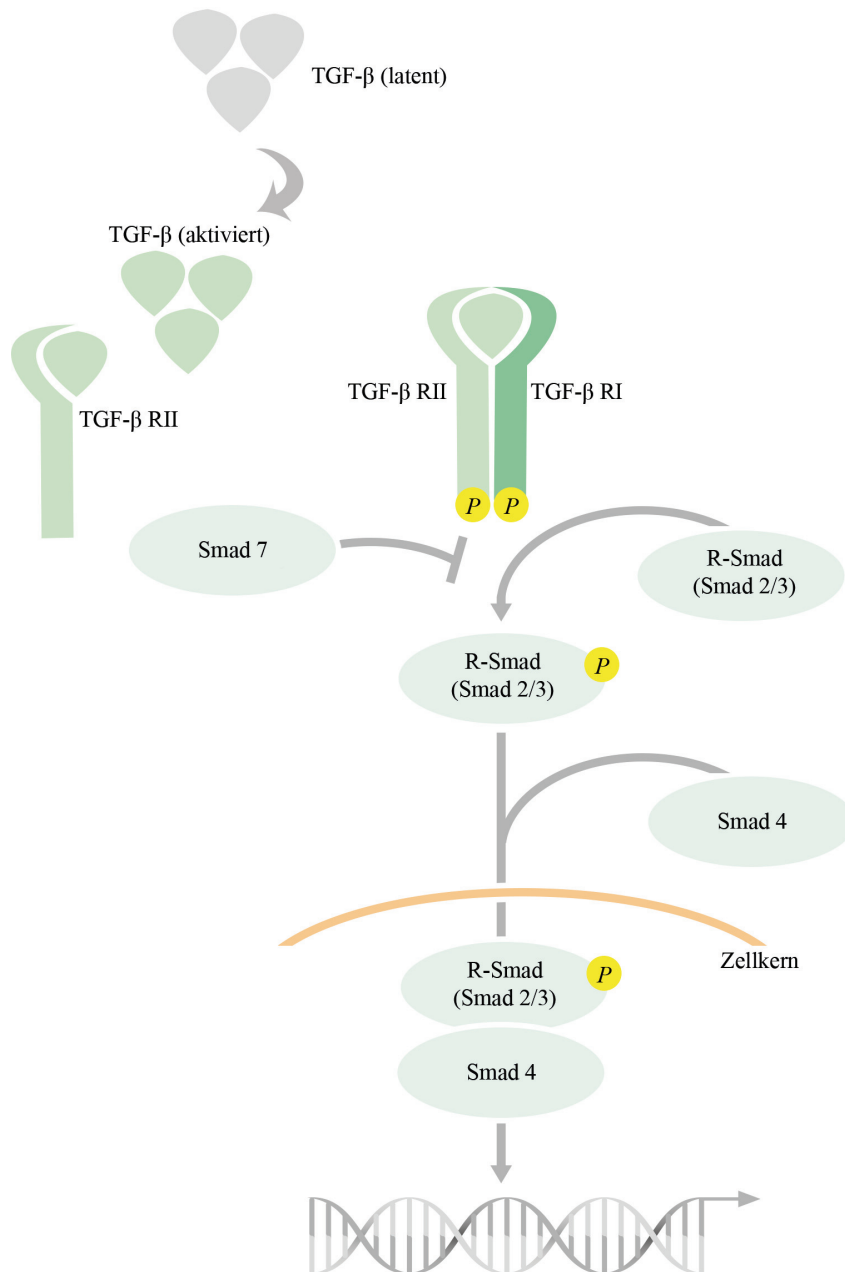


Abbildung 3: Schematische Darstellung des TGF- β -Signalwegs über SMAD-Proteine.
Die detaillierte Beschreibung ist dem Text zu entnehmen.

Die TGF- β Superfamilie beinhaltet eine Vielzahl von Proteinen (nahezu 30 in Säugern) und ist für eine Reihe von physiologischen Prozessen verantwortlich, wie die Embryogenese, Homöostase, Chemotaxis und der Zellzyklus. Dabei stellen TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 die Prototypen der TGF- β Superfamilie dar (Leask und Abraham 2004). Sie werden alle als latente Vorläufer-Komplexe synthetisiert, wobei TGF- β aufgrund nicht-kovalenter Bindungen der Propeptide (*latency-associated peptide* [LAP]) nicht an den Rezeptor binden kann. Ein weiterer Bestandteil des latenten Komplexes ist das sogenannte „*latent-TGF- β -binding protein*“ (LTBP-1, -3, -4) mit einem Molekulargewicht von 125–210 kDa (Annes *et al.* 2003; Leask und Abraham 2004). Der LTBP-TGF- β -Komplex ist vorwiegend in der Matrix lokalisiert, wobei die amino-terminale Region von LTBP-1 durch Transglutaminasen kovalent an Proteine der EZM gebunden ist. Die Aktivierung wird durch den Schnitt der carboxy-terminalen Proregion, an welche LTBP gebunden ist, von der amino-terminalen Region initiiert. TGF- β -Aktivatoren sind unter anderem Proteine, die eng mit dem Prozess der Wundheilung assoziiert sind, wie die Plasminproteasen MMP-2, -9 und Thrombospondin (Schultz-Cherry und Murphy-Ullrich 1993; Yu und Stamenkovic 2000).

Sobald TGF- β aktiviert wird, bindet es an einen heteromeren Rezeptorkomplex, welcher aus einem TGF- β Typ-I- und einem TGF- β Typ-II-Rezeptor besteht. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor Typ-II führt zur Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne, woraufhin die GS-Domäne des Typ-I-Rezeptors durch die aktive T- β R-II-Kinase phosphoryliert wird und es folglich zu einer Rekrutierung seinerseits kommt. Beide dieser Rezeptoren zeigen eine Tyrosinkinase-Aktivität auf und leiten das Signal intrazellulär über Proteine der SMAD-Familie weiter (Roberts 1999; Derynck und Feng 1997). Ihr Name setzt sich aus dem Protein *mother against decapentaplegic* (MAD) und dem Protein *small body size* (SMA) zusammen. Sie werden in drei Subgruppen unterteilt: die rezeptorregulierten R-SMADs (SMAD1, -2, -3, -5 und -8), die Co-SMADs (SMAD4) und die inhibitorischen SMADs (SMAD6 und -7). Die R-SMADs werden vom Rezeptor Typ-I direkt an ihrem COOH-Terminus phosphoryliert, was in dem Signalweg zu einer Vielzahl von Reaktionen führen kann. So wird sowohl ihre Freisetzung vom Rezeptorkomplex induziert als auch die vom Protein *SMAD Anchor for receptor activation* (SARA), dessen Funktion es ist, die SMADs zur Zellmembran zu rekrutieren. Die Phosphorylierung stimuliert außerdem, dass die R-SMADs als heterodimere Komplexe zusammen mit den sogenannten Co-SMADs (einzig Smad4) in den Nukleus gelangen. Dort assoziieren sie mit einem der vielzähligen DNA-Bindungspartnern, sowie Co-Aktivatoren und Co-Repressoren und regulieren dadurch die Genexpression positiv und/oder negativ. Die Antagonisten zum TGF- β -Signalweg stellen die inhibitorischen SMADs mit SMAD6 und -7 dar (Attisano und Wrana 2002; Feng und Derynck 2005).

Die Phosphorylierung am C-terminalen Ende durch den Rezeptor Typ-I ist das Schlüsselereignis der SMAD-Aktivierung; dennoch spielen auch andere Kinase-Signalwege eine Rolle in der Regulation der SMAD-Signalkaskade. So beeinflusst der ERK-Signalweg, stimuliert durch die Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren und/oder RAS, die R-SMADs. Dabei phosphoryliert ERK die MH1-Domäne von SMAD2 und die Bindungssegmente von SMAD1, SMAD2 und SMAD3 (Funaba *et al.* 2002; Kretzschmar *et al.* 1999).

Es wurde in der Vergangenheit aufgezeigt, dass wiederum TGF- β SMAD-unabhängig Kinase-Signalwege aktivieren kann, wie die *TGF- β -associated kinase 1* (TAK1), ERK, p38 MAPK, AKT und *small GTPase* (Mu *et al.* 2012). So wird der ERK-MAPK-Signalweg von Wachstumsfaktoren wie TGF- β und dem Proto-Onkogen *Rat sarcoma* (Ras), welche in Krebszellen hochreguliert sind, aktiviert (Dhillon *et al.* 2007). Der molekulare Mechanismus war noch weitestgehend unbekannt, bis die duale Spezifität der TGF- β -Rezeptoren identifiziert wurde, in der sie sowohl als Tyrosin-Kinase als auch als Serin/Threonin-Kinase agieren. Seitdem werden neue Erkenntnisse über die Rolle von ERK auf die TGF- β -induzierte SMAD-Signalkaskade gewonnen, welche sowohl als positiv- als auch als negativ-regulierend beschrieben werden (Feng und Derynck 2005; Hayashida *et al.* 2003). Im Jahr 2011 beschrieb die Gruppe um Bandyopadhyay (2011) sogar eine selektive Aktivierung von ERK1/2 in dermalen Zellen, welche von der Stärke der TGF- β Typ-II-Rezeptor-Expression abhängig ist (Bandyopadhyay *et al.* 2011). Neben des ERK-Signalwegs aktiviert TGF- β auch die TAK1-, p38- und JNK-MAPK-Signalwege, welche in der Regulation von Apoptose, Migration und der epithelial-mesenchymalen Transition von Bedeutung sind. Dieser Vorgang erfolgt durch SMAD7, welches neben der inhibierenden Funktion auf den SMAD-Signalweg auch die Rolle eines Adapterproteins einnimmt und mit TAK1, MKK3 und p38-MAPK assoziiert ist (Sorrentino *et al.* 2008; Yamashita *et al.* 2008; Landström 2010; Heldin *et al.* 2009). Die Stärke der SMAD7-Expression soll ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des TGF- β -small-GTPase(Cdc42)-Signalwegs in Prostatakarzinomzellen spielen (Edlund *et al.* 2002; Edlund *et al.* 2004).

1.3.4 Die Rolle der NADPH-Oxidase 4

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind aus Sauerstoff hervorgegangene Moleküle, wie Sauerstoffradikale [Superoxide (O_2^-), Hydroxyle ($\bullet OH$), Peroxyle ($RO_2\bullet$) und Alkoxyle ($RO\bullet$)] sowie Moleküle, die oxidierend wirken und/oder in Radikale konvertiert werden können, wie Ozon (O_3), singulett Sauerstoff (1O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die ROS-Generierung ist eine Reaktionskaskade, welche

ihren Anfang bei der Entstehung von Superoxiden hat. Diese dismutieren anschließend rapide zu Wasserstoffperoxid. Die Reaktion verläuft entweder spontan, durch die Änderung des pH-Werts oder katalysiert durch die Superoxid-Dismutasen (SOD), welche essenzielle ROS-Fänger der Zelle darstellen. Reaktive Sauerstoffspezies interagieren mit einer Vielzahl von Molekülen. Zum einen mit anorganischen Molekülen zum anderen auch mit Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren, wodurch deren Funktionen irreversibel gestört oder gar vollständig gehemmt werden können (Bedard und Krause 2007). Somit wurden ROS als hauptmitwirkende Substanzen identifiziert, die in biologischen Organismen erhebliche Schäden verursachen können und besonders im Hinblick auf die Zellalterung eine entscheidende Rolle spielen (Beckman und Ames 1998). Ihre physiologische Generierung erfolgt als Nebenprodukt durch biologische Reaktionen, die beispielsweise in Mitochondrien, Peroxisomen, Cytochrom P-450 und anderen zellulären Bestandteilen stattfinden (Balaban *et al.* 2005; Gonzalez 2005; Schrader und Fahimi 2004).

Die phagozytäre NADPH-Oxidase war das erste identifizierte Beispiel für ein System, welches ROS nicht als Nebenprodukt generiert, sondern dessen primäre Aufgabe die ROS-Generierung ist. Im menschlichen Genom sind bisher sieben homologe NOX-Proteine bekannt: NOX1–NOX5, DUOX1 und DUOX2. Sie alle sind Transmembranproteine, die Elektronen über eine biologische Membran transportieren, um Sauerstoff zu Superoxidanionen zu reduzieren. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Expressionsstärke, der Expressionskontrolle, der organspezifischen Expression, der Art der ROS-Freisetzung und in der Kontrolle ihrer Aktivität. Als natives Monomer sind sie inaktiv und benötigen für ihre Reifung, Stabilisierung, Häm-Inkorporation und den korrekten Transport zum Aktivitätssort Interaktionspartner (Brandes *et al.* 2014). NOX1, NOX2 und NOX3 interagieren mit dem kleinen Transmembranprotein p22phox (Nakano *et al.* 2007; Ambasta *et al.* 2004). Die NOX4 interagiert ebenfalls mit diesem Protein, jedoch hat sie im Vergleich zu den anderen NADPH-Oxidasen spezifische Charakteristika (Martyn *et al.* 2006). Bei ihr handelt es sich um ein 578 Aminosäuren-großes Protein, welches stark im Nierengewebe, Fibroblasten, glomerulären Mesangiumzellen und Podozyten exprimiert wird (Bondi *et al.* 2010; Shiose *et al.* 2001; Gorin *et al.* 2003). Es weist eine 39 %-ige Übereinstimmung zu der phagozytären NOX2 auf und verfügt über Bindungsstellen für NADPH, FAD und Häm. Im Vergleich zu den anderen NOX-Isoformen benötigt sie zur Aktivität jedoch lediglich p22phox als Heterodimerisierungspartner und keine zytosolischen Untereinheiten. Des Weiteren verfügt die NOX4-Dehydrogenasedomäne über eine spezifische Konformation, welche den spontanen Elektronentransfer von NADPH zu dem Flavin-Adenin-Dinukleotid ermöglicht, was die NOX4 als ein konstitutiv aktives Enzym auszeichnet. Somit erfolgt ihre Regulation über die Stärke der

Expression, wobei die Menge an FAD als limitierender Faktor eingestuft wird (Nisimoto *et al.* 2010 A; Nisimoto *et al.* 2010 B). Der Grad der Expression wird durch die Bindung von Agonisten, wie TGF- β , Angiotensin II, Insulin oder *Insulin like growth factor* (IGF) hochreguliert, wodurch die NOX4 eine prädominante Rolle in der Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten einnimmt.

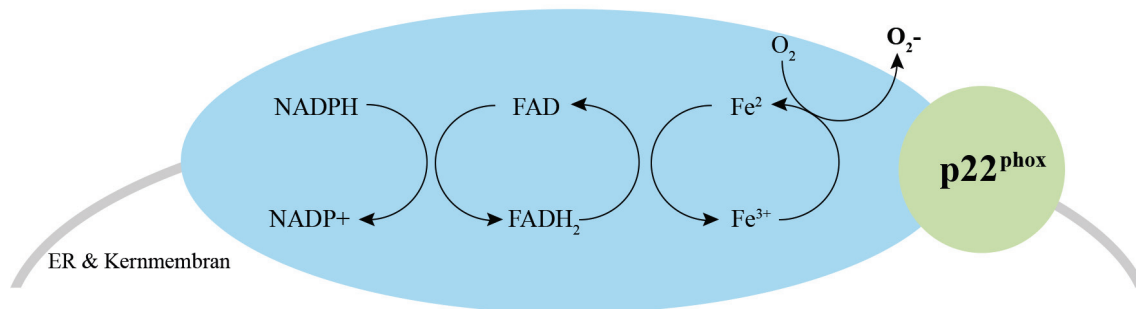


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der NOX4.

So wurde bereits hinreichend etabliert, dass TGF- β als potentester profibrotischer Faktor die NOX4- und ROS-Produktion in einer Vielzahl von Zelltypen, wie glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Hepatozyten und Fibroblasten erhöht (Bondi *et al.* 2010; Hecker *et al.* 2009; Cucoranu *et al.* 2005; Sturrock *et al.* 2006; Hu *et al.* 2005). Die Position der NOX4 ist in den diversen Signalwegen jedoch nicht eindeutig definiert und unterscheidet sich gewebsspezifisch. So wird zum einen darüber berichtet, dass die NOX4 in glatten Muskelzellen der Lunge und in Fibroblasten der Niere den TGF- β -Signalmediatoren Smad2/3 nachgelagert lokalisiert ist und der ERK1/2-Signalweg in einer Redox-abhängigen Weise involviert ist (Sturrock *et al.* 2006; Bondi *et al.* 2010). Zum anderen zeigt eine Studie von Cucoranu an Fibroblasten des Herzes, dass die Aktivierung von Smad2/3 von den NOX4-generierten ROS abhängig ist, was auf eine reziproke Abfolge der Signalkaskade hindeutet (Cucoranu *et al.* 2005). In einer Studie von Haurani wird außerdem von einem negativen *feedback-loop* der NOX4-Expression in adventitiellen Myofibroblasten berichtet (Haurani *et al.* 2008).

1.4 Licht

Das Spektrum der elektromagnetischen Strahlung, welches für das menschliche Auge sichtbar ist, erstreckt sich über einen Wellenlängenbereich von 400–700 nm. Zu den für das menschliche Auge nicht sichtbaren Wellenlängen gehören die Radiowellen, Mikrowellen, Infrarotstrahlung, UV-Strahlung, Röntgenstrahlung und Gammastrahlung. Die spektrale Verteilung der auf der Erde eintreffenden Strahlung gliedert sich in 3–7 % UV Strahlung (290–400 nm), 44 % sichtbares Licht (400–700 nm) und 53 % Infrarotstrahlung (700–1440 nm) (Mahmoud *et al.* 2008; Frederick *et al.* 1989). Gemäß der *International Commission on Illumination* (CIE) wird die UV-Strahlung in

Abhängigkeit ihrer Wellenlänge in drei Bereiche kategorisiert: die kurzwellige UVC-Strahlung (100–280 nm), die UVB-Strahlung (280–315 nm) und die langwellige UVA-Strahlung (315–400 nm). Die Ozonschicht absorbiert Strahlung bis zu einer Wellenlänge von 310 nm, sodass 95 % der UVB-Strahlung und die gesamte UVC-Strahlung nicht auf die Erdoberfläche treffen (Svobodova *et al.* 2006; Matsumura und Ananthaswamy 2004)

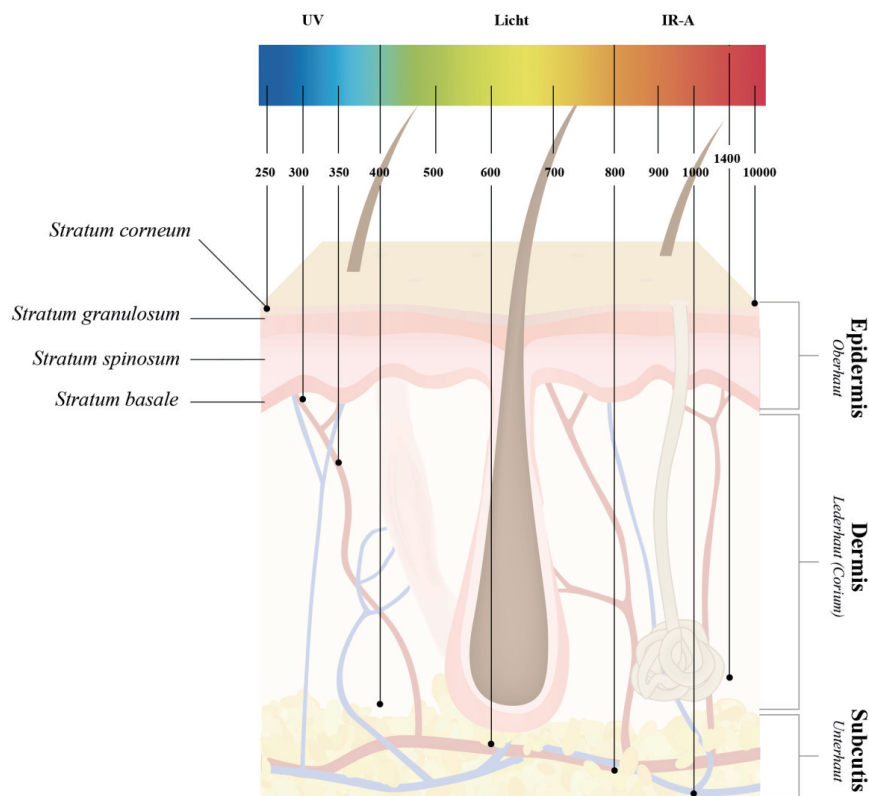


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Eindringtiefe von elektromagnetischer Strahlung in die Haut.

Der Einfluss von Strahlung auf zellbiologische Prozesse im Gewebe hängt von mehreren Variablen ab. So sind neben der Wellenlänge der Strahlung auch die Dosis, die Charakteristika des Gewebes und die Verteilung und Konzentration von endogenen Chromophoren wichtige Faktoren. Sobald Photonen in die Haut eindringen, werden sie von zellulären Molekülen wie Chromophoren oder Photosensibilisatoren absorbiert und eine Serie von biologischen Reaktionen wird eingeleitet. UV-Strahlung kann Schäden in zwei unterschiedlichen Mechanismen induzieren. Zum einen kann eine direkte Absorption der Photonen durch Chromophore erfolgen, was zu photo-induzierten Reaktionen führt und ein Beispiel für die Schädigung von DNA-Basen darstellt. Zum anderen kann eine Schädigung auch indirekt durch endogene oder exogene Photosensibilisatoren erfolgen. Durch die Absorption der Energie des Photons ändert sich die Konformation der Elektronen innerhalb der Chromophore/Photosensibilisatoren und sie gehen in einen angeregten Singulettzustand über. In diesem Zustand kann das Molekül Fluoreszenz emittieren, seine Energie in Form von Hitze abgeben, durch eine photochemische Reaktion Photoprodukte erzeugen oder in einen Triplettzustand übergehen. In diesem langlebigen Zustand emittiert das Molekül Phosphoreszenz, reagiert photochemisch oder geht in den Grundzustand über. Ein zellulärer Schaden durch einen angeregten Photosensibilisator kann auf zwei unterschiedlichen Hauptwegen erfolgen, welche als Typ-I- und Typ-II-Reaktionen bezeichnet werden und von den chemischen Eigenschaften der Photosensibilisatoren abhängig sind. Bei dem Typ-I-Mechanismus findet ein Elektronentransfer durch eine direkte Interaktion zwischen dem erregten Photosensibilisator und anderen Biomolekülen statt, was in einer Bildung von freien Radikalen resultiert, bei dem kein Sauerstoff benötigt wird. Der Typ-II-Mechanismus umfasst den Energietransfer eines erregten Photosensibilisators zu molekularem Sauerstoff, was zur Bildung von ROS führt (Svobodova *et. al.* 2006; Pattison und Davies 2006).

Eine Vielzahl von Biomolekülen, wie Nukleinsäuren, aromatische Aminosäuren, NADH und NADPH, Häme, Quinone, Porphyrine, Carotinoide und 7-Dehydrocholesterol absorbieren Licht im UVB-Bereich (Trautinger 2001). Bei Flavinen handelt es sich um gelbe Verbindungen mit einer Basisstruktur von 7,8-dimethyl-10-alkylisoalloxanzin, welche in vielen biochemischen Reaktionen als Coenzyme und Photoakzeptoren eine Rolle spielen. Das Riboflavin, der Vorläufer von allen biologisch relevanten Flavinen, wurde erstmals im Jahr 1879 als gelbes Pigment der Kuhmilch identifiziert und Laktochrom benannt (Blyth 1879). Seit der Entdeckung und Charakterisierung von Riboflavin und dessen Derivat Flavinmononukleotid (FMN) und FAD wurde auch ihre Fähigkeit identifiziert, in Prozessen mit sowohl einem als auch zwei Elektronentransfers beteiligt zu sein. Dies bedeutet, dass sie in drei verschiedenen Redoxstadien existieren können: oxidiert, ein-Elektron-reduziert (semiquinone) und zwei-Elektronen-reduziert (fully-reduced).

Die Photochemie von Flavinen ist seit nun mehr als 50 Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Das Absorptionsspektrum von Flavinen in wässriger Lösung erstreckt sich über einen Wellenlängenbereich von 220–445 nm mit vier Maximas bei 220, 265, 375 und 445 nm. Präzise Angaben über ihre Absorptionsmaxima sind jedoch abhängig von der Beschaffenheit des Flavin-Chromophors. In erster Linie sind photochemische Reaktionen von Flavinen intra- und intermolekulare Photoreduktionen, intra- und intermolekulare Photoadditionen und intra- und intermolekulare Photodealkylationen. Die Art und das Ausmaß einer solchen photochemischen Reaktion ist abhängig von Faktoren wie: pH des Mediums, die Art und Zusammensetzung des Puffers, Ionenstärke, Sauerstoffgehalt und Lichtintensitäten/Wellenlängen (Ahmad *et al.* 2004; Ahmad *et al.* 2005; Ahmad *et al.* 2006; Schuman Jorns *et al.* 1975).

1.4.2 Effekte von Licht auf zelluläre Prozesse der Haut

Die Bildung eines auf die Vasodilatation von Blutgefäßen beruhenden Erythems, oft gefolgt von der Entstehung eines Sonnenbrands und Ödemen, stellt ein frühes entzündliches Ereignis der Haut als Folge einer erhöhten UV-Exposition dar (Clydesdale *et al.* 2001; Matsumura und Ananthaswamy 2004). Die Effekte von UVB-Strahlung auf die Haut sind überwiegend auf eine direkte DNA-Schädigung zurückzuführen, wohingegen die Schädigung durch UVA-Strahlung indirekt durch die Entstehung von ROS verursacht wird.

Auf molekularer Ebene ist ein Kurzzeiteffekt durch UVB-Bestrahlung die Induzierung von mutagenen Photoprodukten oder DNA-Läsionen in Form von Dimeren, da Nukleinsäuren Licht im Wellenlängenbereich von 245–290 nm absorbieren. Es existieren zwei Formen dieser Dimere: zum einen die Cyclobutan-Dimere (CPDs) zwischen den Resten benachbarter Thymine (T) oder Cytosine (C) und zum anderen Pyrimidin-Photoprodukte zwischen benachbarten Pyrimidinresten (Tornaletti und Pfeifer 1996). Alle dermalen Zellen sind mit Reparatur- und Schutzmechanismen gegen die Ausbildung von Mutationen und Krebszellen ausgestattet. Einer dieser Mechanismen ist der Übergang zu einem Wachstumsarrest gefolgt von der DNA-Reparatur. Ein anderer Mechanismus ist der programmierte Zelltod durch Apoptose. In beiden Mechanismen spielt das Protein p53 eine zentrale Rolle (Matsumura und Ananthaswamy 2004). So wird infolge einer DNA-Schädigung die Transkription von p53 hochreguliert und durch die Phosphorylierung von Serin 15 und Serin 20 aktiviert (Prives und Hall 1999). Die Akkumulation des aktivierten p53-Proteins induziert einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase, welcher der Zelle die Reparatur der geschädigten DNA ermöglicht, bevor sie in der S1-Phase repliziert wird (Huang *et al.* 1996). Ist der DNA-Schaden durch die Lichtexposition zu gravierend und irreparabel, werden zur Entfernung der betroffenen Zellen apoptotische Signalwege eingeleitet. Als ein Transaktivator der Transkription ist p53 in der Lage die Apoptose durch die Hochregulierung von proapoptotischen Genen wie *Bax*, *Fas/Apo-1* zu induzieren, oder

auch die Expression von antiapoptotischen Genen, wie die aus der *Bcl-2*-Familie, herunter zu regulieren.

Die ROS-induzierte Hautschädigung durch UV-Strahlung ist auf ein Ungleichgewicht zwischen der durch Keratinozyten- und Fibroblasten-generierten ROS und antioxidativ-wirkenden Bestandteilen der Zelle (Ascorbat, Tocopherol, Ubichinol, Glutathion, Catalase, Superoxiddismutase, Thioredoxinreduktase, Glutathionperoxidase) zurückzuführen. Durch UVA/B-Strahlung werden ROS durch die Reaktion der Photonen mit endogenen Photosensibilisatoren der Haut überproduziert, was zu einem Ungleichgewicht führt. Dieses Ungleichgewicht wird auch als “oxidativer Stress“ bezeichnet (Svobodova *et al.* 2006). UVA-Strahlen haben dabei einen stärkeren Einfluss auf die Erhöhung des oxidativen Stresses als UVB-Strahlen und führen zu Schädigungen von DNA, Proteinen, Lipiden und zu einer Depletion von NADH, was in einen Energieverlust der Zelle resultiert (Halliday 2005).

Eine Lichtexposition über einen längeren Zeitraum oder wiederholend führt zu einer sukzessiven Verschlechterung der kutanen Struktur und Funktion. Diese resultiert aus kumulativen DNA-Schädigungen und den Effekten der chronischen Entzündung. Diese aktinischen Schäden können schließlich zu der Entstehung von Hautkrebs führen, welcher ein mehrstufiger Prozess der Mutations-Induktion und der Verlust der Immunüberwachung ist.

1.4.3 Effekte von blauem Licht auf zelluläre Prozesse

Das Spektrum blauen Lichts erstreckt sich über einen Wellenlängenbereich von 400–500 nm. Im Vergleich zu Studien mit Licht im UV-Bereich, sind die Erkenntnisse über die Effekte blauen Lichts auf Wundheilungsparameter und deren molekulare Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen, noch weitestgehend unerforscht. Bisher wird blaues Licht in der Dermatologie zur Behandlung von Erkrankungen wie Akne (Wheeland und Dhawan 2011; Gold *et al.* 2011), Psoriasis (Pfaff *et al.* 2015) und atopischer Dermatitis (Becker *et al.* 2011) eingesetzt. In den vergangenen Jahren wurden die Effekte von blauem Licht auf Wundheilungsprozesse sowie auf die dafür essenziellen Zelltypen intensiver studiert. So zeigte im Jahr 2004 die Arbeitsgruppe um Wataha eine verminderte Zellverdopplungszeit in aneuploiden Lungenfibroblasten aus Mäusen, humanen Mammakarzinomzellen und Keratinozyten aus Plattenepithelkarzinomen, welche mit der Aktivität der Succinat-Dehydrogenase (SDH) korrelierte (Wataha *et al.* 2004). In Lungenfibroblasten, Keratinozyten der Vorhaut- und Gingivafibroblasten wurde allerdings eine Erhöhung der SDH-Aktivität in Korrelation zu der Zellverdopplungszeit detektiert. Eine Hypothese, die diese Ergebnisse elaboriert, war die mögliche Modifizierung innerhalb der Atmungskette, da in der SDH ein Flavin-

Molekül integriert ist und dieses blaues Licht absorbiert. Aufgrund der toxischen Wirkung von UV-Strahlung stand auch eine mögliche Toxizität von blauem Licht auf unterschiedliche Zelltypen im Fokus von diversen Forschungsgruppen. So untersuchten die Arbeitsgruppen um Opländer und Liebmann den Einfluss von blauem Licht der Wellenlängen 410, 420, 453 und 480 nm auf dermale Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen. Bei den Wellenlängen von 410–430 nm führte die Bestrahlung mit hohen Dosen zu einer Verringerung der Zellzahl. Im Kontrast dazu konnte bei einer Wellenlänge von 453 nm keine signifikante Verringerung der Zellzahl detektiert werden. Sogar eine Erhöhung der Zellzahl konnte mit einer Bestrahlung von 480 nm beobachtet werden (Opländer *et al.* 2011; Liebmann *et al.* 2010). In Keloidfibroblasten führte eine Bestrahlung mit blauem Licht zu keiner signifikanten Veränderung der Zellzahl (Bonatti *et al.* 2011). Im Jahr 2008 untersuchte die Gruppe um Taoufik den Effekt von blauem Licht auch an Gingivafibroblasten. Dabei konnte kein Kurzzeiteffekt in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Bestrahlung detektiert werden, jedoch eine Hemmung der Proliferation über einen längeren Zeitraum (Taoufik *et al.* 2008).

Neben der Toxizität und dem Proliferationsverhalten wurde auch aufgezeigt, dass blaues Licht zu einer erhöhten Generierung von ROS führt. So konnten Godley und Mitarbeiter neben dem toxischen Effekt in Pigmentepithelzellen auch mitochondriale DNA-Läsionen sowie eine erhöhte Generierung von Singulett-Sauerstoff, Superoxidanionen und Hydroxylradikalen detektieren (Godley *et al.* 2005). Die Bestrahlung mit Wellenlängen von 410, 415 und 420 nm führten bei dermalen Fibroblasten ebenfalls zu einer dosisabhängigen Generierung von ROS (Opländer *et al.* 2011; Mamalis *et al.* 2015). Neben der erhöhten ROS-Produktion bewirkte die Bestrahlung auch eine erhöhte nicht-enzymatische Generierung von Stickstoffmonoxid (NO), wodurch die Differenzierung von Keratinozyten angeregt wurde (Liebmann *et al.* 2010). Auch das Differenzierungsverhalten von Fibroblasten zu Myofibroblasten wurde unter Einfluss von blauem Licht (420 nm) untersucht. Die Bestrahlung von TGF- β -aktivierten Fibroblasten mit subletalen Dosen führte dabei zu einer verringerten Expression des Myofibroblastenmarkerproteins α -SMA (Taflinski *et al.* 2014).

Welchen Einfluss blaues Licht auf die verschiedenen Stoffwechselprozesse von Zellen hat scheint somit von diversen Faktoren abhängig zu sein. So unterscheiden sich die Effekte in Abhängigkeit von der Wellenlänge, der Dosis und der Zelle.

1.4.4 Licht in der medizinischen Anwendung

Die biologische Wirkung von sichtbarem Licht wird heutzutage in der Dermatologie vielschichtig genutzt. Die *Intense pulsed light*-Therapie (ILP) wurde erstmalig im Jahr 1994 angewendet. Dabei handelt es sich um eine Methode, die durch die Verwendung von polychromatischem Licht im Wellenlängenbereich von 515–1200 nm charakterisiert ist und zur Behandlung von vaskulären Anomalien angewendet wird. Eine weitere Behandlungsmethode ist die *Low-level light therapy* (LLLT). Im Unterschied zu der IPL-Therapie wird bei ihr monochromatisches Licht in Form von nicht-kohärenten LEDs (Light-Emitting Diodes) genutzt. Durch ihre geringe Intensität und der folglich geringeren Temperaturschwankungen induziert sie biologische Effekte, ohne dass der Patient Unbehagen während und nach der Behandlung verspürt. Sie wird bisher vorwiegend zur Wundheilung und zur Haarwuchsstimulation eingesetzt. Die Photodynamische Therapie (PDT) basiert auf der Induktion einer photochemischen Reaktion über einen Photosensibilisator. Die Behandlung mit der PDT führt zu der Generierung von ROS und folglich zur Apoptose der betroffenen Zellen. In der Dermatologie ist der am häufigsten verwendete Stoff die Delta-Amino-Lävulinsäure (ALA), welche dafür sorgt, dass der eigentliche Photosensibilisator Protoporphyrin IX (PpIX) über die Häm-Biosynthese generiert wird. Für die PDT wird Licht verschiedenster Quellen genutzt. Neben Breitbandlampen können auch Laser und LEDs eingesetzt werden, wobei dies vom Emissionsspektrum, der Irradianz, der räumlichen Verteilung und der Leistungskonstanz abhängig ist. Die Hauptanwendungsgebiete der PDT sind aktinische Keratosen und Morbus Bowen (Mahmoud *et al.* 2008). Eine weitere lichtbasierte Therapieform ist die *Psoralen plus ultraviolet A*-Therapie (PUVA), welche bei Störungen der Haut wie z.B. Psoriasis, Dermatitis und Vitiligo angewendet wird. Unter der Verwendung des Wirkstoffs Psoralen sensibilisiert sich die Haut für die eingesetzten UV-Strahlen, wodurch deren Effekte auf den Zellstoffwechsel intensiviert werden (Matsumura und Ananthaswamy 2004).

2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, welche molekularen Mechanismen in der durch blaues Licht der Wellenlänge 453 nm hervorgerufenen Differenzierungshemmung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beteiligt sind.

Es sollen folgende Aspekte analysiert werden:

1. Der Einfluss von blauem Licht auf die Myofibroblastendifferenzierung durch die quantitative Bestimmung des Myofibroblastenmarkerproteins α -SMA.
2. Die Ermittlung einer möglichen Induktion der ROS-Generierung durch blaues Licht.
3. Der Effekt von ROS und Antioxidantien auf die Myofibroblastendifferenzierung durch die quantitative Bestimmung des Myofibroblastenmarkerproteins α -SMA.
4. Die Auswirkungen der Bestrahlung auf die Aktivität der ROS-generierenden NOX4 sowie auf die Menge an intrazellulärem FAD.
5. Der Einfluss von blauem Licht auf die Expression der im TGF- β -Signalweg involvierten Enzyme/Proteine/Rezeptoren
6. Die Analyse der ATP-Generierung unter Einfluss von blauem Licht.

Die durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse dienen der Aufklärung des molekularen Mechanismus der Differenzierungsinhibition durch blaues Licht. Die Identifizierung der beteiligten Faktoren wird als Basis zur Entwicklung neuer therapeutischer Behandlungsmöglichkeiten gegen profibrotische Erkrankungen dienen.

3 Material

3.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes™ 1,5 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
12- <i>well</i> -Platte (12- <i>well</i> CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
15 ml Falcons	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
2 ml Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes™ 2,0 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
24- <i>well</i> -Platte (24- <i>well</i> CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
50 ml Falcons	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
6- <i>well</i> -Platte (CytoOne 6- <i>well</i> TC plate)	STARLAB GmbH; Hamburg; Deutschland
96- <i>well</i> -Platte (GREINER 96-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Einwegskalpel	Feather Safety Razor Co., Ltd.; Osaka; Japan
FACS Reaktionsgefäße (FALCON® 5 ml)	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
Handschuhe (Micro-Touch® Nitra-Tex®)	Ansell GmbH; München; Deutschland
Kryogefäße (Cryo.s™ 2 ml)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Nitrocellulose Blotting-Membran Porengröße 0,2 µm	peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen; Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas (ISO 7712)	BRAND GmbH + CO KG; Wertheim; Deutschland
Petrischalen 100 x 20 mm	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Sterilfilter (Millex®-GS 0,22 µm)	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Stripetten (10 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Stripetten (25 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Stripetten (5 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
T75er Flaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 75 cm² red filter cap
Whatman Papier	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Zellschaber (28 cm)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Zellsieb 70 µm	BD Bioscience; Franklin Lakes; Vereinigte Staaten

3.2 Material

Tabelle 2: Auflistung des verwendeten Materials

Becherglas (50 / 100 / 250 ml)	Schott AG; Mainz; Deutschland
Casting Frames	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Casting Stands	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Flaschen (250 / 500 / 1000 ml)	Schott AG; Mainz; Deutschland
Glasplatten (1 mm) mit Spacer	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Kämme (10er/ 15er)	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Küvetten (Glas; 10,00 mm)	Hellma® Analytics GmbH & Co. KG; Müllheim; Deutschland
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik; Friedrichsdorf; Deutschland
Zylinder (500 / 100 / 50 ml)	VWR®; Darmstadt; Deutschland
Zylinder (Kunststoff; 1000 ml)	VITLAB GmbH; Grossostheim, Deutschland

3.3 Geräte

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte

Abzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG; Wangen; Deutschland
Blotter	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
Eisschrank Revco Ultima	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Eppendorf Research® fix 10 - 100 µl Eppendorf Research® fix 100 - 1000 µl Eppendorf Research® fix 0,5 - 10 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Heizbad	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Heizblock	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Kryo-Einfriergerät	Schmidt Laborgeräte GJM Handel und Service GmbH; Wien; Österreich
Kühlschrank	Nalge Nunc International; Rochester (NY); Vereinigte Staaten
LED-Array (453 nm)	Philips GmbH Innovative Technologies; Aachen; Deutschland
Magnetrührer (IKA® RET control/t IKAMAG® safety control)	IKA®-Werke GmbH & Co. KG; Staufen; Deutschland
Mikroskop Zeiss Axiovert 40	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland
Multiplattenlesegerät VICTOR™ V Multilabel Counter model 1420	Perkin Elmer; Waltham; Vereinigte Staaten
MyCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland

Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
pH-Meter; HI 2211 Basic pH/ORP Benchtop Meter	HANNA instruments® GmbH; Vöhringen; Deutschland
Pipettboy accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG; Wertheim; Deutschland
Power supplier Power Pac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Radiometer	Opsytec Dr. Gröbel GmbH; Ettlingen; Deutschland
Real Time PCR System (7300)	Applied Biosystems GmbH; Darmstadt; deutschland
Saugpumpe	KNF Neuberger GmbH; Freiburg; Deutschland
Sonifiziergerät	Hielscher Ultrasonics GmbH; Berlin; Deutschland
Spektralphotometer Specord 205	Analytik Jena AG; Jena, Deutschland
Taumelrollenmischer RM5-V 1750; RM5-V80 1752	Labortechnik Fröbel GmbH; Lindau; Deutschland
Vortexer Art. No 444-1372	VWR®; Darmstadt; Deutschland
Waage (Kern 440; ABJ-N)	Kern & Sohn GmbH; Balingen; Deutschland
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Werkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Zentrifuge (groß) Heraeus Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Zentrifuge (klein) Heraeus Pico 17 Microcentrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland

3.4 Substanzen und Lösungen

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Substanzen und Lösungen

2-Mercaptoethanol (M7154 for electrophoresis)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Adenosine 5'-triphosphate (ATP) disodium salt hydrate	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Cellwash #349524	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
Dihydrorhodamine 123 (ultra pure)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Dispase II (neutral protease grade II)	ROCHE Deutschland
DMSO Dimethyl sulfoxide D2650 - Hybri-Max™, sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, ≥99.7 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline w: Calcium w: Magnesium)	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
DPI #ENZ-52302	Enzo Life Sciences GmbH; Lörrach; Deutschland
Entwickler-Lösung (Clarity™ Western ECL Substrate #170-5060; Luminata™ Forte Western HRP Substrate #WBLUF0100)	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland

FACS Clean #340345	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
FACS Puffer FACS Flow™ BD Bioscience #342003	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
FACS Rinse #340346	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
FCS (Fetal Bovine Serum Gold)	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutschland
Flavin adenine dinucleotide disodium salt hydrate #F6625	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
H ₂ O ₂	VWR®; Darmstadt; Deutschland
Hepes H3375 ≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Isopropanol (2-Propanol EMPLURA®)	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Kollagenase Typ I	Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
L-Glutathione reduced #G4251	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Methanol (Methanol zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur)	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Molekularbiologisch reines Wasser	5PRIME
N-Acetyl-L-cystein #A7250	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	VWR®; Darmstadt; Deutschland
Oligo dT15	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
PBS	Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
Ponceau S	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg; Deutschland
Power SYBR Green	Applied Biosystems GmbH; Darmstadt; deutschland
Random primer (octamers)	Jena Bioscience GmbH; Jena; Deutschland
Recombinant Human TGF-β1 #100-21	PeproTech GmbH; Hamburg; Deutschland
RIPA-Puffer nach Abcam	Abcam plc; Cambridge; Großbritannien
RNase Inhibitor 2500 U (Ambion®)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Roti-Mark Western Set	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Tris	Carl Roth® TRIS PUFFERAN®, ≥99,3 %, Buffer Grade, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-Base	Merck KGaA 648310 Tris Base, Molecular Biology Grade Calbiochem®
Tris-HCl	Merck KGaA 648310648313 Tris, Hydrochloride, ULTROL® Grade Calbiochem®
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Wasser (entionisiert, 10 l)	Otto Fischer GmbH & Co. KG; Waldkirch; Deutschland

3.5 Antikörper, KIT-Systeme und Primer

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antikörper

Kaninchen anti-Human p38 MAPK #9212	Cell Signaling Technology®; Leiden; Niederlande
Kaninchen anti-Human p44/42 MAPK (Erk1/2) #9102	Cell Signaling Technology®; Leiden; Niederlande
Kaninchen anti-Human Phospho-Smad3 (Ser423/425) #9520	Cell Signaling Technology®; Leiden; Niederlande
Kaninchen anti-Human Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) #9211	Cell Signaling Technology®; Leiden; Niederlande
Kaninchen anti-Human Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) #9101	Cell Signaling Technology®; Leiden; Niederlande
Kaninchen anti-Human Smad3 #9523	Cell Signaling Technology®; Leiden; Niederlande
Maus anti-Human alpha smooth muscle Actin ab7817	Abcam plc; Cambridge; Großbritannien
Maus anti-Human Catalase #TA502564	OriGene EU; Acris Antibodies GmbH; Herford; Deutschland
Maus anti-Human Fibronektin ab6328	Abcam plc; Cambridge; Großbritannien
Maus anti-Human GAPDH IMG-6665A	IMGEX; Novus Biologicals; Cambridge; Großbritannien
Maus anti-Human TGF- β RI/ALK-5 APC-konjugiert #FAB5871A	R&D Systems®; Minneapolis; Vereinigte Staaten
Maus anti-Human TGF- β RII PE-konjugiert #FAB241P	R&D Systems®; Minneapolis; Vereinigte Staaten
Maus anti-Human α -Tubulin #sc-8035	Santa Cruz Biotechnology; Texas; Vereinigte Staaten
Sekundärantikörper: Polyklonal Ziege anti-Maus Immunoglobulins/HRP (#P0447); Polyklonal Ziege anti-Kaninchen Immunoglobulins/HRP (#P0449)	Agilent Technologies; Santa Clara; Vereinigte Staaten

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten KIT-Systeme

ATP Kit #LBR-T010	Proteinkinase.de BIAffin GmbH & Co KG; Kassel; Deutschland
Deproteinizing Sample Preparation Kit #K808-200	BioVision; Kalifornien; Vereinigte Staaten
DNA-free Kit DNase I Puffer DNase-Inhibitor	Ambion, Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
FAD Colorimetric/Fluorometric Assay Kit #K357-100	BioVision; Kalifornien; Vereinigte Staaten
Kit zur RNA-Isolation #74106	Qiagen N.V.; Hilden; Deutschland
NADP(H) Kit #ab65349	Abcam plc; Cambridge; Großbritannien
Pierce™ BCA Protein Assay Kit #23225	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland

RT-PCR Kit dNTP-Mix (5 mM) Oligo dT- Primermix (20 µM) RNase-Inhibitor (40 U/µl) Omniscript Reverse Transcriptase (4 U/µl)	Qiagen N.V.; Hilden; Deutschland
--	----------------------------------

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer

NOX4 Forward 5' AAGCCAGTCACCATCATTTTCG 3'	Eurofins Genomics; Ebersberg; Deutschland
NOX4 Reverse 5' CTTTGACCATTCGGATTTCCTCA 3'	
Cyclophilin Forward 5' CCCAAAGTCACCGTCAAGGT 3'	
Cyclophilin Reverse 5' CACCCGGCCTACATCTTCAT 3'	

3.6 Medien, Lösungen und Puffer

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Medien, Lösungen und Puffer

Zellkulturmedium	500 ml Dupleccos MEM (Gibco™)
	10 % oder 5 % FCS
	1 % Penicillin / Streptomycin
Kollagenase Lösung Gelöst in Aqua dest.	0,001 M CaCl
	0,005 M Glucose
	0,1 M HEPES
	0,12 M NaCl
	0,05 M KCl
	0,2 % Kollagenase Typ I
	1,5 % BSA
Dispase- Lösung Gelöst in Aqua dest.	PBS
	0,1 % Dispase Typ II
	5 % Hepes
RIPA-Puffer für die Proteinlysate nach Abcam Lagerung bei 4° Gelöst in Aqua dest.	50 mM Tris pH=8
	150 mM NaCl
	1 % NP-40
	0,5 % Na-deoxycholat
	0,1 % SDS
	Vor Gebrauch werden dem Puffer Phosphataseinhibitor und Proteinaseinhibitor zugesetzt.
Trenngelpuffer Gelöst in Aqua dest.	1,5 M Tris
	0,4 % SDS
Transferpuffer Gelöst in Aqua dest.	25 mM Tris-Base, pH 8,0 - 10,5
	192 mM Glycin

Sammelgelpuffer Gelöst in Aqua dest.	0,5 M Tris
	0,4 % SDS
Elektrophoresepuffer Gelöst in Aqua dest.	25 mM Tris, pH 8,3 - 8,8
	192 mM Glycin
	0,1 % SDS
Blottingpuffer Gelöst in Aqua dest.	150 ml 10x Transferpuffer
	1200 ml H ₂ O
	150 ml Methanol
TBS	7,7 mM Tris, pH 7,5
	150 mM NaCl
Laemmli-Puffer Lagerung bei 4°C Gelöst in Aqua dest.	250 mM Tris-HCl, pH 6,8
	40 % Glycerol
	8 % SDS
	0,1 % Bromphenolblau
	Vor Gebrauch 20 % Mercaptoethanol zusetzen

3.7 Software

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Software

Quantity One 4.6.5 Basic für die Western Blot-Analyse
CellQuestPro für die durchflusszytometrische Messung
WinAspect 2.5.0.0 für photometrische Messung mittels Spektralphotometer
GraphPad Prism 5.0 für Datenauswertung und statistische Analyse
Wallac 1420 Workstation für photometrische Messungen
Workout 2.0 für photometrische Messungen
ABI Prism 7300 System SDS v 1.4 für qRT-PCR, Applied Bioscience
MS Office 2010
EndNote X7, Thomson Reuters (Literaturverzeichnis)

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um Fibroblasten, die zum einen aus der Vorhaut (*Praeputium penis*), und zum anderen aus der Bauchhaut (*Pallem abdominis*) isoliert wurden. Die Patienten, oder der gesetzliche Vormund, haben gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studiennummer: 3634) ihr Einverständnis erklärt, dass die Präparate zu Forschungszwecken verwendet werden dürfen.

Bei den Spendern handelt es sich um 42 männliche und 7 weibliche Donoren, wobei das Durchschnittsalter bei den männlichen Spendern bei 3,025 Jahren liegt (Median = 4) und bei den weiblichen Spendern bei 34,33 Jahren (Median = 31).

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zellen in *Dulbecco's modified eagle* (DMEM) Medium mit 4,5 g Glucose, 10 % *Fetal calf serum* (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

4.1.1 Isolierung von Fibroblasten aus *preputium penis* und Abdomen

Sowohl die Bauchhaut als auch die Vorhaut befanden sich für die Zeit des Transports in gekühlten, sterilen Beuteln oder Gefäßen. Um ein Austrocknen zu verhindern, lagerten die Vorhaut-Präparate zusätzlich in sterilem Zellkulturmedium. Bei der Bauchhaut wurde zunächst die Haut vom darunterliegenden Fett befreit, bevor sie in ca. 5 x 5 mm breite Stücke geschnitten und in ein 50 ml Gefäß überführt wurde. Die Vorhaut-Präparate wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} zunächst vom Zellkulturmedium befreit und anschließend ebenfalls in ca. 5 x 5 mm breite Stücke geschnitten und in ein 50 ml Gefäß überführt. Im ersten Schritt des enzymatischen Verdaus wurde die Epidermis von der Dermis mittels einer zuvor frisch angesetzten Dispase II-Lösung (Zusammensetzung Abschnitt 3.6) dissoziiert. Dazu wurden die Hautstücke mit einer Menge von 5–10 ml der Lösung überschichtet und über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Bei Dispase handelt es sich um ein 36 kDa großes Metalloenzym, welches Fibronectin und Kollagen I spaltet, ohne die Zellmembranen bei langfristiger Inkubation zu schädigen. Am folgenden Tag wurden die Präparate bei 37 °C für ca. 45 Min. unter ständigem Schütteln nochmals in der Dispase II-Lösung inkubiert, bevor sie anschließend für fünf Min. bei 300 g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und der zweite Schritt des enzymatischen Verdaus mittels einer Kollagenase-Lösung bestehend aus 0,2 % Kollagenase I und 1,5 % BSA in Kollagenasepuffer (Zusammensetzung Abschnitt 3.6) eingeleitet. Die Kollagenase diente hierbei zur Auflösung der Zell-Zell-Adhäsion, indem die Kollagenketten durch sie gespalten werden. Die Präparate wurden hierfür mit 5–10 ml frisch hergestellter Lösung überschichtet und unter dauerhaftem Schütteln bei 37 °C für 45 Min. bis zu einer Stunde inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Inhalt

eines Gefäßes mit Hilfe eines Glasstempels durch ein Zellsieb in ein Kulturgefäß (Petrischale) gerieben und angereichert. Um eine möglichst hohe Anzahl an Zellen pro Spender zu gewinnen, wurde dieser Vorgang zwei bis drei Mal im Wechsel mit einer PBS-Spülung wiederholt. Durch eine Zentrifugation mit 300 g über fünf Min. wurden die Zellen von der Lösung getrennt, wobei der Überstand anschließend verworfen wurde. Das übrige Zellpellet wurde mit einer definierten Menge an Zellkulturmedium resuspendiert und in ein Kulturgefäß überführt. Über Nacht setzen sich die adhärenenten Fibroblasten am Zellkulturboden ab; andere nicht-adhärenente Gewebebestandteile werden am nächsten Tag durch einen Mediumwechsel entfernt. Die sich in Passage 0 befindenden Fibroblasten wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

4.1.2 Subkultivierung von Fibroblasten

Die Subkultivierung von adhärenent wachsenden Fibroblasten beginnt zunächst mit einem Waschschrift mit PBS, um noch vorhandene Mediumsreste zu entfernen. Nach Entfernung des PBS, erfolgte das Ablösen der Zellen vom Kulturgefäßboden mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung. Dazu wurden sie ca. fünf Min. im Brutschrank inkubiert und anschließend durch das sogenannte „*shake-off*“-Verfahren, bei welchem man sanft gegen die Seite des Kulturgefäßes schlägt, gelöst. Bei Trypsin handelt es sich um eine Serinprotease, welche ihre größte Aktivität bei einem pH von 7,5 und einer Temperatur von 37 °C entfaltet. Dieser Prozess wurde nach vollständigem Ablösen der Zellen durch dieselbe Menge an FCS-haltigem Kulturmedium gestoppt. Wenn durch Trypsin nicht das gewünschte Ergebnis erzielt wurde, wurden die Zellen zusätzlich mit Hilfe eines Zellschabers mechanisch vom Kulturboden gelöst. Nach mehrmaligem Resuspendieren wurde die Zellsuspension in ein Gefäß überführt und für fünf Min. bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit einer definierten Menge Kulturmedium resuspendiert. Wurde für die nachfolgende Kultivierung bzw. für einen experimentellen Einsatz eine definierte Zellzahl benötigt, wurde diese mittels Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer) bestimmt (Abschnitt 4.1.5). War dies nicht der Fall, konnte die Zellsuspension auch in gleichen Teilen in neue Kulturgefäße überführt werden.

4.1.3 Kryokonservierung von Fibroblasten

Beim Verfahren der Kryokonservierung von Fibroblasten wird aufgrund der zellschädigenden Wirkung des Einfriermediums bei Raumtemperatur zügig und auf Eis gearbeitet. Das stets frisch angesetzte Einfriermedium besteht aus FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), welches bei einer Temperatur von über 0 °C zytotoxisch wirkt. In 1 ml Einfriermedium wurden zwischen 1–1,5 Mio. Zellen eingefroren, wobei die Zellzahl im Vorfeld mittels Hämozytometer (Abschnitt 4.1.5) bestimmt wurde.

Wie bereits in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, wurden die Zellen zunächst gewaschen und mittels Trypsinierung vom Boden des Kulturgefäßes gelöst, um anschließend die Zellzahl und somit die benötigte Menge an Einfriermedium zu bestimmen. Nach der Zentrifugation von fünf Min. bei 300 g und dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit der definierten Menge an vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml der Zellsuspension in vorbereitete Kryoröhrchen überführt. Um ein schonendes Herunterkühlen der Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellen bei -80 °C für 24 Stunden in Kryo-Einfriergeräte mit 100 % Isopropanol gelagert, da bei diesem Vorgehen die Zellen pro Min. um 1 °C heruntergekühlt werden.

4.1.4 Auftauen von Fibroblasten

Bei diesem Arbeitsschritt muss, wie beim Einfrieren der Fibroblasten, aufgrund des im Einfriermedium enthaltenen DMSO zügig und auf Eis gearbeitet werden, da sonst die Gefahr bestünde, dass die Zellen geschädigt werden. Zunächst wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad kurz angetaut, um anschließend die Zellen mit einer definiert vorgelegten Menge an Kulturmedium zu resuspendieren und in ein Gefäß zu überführen. Nachdem die Zellen für fünf Min. bei 300 g zentrifugierten und der Überstand verworfen wurde, erfolgte eine Resuspension des Zellpellets mit Medium und die Aussaat in ein neues Kulturgefäß. Bis zur Konfluenz wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

4.1.5 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämozytometer

Bei den bereits oben beschriebenen Prozessen des Einfrierens und des Auftauens von Zellen, ist es notwendig die Zellzahl im Vorfeld zu bestimmen. Dazu wurde ein Hämozytometer, in welches eine definierte Menge an Zellsuspension zusammen mit Trypanblau hinein pipettiert werden, verwendet. Vorbereitend wurde ein angefeuchtetes Deckglas so auf die Kammer platziert, dass Newton'sche Ringe sichtbar werden und somit gewährleistet ist, dass das Gläschen auf der Kammer haftet. Nachdem die Zellen, wie in den Abschnitten 4.1.2, vom Gefäßboden gelöst wurden, wurde eine geringe Menge der Zellsuspension mit dem Farbstoff Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt und unter das Deckgläschen pipettiert. Durch die entstehenden Kapillarkräfte fließt das

Gemisch zwischen die Kammer und das Deckgläschen. Bei Trypanblau handelt es sich um einen anionischen Diazofarbstoff, der von lebenden Zellen aktiv heraustransportiert wird, wohingegen Zellen mit geschädigter Membran blau gefärbt sind. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop betrachtet somit weiß. Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml Suspension wurden zunächst alle vier Zählfelder ausgezählt und anschließend daraus der Mittelwert gebildet. Dieser wurde mit dem Verdünnungsfaktor und dem festgelegten Kammerfaktor von 10^4 multipliziert, da eine Kammer ein Volumen von $0,1 \mu\text{l}$ fasst.

4.2 Bestrahlung

Für die Bestrahlung der Zellen wurden LED-Lampen der Firma Philips verwendet, welche zuvor kalibriert wurden. Bei der in dieser Arbeit eingesetzten Lampe handelt es sich um die sogenannte „Royal Blue“ (Abbildung 6 und Abbildung 7), welche Blaulicht im Bereich von 453 nm emittiert und eine elektrische Leistung von 68.87 W aufweist.

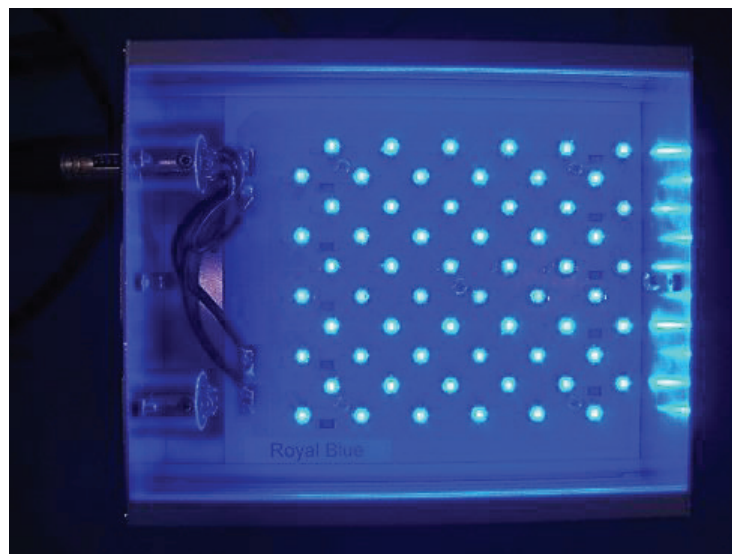


Abbildung 6: Das LED Array mit einer Wellenlänge von 453 nm
(Quelle: Philips GmbH Innovative Technologies).

Die maximale Intensität des Arrays beträgt $23,81 \text{ mW/cm}^2$ bei einem Abstand der Lampe zur bestrahlten Fläche von 3 cm. Sowohl die Irradianz als auch die Intensität können über eine Vergrößerung des Abstandes reguliert werden (Abbildung 7). In dieser Arbeit wurde ein Abstand von 5 cm gewählt, was einer Intensität von $20,7 \text{ mW/cm}^2$ entspricht.

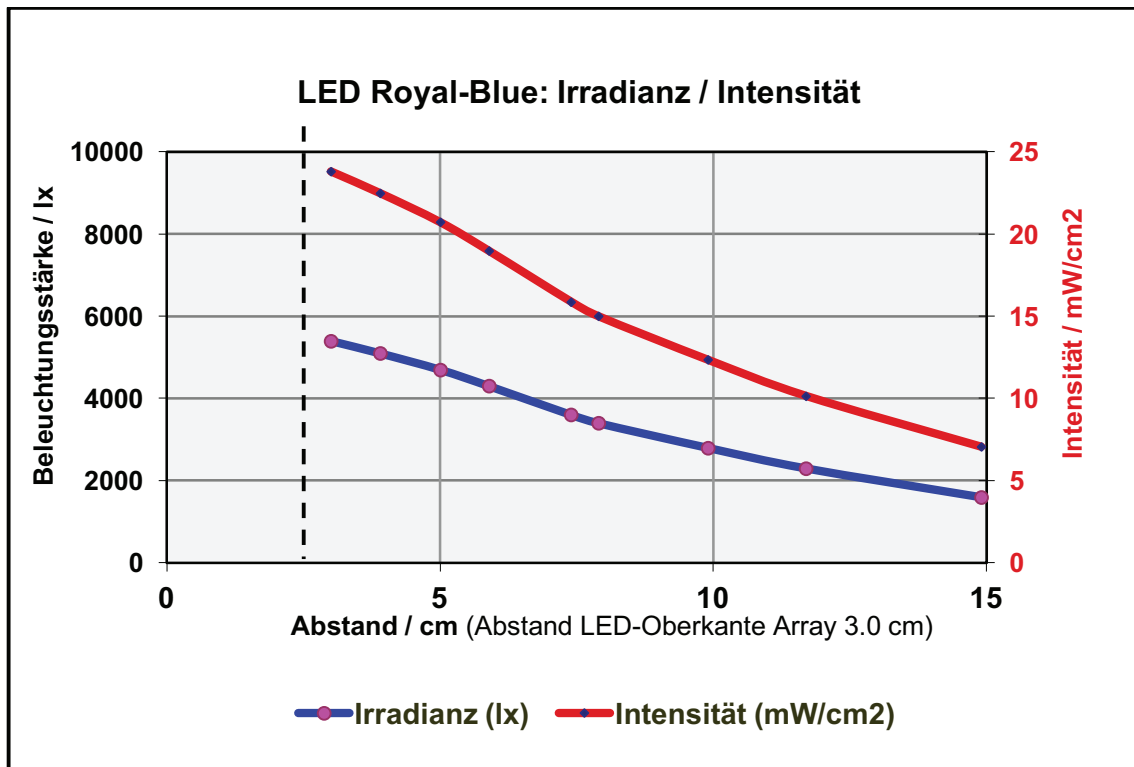


Abbildung 7: Die Irradianz und Intensität des LED Arrays (453 nm) bei verschiedenen Abständen zur bestrahlten Fläche (Quelle: Philips GmbH Innovative Technologies, modifiziert).

4.2.1 Bestrahlung von Fibroblasten

Humane dermale Fibroblasten wurden entweder einmalig oder über einen Zeitraum von 3/6 Tagen täglich mit einer Dosis von 80 J/cm^2 bestrahlt. Dafür wurde zunächst 24 Stunden vor Versuchsbeginn der FCS-Gehalt im Medium durch einen Wechsel um 50 % verringert. Unmittelbar vor Bestrahlungsbeginn wurde das Medium abgesaugt und je nach Größe der verwendeten Kulturgefäße eine entsprechende Menge an PBS (+ Ca^{2+} ; + Mg^{2+}) hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mittig unter die LED-Lampe positioniert und die Bestrahlung durchgeführt. Die unbehandelten Zellen (Kontrolle) verblieben für die Zeit der längsten Bestrahlung unter der sterilen Werkbank, um möglichst analoge Versuchsbedingungen zu schaffen.

4.2.2 Bestrahlung von Flavin-Adenin-Dinukleotiden

Um den Einfluss von blauem Licht auf Flavin-Adenin-Dinukleotide zu untersuchen, wurde eine Konzentration von 10 mM FAD in 10 ml demineralisiertem Wasser gelöst und anschließend mit 453 nm und den Dosen zwischen 0 J/cm^2 und 100 J/cm^2 bestrahlt. Mittels eines Spektralphotometers wurde die Absorption des bestrahlten Gemisches in einem Spektrum von 200–600 nm gemessen.

4.3 Differenzierung und Inkubation mit weiteren Zusätzen

Die Fibroblasten wurden über verschiedene Zeiträume mit verschiedenen Zusätzen kultiviert. Zur Untersuchung eines rapiden Effekts der Zusätze respektive der Bestrahlung wurden Zellen zum einen über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht. Zum anderen wurde ein möglicher Langzeiteffekt der Behandlungen über Intervalle von drei und sechs Tagen evaluiert. Dabei waren sowohl der Zeitpunkt der Zugabe als auch die Inkubationszeit der Zellen mit den jeweiligen Zusätzen unterschiedlich. Um die Sensibilität der Zellen gegenüber Zusätzen zu steigern, wurde 24 Stunden vor Beginn des Versuchs das Medium zu DMEM mit 5 % FCS gewechselt und während des Versuchs bei Mediumswechsels beibehalten.

Tabelle 10: Auflistung der eingesetzten Zusätze inklusive der Konzentrationen, den Zeitpunkten der Applikation und der Inkubationsdauer.

Zusatz	Konzentration	Zeitpunkt der Zugabe	Inkubationsdauer
TGf- β	5 ng/ml	Unmittelbar nach der Bestrahlung	24 Std
GSH	1 mM	Unmittelbar nach der Bestrahlung	24 Std
NAC	1 mM	Unmittelbar nach der Bestrahlung	24 Std
DPI	5 μ M	Unmittelbar nach der Bestrahlung	24 Std
H ₂ O ₂	30 μ M	24 Stunden nach Aussat	64 min

4.4 Proteinbestimmung

Sowohl für die Methodik des Western-Blots (Abschnitt 4.7) als auch zur Normierung von Proben des NADP(H)-Assay-Kits (Abschnitt 4.5) und des FAD-Assay-Kits (Abschnitt 4.6) ist die Bestimmung der Proteinkonzentration obligat, da die Fibroblasten dieser Versuche nicht in einer definierten Menge ausgesät wurden, sondern bei einer 80 %-igen Konfluenz für die einzelnen Versuche eingesetzt wurden.

Bei der Proteinbestimmung handelt es sich um eine Zwei-Stufen-Reaktion, welche mittels des *Biocinonic*-Assays (BCA) der Firma Thermo Fisher durchgeführt wurde. Unter Berücksichtigung des zuvor hergestellten Standards lässt sich die Proteinkonzentration der Proben photometrisch ermitteln.

Tabelle 11: Pipettierschema des BSA-Standards zur Ermittlung der Proteinkonzentration.

Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Probe	BSA-Standard (μl)	PBS (μl)
2	A	300	0
1,5	B	375	125
1,0	C	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	H	100 von G	400
0 = BLANK	I	0	400

Die Biuret-Reaktion ist der erste Teil des Verfahrens und findet im alkalischen Milieu statt. Dabei entsteht eine Komplexbildung zwischen Cu^{2+} -Ionen und Peptidbindungen, wobei je ein Cu^{2+} -Ion vier Peptidbindungen bindet. In der zweiten Stufe findet eine Reduktion des sich im Komplex befindenden Cu^{2+} -Ions statt, wodurch ein Cu^{+} -Ion gebildet wird. Die Biocininsäure dient der Komplexbildung mit den Cu^{+} -Ionen und ist verantwortlich für den violetten Farbkomplex, welcher sein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat.

Im ersten Schritt wurden die sich in RIPA befindenden Proben in einem Verhältnis von 1:6 mit PBS verdünnt. Der vorher angesetzte Proteinstandard (siehe Tabelle 11) und ebenso die verdünnten Proben (je 10 μl), wurden zunächst in Doppelbestimmung in eine Mikrotiterplatte (96 *Well*) pipettiert. Im Anschluss wurden die Proben und der Standard mit dem sogenannten Working Reagenz (je 200 μl) versetzt. Dieser besteht aus zwei Komponenten. Lösung A ist die Biocinonsäure und Lösung B 4 %-iges Kupfersulfat, welche in einem Verhältnis von 50:1 miteinander vermengt wurden. Die Inkubationszeit beträgt unter lichtgeschützten Bedingungen ca. 30–45 Min. bei 37 °C. Anschließend wurde die Absorption photometrisch bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration durch die Standardkurve mathematisch ermittelt.

4.5 Bestimmung der Aktivität von NADPH-abhängigen Oxidoreduktasen (NOX4)

Der Effekt einer einmaligen Bestrahlung mit 80 J/cm^2 auf die Aktivität von flavinhaltigen Oxidoreduktasen, wie das Enzym NADPH-Oxidase 4, wurde mittels einer quantitativen Analyse des Umsatzes von NADPH zu dem oxidierten NADP^+ bestimmt.

4.5.1 Prinzip des NADP/NADPH-Assay-Kits

Bei dem NADP/NADPH-Assay-Kit handelt es sich um eine Methode, bei der spezifisch die intrazelluläre Menge an NADP, NADPH und deren Ratio quantifiziert wird. Dabei detektieren die Enzyme dieses Kits die gesamte Menge an NADP(H) und durch eine vorher durchgeführte Hitzdenaturierung, auch die Menge an NADPH. Der Farbumschlag, hervorgerufen durch eine zyklische Reaktion, wird bei einer Wellenlänge von 450 nm im Photometer detektiert.

4.5.2 Bestimmung des NADP(H)-Umsatzes in TGF β -aktivierten Zellen eine, vier und 24 Stunden nach einmaliger Bestrahlung mit 80 J/cm^2

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % in 6-well-Platten mit je 2 ml DMEM Medium mit 10 % FCS und 1 % P/S kultiviert. Zur Förderung der Sensibilität wurde das Medium 24 Stunden vor Beginn der Versuchsdurchführung zu DMEM mit 5 % FCS und 1 % P/S gewechselt. Unmittelbar nach der Bestrahlung mit 80 J/cm^2 wurden die Zellen partiell mit unterschiedlichen Zusätzen wie Zytokinen und Inhibitoren behandelt und nach einer, vier und 24 Stunden geerntet. Somit ergaben sich für diesen Versuch 24 verschiedene Proben:

Tabelle 12: Aufstellung der unterschiedlichen Zusätze und Erntezeitpunkte bei einer einmaligen Bestrahlung mit 0 J/cm^2 bzw. 80 J/cm^2

	1/4/24 Stunde(n)							
80 J/cm ²	—	+	—	—	+	—	+	+
TGF- β	—	—	+	—	+	+	—	+
DPI	—	—	—	+	—	+	+	+

Unmittelbar nach der Bestrahlung mit 80 J/cm^2 wurden die Fibroblasten mit 2 ml Medium überschichtet und mit den oben genannten Zusätzen für eine, vier und 24 Stunden inkubiert. TGF- β wurde in einer Konzentration von 5 ng/ml und der Inhibitor DPI in einer Konzentration von 5 μM verwendet. Geerntet wurden die Zellen in Extraktionspuffer und deren Zellmembran mittels zwei Einfrier-Auftau-Zyklen zerstört. Anschließend wurden sie fünf Min. stark gemischt und für fünf Min. bei 17000 g zentrifugiert, woraufhin der Überstand abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde. Für die Normierung der Ergebnisse wurde ein Teil dieses Überstandes

in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und für die spätere Proteinbestimmung (Abschnitt 4.4) wieder eingefroren. Um die Menge an NADPH bestimmen zu können, musste NADP mittels Hitze denaturiert werden. Hierfür wurde ein Aliquot der Proben für 30 Min. bei 60 °C im Heizblock erhitzt. Im Anschluss wurden die Proben für fünf Min. mit dem *Reaction Mix* inkubiert, bevor im letzten Schritt die Zugabe des Entwicklers erfolgte. Die Menge an NADP(H)-Total und NADPH wird bei 450 nm im Photometer bestimmt und das NADP/NADPH-Verhältnis mathematisch ermittelt.

4.6 Flavin-Adenin-Dinukleotid-Analyse

Bei Flavin-Adenin-Dinukleotiden handelt es sich um Redox-Cofaktoren, die im Metabolismus der Zelle eine wesentliche Rolle spielen. Um den Einfluss von Bestrahlung durch blaues Licht auf Flavine zu eruieren, werden diese in ihrer oxidierten Form mittels des *FAD Colorimetric/Fluorometric Assay Kits* der Firma BioVision bestimmt. Dabei beruht das Kit auf die Funktion der Flavine als Oxidase, welche die Bildung eines Produkts katalysieren, das eine Färbung und Fluoreszenz aufweist, welche durch Absorption oder eine fluorimetrische Messung ermittelt werden kann.

4.6.1 Bestimmung der intrazellulären Flavinkonzentration

Wie in den vorangegangenen Versuchen wurden die Zellen auch hier einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und eine, vier und 24 Stunden nach Ablauf der Exposition geerntet. Die geernteten Zellen wurden in dem von der Firma BioVision bereitgestellten Puffer homogenisiert und zu gleichen Teilen zwecks einer abschließenden Proteinbestimmung aufgeteilt. (Bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird die Hälfte der Proben bei -80 °C gelagert.) Um die enzymatisch gebundenen Flavine aus dem Proteinverband zu lösen, wurden die Proben mittels des *Deproteinizing Sample Preparation Kits* der Firma BioVision bearbeitet, welches auf der Präzipitation von Proteinen durch Perchlorsäure beruht. Sowohl die Proteinpräzipitation als auch die anschließende Durchführung der FAD Bestimmung wurden wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. In diesem Fall wurde die fluorimetrische Bestimmung als Messvariante gewählt und im Photometer bei einer Extinktion von 535 nm und einer Emission von 587 nm gemessen. Die sich daraus ergebenden Werte wurden abschließend auf die ebenfalls ermittelten Proteinkonzentrationen (Abschnitt 4.4) der Proben normiert.

4.7 Western Blot-Analyse

Um die Schlüsselproteine der Differenzierung und deren Hemmung zu analysieren wurde eine semi-quantitative Messung der exprimierten Proteine mittels der Western Blot-Technologie durchgeführt. Da die Zellen über unterschiedliche Zeiträume behandelt wurden, ergaben sich auch für die Auswahl der zu untersuchenden Proteine verschiedene Analyse-Zeitpunkte.

Tabelle 13: Auflistung der eingesetzten Antikörper Bezug nehmend auf die Analysezeitpunkte der behandelten Zellen.

Analyse nach 3 und 6 Tagen	Analyse nach 1, 4 und 24 Stunden
Anti-alpha smooth muscle Actin	Anti-Catalase Antibody
Anti-Fibronektin	p38 MAPK Antibody
TGF- β RI/ALK-5 APC-conjugated Antibody	Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Antibody
TGF- β RII PE-conjugated Antibody	p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody
	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody
	Smad3 Antibody
	Phospho-Smad3 (Ser423/425) Antibody

4.7.1 Prinzip der Western Blot-Analyse

Die Übertragung von Proteinen auf eine Membran bezeichnet das Protein-Blotting im engeren Sinn. Dabei werden die bereits vorher durch eine Proteinbestimmung (Abschnitt 4.4) quantifizierten Proteine entweder auf eine Membran getüpfelt (Dot-Blot) oder wie hier im Folgenden beschrieben, zunächst gelelektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine Membran transferiert (Gel-Blot). Die Methode der gelelektrophoretischen Auftrennung erfolgt aufgrund der Ladung, der Molmasse, des isoelektrischen Punktes oder einer Kombination dieser Verfahrensweisen.

Der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine Membran gilt dabei als standardisiertes Verfahren des Protein-Blottings, welcher anschließend mittels einer Ponceau-Färbung visualisiert wird. Diese dient zur Überprüfung des Blotting-Vorgangs, bevor anschließend der Nachweis von den zu detektierenden Proteinen mittels Immunmarkierung erfolgt.

4.7.2 Die Probenvorbereitung und das Gießen der Gele

Da die zu untersuchenden Proteine unterschiedliche Größen aufweisen, wurde mit zwei verschiedenen Trenngelen gearbeitet:

Tabelle 14: Mengenangaben für die Zusammensetzung der eingesetzten SDS-Gele.

	%	30 % Acrylamid (ml)	H ₂ O (ml)
250-120 kDa	7,5	1,875	3,75
40-15 kDa	12	3	2,625

Jedem Gel wird außerdem, unabhängig von dem Acrylamid-Wasser-Verhältnis, 1,875 ml 4-fach Trenngelpuffer, 10 µl TEMED und 25 µl APS zugesetzt.

Bevor die Gelkomponenten miteinander vermennt wurden, war es erforderlich die benötigten Glasplatten zu reinigen und in die Gießvorrichtung einzuspannen. Nach der Zugabe des APS, welches als Beschleuniger des Polymerisationsprozesses fungiert, wurde zunächst das Trenngel zwischen die Glasplatten pipettiert. Zur Vermeidung von Luftblasen wurde das Trenngel für die Zeit der Polymerisation mit Ethanol überschichtet. Im zweiten Schritt wurde das Ethanol abgenommen, das Sammelgel zwischen die Glasplatten pipettiert und ein Kamm eingesetzt (10er oder 15er Taschen), welcher die Taschen für die später zu pipettierenden Proben formt. Je nach Gelstärke und Anzahl der Taschen variiert das Gesamtvolumen, welches eine Tasche fasst. In diesem Fall wurden ausschließlich Gele der Stärke 1 mm verwendet, woraus sich bei 10er Kämmen ein Gesamtvolumen von 24 µl ergab und bei den 15er Kämmen ein Gesamtvolumen von 16 µl. Die gegossenen Gele wurden entweder sofort eingesetzt oder konnten bis zu drei Tage bei 4 °C gelagert werden. Vor der Beladung der Gele wurden die Proben mit Laemmli-Puffer versehen und die Proteine bei 95 °C für 5 Min. hitzedenaturiert. Für den späteren Größenvergleich und die genaue Lokalisation des gesuchten Proteins, wurde in die erste Tasche eine Proteinleiter pipettiert.

4.7.3 Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit dem Verfahren der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) ist es möglich die Proteingemische nach ihrer Molmasse zu trennen. Die Denaturierung erfolgt mittels Hitze (95 °C) und des Laemmli-Puffers, woraufhin das in den Gelen enthaltene SDS an die Polypeptidketten binden kann. Die negative Ladung des SDS (Natriumdodecylsulfat) hat die Funktion die Eigenladung der Proteine zu überdecken und ist dabei proportional zu deren Molmasse. Die Proteine besitzen demnach eine gleichmäßige negative Ladung. Im Laemmli-Puffer befindet sich zusätzlich β-Mercaptoethanol, welches die Disulfidbrücken reduziert und zu einer Linearität der Proteine führt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das System der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese angewendet, welches aus einem wie oben

bereits beschriebenen Trenn- (*resolving gel*) und Sammelgel (*stacking gel*) besteht. Die Funktion des großporigen Sammelgels ist es, das Proteingemisch bei einer niedrigen Spannung an der Grenze zum Trenngel zu konzentrieren (*stacking*), was auf den Unterschied der Ionen zwischen den Gelen und im Elektrophoresepuffer beruht. Die charakteristische Bande an der Grenze zum Trenngel basiert auf einem entstehenden Feldstärkegradienten, hervorgerufen durch die schnellere Wanderungsgeschwindigkeit der Chloridionen (Sammelgelpuffer), verglichen mit den Glycinionen (Elektrophoresepuffer) und den Proteinen.

Nach dem Befüllen der Wanne mit Elektrophoresepuffer, wurden die aufbereiteten Proben und die Proteinleiter hinein pipettiert, der Deckel geschlossen und für ca. 15 Min. eine Spannung von 60 V angelegt. Die Spannung wurde für den Durchlauf der Proteine durch das Trenngel auf 130 V erhöht, bis die Proben durch das Gel gelaufen sind. Die Visualisierung der Proben beruht auf dem im Laemmli-Puffer enthaltene Bromphenolblau.

4.7.4 Das *Blotting*

Der Prozess des *Blottings* ist im engeren Sinne die Übertragung von Proteinen eines Gels auf eine Trägermembran (Nitrocellulose, Nylon oder PVDF). Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die Proteine aus dem Gel heraus und gelangen auf die darunterliegende Membran. Für diesen Vorgang wurde hier die Trans-Blot Turbo-Apparatur der Firma BioRad in Gebrauch genommen, wobei für 30 Min. eine Spannung von 25 V und 2,5 A angelegt wurde. Der Aufbau der Blot Kassette gestaltete sich wie folgt:

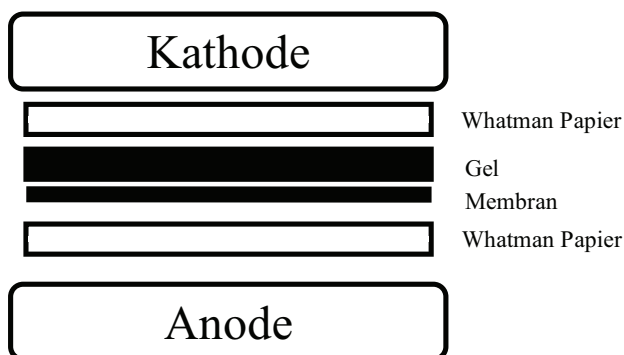


Abbildung 8: Aufbau der Blot Kassette. Die einzelnen Komponenten werden zunächst mit Blotting-Puffer befeuchtet, bevor sie in der Kassette platziert werden. Zwischen zwei Whatman Papieren befinden sich die Membran und das darauf liegende Gel.

4.7.5 Die Ponceau-S-Färbung

Zur Evaluation des Blotting-Vorgangs wurde die Ponceau-S-Färbung verwendet, welche auf die reversible, unspezifische Bindung an die positiven Aminogruppen aller Proteine beruht. Nach dem Abschluss des Blottings wurde die Nitrocellulosemembran in eine saubere Schale überführt und für ca. drei Min. mit der Ponceau-S-Färbelösung überschichtet. Anschließend wurde die Membran mit demineralisiertem Wasser gespült, um die Proteine stärker zu visualisieren. Für die nachfolgende Immundetektion war es notwendig, die Membran mittels TBS-T (*Tris Buffer Saline* mit Tween) zu entfärben.

4.7.6 Die Immunmarkierung und Detektion

Die Immundetektion der Zielproteine erfolgt in zwei Prozessen. Im ersten Schritt wird die Membran geblockt und mit dem ersten Antikörper inkubiert. Diese Inkubation erfolgte mit Ausnahme der Detektion von GAPDH über Nacht bei 4 °C. Der zweite Schritt der Immunfärbung beinhaltet die Inkubation der Membran mit dem Zweitantikörper und die abschließende Detektion in der Geldokumentationsanlage. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Antikörper eingesetzt. Sowohl die Konzentrationen der Antikörper als auch die benötigten Puffer wurden, wie vom Hersteller empfohlen, eingesetzt.

Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde der Blot drei Mal für fünf Min. mit TBS-T gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen und die Bildung von sogenannten „Wolken“ zu vermeiden. Die Inkubationszeit der Membran mit dem Sekundärantikörper und dem anti-Marker betrug eine Stunde bei Raumtemperatur und die Konzentration wurde in allen Experimenten gleich gewählt (1:1000 in TBS-T). Der zweite Antikörper ist mit HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelt, welche als Peroxidase agiert und die Chemilumineszenzreaktion bei der Visualisierung der Blots katalysiert, indem sie das in der Entwicklerlösung enthaltene Luminol oxidiert. Die Blots wurden nach einer kurzen Beschichtung mit der Entwicklerlösung in der Geldokumentationsanlage positioniert und die gesuchten Proteinbanden mittels UV-Licht detektiert. Für die spätere densitometrische Auswertung mit der Software Quantity One wurden die Ergebnisse fotografisch festgehalten. Im Falle einer weiteren Immundetektion können die Blots lichtgeschützt bei 4 °C in TBS aufbewahrt werden.

4.8 Prinzip der ROS-Bestimmung

Eine weitere Methode zur Bestimmung der NOX4-Aktivität ist die Detektion von ROS. Zur Bestimmung der ROS-Produktion in bestrahlten Fibroblasten wurde der Farbstoff Dihydrorhodamine 123 (DHR) eingesetzt. Bei diesem Farbstoff handelt es sich um einen ROS spezifischen Indikator, welcher passiv durch die Zellmembran diffundiert. Innerhalb der Zelle wird er durch ROS zu dem fluoreszierenden Farbstoff Rhodamine 123 oxidiert. Die Detektion erfolgt im Photometer durch Absorption bei einer Wellenlänge von 500 nm oder mittels Fluoreszenzspektroskopie bei einer Excitation von 500 nm und einer Emission von 536 nm.

4.8.1 Detektion von ROS nach Bestrahlung

In eine 24-well-Platte wurden $3,5 \times 10^4$ Zellen in DEMEM Medium mit 5 % FCS ausgesät und bis zum darauffolgenden Tag im Brutschrank inkubiert. Wie auch in den vorherigen Versuchen wurden die Zellen einmalig mit einer Dosis von 80 J/cm^2 bestrahlt. Unmittelbar nach der Bestrahlung erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Farbstoff DHR in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ in Zellkulturmedium. Da der Farbstoff in die Zelle diffundieren muss, wurde die erste Messung 30 Min. nach der Applikation durchgeführt. Das Medium mit dem sich darin befindenden Farbstoff wurde abgesaugt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und anschließend mit ca. 500 μl PBS beschichtet. Die ROS-Generierung wurde im Photometer über einen 9-fachen Scan pro Well bestimmt. Die weiteren Messungen erfolgten eine, zwei, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende.

4.9 RT-PCR

Die „real time“ RT-PCR ist eine vollautomatische und schnelle Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression. Anders als bei der semiquantitativen PCR, bei der das Amplifikat im Anschluss an die PCR auf ein Agarosegel aufgetragen wird und Nukleinsäure-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt werden, erfolgt die Detektion der PCR-Produkte mittels Fluoreszenzfarbstoffen, welche in der doppelsträngigen DNA interkalieren. Dabei korreliert die Fluoreszenzintensität mit der Menge an PCR-Produkten und wird in der exponentiellen Phase (Phase 2) in Echtzeit bestimmt. Aufgrund der geringen Templatemenge findet zu Beginn (Phase 1) und am Ende eines Reaktionszyklus (Phase 3) keine Amplifizierung der DNA statt.

4.9.1 Bestimmung der NOX4-Genexpression mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR)

In diesem Experiment wird ermittelt, welchen Einfluss die Bestrahlung mit blauem Licht auf die NOX4-Genexpression ausübt. Dazu wurden die Zellen, wie auch in den vorangegangenen Versuchen, einmalig mit einer Dosis von 80 J/cm^2 bestrahlt und/oder

mit TGF- β aktiviert und eine Stunde, vier Stunden und 24 Stunden nach Ende der Bestrahlung geerntet. In diesem Fall wurde das Zellpellet nach der Zentrifugation bis zur Weiterverarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ trocken gelagert.

4.9.2 RNA-Isolierung aus Fibroblasten und photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Bei der RNA-Isolierung werden alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt und alle zusätzlich verwendeten Lösungen frisch angesetzt. Die Isolierung der RNA aus Fibroblasten erfolgte mit Hilfe des RNeasy Kits der Firma Qiagen und basiert auf der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987). Der im Lieferumfang enthaltende Lysepuffer enthält 2-Mercaptoethanol und Guanidium-Isothiocyanat, welches stark denaturierend wirkt. Wie vom Hersteller beschrieben, wurde der RLT-Lysepuffer frisch mit 2-Mercaptoethanol versetzt und anschließend das Pellet mit $350\text{ }\mu\text{l}$ diesen Puffers resuspendiert. Im weiteren Verlauf der Isolation wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde anschließend durch eine spektralphotometrische Messung mit Hilfe eines Photometers (Nanodrop) bestimmt. Dabei gibt die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm Aufschluss über die RNA-Konzentration und die Absorption bei 280 nm zeigt den Reinheitszustand der Probe an. Der Quotient (A_{260}/A_{280}) sollte dabei in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um eine lineare Abhängigkeit zu gewährleisten.

4.9.3 Reverse Transkription der Total-RNA in cDNA

Bei der reversen Transkription werden unter optimalen Bedingungen 500 ng der RNA in 500 ng cDNA umgeschrieben. Die Proben wurden zunächst auf eine Konzentration von $500\text{ ng}/10\text{ }\mu\text{l}$ verdünnt. Die cDNA-Konzentration liegt bei einem Gesamtvolumen von $20\text{ }\mu\text{l}$ pro *Well* bei $25\text{ ng}/\mu\text{l}$. Für diesen Versuch wurde eine cDNA-Menge von 2 ng in $10\text{ }\mu\text{l}$ Wasser ($0,5\text{ ng}/\mu\text{l}$ im Gesamtvolumen) eingesetzt. Das Pipettierschema des Mastermixes für einen Ansatz ist wie folgt:

Tabelle 15: Pipettierschema für die Herstellung des Mastermixes für einen Ansatz.

	1-facher Ansatz
10-facher RT-Puffer	$2\text{ }\mu\text{l}$
dNTP-Mix (je 5 mM)	$2\text{ }\mu\text{l}$
Oligo dT Primermix ($20\text{ }\mu\text{M}$)	$1\text{ }\mu\text{l}$
RNase-Inhibitor ($40\text{ U}/\mu\text{l}$)	$0,25\text{ }\mu\text{l}$
Reverse Transkriptase ($4\text{ U}/\mu\text{l}$)	$0,25\text{ }\mu\text{l}$
RNase-freies Wasser	$4,5\text{ }\mu\text{l}$
Gesamtvolumen Mastermix	$10\text{ }\mu\text{l}$
500 ng Total-RNA	$10\text{ }\mu\text{l}$
Gesamtvolumen pro Probe	$20\text{ }\mu\text{l}$

Die verdünnten RNA-Proben wurden mit 10 µl des Mastermixes versetzt und im Thermocycler (BioRad) bei einer Temperatur von 37 °C und einer Dauer von 60 Min. zu cDNA umgeschrieben. Bis zur weiteren Verarbeitung können die Proben bei -20 °C gelagert werden.

Für die eigentliche reverse Transkription wurde für das zu untersuchende Gen ein Mastermix hergestellt, dessen Zusammensetzung in Tabelle 16 aufgeführt ist. Als Kontrolle diente die sogenannte NTC (*Non template control*), in welche statt cDNA Wasser pipettiert wurde, um Kontaminationen der verwendeten Reagenzien auszuschließen. Es wurden 21 µ des Mastermixes zu jeder Probe hinzu pipettiert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 25 µl pro *Well* ergab.

Tabelle 16. Zusammensetzung eines einfachen Ansatzes der reversen Transkription.

	1-facher Ansatz
DNase freies Wasser	7 µl
2.fach SYBR Green Mastermix	12,5 µl
Primer forward (10 µM)	0,75 µl (Endkonzentration von 300 nM)
Primer	0,75 µl (Endkonzentration von 300 nM)

Bei dem zu untersuchenden Gen handelt es sich um die NADPH-Oxidase 4. Als Kontrollgen wurde PPIB Peptidylprolyl Isomerase B (Cyclophilin B) verwendet. Im Anschluss an den Pipettiervorgang erfolgte die Messung im Real-Time Thermocycler der Firma Applied Biosystems. Aus dem exponentiellen Bereich der Kurve erhält man den sogenannten Ct-Wert. In diesem Fall wurden die Daten mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode relativ quantifiziert, sodass die behandelten Proben (in diesem Fall bestrahlt und/oder mit TGF- β behandelt) auf die unbehandelten Proben normiert wurden. Die Ratio zwischen der unbehandelten Probe und den behandelten Proben stellt den relativen Expressionsunterschied normiert zum Referenzgen dar und wird mit der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ berechnet.

$$\Delta\text{CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT Kontroll-Gen}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT Behandelte Probe} - \Delta\text{CT Unbehandelte Probe (Kontrolle)}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

4.10 ATP-Analyse

Mit Hilfe der Bestimmung von intrazellulärem ATP wurde der Einfluss von blauem Licht auf die Stoffwechselaktivität bestimmt.

4.10.1 Prinzip der ATP-Bestimmung und Messung an intrazellulärem ATP nach Bestrahlung und Aktivierung von Fibroblasten mit TGF- β

Die Menge an ATP wurde mit Hilfe des zeitstabilen ATP-Detektions-Kits der Firma Biaffin GmbH & Co KG bestimmt. Dabei handelt es sich um ein Biolumineszenz Assay, bei welchem das Substrat Luciferin in einer ATP-abhängigen Reaktion mittels Luciferase oxidiert wird und Chemilumineszenz bei einer Wellenlänge von 560 nm generiert.



Die Fibroblasten werden zunächst in 6-*well*-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % in DMEM Medium mit 10 % FCS kultiviert. Einen Tag vor der Bestrahlung erfolgte, wie auch bei den vorangegangenen Versuchen, ein Mediumwechsel zu DMEM mit einem FCS-Gehalt von 5 %, welches auch unmittelbar nach der Bestrahlung (inkl. TGF- β) hinzugegeben wurde. Wie auch in den vorangegangenen Versuchen, werden die Zellen eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende vom Gefäßboden gelöst. Zur quantitativen Auswertung wurde die Zellzahl im Voraus mittels Hämozytometer, wie in Abschnitt 4.1.5 beschrieben, bestimmt und die Zellsuspension anschließend bei 17000 g für zehn Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit je 1 ml kochendem demineralisiertem Wasser resuspendiert und gemischt, was zur Aufbrechung der Zellmembran führt. Das Gemisch wurde erneut für fünf Min. bei 17000 g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, worin er für die darauffolgende ATP Messung bei -80 °C gelagert werden kann. Die Stock-Lösungen und der Standard wurden zunächst wie im Herstellerprotokoll beschrieben angefertigt. Für die Generierung des Standards wurde ATP der Firma Sigma Aldrich mit einer Höchstkonzentration von 8 μM verwendet. Für die Messung wurden die Proben und der bereits aliquotierte *Reaction Mix* aufgetaut. Je 50 μl Probe wurden zusammen mit 50 μl des *Reaction Mix* in einer weißen 96-*well*-Mikrotiterplatte gemischt. Nach einer Einwirkzeit von 40 Min. wird die Chemilumineszenz bei einer Wellenlänge von 590 nm im Photometer gemessen. Mit Hilfe des Programms WorkOut wurde die Menge an ATP aufgrund des Standards automatisch berechnet. Diese Menge wurde dann auf die Zellzahl normiert, um eine ATP-Konzentration pro Zelle zu erhalten.

4.11 Bestimmung der TGF- β -Rezeptorexpression

Die Bestimmung der Rezeptorexpression dient in diesem Versuchsansatz der Einordnung des Blaulichteffekts innerhalb der TGF- β -Signalkaskade. Mittels der Durchflusszytometrie wird untersucht, ob die Bestrahlung mit blauem Licht in TGF- β -aktivierten Zellen bereits einen Einfluss auf die Rezeptorexpression ausübt.

4.11.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode, welche es erlaubt, gleich mehrere zelluläre Eigenschaften, wie Zellgröße und Zellgranularität einer Population sowohl quantitativ als auch qualitativ zu bestimmen und darzustellen. Die Zellgröße und deren Granularität werden von zwei Photodetektoren detektiert, der FSC (*forward scatter*) und der SSC (*side scatter*). Darüber hinaus erlaubt die Methodik der Durchflusszytometrie Zellstrukturen durch vorherige Markierung mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs zu quantifizieren. Bei den Strukturen kann es sich um intrazelluläre Proteine oder Oberflächenantigene handeln. Verschiedene Fluoreszenzdetektoren messen die Intensität der Fluoreszenzemission der zu analysierenden Strukturen/Zellen.

4.11.2 Bestimmung der TGF- β -Rezeptorexpression nach 3/6-tägiger Betrahlung und/oder Aktivierung mit TGF- β

Die Zellen wurden zunächst über einen Zeitraum von drei und sechs Tagen täglich mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit TGF- β aktiviert. Am vierten und siebten Tag wurden sie mit *Cellwash* (3% FCS) vom Gefäßboden gelöst, in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets mit je 200 μ l *Cellwash* (3% FCS) resuspendiert. Anschließend wurde unter lichtgeschützten Bedingungen je 3 μ l der Antikörper gegen Die TGF- β -Rezeptoren I und II hinzugefügt. Jede Probe war zweifach vorhanden, da die abschließende Messung und Auswertung auf ungefärbte Zellen standardisiert wurde. Die Inkubation der Antikörper erfolgte für 45 Min. lichtgeschützt und auf Eis. Im nachfolgenden Schritt wurde die überschüssige Menge des Antikörpers mit 3–4 ml *Cellwash* (3% FCS) herausgewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 300 g wurde das Zellpellet mit 200–400 μ l *Cellwash* (3% FCS) resuspendiert. Die Messung der Rezeptorexpression erfolgte am Durchflusszytometer FACSCalibur und die Auswertung mit Hilfe des Programms CellQuest Pro; beides von der Firma Becton Dickinson.

4.12 Statistische Auswertung

Die Archivierung und statistische Auswertung der in dieser Arbeit evaluierten Daten erfolgte mittels der Software GraphPad Prism 5.0. Bei den statistischen Tests wurde im Fall einer Normalverteilung der *One-way* ANOVA respektive der *Two-way* ANOVA mit anschließendem *Bonferroni post-Test* angewendet. Bei einer geringen Fallzahl und/oder eines nicht-normalverteilten Datensatzes wurde der *Kruskal-Wallis Test* durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Vorarbeit: Proliferation und Differenzierung

Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde untersucht, welchen Einfluss blaues Licht auf die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten ausübt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung von Fibroblasten sowohl zu einer dosisabhängigen Inhibition der Proliferation führt als auch zu einer dosisabhängigen Inhibition der Expression des Myofibroblastenmarkerproteins α -SMA (siehe Anhang 8.1). Dabei erzielte die tägliche Bestrahlung mit hohen subletalen Dosen (80 J/cm^2) den stärksten Effekt der Proliferations- und Differenzierungshemmung. Über einen Bestrahlungszeitraum von bis zu sechs Tagen verringerte sich die Proliferation signifikant um nahezu 50 % (Abbildung 44) und die Expression von α -SMA (Abbildung 45) signifikant um mehr als 90 %. Schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit ausschließlich eine Dosis von 80 J/cm^2 eingesetzt, um den molekularen Mechanismus der Differenzierungs- und Proliferationshemmung aufzuschlüsseln.

5.2 Expression von α -SMA nach 3/6-tägiger Bestrahlung und/oder TGF- β -Aktivierung

Wie einleitend bereits beschrieben gilt das Protein α -SMA als Marker für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Humane dermale Fibroblasten wurden über drei (Abbildung 9 A) respektive sechs Tage (Abbildung 9 B) täglich mit einer Dosis von 80 J/cm^2 bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β behandelt, um die Differenzierung zu Myofibroblasten einzuleiten. Nach bereits dreitägiger Behandlung ist die Expression von α -SMA in den mit TGF- β -aktivierten Zellen signifikant erhöht. Eine alleinige Bestrahlung führt hingegen zu einer signifikant verringerten α -SMA-Expression.

Um einen möglichen Einfluss des blauen Lichts auf die Myofibroblastendifferenzierung zu detektieren, wurden die bestrahlten Zellen zusätzlich mit TGF- β aktiviert. Die Bestrahlung führt hier ebenfalls zu einer verringerten Expression von α -SMA, was auf eine Hemmung der Differenzierung hindeutet. Dieser Effekt konnte nach einer sechstägigen Behandlung noch stärker beobachtet werden (Abbildung 9 B). Sowohl in den nativen Fibroblasten als auch in den TGF- β -aktivierten Fibroblasten führt die Bestrahlung zu einer hochgradigen Hemmung der α -SMA-Expression.

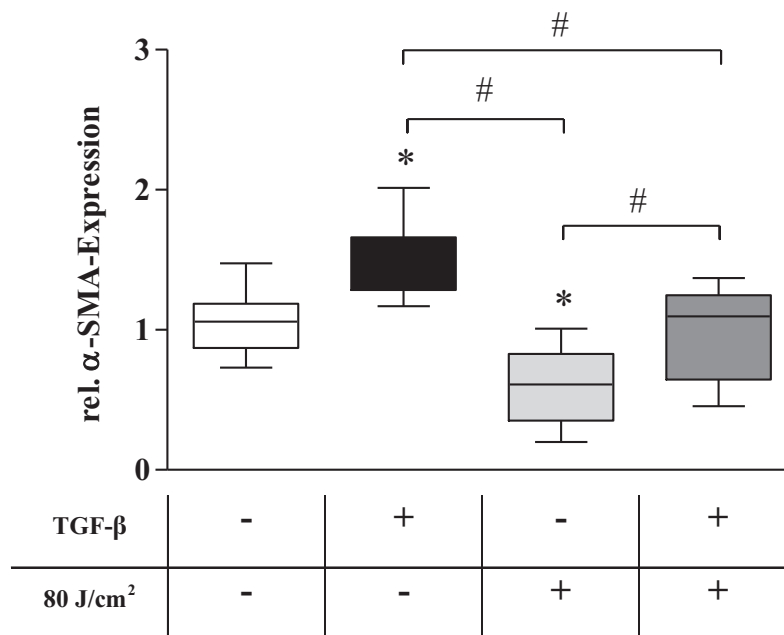
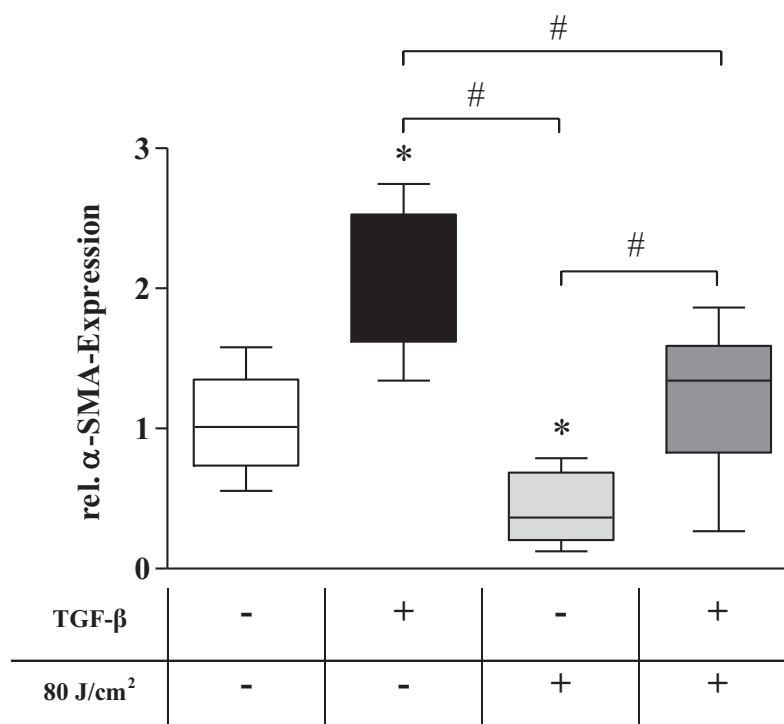
A**B**

Abbildung 9: Die relative Expression des Proteins α -SMA in Relation zum Kontrollprotein GAPDH. Humane dermale Fibroblasten wurden täglich über drei (A) bzw. sechs (B) Tage mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; # = signifikant [$p < 0,05$]; $n = 13$).

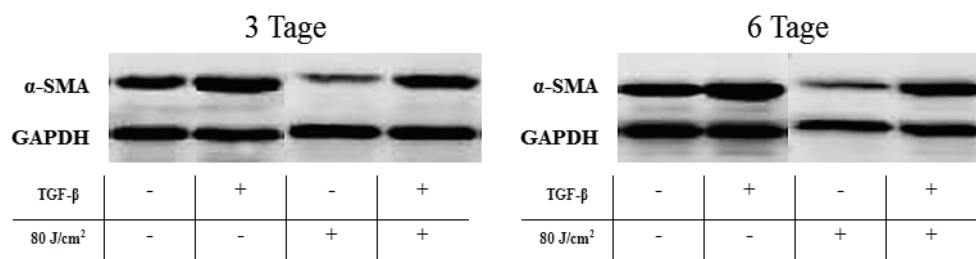


Abbildung 10: Western Blot-Analyse des Proteins α -SMA und des Kontrollproteins GAPDH nach drei- und sechstägiger Bestrahlung und/oder Aktivierung mit 5 ng/ml TGF- β .

5.3 Die Generierung von ROS und deren Effekte auf die Differenzierung

In Anlehnung an die bisherigen Erkenntnisse über die Generierung von ROS durch Bestrahlung mit Licht im UV-Bereich, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob auch blaues Licht in der Lage ist, die intrazelluläre ROS-Generierung zu modifizieren und ob diese Modifikation für die Differenzierungshemmung ursächlich sein könnte. In dieser Beziehung wurden Fibroblasten einmalig mit einer Dosis von 80 J/cm² bestrahlt. Anschließend wurde die Menge an ROS mittels des Farbstoffs DHR123 in Zeitabständen von 0,5–1 Stunde nach Bestrahlungsende ermittelt.

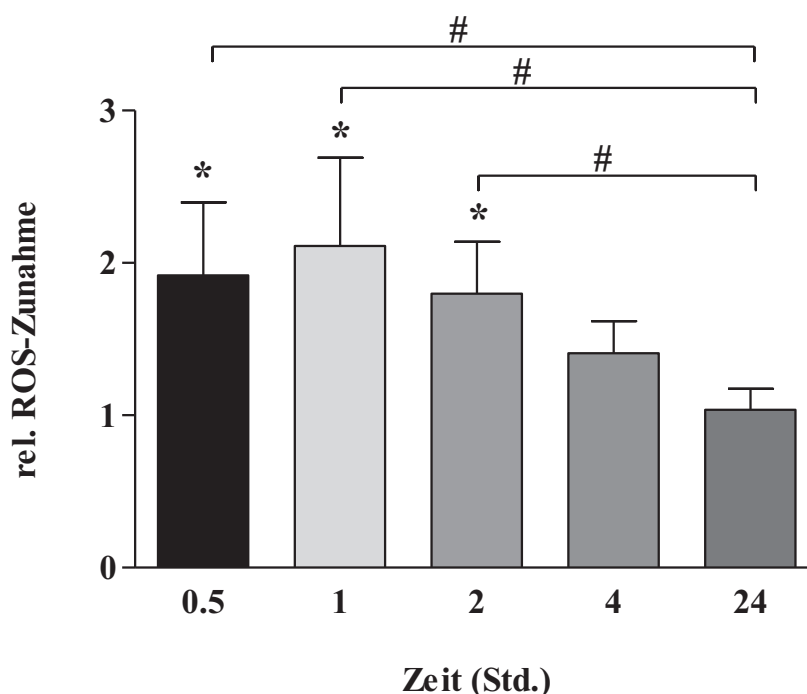


Abbildung 11: Die relative ROS-Zunahme in einem Messzeitraum von bis zu 24 Stunden. Fibroblasten wurden einmalig mit einer Dosis von 80 J/cm² bestrahlt. Nach der Zugabe von DHR123 wurde in einer Zeitspanne von 0,5 bis 24 Stunden nach Bestrahlungsende die Menge an ROS bestimmt. Dargestellt ist die relative Zunahme an ROS bezugnehmend auf unbestrahlte Zellen (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; # = signifikant [$p < 0,05$]; $n = 8$).

Die einmalige Bestrahlung von Fibroblasten führte bereits unmittelbar nach Beendigung der Bestrahlung (0,5 Stunden) zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären ROS-Generierung um das 1,9-Fache (Abbildung 11). Die höchste Menge an ROS ist eine Stunde nach Bestrahlungsende mit einer Verdopplung (2,11) zu beobachten. Im zeitlichen Verlauf nimmt die Menge jedoch kontinuierlich ab, sodass sich nach 24 Stunden die ROS-Menge wieder auf dem Niveau der unbestrahlten Kontrollzellen befindet (1,03).

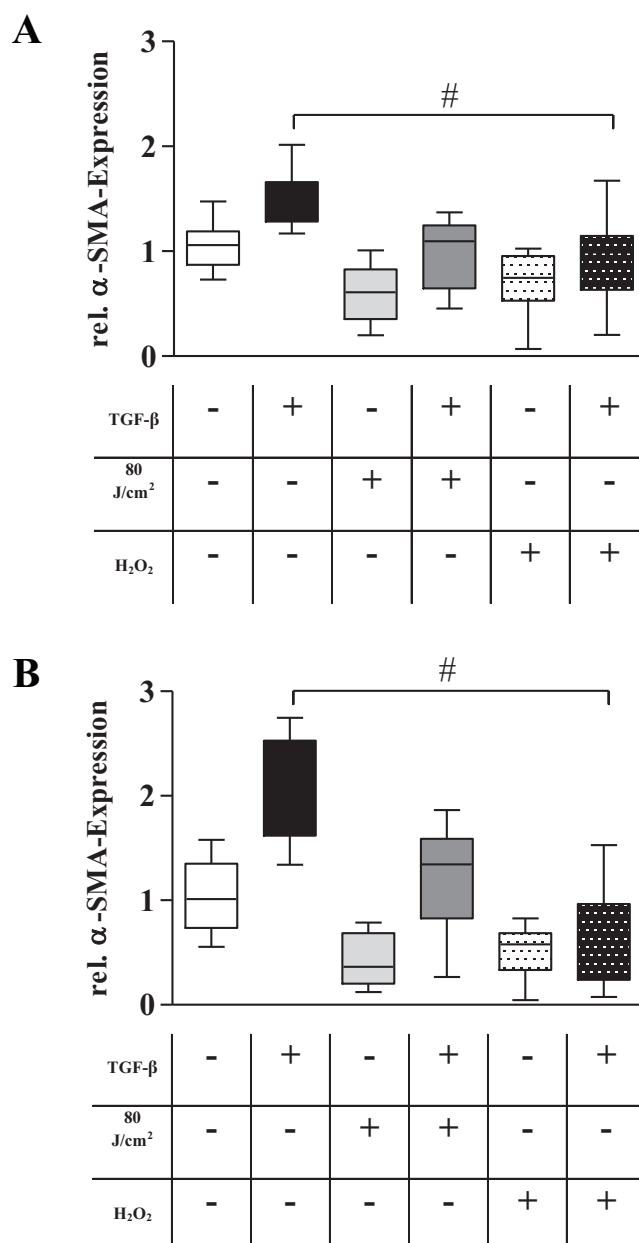


Abbildung 12: Die relative Expression des Proteins α -SMA in Relation zum Kontrollprotein GAPDH. Humane dermale Fibroblasten wurden über drei (A) bzw. sechs (B) Tage täglich mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. Unbestrahlte Zellen wurden für den Zeitraum der Bestrahlung zusätzlich mit 30 μ M H₂O₂ inkubiert (# = signifikant [$p < 0,05$]; $n = 13$).

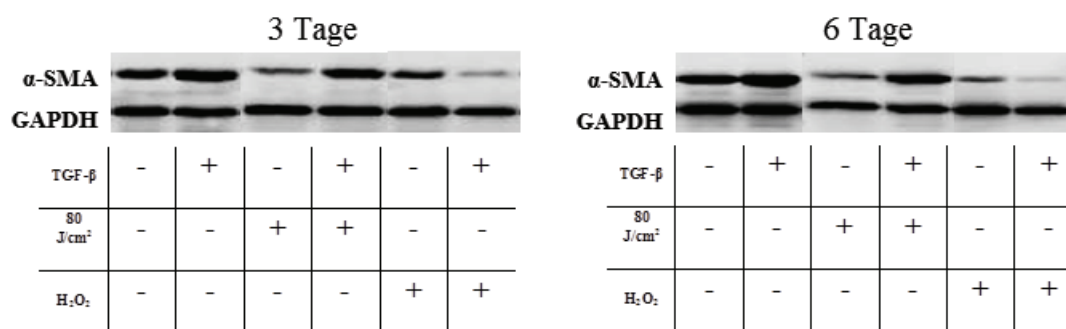


Abbildung 13: Western Blot-Analyse des Proteins α -SMA und des Kontrollproteins GAPDH nach drei- und sechstägiger Bestrahlung und/oder Aktivierung mit 5 ng/ml TGF- β . Zusätzlich wurden die Zellen mit 30 μ M H₂O₂ inkubiert.

Um zu examinieren, ob die Zugabe von ROS in Form von H₂O₂ einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt wie die Bestrahlung aufweist, wurden sowohl die mit TGF- β -aktivierten Fibroblasten als auch unbehandelte Fibroblasten analog zur Bestrahlungsdauer mit 30 μ M H₂O₂ in PBS inkubiert. In Abbildung 12 und 13 ist die (relative) Proteinexpression von α -SMA dargestellt, das als Marker für ausdifferenzierte Myofibroblasten gilt. Nach dreitägiger (Abbildungen 12 A und 13) Inkubation mit H₂O₂ ist die Menge an exprimiertem α -SMA nahezu so hoch, wie die der Zellen, die bestrahlt (und mit TGF- β aktiviert) wurden. Dies deutet auf einen vergleichbaren Effekt der beiden Behandlungen hinsichtlich des Inhibitionspotenzials hin. Nach sechstägiger Inkubation ist das Expressionsmuster zwischen den verschiedenen Proben unterschiedlicher. Die Inkubation mit H₂O₂ führt hier zu einer weitaus stärkeren Abnahme der α -SMA-Expression verglichen mit den bestrahlten und/oder TGF- β -aktivierten Zellen (Abbildungen 12 B und 13).

Mit Hilfe von Antioxidantien sind Zellen in der Lage oxidativen Stress in Form von ROS zu nivellieren. Ob eine zusätzliche Zugabe von Antioxidantien den inhibitorischen Effekt der Bestrahlung vermindern kann und die Expression des Proteins α -SMA dadurch ausbalanciert wird, ist in Abbildung 14 dargestellt. Unmittelbar nach jeder Bestrahlung wurde dem Zellkulturmedium 1 mM GSH beigefügt und die Zellen bis zur nächsten Bestrahlung (24 Stunden später) darin kultiviert. Nach einer dreitägigen (Abbildung 14 A) Behandlung wurde die Menge an α -SMA mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Sowohl in den bestrahlten als auch in den unbestrahlten Zellen führte die Zugabe von GSH zu keiner erhöhten Proteinexpression von α -SMA verglichen mit den nativen, unbehandelten Fibroblasten. Ein analoges Ergebnis lässt sich auch nach einer sechstägigen (Abbildung 14 B) Behandlung feststellen. Die Zugabe von GSH führt auch hier nicht zu einer signifikanten Erhöhung der α -SMA-Expression.

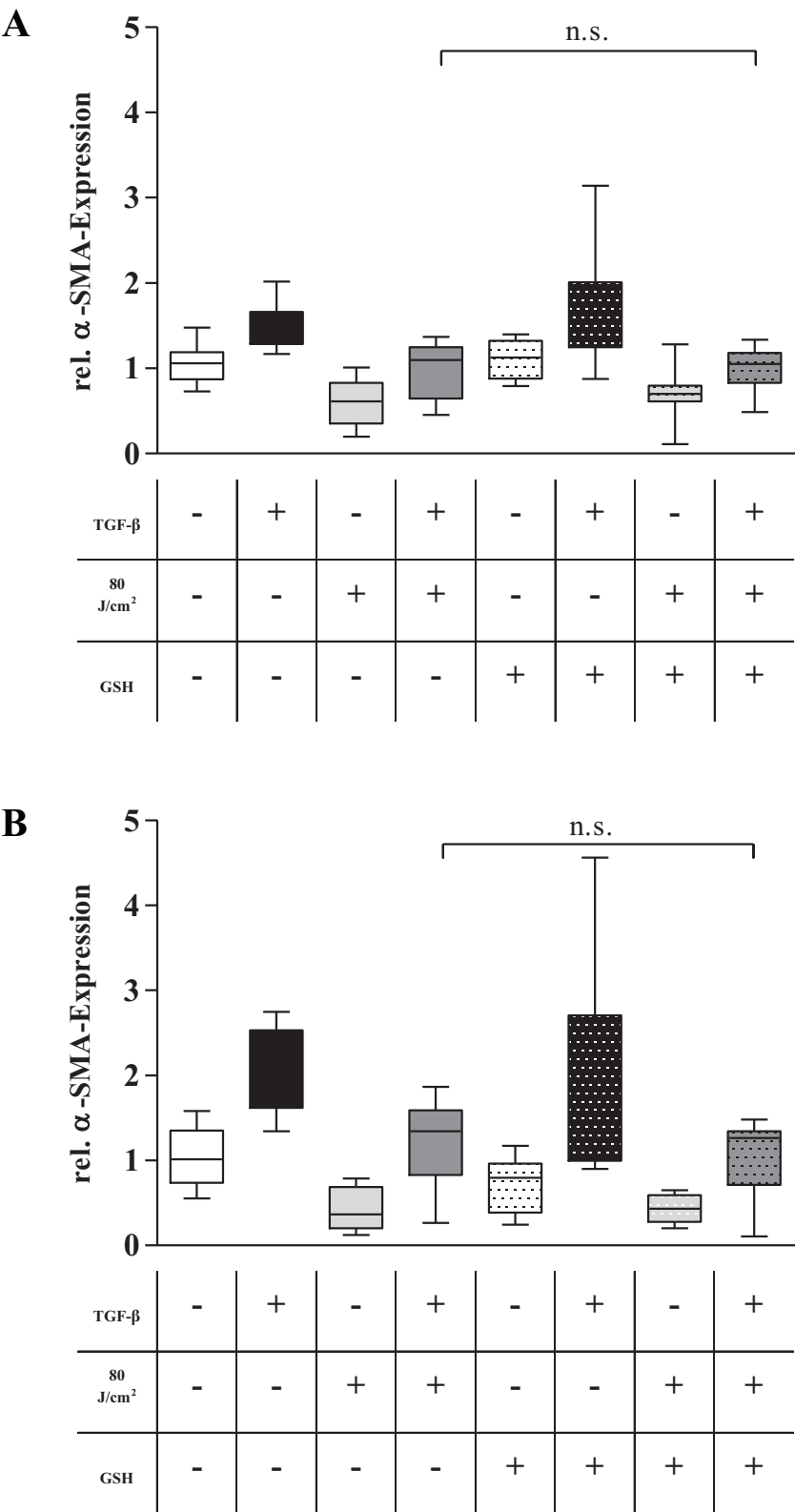
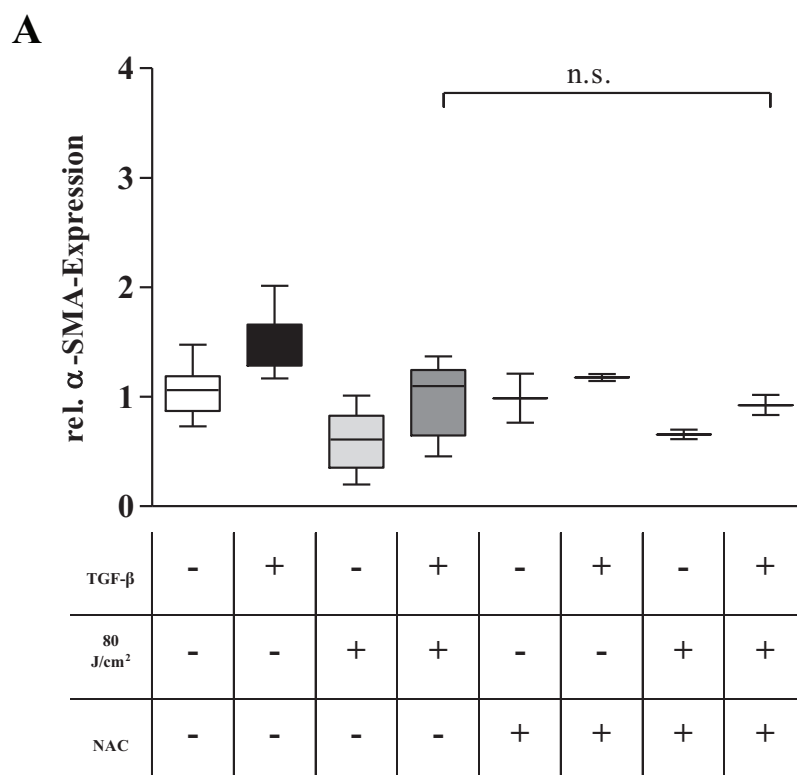


Abbildung 14: Die relative Expression des Proteins α -SMA in Relation zum Kontrollprotein GAPDH. Humane dermale Fibroblasten wurden über drei (A) bzw. sechs (B) Tage täglich mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. Zusätzlich wurden sie mit 1 mM GSH behandelt (n.s. = nicht signifikant [$p > 0,05$]; n = 8–13).

Bei dem Wirkstoff *N*-Acetylcystein (NAC) handelt es sich ebenfalls um ein Antioxidant, welches chemisch hergestellt wird und durch die Bereitstellung von Cystein zur Synthese von GSH beiträgt. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurde dessen Einfluss auf bestrahlte und/oder TGF- β -aktivierte Zellen über einen Zeitraum von drei (Abbildung 15 A) und sechs (Abbildung 15 B) Tagen untersucht. Die gewählte Konzentration betrug ebenso 1 mM, welche den Zellen unmittelbar nach der Bestrahlung appliziert wurde. Wie in den vorangegangenen Versuchen mit GSH, führte auch hier die Inkubation mit NAC zu keiner signifikanten Änderung der α -SMA-Expression. Nach dreitägiger (Abbildung 15 A) Bestrahlung (und Aktivierung mittels TGF- β) führte eine zusätzliche Inkubation mit NAC weder zu einer Erhöhung noch zu einer Verringerung der Proteinexpression von α -SMA.



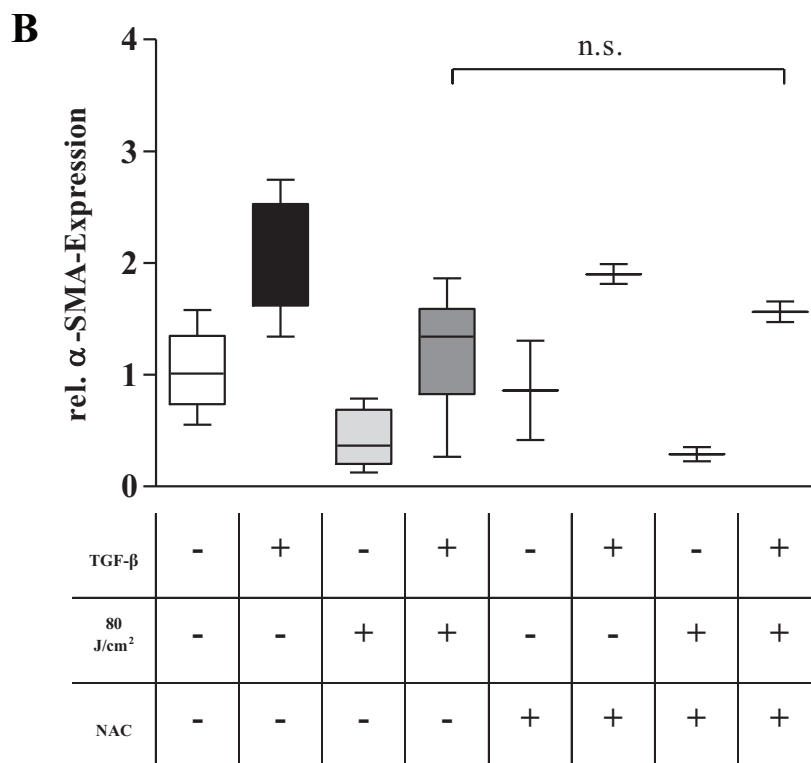


Abbildung 15: Die relative Expression des Proteins α -SMA in Relation zum Kontrollprotein GAPDH. Humane dermale Fibroblasten wurden über drei (A) bzw. sechs (B) Tage täglich mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. Zusätzlich wurden sie mit 1 mM NAC behandelt (n.s. = nicht signifikant [$p > 0,05$]; $n = 2 - 13$).

Auch eine sechstägige Inkubation hatte keinen Einfluss auf das Expressionsmuster (Abbildung 15 B). Die Bestrahlung verursacht sowohl in unbehandelten Zellen als auch in TGF- β -aktivierten Zellen, trotz einer Inkubation mit Antioxidantien, eine Hemmung der Proteinexpression.

Bei der Catalase handelt es sich um ein Enzym, welches ROS in Form von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser konvertiert. Ob die oben erwähnte Gernerierung von ROS in Wechselwirkung mit der Catalase-Expression steht, wurde im folgenden Experiment untersucht. Dabei wurden Fibroblasten einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert und anschließend deren Catalase-Expression nach einer, vier und 24 Stunden mittels Western Blot-Analyse (Abbildungen 16 und 17) bestimmt.

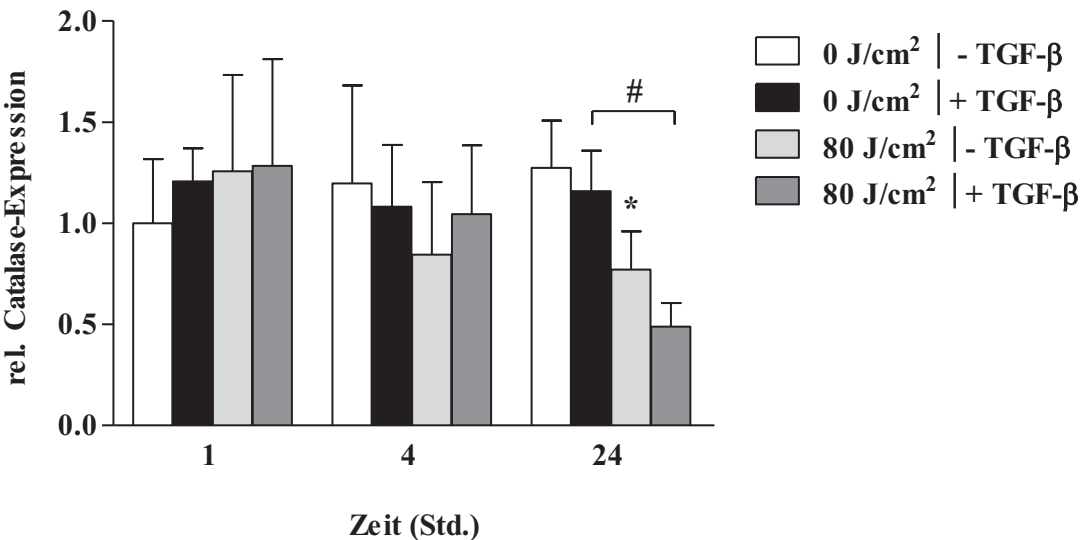


Abbildung 16: Die relative Expression des Proteins Catalase in Relation zum Kontrollprotein GAPDH. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF-β aktiviert. Die Catalase-Expression wurde 1, 4 und 24 Stunden nach Bestrahlungsende bestimmt (* = signifikanz zu unbehandelten Zellen [p < 0,05]; # = signifikant [p < 0,05]; (n = 8).

Bezug nehmend auf die Beobachtung, dass die erhöhte Generierung von ROS einen unmittelbar nach der Bestrahlung auftretenden Effekt darstellt und sich die Menge an ROS nach 24 Stunden wieder auf Normalniveau befindet, wurde die Expression der Catalase zu drei Zeitpunkten innerhalb dieser 24 Stunden bestimmt. Nach einer und vier Stunden hat die Bestrahlung mit blauem Licht (Abbildung 16) keinen Effekt auf die Catalase-Expression. Die bestrahlten Zellen weisen nach einer Stunde lediglich eine tendenziell stärkere Expression auf, welche nach vier Stunden wiederum tendenziell verringert ist. Ein signifikanter Unterschied in der Expression ist 24 Stunden nach der Bestrahlung zu beobachten. Hier ist die Expression der Catalase in den lichtexponierten Fibroblasten, welche sowohl mit TGF-β inkubiert wurden als auch unaktiviert blieben, signifikant verringert.

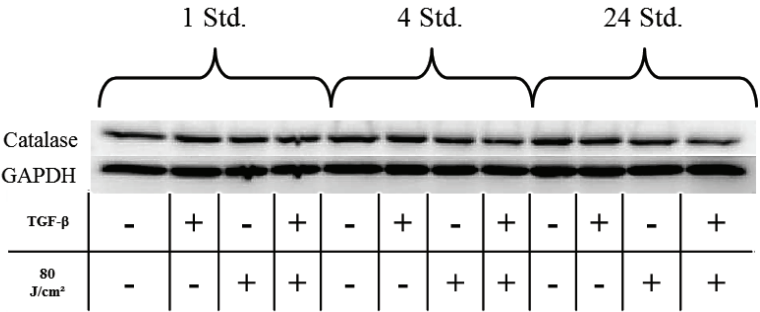


Abbildung 17: Western Blot-Analyse des Proteins Catalase und des Kontrollproteins GAPDH eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende.

5.4 Die Reduktion von Flavinen durch blaues Licht

Wie in der Einleitung bereits beschrieben (Abschnitt 1.4), sind Flavine Photoakzeptoren für blaues Licht, da sie in diesem Wellenlängenbereich ein Absorptionsmaximum aufweisen. Neben einer Vielzahl von Enzymen sind auch sie Cofaktoren der NOX4, da sie über eine Reduktion ihrerseits für den Elektronentransport innerhalb des Enzyms verantwortlich sind. Aufgrund der absorbierenden Eigenschaften von Flavinen im Blaulichtbereich wurde zunächst untersucht, welchen Einfluss blaues Licht auf FAD hat. Hierzu wurde FAD in Wasser gelöst und mit einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 0 J/cm^2 – 100 J/cm^2 bestrahlt.

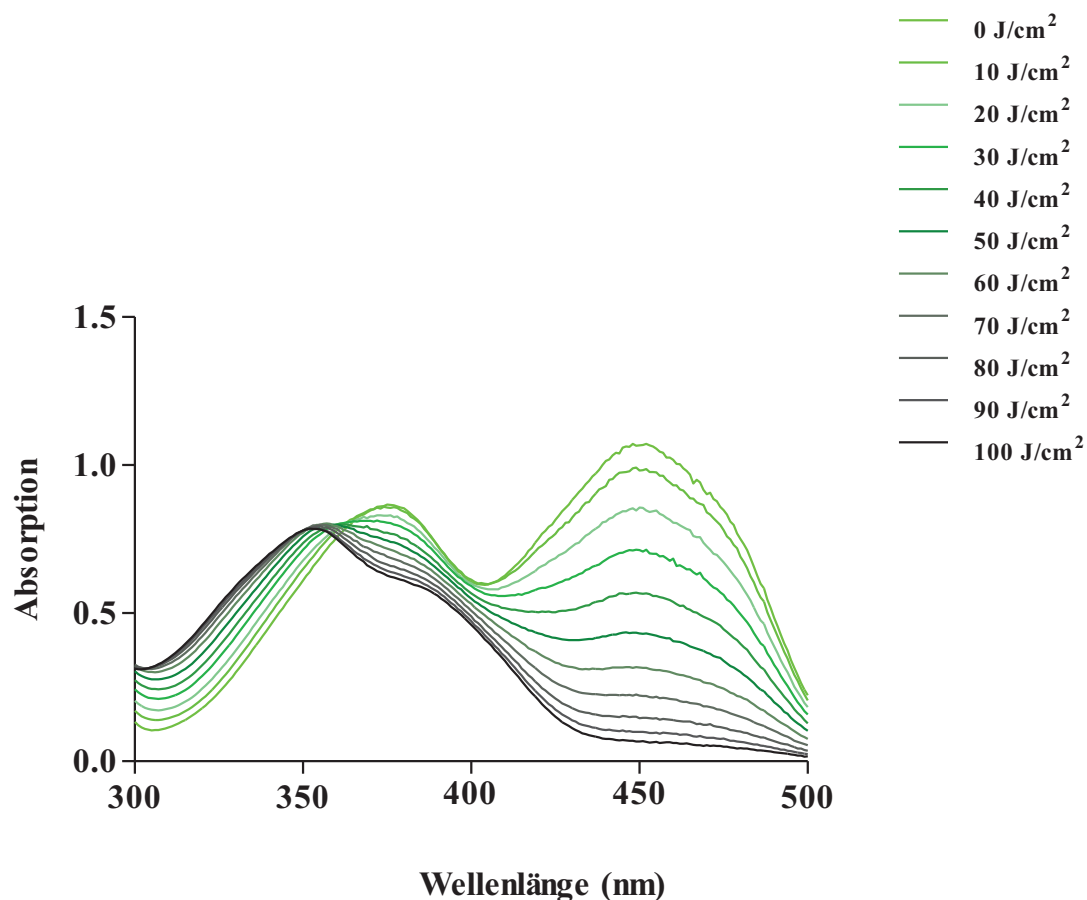


Abbildung 18: Das Absorptionsspektrum von FAD in demineralisiertem Wasser nach der Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 453 nm und den Dosen 0 J/cm^2 – 100 J/cm^2 .

Die noch unbestrahlten Flavine weisen eine gelbliche Färbung und ein für sie charakteristisches Absorptionsmaximum bei ca. 450 nm auf. In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass eine zunehmende Bestrahlungsdosis zu einer Abnahme dieses Maximums führt. Unbestrahlt liegt der höchste Absorptionswert bei ca. 1,0, wohingegen die Bestrahlung mit einer Dosis von 20 J/cm^2 bereits zu einer Minderung um 15 % führt. Die Bestrahlung mit der Höchstdosis von 100 J/cm^2 führt zu einer Abnahme der Absorption um 94 % (0,06) und per Definition zu einer Reduktion der Flavine.

Dieser hier beobachtete Effekt wurde auch auf zelluläre Ebene übertragen. Wie auch in vorangegangenen Versuchen, wurden die Zellen einmalig mit einer Dosis von 80 J/cm^2 bestrahlt und/oder mit TGF- β aktiviert. Anschließend wurde nach einer, vier und 24 Stunden die Menge an oxidierten Flavinen (FAD) detektiert.

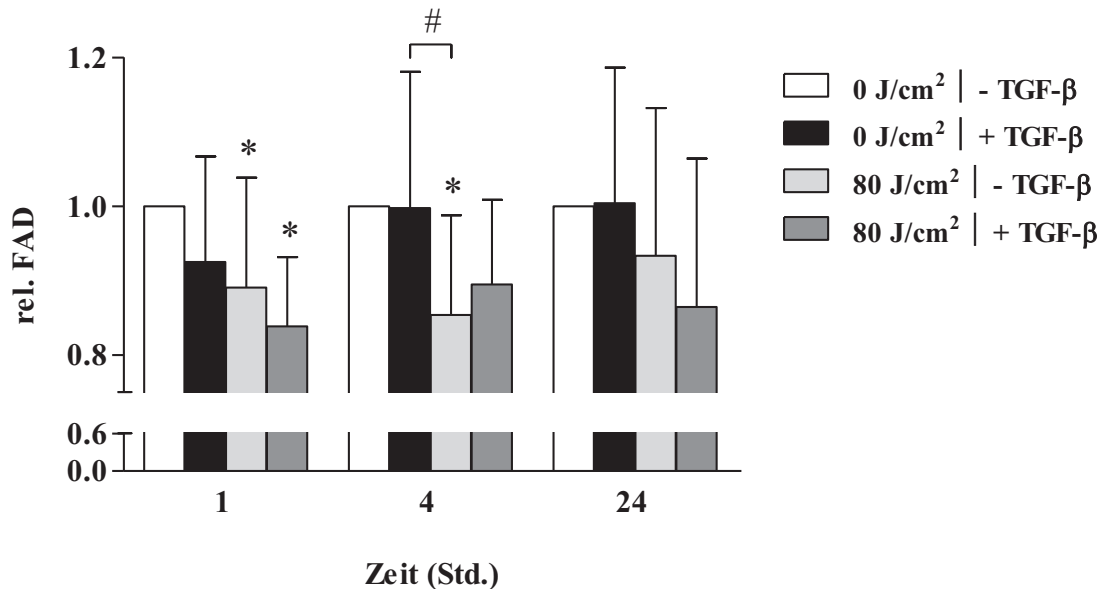


Abbildung 19: Die relative Menge an FAD in Fibroblasten nach Bestrahlung und/oder Aktivierung. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm^2 bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. Nach einer, vier und 24 Stunden wurde die intrazelluläre Menge an FAD bestimmt (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; # = signifikant [$p < 0,05$]; $n = 10 - 11$).

In Abbildung 19 ist dargestellt, dass die Bestrahlung mit 453 nm Einfluss auf die Quantität von oxidierten Flavinen nimmt. So wurde eine Stunde nach Bestrahlungsende eine signifikant geringere Menge an FAD (oxidiert) in den bestrahlten Proben (mit und ohne TGF- β) detektiert, als in den unbehandelten Fibroblasten. Auch nach vier Stunden ist dieser Unterschied weiterhin gegeben. Darüber hinaus konnte nach vier Stunden eine signifikante Differenz in der FAD-Menge zwischen der TGF- β -aktivierten Zellen und den lichtexponierten Zellen festgehalten werden, was darauf hindeutet, dass die Bestrahlung intrazelluläre Flavine reduziert. Nach 24 Stunden relativiert sich die frühzeitig beobachtete Varianz und zwischen den untersuchten Proben besteht kein Unterschied mehr in der Menge an FAD.

5.5 Der Einfluss von blauem Licht auf NADPH-abhängige Oxidoreduktasen am Beispiel der NOX4

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist die NOX4 ein wichtiger Faktor in der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und gehört zu der Enzymgruppe der NADPH-abhängigen Oxidoreduktasen. Durch die Oxidation von NADPH zu NADP^+ und einem darauffolgenden Elektronentransport über die Reduktion von FAD und die Oxidation von Eisen entstehen Superoxidanionen. Ein möglicher Einfluss von Bestrahlung mit blauem Licht auf die Aktivität von Oxidoreduktasen sowie die Expression der NOX4 wurde mittels eines NADP(H)-Assays (Abschnitt 4.5) und der PCR (Abschnitt 4.9) bestimmt. Zur Vergleichbarkeit wurden die Zellen zusätzlich mit dem irreversiblen Inhibitor DPI inkubiert, welcher unter anderem die NOX4-Aktivität hemmt.

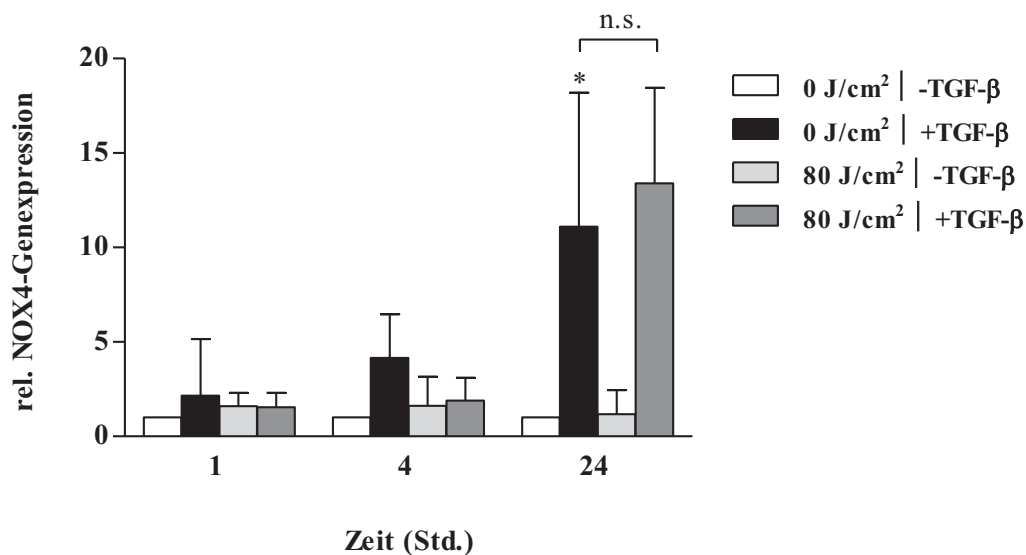


Abbildung 20: Die relative NOX4-Genexpression nach Bestrahlung und/oder Aktivierung. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF-β aktiviert. Die Nox4-Genexpression wurde eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende bestimmt (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; n.s. = nicht signifikant [$p > 0,05$]; $n = 4 - 5$).

Die Bestrahlung und/oder Aktivierung der Fibroblasten hat, wie in Abbildung 20 dargestellt, nach einer Stunde keinen Einfluss auf die NOX4-Genexpression. Auch nach vier Stunden ist keine signifikante Veränderung zwischen den unterschiedlich behandelten Zellen detektierbar. Erst nach 24 Stunden ist eine Differenz in der Genexpression festzustellen. So ist die NOX4-Genexpression in den TGF-β-aktivierten Zellen, welche sowohl nicht bestrahlt als auch bestrahlt wurden, um mehr als das 10-Fache erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass die Bestrahlung mit blauem Licht keinen Einfluss auf die Genexpression der NOX4 hat.

Aufgrund der Beobachtung, dass die Bestrahlung die NOX4-Genexpression nicht beeinflusst, wurde in den folgenden Experimenten die Aktivität von Oxidoreduktasen am Beispiel der NOX4, unter dem Einfluss von Bestrahlung und/oder TGF- β , mittels eines NADP(H)-Assays analysiert. In Abbildung 21 ist die Menge an NADP(H)-Total eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende/TGF- β -Aktivierung dargestellt. Die Bestrahlung führt sowohl in den nativen Fibroblasten als auch in den TGF- β -aktivierten Fibroblasten zu einer verringerten Menge an NADP(H)-Total. Dieser Unterschied ist zwischen den mit TGF- β -behandelten Zellen und den bestrahlten und TGF- β -aktivierten Zellen eine Stunde nach Ende der Bestrahlung signifikant, was auf einen unmittelbaren Effekt des blauen Lichts hindeutet. Nach vier Stunden ist diese Differenz bereits deutlich schwächer zu beobachten und nach 24 Stunden nahezu nicht mehr detektierbar.

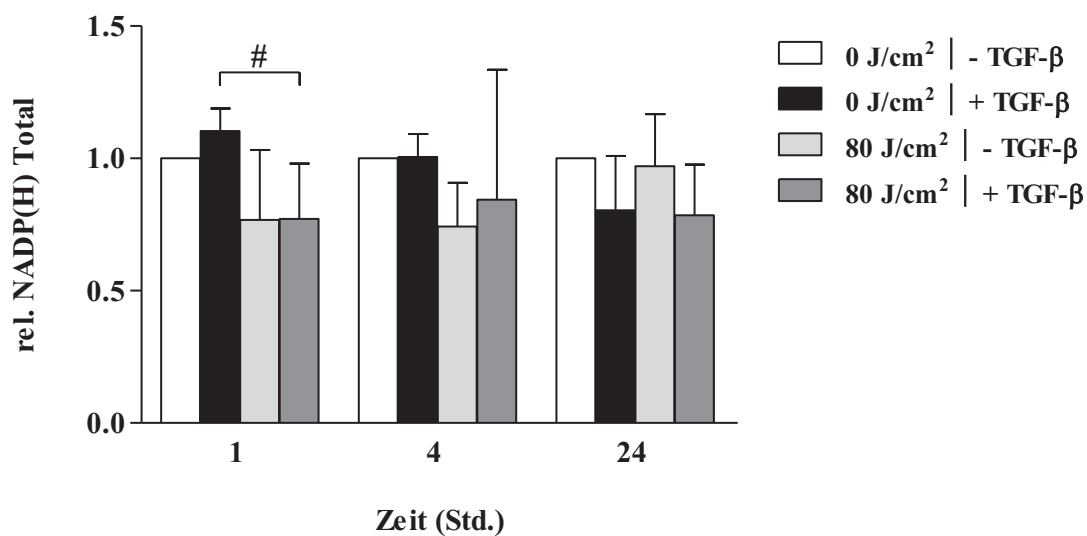


Abbildung 21: Die relative Menge an NADP(H) nach Bestrahlung und/oder Aktivierung. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. Die Menge an NADP(H)-Total wurde eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende bestimmt (# = signifikant [$p < 0,05$]; $n = 12$).

Die Zugabe von DPI (Abbildung 22) führt zu einem analogen Ergebnis. Unmittelbar nach Bestrahlungsende (eine Stunde) ist eine deutliche Reduktion der NADP(H)-Total-Menge zu beobachten. Dieser Mengenunterschied ist zwischen den unbestrahlten Zellen und den bestrahlten Zellen, welche zusätzlich mit DPI inkubiert wurden, signifikant.

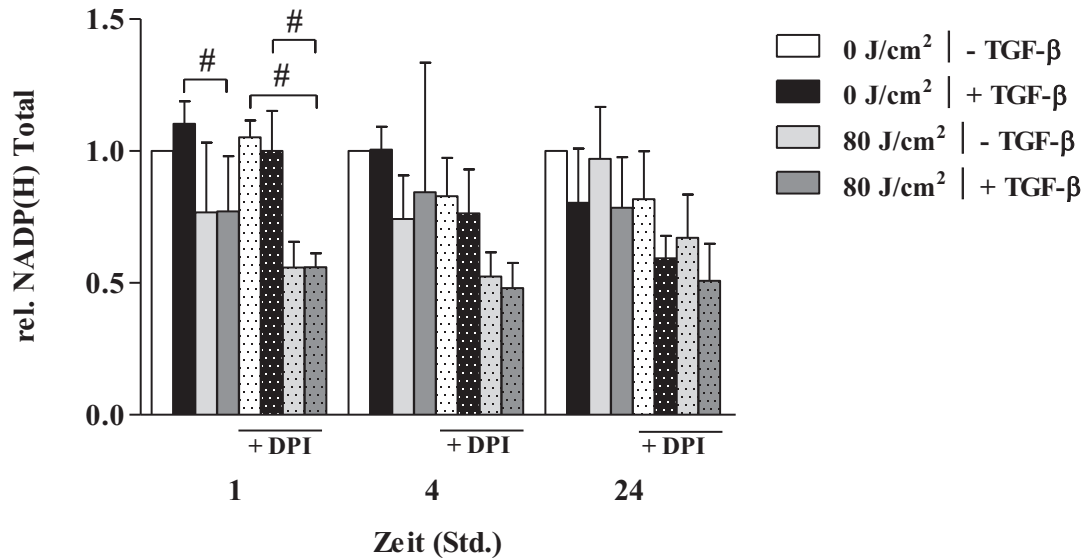


Abbildung 22: Die relative Menge an NADP(H) nach Bestrahlung und/oder Aktivierung. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF-β aktiviert. Zusätzlich wurden sie mit dem NOX4-Inhibitor DPI behandelt (5 μM). Die Menge an NADP(H)-Total wurde eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende bestimmt (# = signifikant [p < 0,05]; n = 6 - 12).

Auch in diesem Zusammenhang relativiert sich die Differenz nach vier und 24 Stunden und es ist kein signifikanter Unterschied in der NADP(H)-Total-Menge zwischen den unbestrahlten und den bestrahlten Zellen detektierbar. Neben der Gesamtmenge an NADP(H) wurde zur Aktivitätsbestimmung auch die Menge des Substrats NADPH bestimmt. In Abbildung 23 ist die relative Menge an NADPH eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende dargestellt. Zu keinem Zeitpunkt nach der Bestrahlung konnte in diesem Versuch eine signifikante Änderung der NADPH-Menge detektiert werden. Auch die Aktivierung mit TGF-β führte zu keiner Änderung in der NADPH-Menge, was auf eine konstante Aktivität der NOX4 hindeutet. Die Zugabe von DPI führt hingegen zu einer erhöhten Menge an NADPH, was in Abbildung 24 verdeutlicht wird. Bereits nach einer Stunde ist eine signifikant erhöhte NADPH-Menge gegenüber den unbehandelten Zellen zu beobachten. In unbestrahlten, TGF-β-aktivierten Fibroblasten ist diese Differenz ebenfalls signifikant. Mit blauem Licht bestrahlte und mit DPI behandelte Zellen weisen hingegen eine ähnliche Menge an NADPH auf, wie die Zellen, welche nicht mit DPI behandelt wurden. Nach vier Stunden ist zwischen den Proben kein signifikanter Unterschied in der NADPH-Menge zu beobachten, wohingegen der oben beschriebene inhibitorische Effekt durch DPI nach 24 Stunden noch deutlicher ausgeprägt ist. Die Inkubation mit DPI führt in den unbestrahlten Zellen, verglichen mit unbehandelten Zellen, zu einer Verdopplung der NADPH-Menge. Auch in bestrahlten und TGF-β-aktivierten Zellen führt DPI zu einer signifikanten Zunahme von NADPH. Die beobachteten Effekte affirmieren die inhibitorische Wirkung von DPI auf die NOX4.

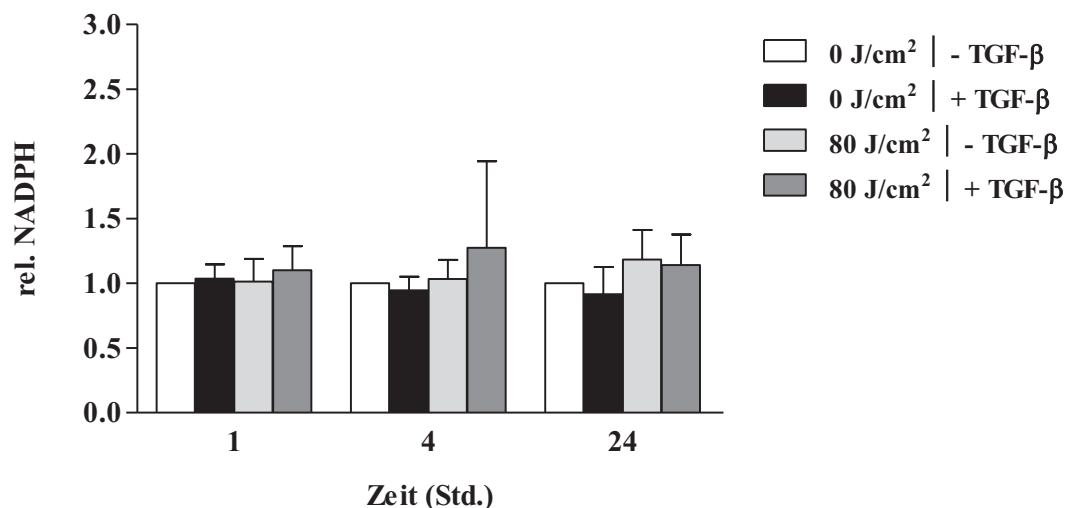


Abbildung 23: Die relative Menge an NADPH nach Bestrahlung und/oder Aktivierung. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF-β aktiviert. Die Menge an NADPH wurde eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende bestimmt (n = 12).

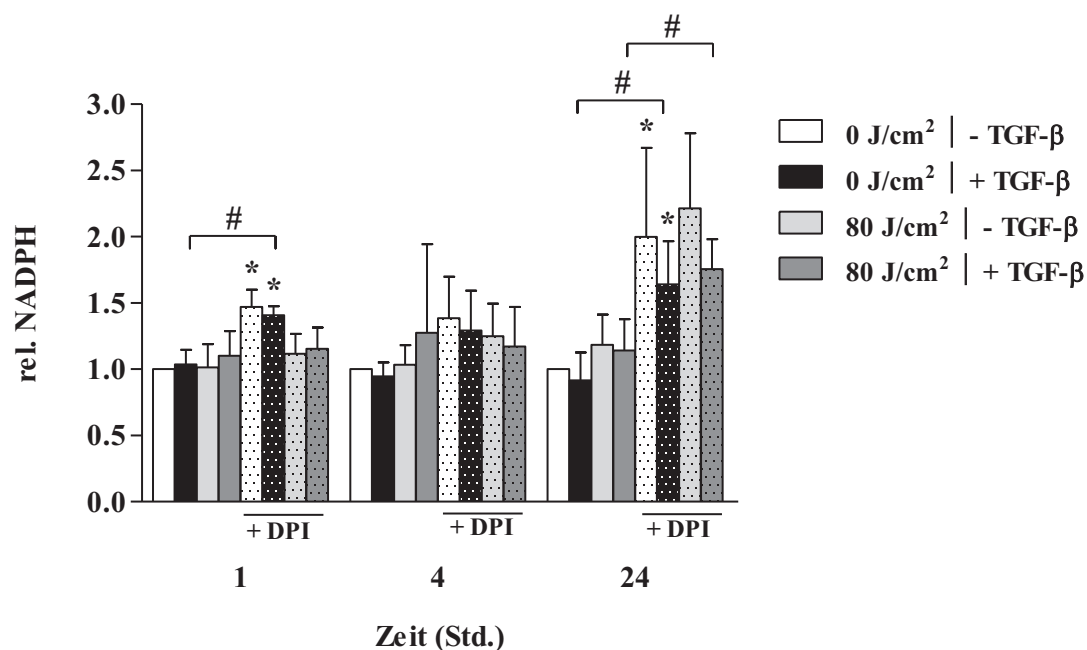


Abbildung 24: Die relative Menge an NADPH nach Bestrahlung und/oder Aktivierung. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF-β aktiviert. Zusätzlich wurden sie mit dem NOX4-Inhibitor DPI behandelt (5 μM). Die Menge an NADPH wurde eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende bestimmt (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [p < 0,05]; # = signifikant [p < 0,05]; n = 6 - 12).

Durch die Detektion von NADP(H) Total und NADPH konnte mathematisch die Menge an NADP⁺ bestimmt werden. Abbildung 25 beschreibt die relative Menge von NADP⁺ eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlung und/oder TGF- β -Aktivierung. Die Zugabe von TGF- β führt nach einer Stunde in den nativen Fibroblasten zu einer geringen Erhöhung der NADP⁺-Menge, was auf eine gesteigerte Aktivität während des Differenzierungsprozesses hindeutet. Eine zusätzliche Bestrahlung führt hingegen zu einer signifikanten Reduktion der NADP⁺-Menge. Dieses Ergebnis ist sowohl nach einer Stunde als auch nach vier Stunden zu beobachten und relativiert sich nach 24 Stunden partiell. Einzig die bestrahlten und TGF- β -aktivierten Fibroblasten weisen, verglichen mit den unbehandelten Zellen, eine signifikant geringe Menge an NADP⁺ auf.

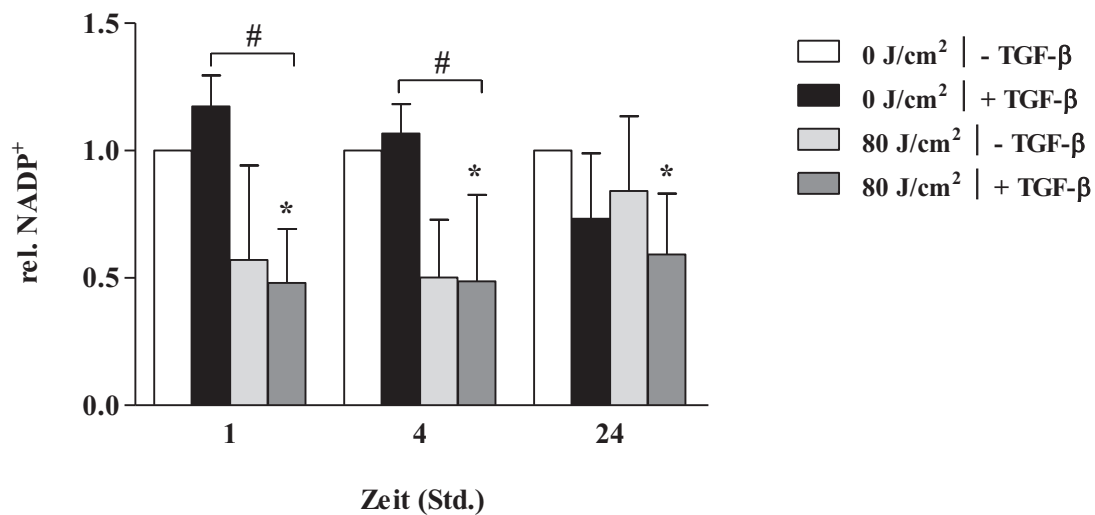


Abbildung 25: Die relative Menge an NADP⁺ nach Bestrahlung und/oder Aktivierung. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. Die Menge an NADP⁺ wurde eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende bestimmt und berechnet (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; # = signifikant [$p < 0,05$]; $n = 12$).

Welchen Einfluss der zusätzliche Einsatz des Inhibitors DPI auf die NOX4-Aktivität ausübt, ist in Abbildung 26 dargestellt. Bereits eine einstündige Inkubation führt in unbestrahlten Zellen zu einer verminderten NADP⁺-Generierung um mehr als 50 %. Im zeitlichen Verlauf verstärkt sich dieses Ergebnis. Nach vier Stunden ist die NADP⁺-Generierung um ca. 75 % verringert, nach 24 Stunden sogar um bis zu mehr als 90 %. Eine zusätzliche Bestrahlung führt über die Zeit zu einer Verstärkung des beobachteten Effekts. Eine negative Tendenz liegt der Tatsache zugrunde, dass die Menge an NADP⁺ aus den Werten von NADP(H) Total und NADPH berechnet wird.

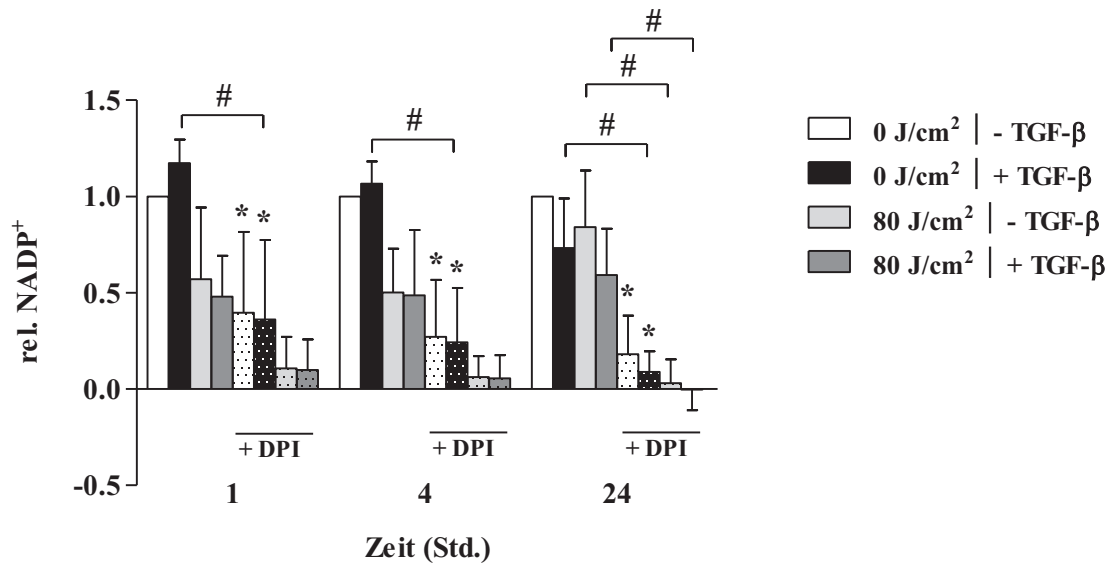


Abbildung 26: Die relative Menge an NADP⁺ nach Bestrahlung und/oder Aktivierung. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF-β aktiviert. Zusätzlich wurden sie mit dem NOX4-Inhibitor DPI behandelt (5 μM). Die Menge an NADP⁺ wurde eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende bestimmt und berechnet (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [p < 0,05]; # = signifikant [p < 0,05]; n = 6 - 12).

Die Ratio aus NADPH und NADP⁺ gibt Aufschluss über den Umsatz unter Einfluss von blauem Licht und/oder TGF-β-Induktion. In Abbildung 27 ist dargestellt, dass die Bestrahlung von Fibroblasten den Umsatz von NADPH zu NADP⁺ stark beeinflusst. Eine Stunde nach Bestrahlungsende ist eine signifikant reduzierte Ratio (um ca. 50 %) in den bestrahlten und TGF-β-aktivierten Zellen, verglichen mit den unbestrahlten und TGF-β-aktivierten Zellen, detektierbar. Diese Differenz ist auch nach vier und 24 Stunden noch signifikant erhöht, wobei sie sich nach 24 Stunden minimal relativiert.

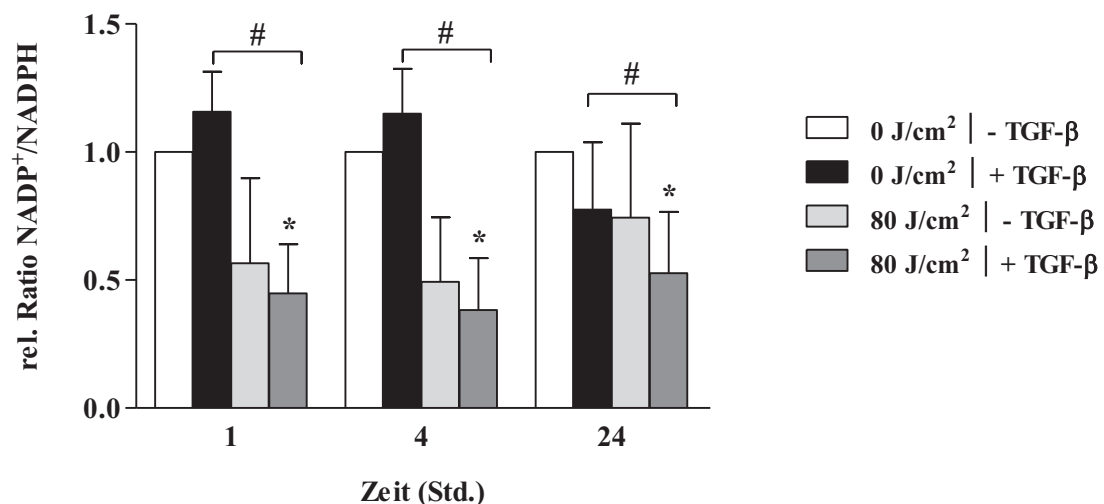


Abbildung 27: Die relative Ratio von NADP⁺/NADPH nach Bestrahlung und/oder Aktivierung. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF-β aktiviert. Die Ratio wurde aus der Menge an NADP(H) Total und NADPH berechnet (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [p < 0,05]; # = signifikant [p < 0,05]; n = 12).

Die Zugabe von DPI zu unbestrahlten Zellen verursacht einen korrespondierenden Effekt wie die einmalige Bestrahlung mit blauem Licht (Abbildung 28). Sowohl die Bestrahlung als auch die Inkubation mit DPI führen eine Stunde und vier Stunden nach Bestrahlungsende zu einer signifikanten Reduktion von $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Die Kombination von Bestrahlung und DPI führt zur stärksten Hemmung. Bedingt durch die Tatsache, dass DPI die NOX4 irreversibel hemmt, befinden sich die Werte nach 24 Stunden nahe und sogar unter 0. Die Relativierung der Werte zwischen den unbestrahlten und den bestrahlten Fibroblasten deutet darauf hin, dass die Zellen innerhalb von 24 Stunden in der Lage sind, ein Gleichgewicht zwischen der NADPH- und NADP^+ -Menge wiederherzustellen.

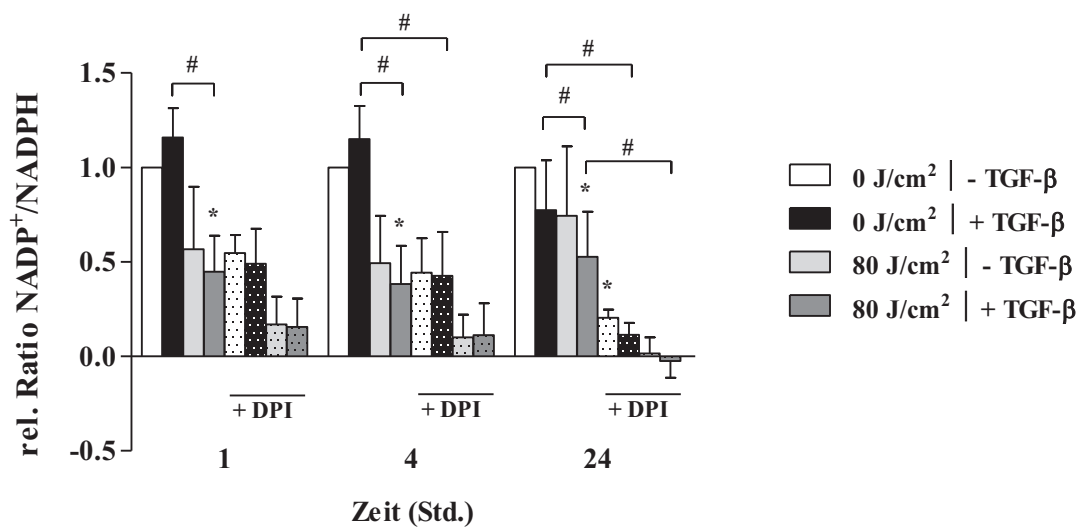


Abbildung 28: Die relative Ratio von $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ nach Bestrahlung und/oder Aktivierung. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF-β aktiviert. Zusätzlich wurden sie mit dem NOX4-Inhibitor behandelt (5 μM). Die Ratio wurde aus der Menge an NADP(H) Total und NADPH berechnet (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; # = signifikant [$p < 0,05$]; n = 6 - 12).

5.6 Der Einfluss von blauem Licht auf Bestandteile des TGF- β -Signalwegs

Der TGF- β -Signalweg repräsentiert den Schlüsselprozess in der Myofibroblastendifferenzierung. Eine Vielzahl von Proteinen ist in dieser Singnalkaskade involviert und an verschiedenen Schnittstellen lokalisiert. Die Analyse der integrierten Proteine ist Gegenstand der folgenden Experimente.

Die Aktivierung des TGF- β -Signalwegs beginnt mit der Bindung der Liganden (TGF- β) an die spezifischen Rezeptoren (detailliert in Abschnitt 1.3.2). In diesem Experiment wurde überprüft, ob die Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm bereits in der frühen Phase des Signalwegs einen Einfluss ausübt. Dabei wurden die Fibroblasten täglich über einen Zeitraum von drei bis sechs Tagen mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder 5 ng/ml TGF- β aktiviert.

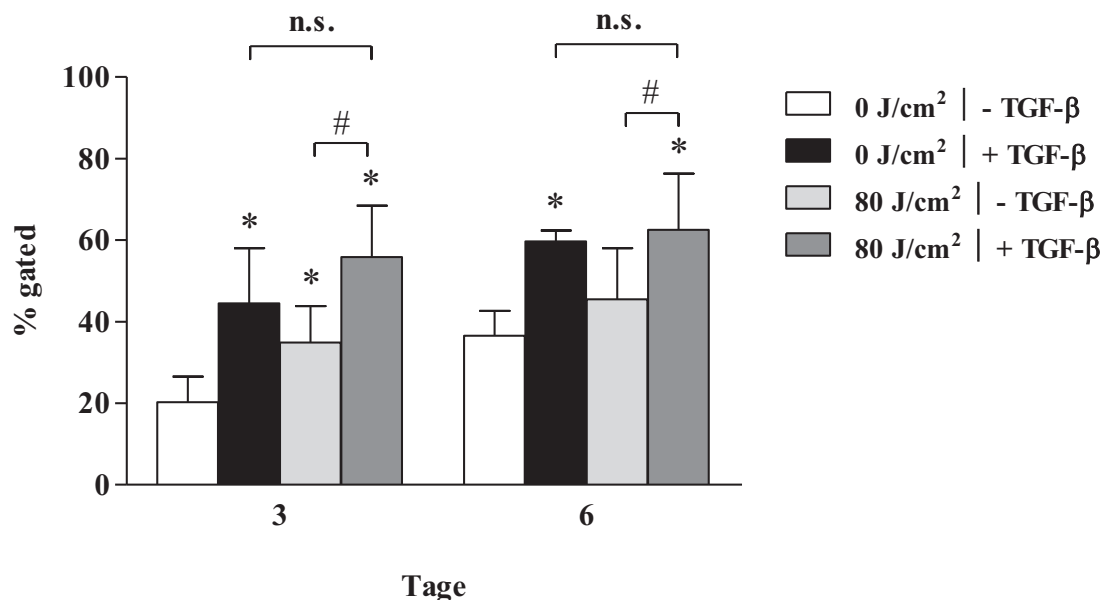


Abbildung 29: Die relative Anzahl an TGF- β RI-positiven Zellen. Humane dermale Fibroblasten wurden täglich über drei bzw. sechs Tage mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [p < 0,05]; # = signifikant [p < 0,05]; n.s. = nicht signifikant; n = 6)

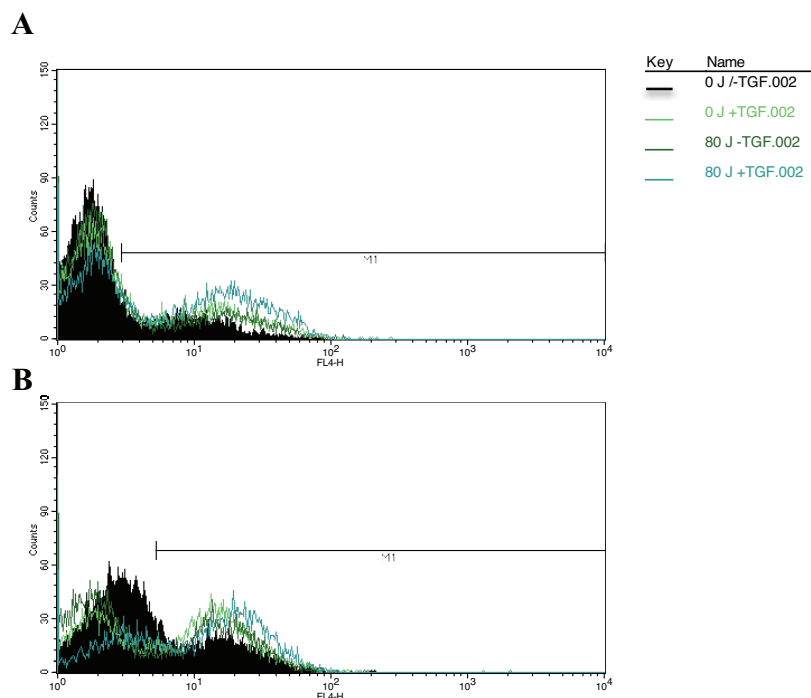


Abbildung 30: Die TGF- β RI-Expression im Histogramm Overlay. Fibroblasten wurden über drei (A) und sechs (B) Tage täglich mit einer Dosis von 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zellen.

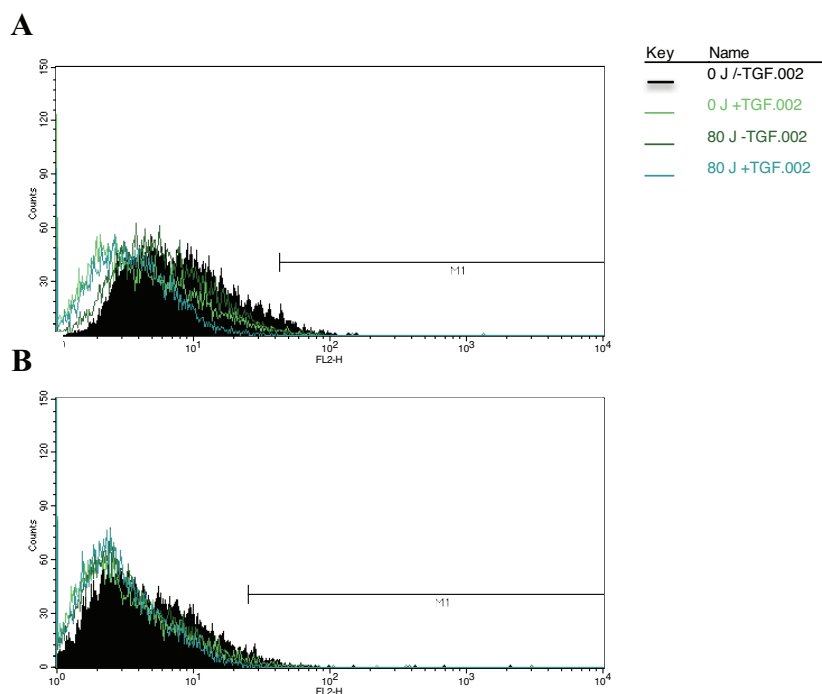


Abbildung 31: Die TGF- β RII Expression im Histogramm Overlay. Fibroblasten wurden über drei (A) und sechs (B) Tage täglich mit einer Dosis von 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zellen.

Die Inkubation mit 5 ng/ml TGF- β führt in unbestrahlten Zellen bereits nach drei Tagen zu einer signifikanten Erhöhung TGF- β RI-exprimierender Zellen um 100 % (Abbildungen 29 und 30 A). Diese Zunahme ist auch nach sechs Tagen zu beobachten, wohingegen die Erhöhung in diesem Fall ca. 63 % beträgt. Auch die zusätzliche Bestrahlung führt zu einer signifikanten Zunahme an positiven Zellen, verglichen mit den unbehandelten Zellen und den ausschließlich bestrahlten Zellen. Im Kontrast dazu besteht keine signifikante Differenz in der Rezeptorexpression zwischen den TGF- β -aktivierten Zellen, welche unbestrahlt sind und den Zellen, welche bestrahlt wurden. Die alleinige Bestrahlung führt nach drei Tagen jedoch zu einer signifikanten Zunahme positiver Zellen, was nach sechs Tagen hingegen nicht mehr detektiert werden konnte.

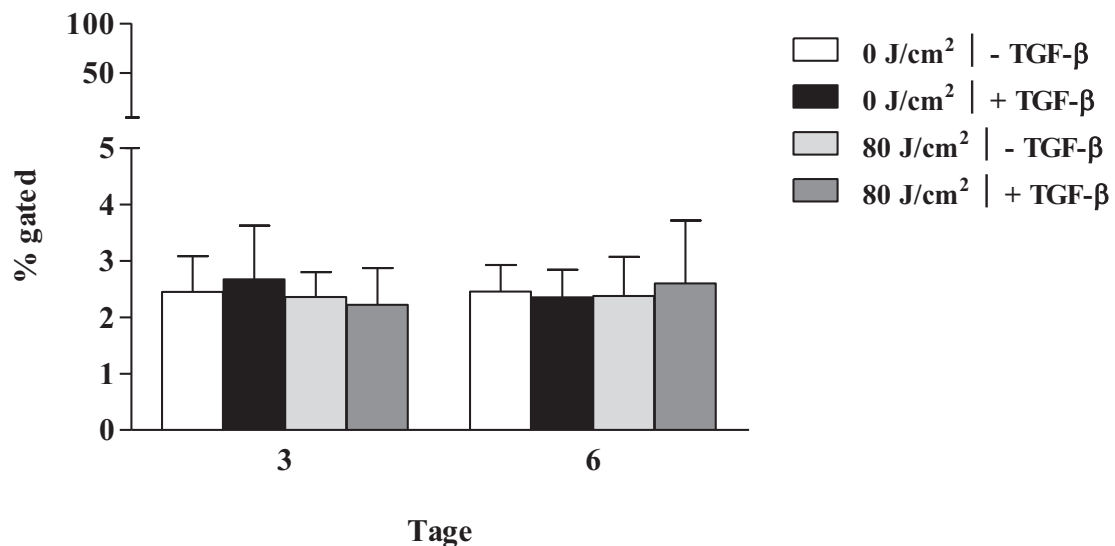


Abbildung 32: Die relative Anzahl an TGF- β RII-positiven Zellen

Humane dermale Fibroblasten wurden täglich über drei bzw. sechs Tage mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert (n = 6).

Der zum Komplex gehörende Rezeptor Typ-II wurde ebenfalls untersucht und wies in der Expression keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Proben auf (Abbildungen 31 und 32). Die Anzahl an TGF- β RII-positiven Zellen blieb über den Behandlungszeitraum von drei und sechs Tagen konstant bei einem Wert von 2,2–2,6 %, was darauf hindeutet, dass weder die Inkubation mit TGF- β noch eine Bestrahlung mit blauen Licht Einfluss auf die Expression des Rezeptors vom Typ-II nehmen.

Ein Charakteristikum und auch Voraussetzung für die Ausdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist die Synthese des EDA-FN, eine spezielle Splicevariante des Fibronectins (detailliert in Abschnitt 1.3.1). In diesem Experiment wurde untersucht, ob sich die Bestrahlung mit blauem Licht auf die EDA-FN Synthese auswirkt.

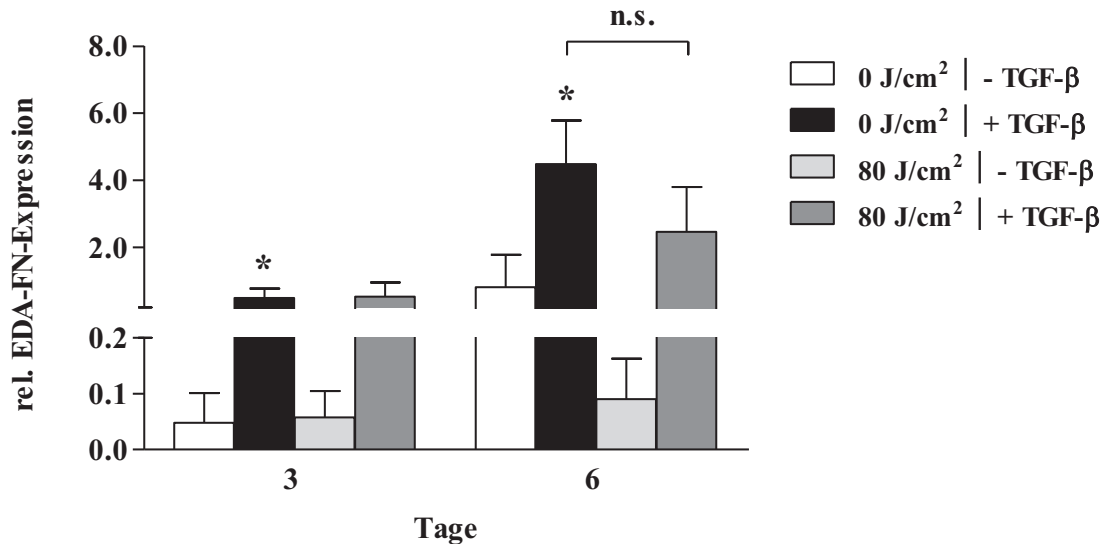


Abbildung 33: Die relative Expression des Proteins EDA-FN in Relation zum Kontrollprotein α -Tubulin. Humane dermale Fibroblasten wurden täglich über drei bzw. sechs Tage mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; n.s. = nicht signifikant [$p > 0,05$]; n = 5 - 6).

Eine dreitägige Inkubation von Fibroblasten mit 5 ng/ml TGF- β führt, wie in Abbildung 33 dargestellt, zu einer signifikanten Zunahme des Proteins EDA-FN. Auch in den zusätzlich bestrahlten Fibroblasten führt die Inkubation mit TGF- β zu einer erhöhten EDA-FN-Expression. Die Bestrahlung hat nach drei Tagen demnach keinen Einfluss auf die Synthese von EDA-FN. Nach einem Behandlungszeitraum von sechs Tagen erhöht sich die Menge des Zielproteins sowohl in den unbehandelten Zellen als auch in den TGF- β -aktivierten Zellen (unbestrahlt und bestrahlt). Einzig in den bestrahlten Zellen, welche nicht mit TGF- β aktiviert wurden, ist die Zunahme vergleichsweise gering (von 0,05 auf 0,09). Die signifikante Differenz der Proteinexpression zwischen den unbehandelten Zellen und den mit TGF- β -aktivierten Zellen bleibt auch nach sechs Tagen bestehen (0,81 vs. 4,48). Hinsichtlich einer Hemmung der Expression, bedingt durch die Bestrahlung, lässt sich in den TGF- β -aktivierten Zellen lediglich ein Trend verzeichnen, welcher nicht signifikant ist.

In der TGF- β -Signalkaskade spielen die sogenannten SMAD-Proteine eine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung bis hin zum Zellkern. Eines dieser SMAD-Proteine ist das SMAD3, welches im TGF- β -Signalweg durch Phosphorylierung aktiviert wird (detailliert in Abschnitt 1.3.2).

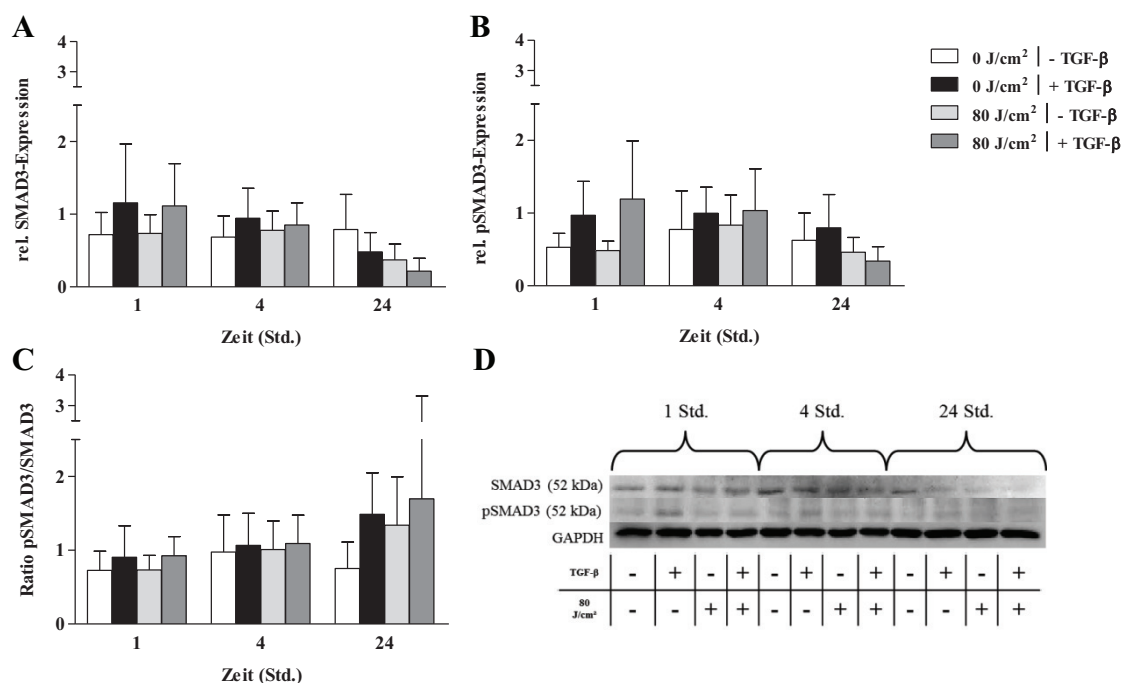


Abbildung 34: Die relative Expression des Proteins (p)SMAD3 (52 kDa) und dessen Ratio in Relation zum Kontrollprotein GAPDH.

Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. Nach einer, vier und 24 Stunden wurde Expression von SMAD3 (A), pSMAD3 (B) und deren Ratio (C) bei 52 kDa mittels Western Blot-Analyse (D) bestimmt (n = 5-6).

Die einmalige Bestrahlung mit blauem Licht hat, wie in Abbildung 34 (A, B und D) dargestellt, weder einen Einfluss auf die Expression von SMAD3 noch auf die Expression der phosphorylierten Form pSMAD3. Die Aktivierung der Fibroblasten mit TGF- β führt zu einer tendenziell erhöhten Expression des Proteins (inaktiv und phosphoryliert). Diese Beobachtungen implizieren, dass die Aktivierung mittels TGF- β zu einer gesteigerten Expression führt, jedoch nicht zu einer gesteigerten Phosphorylierung, was in Abbildung 24 C durch die Ratio ersichtlich wird.

Neben SMAD3 mit einem Molekulargewicht von 52 kDa wurde zusätzlich eine weitere Bande bei ca. 30 kDa detektiert, was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um eine Untereinheit handelt.

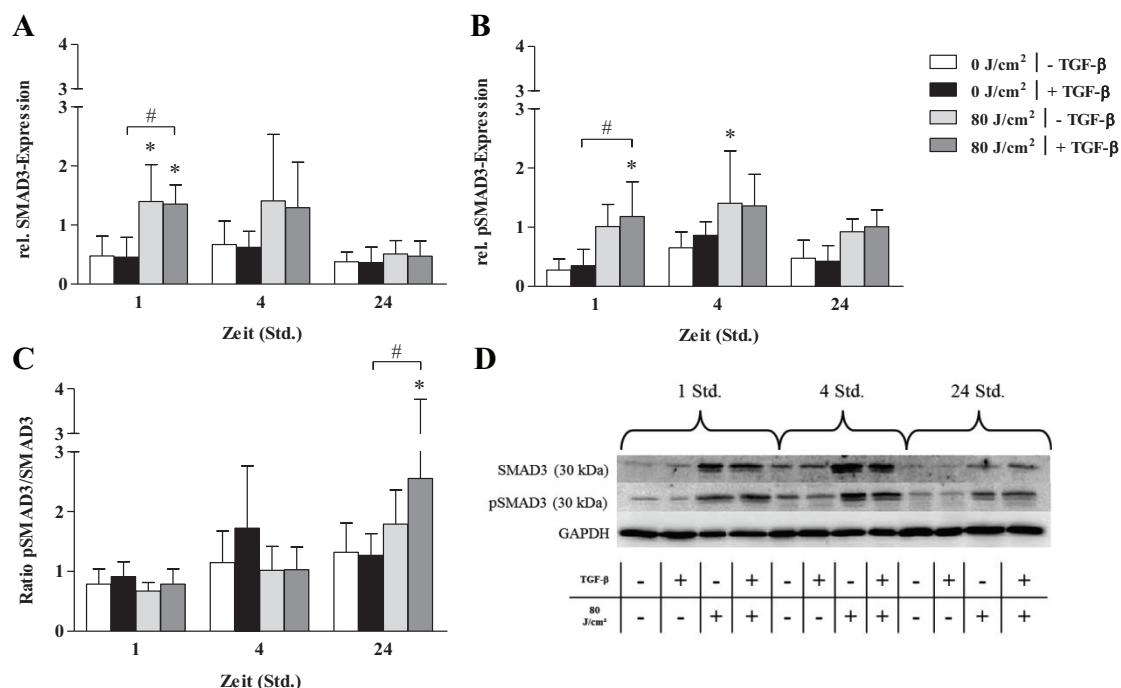


Abbildung 35: Die relative Expression des Proteins (p)SMAD3 (30 kDa) und dessen Ratio in Relation zum Kontrollprotein GAPDH.

Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF-β aktiviert. Nach einer, vier und 24 Stunden wurde Expression von SMAD3 (A), pSMAD3 (B) und deren Ratio (C) bei 30 kDa mittels Western Blot-Analyse (D) bestimmt (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [p < 0,05]; # = signifikant [p < 0,05]; n = 4-5).

Die Bestrahlung von Fibroblasten führt hier zu einer signifikant erhöhten SMAD3-Expression; sowohl in den nativen Fibroblasten als auch in den TGF-β-aktivierten Zellen. (Abbildung 35 A und D). Die Ausprägung dieses Effekts ist eine Stunde nach Bestrahlungsende am deutlichsten zu beobachten. Nach vier Stunden ist eine vergleichbare Tendenz zu erkennen, wohingegen nach 24 Stunden keine Differenz in der Proteinexpression zu detektieren ist. Auch die Menge der phosphorylierten Form des Proteins SMAD3 ist in den zuvor bestrahlten Zellen nach einer Stunde signifikant um ein Vielfaches erhöht (Abbildung 35 B und D). Nach vier Stunden weisen alle Proben eine gesteigerte Expression auf, wenngleich die Differenz in der Expression zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen nach wie vor signifikant ist. Eine Stunde nach Bestrahlungsende haben weder die Bestrahlung noch die Inkubation mittels TGF-β einen signifikanten Einfluss auf die Expression von pSMAD3 im Verhältnis zu SMAD3 (Abbildung 35 C). Nach vier Stunden ist in den TGF-β-aktivierten Zellen ein erhöhter Trend zu beobachten, welcher jedoch nicht signifikant ist. Die Analyse nach 24 Stunden

ergab eine signifikant erhöhte Aktivität in den kombiniert bestrahlten und TGF- β -aktivierten Proben.

Neben der Signaltransduktion über SMAD-Proteine ist auch der MAP-Kinase-Signalweg während des Differenzierungsprozesses von hoher Relevanz. Zur Aufklärung in welchem Maß die Bestrahlung einen Einfluss auf Segmente der MAP-Kinase-Signaltransduktion hat, wurde die Expression von (p)ERK und (p)-p38 mittels Western Blot-Analyse bestimmt.

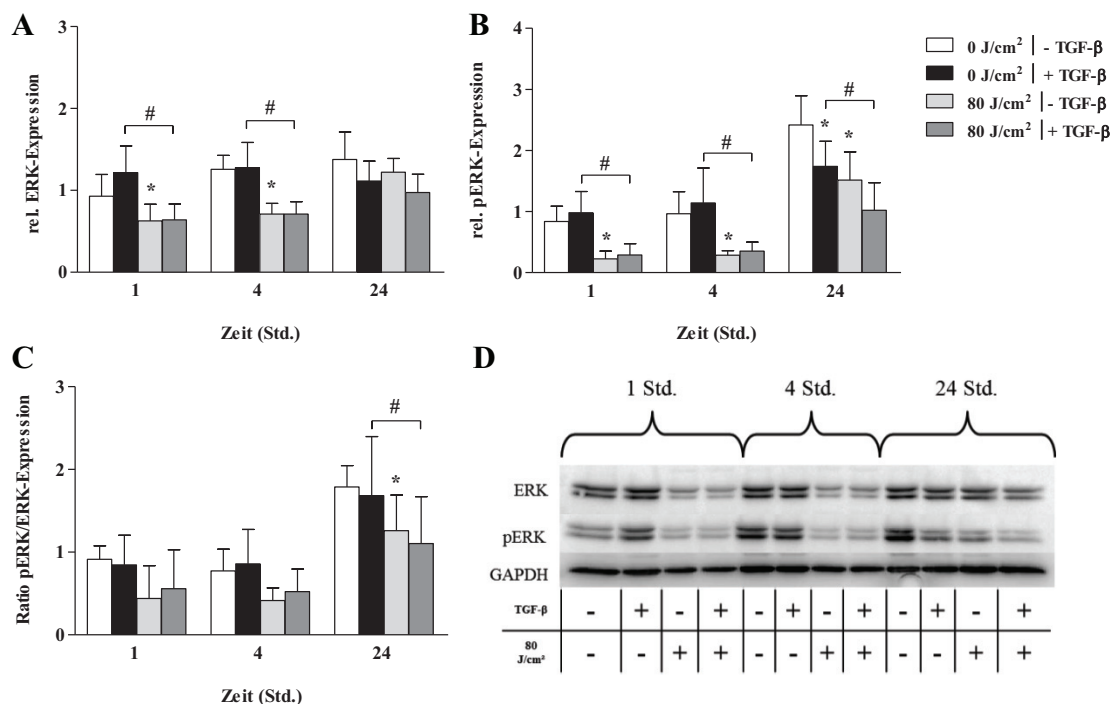


Abbildung 36: Die relative Expression des Proteins (p)ERK1/2 und dessen Ratio in Relation zum Kontrollprotein GAPDH.

Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. Nach einer, vier und 24 Stunden wurde die Expression von ERK1/2 (A), pERK1/2 (B) und deren Ratio (C) mittels Western Blot-Analyse (D) bestimmt (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; # = signifikant [$p < 0,05$]; $n = 8$).

Wie in den vorangegangenen Versuchen wurden Fibroblasten einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert, um die Differenzierung zu Myofibroblasten einzuleiten. Wie in Abbildung 36 dargestellt, führt eine einmalige Bestrahlung zu einer signifikant verminderten Expression von ERK1/2 (Abbildung 36 A und D). Die singuläre Inkubation mit TGF- β führt nach einer Stunde zu einer tendenziell erhöhten Expression (1,2) wohingegen eine zusätzliche Lichtexposition die Expression signifikant um ca. 50 % hemmt (0,64). Dieser Effekt ist auch nach vier Stunden zu detektieren, wohingegen sich das Expressionsmuster nach 24 Stunden relativiert und keine Differenz mehr festzustellen ist. Auch bei der phosphorylierten Form von ERK1/2 inhibiert die Bestrahlung die Expression sowohl in nativen Fibroblasten als auch in TGF- β -aktivierten Fibroblasten signifikant (Abbildung 36 B).

Die Proben, die nach 24 Stunden untersucht wurden, unterscheiden sich allerdings hinsichtlich des Expressionsmusters von der phosphorylierten Form des Proteins. Die inhibierende Wirkung des blauen Lichts erstreckt sich bei pERK1/2 über einen Zeitraum von bis zu 24 Stunden. Das Verhältnis der phosphorylierten Form des Proteins zum unphosphorylierten Zustand ist in Abbildung 36 D dargestellt. Auch hier ist eine inhibierende Tendenz durch die Bestrahlung erkennbar, welche jedoch nicht signifikant ist. Eine signifikante Hemmung durch blaues Licht konnte erst nach 24 Stunden detektiert werden.

Bei dem Protein p38 handelt es sich um ein Protein, welches in der Literatur ebenfalls als ein Mediator der TGF- β -Signaltransduktion beschrieben wird und folglich ein Faktor der Myofibroblastendifferenzierung darstellt.

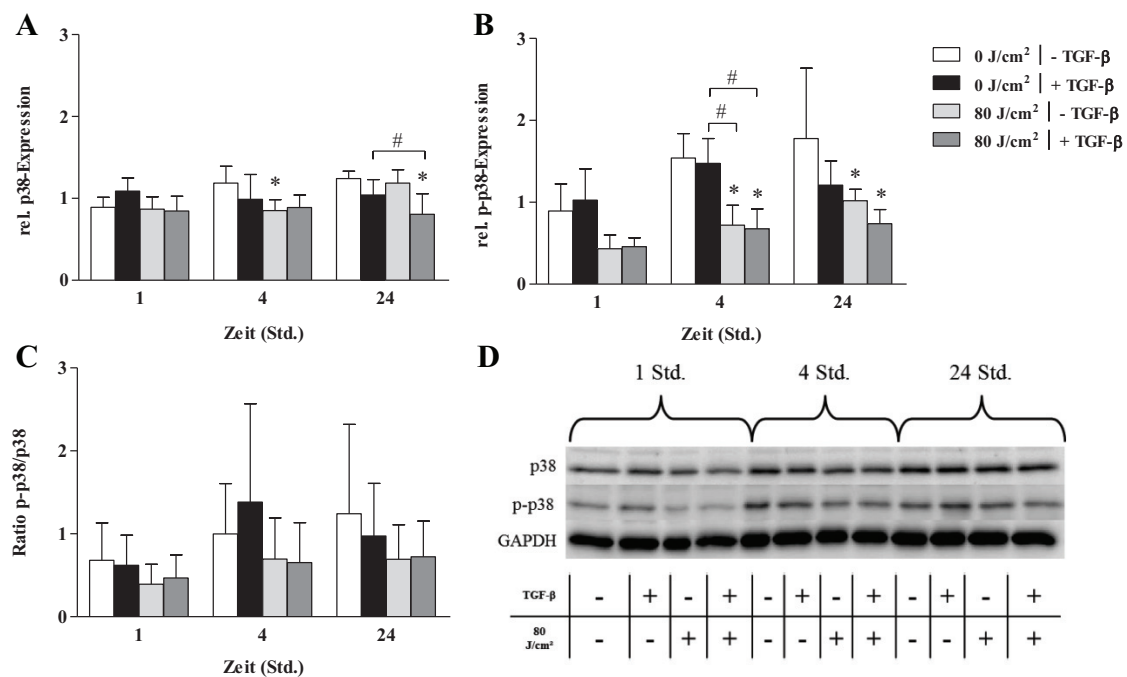


Abbildung 37: Die relative Expression des Proteins (p-)p38 und dessen Ratio in Relation zum Kontrollprotein GAPDH.

Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. Nach einer, vier und 24 Stunden wurde Expression von p38 (A), phosphop38 (B) und deren Ratio (C) mittels Western Blot-Analyse (D) bestimmt (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; # = signifikant [$p < 0,05$]; $n = 4$).

In der Abbildung 37 ist die Analyse der Expression von p38, p-p38, und die daraus gebildete Ratio sowie der Western Blot dargestellt. Eine Stunde nach Bestrahlungsende ist kein signifikanter Unterschied in der Expression von p38 detektierbar (Abbildung 37 A). Erst vier Stunden nach der Bestrahlung ist die Expression von p38 in den lichtexponierten Proben verglichen mit den unbehandelten Proben signifikant verringert. Bei der phosphorylierten Form des Proteins war eine stärkere Differenz der Expression zu beobachten. So ist nach einer Stunde die Expression in den bestrahlten Proben bereits tendenziell inhibiert (Abbildung 37 B). Vier Stunden nach der Lichtexposition ist diese Differenz in der Expression zwischen den bestrahlten Fibroblasten und den unbestrahlten Fibroblasten (unabhängig von der TGF- β -Aktivierung) signifikant. Diese Beobachtung erstreckt sich auch partiell auf einen Zeitraum von 24 Stunden, wobei hier die unbestrahlten, TGF- β -aktivierten Fibroblasten eine verringerte Expression verglichen mit den unbehandelten Zellen aufweist. Durch die Bildung des Quotienten (Abbildung 37 C) relativieren sich die Ergebnisse, sodass der Unterschied nicht signifikant ist. Lediglich ein tendenziell inhibierender Effekt durch die Bestrahlung ist zu beobachten.

5.7 Die ATP-Generierung

Die Generierung von ATP durch einen Elektronentransport ist die Hauptaufgabe der Atmungskette. In diesem Vorgang sind auch Flavinmoleküle als Cofaktoren gegenwärtig und spielen bei der Elektronenübertragung eine wichtige Rolle. Wie oben bereits erläutert (Abschnitt 5.1), wurde in Vorarbeiten eine dosisabhängige Proliferationshemmung von Fibroblasten durch die Bestrahlung mit blauem Licht beobachtet. Um zu überprüfen, ob diese Hemmung in Zusammenhang mit Stoffwechselprozessen steht, wurde die ATP-Menge nach Bestrahlung und/oder TGF- β -Aktivierung bestimmt.

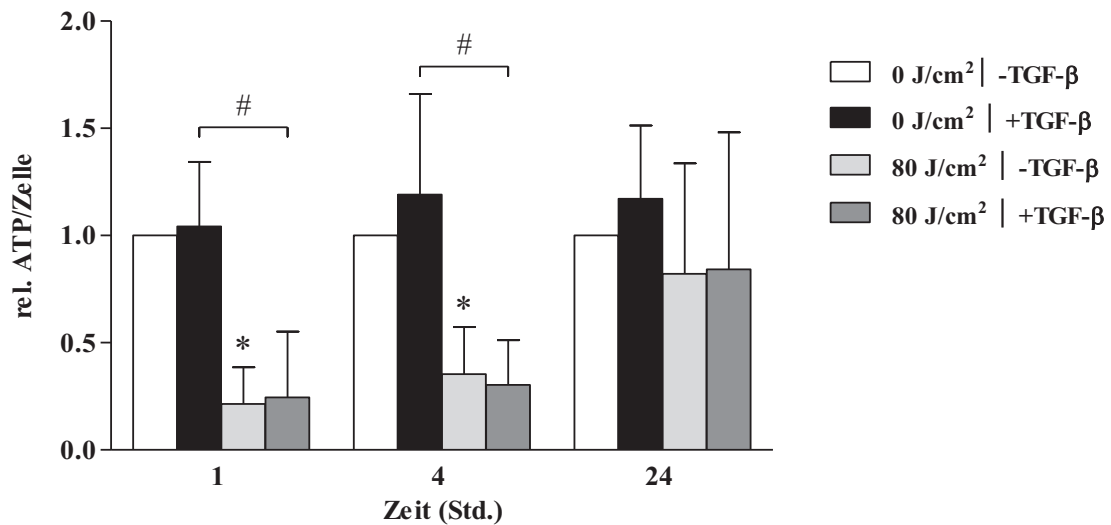


Abbildung 38: Die relative Menge an ATP nach Bestrahlung und/oder Aktivierung

Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm² bestrahlt und/oder mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. Nach einer, vier und 24 Stunden wurde die ATP-Menge bestimmt (* = signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; # = signifikant [$p < 0,05$]; $n = 9$).

Die einmalige Bestrahlung von Fibroblasten mit blauem Licht führt, wie in Abbildung 38 dargestellt, bereits nach einer Stunde zu einer signifikanten Inhibition der ATP-Generierung, welche auch nach vier Stunden noch zu beobachten ist. Nach 24 Stunden relativiert sich die Differenz und es ist zwischen den unterschiedlich behandelten Proben kein signifikanter Unterschied in der ATP-Generierung detektierbar.

6 Diskussion

Der Wundheilungsprozess der Haut ist ein sehr komplexer und effizienter Mechanismus des größten menschlichen Organs, in welchem unmittelbar nach einer Verletzung intrazellulär und interzellulär Signalwege aktiviert und koordiniert werden. Dabei sind eine Vielzahl von Zellen, wie Immunzellen (Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Dendritische Zellen), Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten beteiligt (Gurtner *et al.* 2008). In der reparativen Phase der Wundheilung erfolgt neben der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix auch die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche über ihre hohe kontraktile Kraft die Wundränder zusammenführt und die Wunde letztlich verschließt (Hinz 2007).

Störungen in diesem Prozess können zu fibrotischen Erkrankungen der Haut führen, wie Keloide und hypertrophe Narben, welche abnormale Hautveränderungen infolge von Trauma, Entzündung oder Verbrennung darstellen. Sie sind typischerweise erhaben, rot oder rosafarben und gelegentlich juckend. Im Unterschied zu Keloiden, welche gesunde Hautareale überwachsen, überschreiten hypertrophe Narben nicht die Grenze des ursprünglichen Verletzungsgebiets (Murray 1994; Slemp und Kirschner 2006). Verglichen mit gesunder Haut lässt sich eine Vielzahl von Unterschieden feststellen. So ist die Kollagensynthese überproportional gesteigert sowie die Proliferation von Fibroblasten und die Differenzierungsrate von Fibroblasten zu Myofibroblasten (Gauglitz *et al.* 2011).

Das Zytokin TGF- β spielt im Prozess der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten *in vivo* und *in vitro* eine Schlüsselrolle (Vaughan *et al.* 2000) und auch auf dieser Ebene besteht ein Ungleichgewicht in der TGF- β -Expression zwischen gesundem Gewebe und keloidalem Gewebe. Sowohl die Expression des Zytokins als auch die Expression der TGF- β -Rezeptoren sind in Keloiden stark erhöht (Wolfram *et al.* 2009 Bock *et al.* 2005; Chin *et al.* 2001). Dies spricht für eine verstärkte Differenzierung zu Myofibroblasten, welche durch die *de novo* Expression des Myofibroblastenmarkerproteins α -SMA charakterisiert ist. Neben der Signaltransduktion über SMAD-Proteine und MAP-Kinasen spielt auch die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine entscheidende Rolle im Differenzierungsprozess von Fibroblasten zu Myofibroblasten und somit auch in der Entstehung von profibrotischen Erkrankungen.

6.1 Die Rolle von ROS während der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten

Bei ROS handelt es sich um eine kurzlebige, aus Sauerstoff hervorgegangene Verbindung, wie Sauerstoffradikale [Superoxide (O_2^-), Hydroxyle ($\bullet OH$), Peroxyle ($RO_2\bullet$) und Alkoxyle ($RO\bullet$)] sowie Moleküle, die oxidierend wirken und/oder in Radikale konvertiert werden können, wie Ozon (O_3), singulett Sauerstoff (1O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Sie interagieren mit einer Vielzahl von Molekülen, wie Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren (Bedard und Krause 2007). Neben ihrer schädigenden Wirkung in hohen Mengen, welcher als oxidativer Stress bezeichnet wird, dienen sie auch als Signalmoleküle für metabolische Prozesse von Zellen. Der Beweis dafür stellt die Identifikation der NADPH-Oxidasen (NOX) dar, welche ROS nicht als Nebenprodukt generieren, sondern deren Hauptaufgabe die ROS-Produktion ist. Sie katalysieren die NADPH-abhängige Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxidanionen, welche ihrerseits zu Wasserstoff dismutieren (Leusen *et al.* 1996). Die Isoform NOX4 ist ein aus 578 Aminosäuren bestehendes Protein, welches stark in Nierentubuli, glomerulären Mesangiazellen, Fibroblasten und Podozyten exprimiert ist (Bondi *et al.* 2010; Shiose *et al.* 2001; Gorin *et al.* 2003). Obwohl die meisten vaskulären und renalen NOX-Isoformen durch profibrotische Stimuli wie TGF- β , Angiotensin II oder Hyperglykämie reguliert werden, besitzt die NOX4 eine prädominante Rolle in der Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (Barnes und Gorin 2011).

Es ist etabliert, dass TGF- β als der potenteste profibrotische Faktor die Expression der NOX4 und die damit einhergehende ROS-Generierung, in einer Vielzahl von Zellen induziert, wie in glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Hepatozyten und Fibroblasten (Abbildung 39) (Bondi *et al.* 2010; Hecker *et al.* 2009; Cucoranu *et al.* 2005; Sturrock *et al.* 2006; Hu *et al.* 2005). Eine erhöhte ROS-Generierung durch NADPH-Oxidasen wird neben der Induktion von profibrotischen Erkrankungen der Lunge, des Herzens und der Niere (Lambeth 2007; Barnes und Gorin 2011) auch mit profibrotischen Erkrankungen der Haut, wie Keloiden und hypertrophen Narben in Zusammenhang gebracht (Babalola *et al.* 2014).

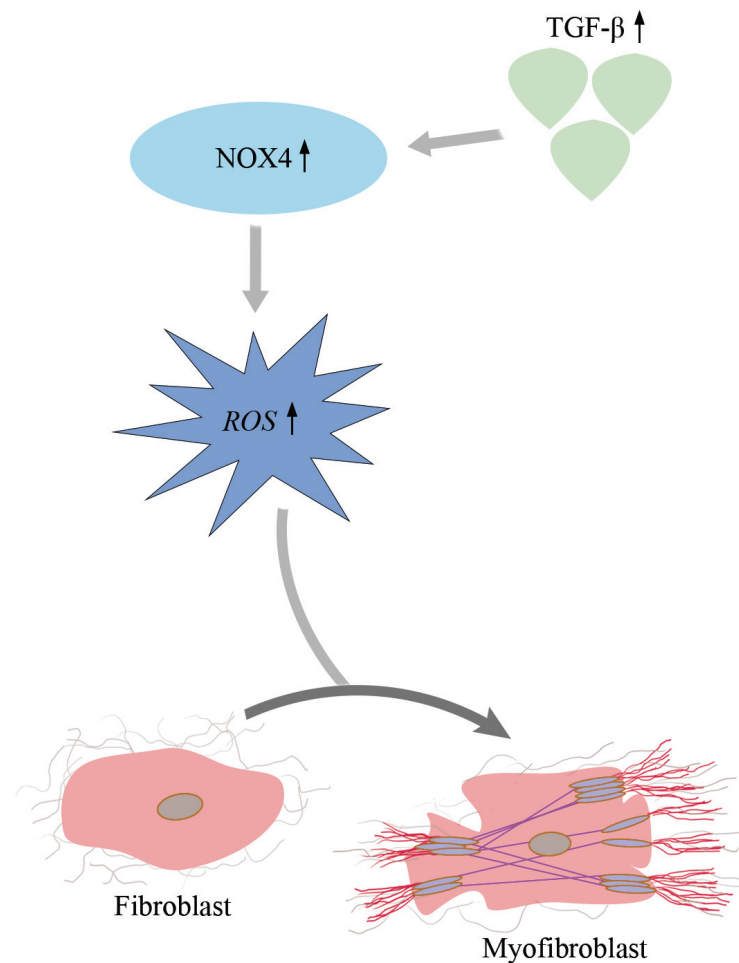


Abbildung 39: Die Induktion der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten über die NOX4. Als profibrotisches Zytokin führt TGF-β zu einer gesteigerten NOX4-Expression und folglich zu einer erhöhten ROS-Generierung. Diese ist neben einer gesteigerten Proliferationsrate auch ursächlich für eine vermehrte Differenzierungsrate von Fibroblasten zu Myofibroblasten, was in profibrotischen Erkrankungen resultieren kann.

Die bisherigen Therapieoptionen zur Behandlung von Keloiden und hypertrophen Narben ist vielfältig, jedoch ist die chirurgische Entfernung des betroffenen Gewebes bisher die gängigste Behandlungsmethode (Wolfram *et al.* 2009). Neben den Therapien mithilfe von Druck, Silikon-Auflagen, Corticosteroiden, Röntgenbestrahlung und dem Einsatz einer Kryotherapie, zeigte auch die Verwendung von gepulsten Farblasern Erfolge in der Behandlung von Keloiden und hypertrophen Narben, was in Abschnitt 1.2.2 detailliert beschrieben wurde. In der Dermatologie wird heutzutage Licht im sichtbaren und UV-Bereich bereits vielschichtig genutzt. Als bekannteste Therapien sind dabei die *Intense pulsed light*-Therapie (ILP), die *Low-level light therapy* (LLLTL), die Photodynamische Therapie (PDT) und die *Psoralen plus ultraviolet A*-Therapie (PUVA) zu benennen, welche jedoch häufig auf dem Einsatz von polychromatischem Licht basieren.

Blaues Licht wird in der Dermatologie bisher in der Behandlung von Erkrankungen wie Akne (Wheeland und Dhawan 2011; Gold *et al.* 2011), Psoriasis (Pfaff *et al.* 2015) und atopischer Dermatitis (Becker *et al.* 2011) verwendet. Das Spektrum blauen Lichts

erstreckt sich über einen Wellenlängenbereich von 400–500 nm und im Vergleich zu Studien mit UV-Licht sind die Erkenntnisse über die Effekte des blauen Lichts auf Wundheilungsparameter und deren molekulare Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen, noch weitestgehend unerforscht. Neben einem möglichen zytotoxischen Einfluss sowie seiner modulativen Wirkung auf das Proliferationsverhalten, wurde in der Vergangenheit auch der Einfluss von Blaulichtbestrahlung auf den Differenzierungsprozess von Zellen untersucht.

Die Arbeitsgruppe um Godley und Mitarbeitern publizierte im Jahr 2005, dass die Bestrahlung mit blauem Licht (390–550 nm) in Pigmentepithelzellen zu einer erhöhten ROS-Generierung führt. Dabei detektierten sie in isolierten Mitochondrien nach Blaulichtexposition eine erhöhte Menge an singulett Sauerstoff, Superoxidanion und Hydroxylradikalen (Godley *et al.* 2005). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei dermalen Fibroblasten gemacht. Die Bestrahlung mit monochromatischem blauem Licht der Wellenlängen 410, 415 und 420 nm führte dosisabhängig zu einer erhöhten ROS-Produktion (Opländer *et al.* 2011; Mamalis *et al.* 2015). Im Jahr 2014 untersuchte die Arbeitsgruppe um Taflinski erstmals den Einfluss von blauem Licht auf TGF- β -aktivierte Fibroblasten. Dabei detektierten sie, dass durch die Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 420 nm (ebenfalls dosisabhängig) vermehrt ROS generiert und gleichzeitig die Expression des Myofibroblastenmarkerproteins α -SMA inhibiert wurde (Taflinski *et al.* 2014).

Auf diesen Beobachtungen aufbauend, lag der Fokus meiner aktuellen Arbeit auf die Untersuchung der Auswirkungen von sichtbarem blauem Licht auf wundheilungsrelevante Parameter und die Entschlüsselung des molekularen Mechanismus der Blaulichteffekte. Dazu verwendete ich monochromatisches blaues Licht der Wellenlänge 453 nm, welches bereits in meinen Vorarbeiten (Abschnitt 8.1) zu einer dosisabhängigen Hemmung der Proliferation sowie zu einer Hemmung der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten führte. In dieser Arbeit bestätigen sich die Ergebnisse. Durch eine tägliche Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm konnte ich in TGF- β -aktivierten Fibroblasten zeigen, dass die Expression von α -SMA inhibiert und somit die Ausbildung des Myofibroblasten-Phänotyps verhindert wird (Abbildungen 9 und 10). Diese Beobachtungen wurden von einer erhöhten ROS-Generierung begleitet. Dabei wurde die ROS-Akkumulation nach einmaliger Bestrahlung über einen Zeitraum von 0,5 bis 24 Stunden untersucht, wobei die höchste Menge an ROS bereits eine Stunde nach Bestrahlungsende detektiert werden konnte (Abbildung 11). Ob die durch blaues Licht vermehrt produzierten ROS für die von mir beobachtete Differenzierungshemmung verantwortlich ist, wurde mittels einer zusätzlichen Inkubation der TGF- β -aktivierten Zellen mit Wasserstoffperoxid untersucht (Abbildung 12). Wie auch durch die Bestrahlung mit blauem Licht, führte die Inkubation mit ROS in Form von H_2O_2 zu einer signifikant verminderten Expression

von α -SMA, was bestätigt, dass eine erhöhte Menge an ROS für die Inhibition der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verantwortlich ist (Abbildung 40).

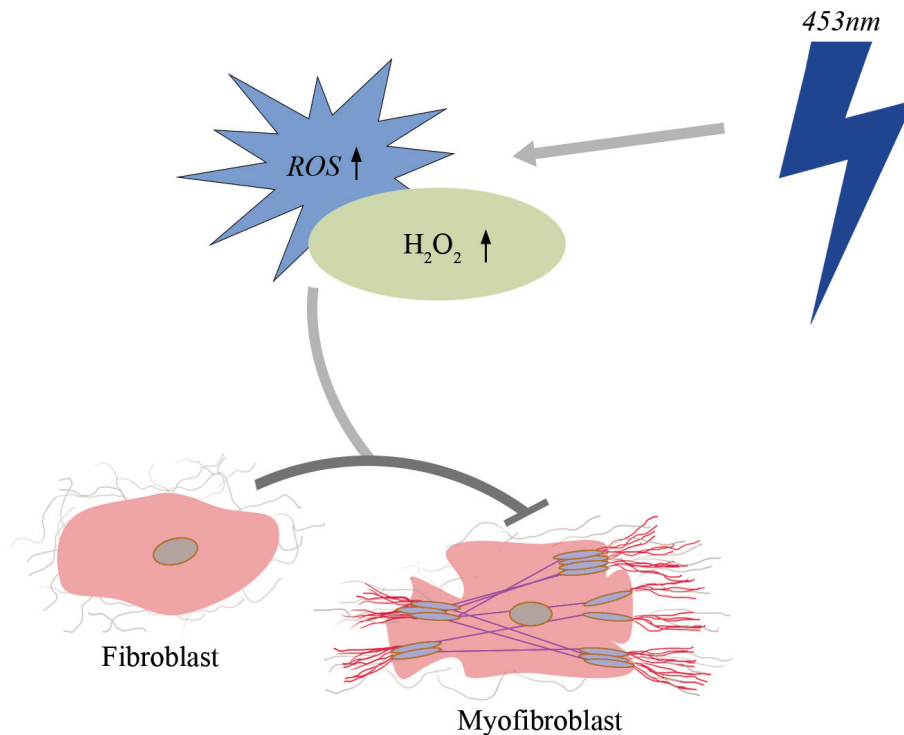


Abbildung 40: Der Effekt von blauem Licht auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Die Bestrahlung von blauem Licht führt zu einer erhöhten ROS-Generierung in Fibroblasten, welche die Differenzierung zu Myofibroblasten inhibiert.

Der Grund für eine unterschiedlich starke ROS-Generierung liegt in den physikalischen Eigenschaften der verwendeten Wellenlängen. Der Wellenlängenbereich von UVA-Strahlung erstreckt sich von ca. 315–400 nm. Verglichen mit dem hohen energetischen Potential der UVB- und UVA-Strahlung (3,26–2,95 Elektronenvolt), ist das energetische Potenzial von blauem Licht weitaus geringer (2,53–2,95 Elektronenvolt). So ist die Wahrscheinlichkeit für eine Absorption der UV-Strahlung durch Photosensibilisatoren und die damit einhergehende ROS-Entstehung durch die Elektronenübertragung auf Sauerstoff wesentlich höher als bei blauem Licht. Dennoch detektierten mehrere Arbeitsgruppen auch eine erhöhte ROS-Generierung in Form von singulett Sauerstoff, Superoxidanionen und Hydroxylradikalen (Godley *et al.* 2005; Opländer *et al.* 2011; Mamalis *et al.* 2015). Dabei verwendeten sie jedoch blaues Licht, dessen Wellenlänge sich nahe zum energetisch höheren UV-Bereich befindet, wie 410, 415 und 420 nm. Da sich innerhalb einer Zelle mehr Photosensibilisatoren für UVA-Licht befinden, kann davon ausgegangen werden, dass die von diesen Arbeitsgruppen vorgestellten Ergebnisse möglicherweise darauf beruhen, dass die Nähe der eingesetzten Wellenlängen zum UVA-Bereich für die erhöhte ROS-Generierung verantwortlich ist. Den Beweis dafür zeigte auch die Gruppe um Opländer und Mitarbeitern. Die Bestrahlung mit höheren Wellenlängen, welche sich entfernter vom UVA-Bereich

befinden (453 und 480 nm), induzierten bei der gleichen Dosis weniger ROS (Opländer *et al.* 2011).

Eine weitere Beobachtung, die nicht außer Acht gelassen werden sollte, ist, dass neben einer Inhibition der Differenzierung durch ROS auch eine mögliche Redifferenzierung der Fibroblasten durch die Bestrahlung respektive Inkubation mit H₂O₂ erzielt werden kann. Nicht nur die Expression in TGF- β -aktivierten Zellen wurde durch die Bestrahlung mit blauem Licht und der zusätzlichen Inkubation mit H₂O₂ gehemmt, auch die nativen Fibroblasten zeigten nach der täglichen Bestrahlung oder Inkubation mit H₂O₂ eine verminderte α -SMA-Expression (Abbildung 12 und Abbildung 13). Der Vorgang der Redifferenzierung von Myofibroblasten zurück zu Fibroblasten ist bisher noch weitestgehend unklar. Kürzlich durchgeführte Studien konstantierten jedoch, dass mehrere antifibrotische Mediatoren, wie MyoD (Hecker *et al.* 2011), Prostaglandin E₂ (PGE₂) (Garrison *et al.* 2013), *fibroblast growth factor* (FGF) (Ramos *et al.* 2010) und *Nuclear factor erythroid 2-related factor2* (Nrf2) (Artaud-Macari *et al.* 2013) über die Fähigkeit verfügen, etablierte Myofibroblasten zu redifferenzieren. Daraufhin wurden weitere Verbindungen identifiziert, wie Capsaicin (Bitencourt *et al.* 2014), S-Nitroso-N-Acetylcystein (Stefano *et al.* 2011), Traubenkernextrakt (GSPs) (Vaid *et al.* 2011) und Kupfer/Zink Superoxiddismutasen (Cu/Zn SOD) (Vozenin-Brotons *et al.* 2001). Da es sich bei einigen Substanzen um Stoffe handelt, die oxidativem Stress entgegenwirken, könnten ROS als Signalmoleküle für die Differenzierung nicht mehr ausreichend vorhanden sein. So scheint die Induktion der Differenzierung stark von der Konzentration der ROS abhängig zu sein. Eine Inhibition der ROS-Generierung und eine zu hohe ROS-Generierung wirken demnach redifferenzierend.

6.2 Die Rolle von Flavinen als Photoakzeptoren für blaues Licht

Endogene Photosensibilisatoren für blaues Licht stellen Flavine dar. Bei ihnen handelt es sich um gelbe Verbindungen mit einer Basisstruktur von 7,8-dimethyl-10-alkylisoalloxanzin, welche in vielen biochemischen Reaktionen als Coenzyme und Photoakzeptoren beteiligt sind und bei 220, 265, 375 und 445 Absorptionsmaxima aufweisen. Da eines dieser Maxima mit der in dieser Arbeit eingesetzten Wellenlänge nahezu identisch ist, stellte sich die Frage, ob die Bestrahlung mit blauem Licht zu einer Änderung der Flavinmoleküle führt.

In Pflanzen ist es schon lange bekannt, dass blaues Licht viele Vorgänge reguliert wie Phototropismus, das Öffnen der Stomata, die Inhibition des Hypokotylwachstums, die Induktion der Blüte, den zirkadianen Rhythmus sowie die lichtabhängige transkriptionale Regulation. Die Blaulicht-Photorezeptoren wie Cryptochrom1, Phototropine und die photoaktivierte Adenylatcyclase (PAC) sind mit Flavinen, wie Flavinmononukleotide (FMN) und Flavindinukleotide, verbunden (Losi 2007). Auch in menschlichen Zellen stellen sie wichtige Co-Faktoren enzymatischer Reaktionen dar,

wie beispielsweise bei den Oxidoreduktasen Succinatdehydrogenase und NOX. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind Flavine fähig Ein- und Zweielektronentransferreaktionen zu katalysieren und je nach Redoxstadium ändert sich auch ihr Absorptionsspektrum. Beruhend auf diesen Erkenntnissen wurde hier auch der Einfluss von Blaulichtbestrahlung auf Flavine untersucht. Zum einen auf die oxidierten Flavinadenindinukleotide in wässriger Lösung (Abbildung 18) und zum anderen auf den intrazellulären Gehalt an oxidierten Flavinen nach einmaliger Blaulichtexposition (Abbildung 19). In wässriger Lösung führte die Blaulichtbestrahlung mit 100 J/cm^2 zu einer Änderung des Absorptionsspektrums. Die Absorptionsmaxima wurden kleiner und charakteristisch für die reduzierte Form von Flavinen. Auch intrazellulär wurde nach einmaliger Bestrahlung eine signifikant verringerte Menge an oxidierten Flavinen detektiert, was ebenso auf eine Reduktion von FAD durch Blaulichtbestrahlung hindeutete.

Ob diese beobachtete Reduktion von Flavinen auch die Aktivität von Enzymen, wie die NADPH-abhängige Oxidoreduktase NOX4 beeinflusst, wurde mittels eines NADP(H) Assays bestimmt, welcher die Gesamtmenge NADP(H) und die Menge an NADPH detektiert und aus deren Differenz die Menge an NADP^+ bestimmt werden kann (Abbildungen 21-28). Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde zusätzlich der Inhibitor DPI eingesetzt, welcher die NOX4 irreversibel bindet. Eine einmalige Bestrahlung mit einer Dosis von 80 J/cm^2 führte eine Stunde nach Bestrahlungsende zu einer signifikant verringerten NADP(H)-Gesamtmenge. Diese Differenz war, wie auch bei der ROS-Detektion (Abbildung 11), nach 24 Stunden wieder ausgeglichen, was auf einen unmittelbaren, wenn auch zeitlimitierten Effekt des Lichtes hindeutet. Die Inkubation der Fibroblasten mit DPI führt zu einem gleichartigen, wenn auch stärkeren Effekt.

Aufschluss über die Aktivität eines NADPH-abhängigen Enzyms gibt die Detektion des zu oxidierenden Substrats NADPH und des Produkts aus dieser Oxidation, das NADP^+ . Wie auch bei dem vorherigen Experiment wurde die Menge an NADPH eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende ermittelt. Nach keinem dieser Messzeitpunkte war eine Abnahme in der NADPH-Menge detektierbar, was signalisiert, dass das für die NADPH-abhängige Oxidoreduktasen erforderliche Substrat nicht verkonsumiert wurde. Die zusätzliche Inkubation mit DPI führt hingegen zu einem anderen Ergebnis (Abbildung 24). Wie zu erwarten war, führt die Behandlung der Fibroblasten mit DPI zu einer gesteigerten NADPH-Menge, da die NOX4 und andere Oxidoreduktasen durch die Inhibition inaktiviert wurden und das Substrat weiterhin nicht mehr oxidiert werden konnte. Dass sich diese Differenz nach 24 Stunden nicht wieder relativierte, liegt, wie oben bereits erwähnt, voraussichtlich an der irreversiblen Hemmung durch DPI.

Die Menge an intrazellulärem NADP^+ wurde durch die Differenz aus der Gesamtmenge an NADP(H) und NADPH mathematisch ermittelt und ebenfalls grafisch aufgetragen (Abbildungen 25 und 26). Im Unterschied zu der Menge an NADPH, war in der

NADP⁺-Menge eine signifikante Abnahme in den lichtexponierten Fibroblasten erkennbar. Sowohl eine als auch vier Stunden nach Bestrahlungsende ist die Quantität an NADP⁺ in Korrelation zu den unbestrahlten Zellen signifikant reduziert. Die zusätzliche Inkubation mit DPI führte ebenfalls zu diesem Effekt, wobei er hier jedoch stärker ausgeprägt und auch nach 24 Stunden noch beständig war. Die geringe Menge an NADP⁺ deutet zwar auf eine Inaktivität der adressierten Enzyme hin, jedoch konnte ich in den vorherigen Experimenten auch zeigen, dass blaues Licht in der Lage ist FAD zu reduzieren. In diesem Fall könnte blaues Licht als Redukter von Flavinen dienen, ohne dass das Substrat verkonsumiert wird, was auf eine Entkopplung dieser Enzyme hindeutet. Besonders in Bezug auf die NOX4 könnte dies die von uns erhöhte ROS-Generierung und die damit einhergehende Inhibition der Differenzierung von Fibroblasten zu Mofibroblasten erklären (Abbildung 41).

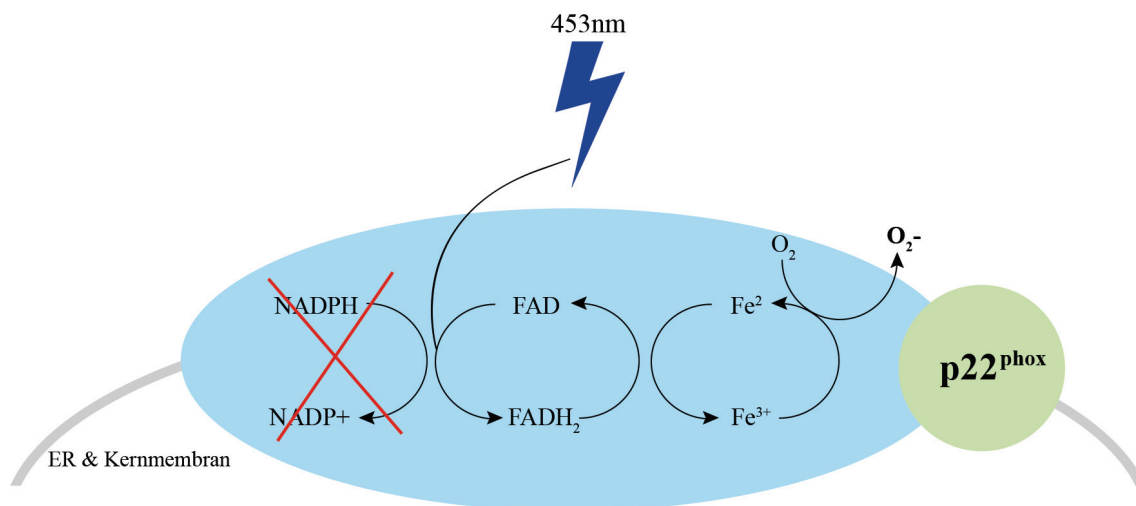


Abbildung 41: Der mögliche Effekt einer Blaulichtbestrahlung von 453 nm auf Oxidoreduktasen am Beispiel der NADPH-Oxidase 4. Durch die Reduktion von Flavinen wird ROS weiterhin generiert, ohne dass das Substrat NADPH oxidiert wird, was auf eine Entkopplung des Enzyms hindeutet.

Diese Hypothese wird auch durch die von mir untersuchte Genexpressionsanalyse der NOX4 bekräftigt (Abbildung 20). Nach einer vierstündigen Inkubation mit TGF- β konnte bereits eine tendenziell erhöhte NOX4-Genexpression in den TGF- β -aktivierten Zellen detektiert werden. Nach 24 Stunden war diese Expression noch um ein Vielfaches erhöht; sowohl in den bestrahlten Zellen als auch in den zusätzlich mit TGF- β -aktivierten Zellen. Folglich hat die Bestrahlung keinen Einfluss auf die NOX4-Genexpression. Da es sich bei der NOX4 um ein konstitutiv aktives Protein handelt (Bedard und Krause 2007), kann die Inhibition der α -SMA-Expression aufgrund von Expressionsunterschieden in diesem Fall ausgeschlossen werden.

Die hier gewonnenen Ergebnisse sind dennoch auch kritisch zu betrachten. So handelt es sich bei dem hier eingesetzten Wirkstoff DPI um einen verhältnismäßig unspezifischen Inhibitor, dessen gebildetes Radikal an die Flavingruppe der

Elektronentransporter-Proteine bindet (O'Donnell *et al.* 1993). So inhibiert er nicht nur die NADPH-Oxidasen; vielmehr hat er auch Einfluss auf Enzyme, wie die NO Synthase (Stuehr *et al.* 1991), Xanthin Oxidase (Doussière und Vignais 1992), den mitochondrialen Komplex I (Li und Trush 1998) und die Cytochrom P-450 Reduktase (O'Donnell *et al.* 1994). Da diese Enzyme, wie auch Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPD) (Orr *et al.* 2012), das elektrontransferierende Flavoprotein/ETF:Q-Oxidoreduktase-System (ETF/ETF:QOR) (Seifert *et al.* 2010), die Prolin Dehydrogenase (White *et al.* 2007) und die Dihydroorotat-Dehydrogenase (Forman und Kennedy 1975) alle Flavine als Elektronenüberträger integrieren und durch diese Elektronenübertragung ROS generiert werden, muss in weiteren Arbeiten sowohl ein spezifischer Inhibitor gewählt werden als auch die oben genannten Enzyme auf Blaulichteffekte untersucht werden.

Der Literatur zufolge wirkt der Einsatz von Antioxidantien einer Überproduktion von ROS entgegen, um den Organismus vor oxidativem Stress zu schützen. Zur Klärung der Möglichkeit, ob der Einsatz von Antioxidantien die Differenzierungshemmung durch die Bestrahlung möglicherweise aufhebt, wurden Fibroblasten zusätzlich mit Glutathion (GSH) und N-Acetylcystein (NAC) behandelt (Abbildung 14 und Abbildung 15).

Bei GSH handelt es sich um ein Tripeptid, welches eine kritische Rolle in der Regulation diverser zellulärer Funktionen spielt, inklusive der DNA-Synthese und anderer endogener Bestandteile, der Modulation der Genexpression sowie der Regulation des Zellzyklus. Die wohl wichtigste Funktion von GSH besteht in der antioxidativen Abwehr. Es ist in der Lage, Wasserstoffperoxid und Lipidperoxid durch Glutathionperoxidase(GPx)-katalysierte Reaktionen zu reduzieren. Bei NAC handelt es sich um einen synthetisch hergestellten Abkömmling der Aminosäure Cystein. Wie auch GSH, ist eine der wichtigsten Funktionen von NAC die antioxidative Abwehr, indem es die GSH-Synthese induziert.

Aus den von mir durchgeführten Experimenten lässt sich eine Wirkung der Antioxidantien auf eine mögliche Aufhebung der Differenzierungshemmung allerdings nicht beobachten. Die zusätzliche Inkubation mit GSH/NAC führte weder nach drei noch nach sechs Behandlungstagen zu einer gesteigerten α -SMA-Expression in bestrahlten und aktivierten Fibroblasten (Abbildung 14 und Abbildung 15).

Bisher ist die Wirkung von Antioxidantien gegen ROS in mit blauem monochromatischem Licht bestrahlten Zellen noch weitestgehend unerforscht. In der Studie von Tyrrell und Pidoux aus dem Jahr 1986 wurde präsentiert, dass die Depletion von GSH in dermalen Fibroblasten zu einer Sensitivierung gegen Bestrahlung mit sichtbarem Licht, UVA und UVB führt (Tyrrell und Pidoux 1986), was bestätigt, dass GSH in der antioxidativen Abwehr in Fibroblasten von essentieller Bedeutung ist. Im Jahr 1997 zeigten Emonet und Mitarbeiter ebenfalls in dermalen Fibroblasten, dass eine Zugabe von NAC UVA-induzierte DNA-Schäden reduzieren kann (Emonet *et al.* 1997). Auch die Arbeitsgruppe um Morley untersuchte im Jahr 2003 die Wirkung von NAC in humanen Fibroblasten und auch sie beobachteten eine Reduktion von DNA-

Schäden nach Bestrahlung (Morley *et al.* 2003). Doch viele dieser Ergebnisse beruhen auf der Induktion von oxidativem Stress mittels UV-Licht, welches in der Lage ist, direkte DNA-Schäden zu verursachen.

Die Arbeitsgruppe um Liebmann und Mitarbeiter beobachtete unter der Verwendung von blauem Licht einen ähnlichen Effekt wie in dieser Arbeit. Auch sie konnten mit Hilfe von Sauerstoffradikalfängern wie Vitamin C und Natriumazid keinen positiven Effekt in Endothelzellen erzielen (Liebmann *et al.* 2009).

Ein Faktor für die Unwirksamkeit von GSH könnte das Flavin-Adenin-Dinukleotid darstellen, welches, wie bereits oben erwähnt, einen Photoakzeptor für blaues Licht darstellt. Im antioxidativen Schutzsystem spielt es eine essentielle Rolle, da es in der Glutathion-Reduktase integriert ist und durch die Übertragung des Radikals auf das Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP) recycelt wird. Eine Störung in diesem System könnte möglicherweise zu einem Funktionsverlust führen und die Zelle wäre nicht in der Lage GSH selbst zu generieren. Bei der hohen Menge an ROS, die in dieser Arbeit nach Lichtexposition detektiert wurden, müsste für den Ausgleich des oxidativen Stresses die Menge an Antioxidantien möglicherweise höher konzentriert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die Zugabe von Antioxidantien keinen Effekt auf die Differenzierungsinhibition durch blaues Licht erzielte, untersuchte ich die Auswirkungen von blauem Licht auf die Expression der Catalase. Bei ihr handelt es sich um ein Tetramer mit einer Ferriprotoporphyrin-Gruppe an jeder Untereinheit und sie ist vorwiegend in den Peroxisomen lokalisiert. Neben der Superoxid Dismutase (SOD) und der Glutathion Peroxidase (GPx) spielt die Catalase durch die Metabolisierung von H_2O_2 zu H_2O und O_2 ebenfalls eine essenzielle Rolle in der antioxidativen Abwehr.

So wurde gezeigt, dass sich die Balance zwischen der Expression der Cu/Zn SOD und der Catalase auf die Sensibilität zu oxidativem Stress in Maus-Epidermiszellen auswirken kann. Diese Hypersensitivität aufgrund einer Überexpression der Cu/Zn SOD wird indes durch einen simultanen Anstieg der Catalase und GPx korrigiert (Amstad *et al.* 1991). Die Arbeitsgruppe um Hussain untersuchte ebenfalls die Rolle der Catalase im Zusammenspiel mit p53, MnSOD und GPx. Dabei zeigte sie, dass der Gen-Knockout von p53 sowohl zu einer erhöhten Expression der MnSOD- und GPx-Proteine/Gene als auch zu einer erhöhten Aktivität derer führt. Der Proteingehalt der Catalase blieb hingegen unverändert (Hussain *et al.* 2004).

Meine Beobachtungen ergaben eine und vier Stunden nach Bestrahlungsende keine signifikanten Differenzen in der Catalase-Proteinexpression (Abbildungen 16 und 17). Nach 24 Stunden konnte ich allerdings entgegen der Erwartungen in Korrelation zu der ROS-Generierung sowohl in den bestrahlten als auch in den unbestrahlten und TGF- β -

aktivierten Fibroblasten eine signifikant verringerte Catalase-Proteinexpression beobachten.

Eine mögliche Hypothese für diese Beobachtungen könnte eine erhöhte Menge an oxidierten Proteinen nach Lichtexposition darstellen. Reaktive Sauerstoffspezies verursachen Modifikationen in den Aminosäuren von Proteinen, welche in funktionelle Änderungen von Struktur- und enzymatischen Proteinen resultieren (Stadtman 1992). Eine ähnliche Beobachtung machte auch die Arbeitsgruppe um Sander im Jahr 2002, indem sie die Auswirkungen von Licht auf die Haut *in vivo* untersuchten.

Dabei ermittelten sie unter anderem die Menge an Catalase nach 10-tägiger UV-Lichtbestrahlung. So detektierten sie, dass die Menge an Catalase in lichtexponierter Haut signifikant verringert ist; die Menge an oxidierten Proteinen hingegen besonders in der Dermis signifikant erhöht ist (Sander *et al.* 2002).

Die Arbeitsgruppe um He *et al.* untersuchte die Catalase-Genexpression in dermalen Fibroblasten unter Einfluss von exogenem Wasserstoffperoxid (He *et al.* 2014). Sie beobachteten eine Abnahme der Catalase-Expression nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid.

So ist die von mir identifizierte Erhöhung der ROS-Generierung in Form von Wasserstoffperoxid ursächlich für die Inhibition der Catalase-Expression. Ein mögliches Ungleichgewicht in der Expression von antioxidativen Enzymen, wie der Catalase und der Cu/Zn SOD und ein erhöhter oxidativer Stress durch die Blaulichtbestrahlung, könnte in oxidative Proteinschäden resultieren, was zu einem negativen *feedback-loop* und somit zu einer verringerten Catalase-Proteinexpression führen könnte.

6.2 Der Einfluss von blauem Licht auf weitere Parameter der TGF- β -Signalkaskade

Wie bereits erwähnt, gehört TGF- β neben PDGF, Angiotensin II und CTGF, zu den Wachstumsfaktoren, welche mit der Myofibroblastendifferenzierung assoziiert sind (Hinz 2007). Es spielt *in vitro* und bei vaskulären Erkrankungen eine prädominante Rolle in der Fibroblastenaktivierung und Matrixsynthese (Abbate *et al.* 2002; Shi *et al.* 1996). Bei der Signaltransduktion ist eine Vielzahl diverser Enzyme beteiligt, welche über unterschiedliche Wege die Expression der Myofibroblastenmarkerproteine steuern. In diesem Abschnitt wird der Einfluss von blauem Licht und der damit einhergehenden ROS-Generierung auf eine mögliche redox-Sensitivität dieser Moleküle analysiert.

Zunächst wurde die Expression der TGF- β -Rezeptoren I und II unter dem Einfluss von blauem Licht respektive TGF- β -Aktivierung nach drei und sechs Behandlungstagen untersucht (Abbildungen 29-32). TGF- β übt seine Wirkung auf der Zelloberfläche durch die Bindung an TGF- β -Rezeptor Typ-II aus und nachfolgend durch die Phosphorylierung der Rezeptor Typ-I-(ALK 5)-Untereinheit mit der anschließenden Bildung eines heterodimeren Komplexes. Beide, TGF- β -Rezeptor Typ-I und Typ-II, disponieren über eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität, welche das Signal über einen kanonischen Weg durch die Proteine der SMAD Familie weiterleiten (Derynck und Zhang 2003; Evans *et al.* 2003). In Fibroblasten wird die Regulation der α -SMA-Transkription und Myofibroblastendifferenzierung durch die Typ-I-Rezeptor-übermittelte Phosphorylierung der SMAD2/3 Proteine, welche mit SMAD4 komplexieren, in den Kern translozieren und dort an die Promotorregion des α -SMA Gens binden, gesteuert (Hinz 2007).

Mittels der durchflusszytometrischen Analyse untersuchte ich die Anzahl an TGF- β -Rezeptor-positiven Zellen und bereits nach drei Tagen war die Menge an ALK 5-positiven Zellen, welche mit TGF- β aktiviert wurden signifikant erhöht (Abbildung 29). Die tägliche Bestrahlung mit blauem Licht führte dabei zu keinem hemmenden Effekt der Rezeptorexpression, sie ist im Vergleich zu den ausschließlich mit TGF- β -aktivierten Zellen sogar gesteigert. Weder die Bestrahlung noch die Aktivierung mit TGF- β führte hingegen zu einer Differenz in der Rezeptor-Typ-II-Expression.

Bei TGF- β handelt es sich um das potenteste profibrotische Zytokin. Sowohl die mRNA als auch die Proteinexpression von TGF- β ist in profibrotischen Erkrankungen in nahezu allen Organen erhöht (Broekelmann *et al.* 1991; Bergeron *et al.* 2003; Bataller und Brenner 2005; Tzortzaki *et al.* 2007), was mit einer Zunahme an ROS einhergeht und in einer Vielzahl von Studien bereits beschrieben wurde (Thannickal und Fanburg 1995; Yoon *et al.* 2005; Sturrock *et al.* 2006).

Die hier gesteigerte Rezeptorexpression in den bestrahlten Fibroblasten könnte in der vermehrten ROS-Generierung begründet sein. So wird die Aktivierung von ALK 5 negativ (dephosphorylierend) durch die Protein Phosphatase I (PP1) und PP2A reguliert

(Itoh und Dijke 2007). Es ist bewiesen, dass diese Proteine redox-sensitiv sind und durch die Inkubation mit ROS wie H_2O_2 inaktiviert werden können (Kim *et al.* 2003). Diese Inaktivierung führt folglich zu einer ALK 5-Aktivierung und einer erhöhten SMAD-Phosphorylierung.

Eine weitere Erklärung für die erhöhte Rezeptorexpression ist womöglich auch die Reaktion einer vermehrten Aktivierung von latentem TGF- β . Dabei wurden zwei potenzielle Mechanismen beschrieben. Zum einen die direkte Aktivierung durch die Oxidation von LAP und zum anderen eine Indirekte über die Aktivierung von MMP's, wie MMP-2 und MMP-9, welche wiederum LAP abspalten, um aktives TGF- β freizusetzen (Barcellos-Hoff und Dix 1996; Wang und Kochevar 2005).

Neben der Aktivierung von TGF- β ist ROS auch in der Lage die Expression und Sekretion von TGF- β zu stimulieren (Bellocq *et al.* 1999), was ebenfalls die Ursache für eine verstärkte Rezeptorexpression sein könnte. Um dies herauszufinden, müsste in weiteren Arbeiten die Menge an intrazellulär latentem und aktivem TGF- β nach Bestrahlung bestimmt werden. Die in Abbildung 40 dargestellte Grafik gibt einen hypothetischen Entwurf für die von mir beobachtete Erhöhung von ALK 5 nach Bestrahlung.

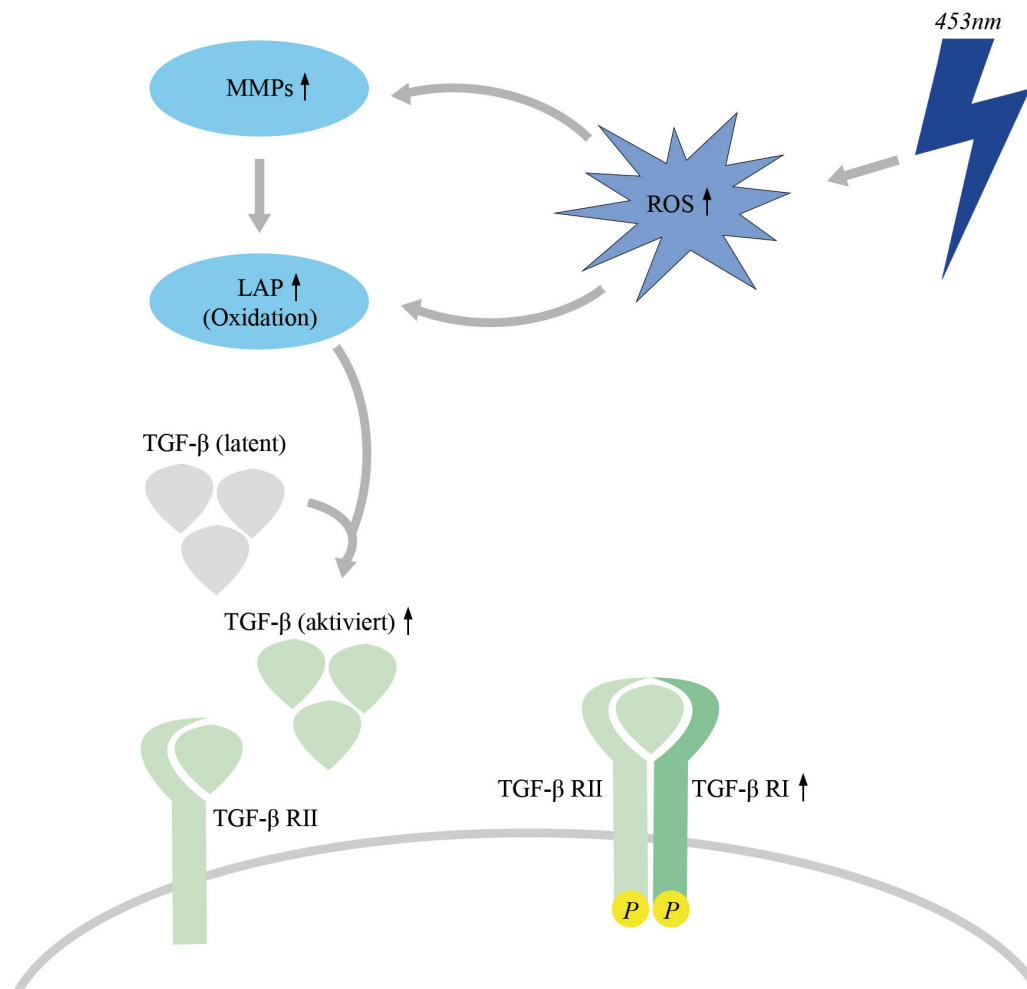


Abbildung 42: Der Effekt von blauem Licht auf die TGF- β -Rezeptorexpression. Aufgrund der hohen ROS-Generierung durch blaues Licht könnte die hohe Expression des Typ-I-Rezeptors in einer Aktivierung der MMPs oder einer direkten Oxidation des LAP begründet sein.

Neben dem Matrixprotein Kollagen Typ-VI ist das EDA-Fibronektin *in vitro* und in Erkrankungen eng mit der Myofibroblastendifferenzierung assoziiert (Hinz 2007). TGF- β reguliert die Expression von EDA-Fibronektin (Borsi *et al.* 1990), welches elementar für die Myofibroblastendifferenzierung und α -SMA-Expression ist (Serini *et al.* 1998). Aufgrund dieser Relevanz analysierte ich die Proteinexpression von EDA-FN nach drei- und sechstägiger TGF- β -Aktivierung und/oder Blaulichtexposition (Abbildung 33). Native Fibroblasten, welche nicht mit TGF- β aktiviert wurden, weisen nach drei- und sechstägiger Bestrahlung nur eine sehr geringe Menge an EDA-FN auf, wobei eine zusätzliche Bestrahlung nach sechs Tagen zu der geringsten EDA-FN-Expression führte. Anlehnend an die Literatur wurde die Erwartung bestätigt, dass die Aktivierung mit TGF- β eine signifikant gesteigerte EDA-FN-Expression initiiert (Borsi *et al.* 1990). Dabei inhibiert die Bestrahlung mit 453 nm die Expression nur tendenziell, jedoch nicht signifikant. In Relation zu der von uns beobachteten Hemmung der α -SMA-Expression durch Blaulichtbestrahlung, respektive der dadurch gebildeten ROS, hat die Bestrahlung in diesem Zusammenhang keinen Einfluss auf die EDA-FN-Expression.

Die SMAD-Proteine sind bei der Myofibroblastendifferenzierung innerhalb des TGF- β -Signalwegs die zentralen Signalübermittler. Dabei aktiviert der phosphorylierte Rezeptor Typ-I das SMAD2 und/oder SMAD3, welche ihrerseits einen heterodimerischen Komplex mit SMAD4 bilden, in den Kern translozieren und dort an die Promoterregionen der zu regulierenden Gene binden.

Die Intention in dieser Arbeit war es zu prüfen, ob die Bestrahlung mit blauem Licht und die damit einhergehende ROS-Generierung die Expression des (p)SMAD3-Proteins beeinflusst. So wurden dermale Fibroblasten, wie auch in den vorangegangenen Versuchen, einmalig bestrahlt und/oder mit TGF- β aktiviert. Anschließend wurde die Proteinexpression von (p)SMAD3 eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende bestimmt (Abbildung 34). Sowohl die Proteinexpression von SMAD3 als auch von phosphoryliertem SMAD3 war nach einer und vier Stunden in den TGF- β -aktivierten Fibroblasten tendenziell erhöht.

Studien an Fibroblasten aus dem Herzen, der Lunge und der Niere zeigten, dass NOX4 die zentrale Schaltstelle in der TGF- β -induzierten ROS-Generierung und Myofibroblastendifferenzierung über SMAD-Proteine darstellt. So wurde belegt, dass in kardialen oder pulmonaren Fibroblasten die TGF- β -induzierte Transition zu α -SMA-positiven Fibroblasten von der Regulation der SMAD2/3-Proteine durch die NOX4-vermittelte ROS-Generierung abhängig ist (Hecker *et al.* 2009; Cucoranu *et al.* 2005). In einer anderen Studie von Sturrock und Mitarbeitern im Jahre 2006 wurden glatte Muskelzellen der pulmonaren Arterie im Hinblick auf die NOX4 untersucht. Hier hatte der Einsatz von siRNA gegen NOX4, konträr zu den Ergebnissen von Hecker *et al.* und Cucoranu *et al.*, keinen Einfluss auf die SMAD3-Expression.

Der Einsatz von Wasserstoffperoxid in Hautfibroblasten führte in einer Studie von He und Mitarbeitern zu einer verringerten Expression von SMAD3, was die tendenzielle

Reduktion der SMAD3-Expression in meinen Ergebnissen und die Hypothese, dass ROS die TGF- β -Signaltransduktion inhibiert, bestätigt (He *et al.* 2014).

Neben der 52 kDa SMAD3-Proteinbande wurde eine zusätzliche zweite Bande bei ca. 30 kDa detektiert. Im Unterschied zu der Expression von SMAD3 bei 52 kDa beobachtete ich hier eine signifikant erhöhte Expression von SMAD3 und pSMAD3 in den bestrahlten Fibroblasten eine Stunde und vier Stunden nach Bestrahlungsende (Abbildung 35). Bei dieser Bande könnte es sich um eine gekürzte Isoform von SMAD3 handeln.

Eine mögliche Begründung für diese starke Expression durch die Bestrahlung könnte eine verstärkte Activinexpression sein. Bei Activinen handelt es sich um Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, welche ihre Bezeichnung durch die Identifikation ihrer regulatorischen Eigenschaften des Hypophysenhormons *Follicle-stimulating-hormone* (FSH) erhielten. Activin A und B agieren über ein klassisches TGF- β Serin/Threonin-Kinase-System durch die aktivinspezifischen Rezeptoren (ActRIIA/B und ActRI). Anschließend phosphorylieren sie, wie auch TGF- β , die Proteine SMAD2/3, welche einen heterodimeren Komplex mit SMAD4 bilden und in den Kern translozieren. Wie auch TGF- β kann Activin alternative Signalwege, wie MAP-Kinase-Signalwege (ERK1/2, JNK und p38 MAPK) aktivieren (Cocolakis *et al.* 2001; Ogihara *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2005). Eine Überexpression von Activin korreliert mit der Bildung von fibrotischen Ereignissen (Munz *et al.* 1999).

In einer Studie von Kim und Mitarbeitern, in welcher der Einfluss von Activin auf die Expression von SMAD-Proteinen untersucht wurde, wurde ebenfalls eine dominante Proteinbande bei 30 kDa beobachtet. Dabei untersuchten sie die Expression dieser Isoform in verschiedenen Zelltypen und konnten feststellen, dass die Inkubation von Mäuse-Hypophysenzellen mit Activin zu einer verstärkten Expression der SMAD-Isoform führt (Kim *et al.* 2011). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass auch oxidativer Stress die Freisetzung von Activin A in humanen Plazenta- und Endothelzellen, jedoch nicht in Monozyten induziert (Mandang *et al.* 2007).

Ob die von mir beobachtete Expression der SMAD3-Isoform durch eine erhöhte Expression von Activin aufgrund von oxidativem Stress durch Blaulichtbestrahlung resultiert, bedarf weiterer Untersuchungen.

Neben der Signalweiterleitung über SMAD-Proteine, ist TGF- β auch in der Lage über andere Kinase-Signalwege zu agieren, so über ERK1/2- und p38-vermittelte Signalwege. So zeigte die Arbeitsgruppe um Hu im Jahre 2006 an fetalen Lungenfibroblasten, dass die Inkubation mit TGF- β zu einer erhöhten Aktivität der p38-Kinase und ERK führt. Die Induktion der α -SMA-Expression konnte mithilfe von Inhibition dieser beiden Kinasen gehemmt werden, was demonstriert, dass die MAP-Kinasen neben des SMAD-Signalwegs für den Differenzierungsprozess von relevanter Bedeutung sind (Hu *et al.* 2006). Aufgrund dieser Tatsache untersuchten wir die

Expression dieser beiden Proteine in Fibroblasten unter Einfluss von Blaulichtbestrahlung und/oder TGF- β -Aktivierung (Abbildung 36 und 37).

Die Bestrahlung mit blauem Licht hat, wie in der Abbildung 36 dargestellt, sowohl einen hemmenden Einfluss auf die Expression von ERK1/2 als auch auf dessen phosphorylierte Form. Diese beobachtete Hemmung der Expression nivelliert sich 24 Stunden nach Bestrahlungsende, homolog zu der von mir beobachteten ROS-Generierung, welche nach 24 Stunden ebenfalls nicht länger erhöht war. Doch welcher Zusammenhang besteht zwischen ROS und den MAP-Kinasen ERK1/2 und p38?

Sowohl der ERK1/2-Signalweg als auch der p38-Signalweg sind redox-sensitiv und in zahlreichen Studien wurde bereits beschrieben, dass ROS den fibrotischen Effekt durch TGF- β vermittelt, was die Aktivität der MAPK-Signalwege moduliert (Vayalil *et al.* 2007; Sturrock *et al.* 2006). Bisher ist noch nicht bekannt, ob ROS in der Lage sind MAP-Kinasen direkt zu oxidieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Proteinphosphatasen über die Oxidation von Cysteinresten im aktiven Zentrum durch ROS inaktiviert werden können, was mit einer anhaltenden MAP-Kinase-Aktivität einhergeht.

So zeigte die Arbeitsgruppe um Foley im Jahre 2004, dass die Inkubation von Rattenhirnzellen mit H₂O₂ zu einer verringerten MAPK-Phosphataseaktivität führt. Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit GSH konnte diesen Effekt nicht aufheben, sie verstärkte diesen Effekt sogar (Foley *et al.* 2004).

Einen gegensätzlichen Effekt, welcher meine Ergebnisse bestätigt, beobachtete Schroder und Mitarbeiter in humanen und murinen Adipocyten. Die Überexpression der NOX4 – und somit eine gesteigerte ROS-Generierung – verringert die Phosphorylierung von ERK1/2 und demzufolge steigert die Herunterregulierung der NOX4 die Phosphorylierung von ERK1/2, was möglicherweise durch die Expression der MKP-1 reguliert wird. Somit wurde gezeigt, dass die NOX4 die MKP-1-Expression induziert (Schroder *et al.* 2009).

Da ERK1/2 im Normalfall die Proliferation fördert, bestätigen diese Beobachtungen auch die Ergebnisse meiner Vorarbeiten. Demzufolge könnte eine erhöhte Generierung von ROS durch eine mögliche Entkopplung der NOX4 zu einer erhöhten MKP-1 Expression führen, welche wiederum die MAP-Kinasen dephosphorylieren. Die gehemmte Proliferation von Fibroblasten sowie die verringerte Expression von (p)ERK1/2 in den bestrahlten Fibroblasten könnte dadurch erklärt werden.

Dies widerspricht jedoch auch gewonnenen Erkenntnissen über die Rolle von ERK1/2 im Zusammenspiel mit ROS innerhalb der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. So wurde in humanem pulmonarem Epithel gezeigt, dass die NOX4 ERK1/2 aktiviert und dadurch die MMP-1-Expression fördert (Amara *et al.* 2007).

Neben ERK1/2 wurde des Weiteren die Expression von (p)p38 untersucht (Abbildung 37), welches ebenfalls ein Mitglied der MAP-Kinase Familie repräsentiert.

Wie auch in den vorherigen Experimenten, wurde die Expression von (p)p38 eine, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende detektiert. Die einmalige Bestrahlung führte vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende zu einer verminderten Expression von (p)p38, wobei dieser inhibitorische Effekt bei der phosphorylierten Form des Proteins am stärksten ausgeprägt war.

Neben ERK1/2 regulieren die bereits genannten MAP-Kinase Phosphatasen auch p38. So wurde in primären embryonalen Fibroblasten der Maus mit fehlender MKP-1 festgestellt, dass p38 als Reaktion auf Serum, osmotischen Stress und Anisomycin hyperaktiviert wird (Wu und Bennett 2005). Eine mögliche Erklärung könnte, wie oben bereits erwähnt, die Redox-Sensitivität der MKP-1 sein. Die durch die Blaulichtbestrahlung erhöhte Generierung von ROS könnte mit einer erhöhten Expression der MKP-1 einhergehen, welche wiederum p38 dephosphoryliert.

Dies würde den von Kefaloyianni und Mitarbeitern gewonnenen Ergebnissen jedoch widersprechen. So zeigte er im Jahre 2006, dass die Inkubation von skelettalen Myoblasten mit H_2O_2 zu einer dosis- und zeitabhängigen Aktivierung von ERK1/2 und p38 führt (Kefaloyianni *et al.* 2006).

In einer weiteren Studie von Park und Mitarbeitern im Jahre 2010 wurde ebenfalls eine erhöhte p38- und ERK-Phosphorylierung sowie eine erhöhte Expression von α -SMA und Fibronectin nach γ -Bestrahlung in Lungenfibroblasten detektiert, welche positiv mit der Expression der NOX4 korrelierte (Park *et al.* 2010).

Da beide MAP-Kinasen ATP als Substrat benötigen, wurde ebenso der Einfluss der Blaulichtbestrahlung auf die Menge an intrazellulärem ATP untersucht (Abbildung 38). Eine einmalige Bestrahlung mit 80 J/cm^2 führte dabei sowohl in nativen Fibroblasten als auch in aktivierten Fibroblasten zu einer signifikanten Reduktion an intrazellulärem ATP über einen Zeitraum von bis zu vier Stunden nach Bestrahlungsende. Diese Beobachtungen könnten die von mir detektierte Inhibition der ERK1/2-Expression begründen. So detektierten Lu und Insel in diesem Zusammenhang eine erhöhte Expression von α -SMA und ERK1/2 unter der zusätzlichen Inkubation mit ATP bei cardialen Rattenfibroblasten (Lu und Insel 2013). Die fehlende Energie in Form von ATP ist somit möglicherweise die Ursache für eine verminderte Expression von ERK1/2.

Die geringe Menge an ATP ist möglicherweise auf eine Unterbrechung des Elektronentransports innerhalb der Atmungskette zurückzuführen. Wie bereits erwähnt, existieren in der Säugerzelle eine Vielzahl von flavinhaltigen Proteinen, welche mitunter auch in der Atmungskette lokalisiert sind. Dazu zählt auch die Succinatdehydrogenase (SDH; Komplex II). Aus der Literatur (Ahmad *et al.* 2004; Ahmad *et al.* 2005; Ahmad *et al.* 2006) und unseren Beobachtungen (Abschnitt 5.4) geht hervor, dass blaues Licht in der Lage ist Flavine (auch intrazellulär) zu reduzieren. In Relation zu der Generierung von ROS galt der Komplex II bislang als nicht

signifikanter Mitwirkender; vielmehr gehören die Komplexe I und III zu den wichtigsten mitochondrialen Superoxid-Produzenten (Murphy 2009; Brand 2010).

Die Arbeitsgruppe um Quinlan zeigte im Jahr 2012, dass auch der Komplex II in der Lage ist ROS zu generieren; sowohl bei der Vorwärts- als auch bei der Rückwärtsreaktion (Quinlan *et al.* 2012). Die anschließende Reduktion von Ubichinon zu Ubihydrochinon benötigt zwei Protonen vom zuvor oxidierten FADH_2 . Fehlübertragungen von Elektronen könnten in diesem Zusammenhang die Hemmung der ATP-Synthese und die erhöhte ROS-Generierung erklären, welche schlussfolgernd auch zur Inhibition der Myofibroblastengnese führen könnte.

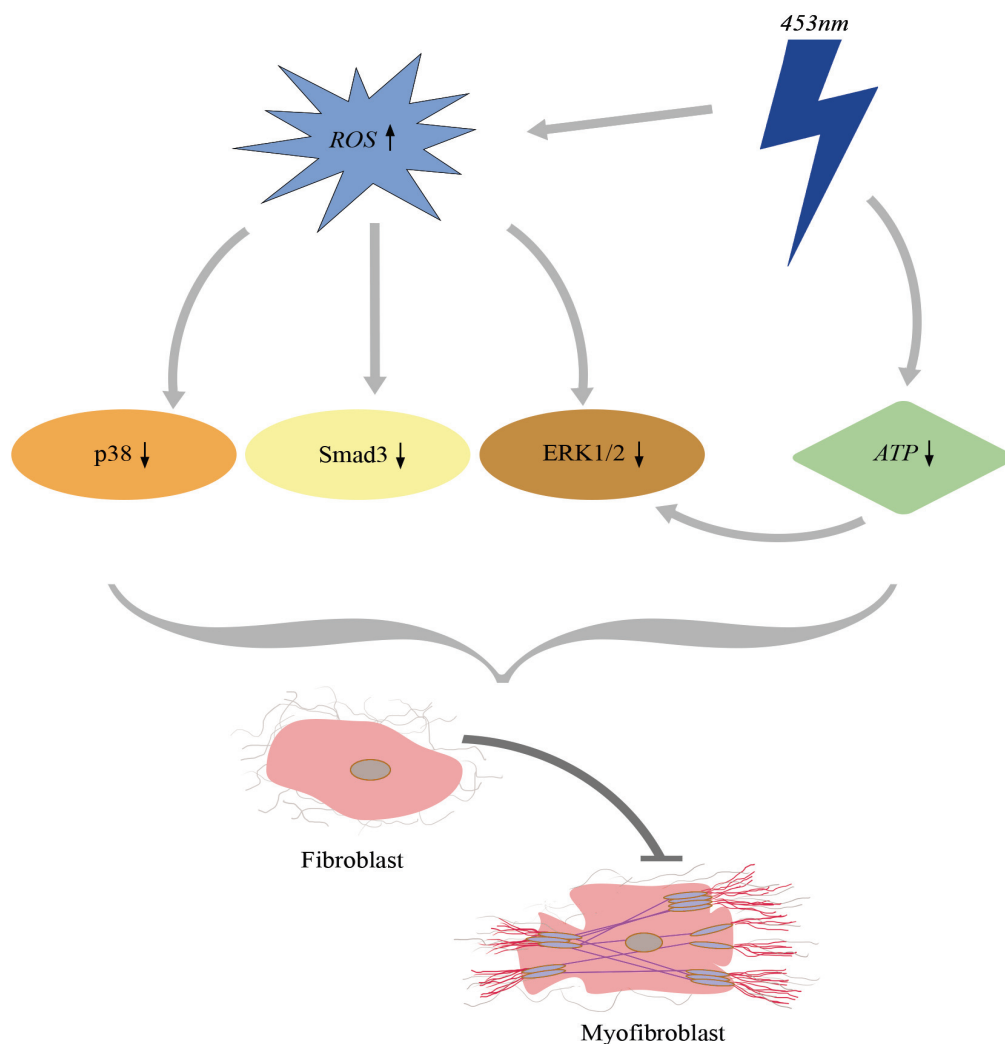


Abbildung 43: Der Einfluss von blauem Licht auf Proteine der TGF-β-Signalkaskade. Die Expression der Proteine Smad3 (tendenziell), p38 sowie ERK1/2 werden durch die Bestrahlung mit blauem Licht gehemmt, was auf eine erhöhte ROS-Generierung zurückgeführt werden könnte. Außerdem ist die Menge an ATP nach Blaulichtbestrahlung verringert, was die Aktivierung von MAP-Kinasen wie die ERK1/2 hemmt. Die verminderte Expression dieser Proteine innerhalb der TGF-β-Signalkaskade hemmt voraussichtlich die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten.

7 Literatur

- Abbate, M., C. Zoja, D. Rottoli, D. Corna, S. Tomasoni und G. Remuzzi. "Proximal Tubular Cells Promote Fibrogenesis by Tgf-B1-Mediated Induction of Peritubular Myofibroblasts." *Kidney Int* 61, no. 6 (2002): 2066-77.
- Abe, Riichiro, S. C. Donnelly, T. Peng, R. Bucala und C. N. Metz. "Peripheral Blood Fibrocytes: Differentiation Pathway und Migration to Wound Sites." *The Journal of Immunology* 166, no. 12 (2001): 7556-7562.
- Ahmad, I., Q. Fasihullah, A. Noor, I. A. Ansari und Q. N. Ali. "Photolysis of Riboflavin in Aqueous Solution: A Kinetic Study." *Int J Pharm* 280, no. 1-2 (2004): 199-208.
- Ahmad, I., Q. Fasihullah und F. H. Vaid. "Effect of Phosphate Buffer on Photodegradation Reactions of Riboflavin in Aqueous Solution." *J Photochem Photobiol B* 78, no. 3 (2005): 229-34.
- Ahmad, I., Q. Fasihullah und F. H. Vaid. "Effect of Light Intensity und Wavelengths on Photodegradation Reactions of Riboflavin in Aqueous Solution." *J Photochem Photobiol B* 82, no. 1 (2006): 21-7.
- Amara, Nadia, R. Bachoual, M. Desmard, S. Golda, C. Guichard, S. Lanone, M. Aubier, E. Ogier-Denis und J. Boczkowski. "Diesel Exhaust Particles Induce Matrix Metalloprotease-1 in Human Lung Epithelial Cells Via a Nadp (H) Oxidase/Nox4 Redox-Dependent Mechanism." *American Journal of Physiology-Lung Cellular und Molecular Physiology* 293, no. 1 (2007): L170-L181.
- Ambasta, R. K., P. Kumar, K. K. Griendling, H. H. Schmidt, R. Busse und R. P. Brundes. "Direct Interaction of the Novel Nox Proteins with P22phox Is Required for the Formation of a Functionally Active Nadph Oxidase." *J Biol Chem* 279, no. 44 (2004): 45935-41.
- Amstad, P., A. Peskin, G. Shah, M. Edouard Mirault, R. Moret, I. Zbinden und P. Cerutti. "The Balance between Copper-Zinc Superoxide Dismutase und Catalase Affects the Sensitivity of Mouse Epidermal Cells to Oxidative Stress." *Biochemistry* 30, no. 38 (1991): 9305-9313.
- Annes, J. P., J. S. Munger und D. B. Rifkin. "Making Sense of Latent Tgf β Activation." *Journal of cell science* 116, no. 2 (2003): 217-224.
- Apfelberg, D. B., M. R. Maser, H. Lash Dds, D. White und J. Weston. "Preliminary Results of Argon und Carbon Dioxide Laser Treatment of Keloid Scars." *Lasers in surgery und medicine* 4, no. 3 (1984): 283-290.
- Artaud-Macari, E., D. Goven, S. Brayer, A. Hamimi, V. Besnard, J. Marchal-Somme, Z. E. Ali, B. Crestani, S. Kerdine-Romer, A. Boutten und M. Bonay. "Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Nuclear Translocation Induces Myofibroblastic Dedifferentiation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Antioxid Redox Signal* 18, no. 1 (2013): 66-79.
- Attisano, L. und J. L. Wrana. "Signal Transduction by the Tgf-B Superfamily." *Science* 296, no. 5573 (2002): 1646-1647.
- Babalola, O., A. Mamalis, H. Lev-Tov und J. Jagdeo. "Nadph Oxidase Enzymes in Skin Fibrosis: Molecular Targets und Therapeutic Agents." *Arch Dermatol Res* 306, no. 4 (2014): 313-30.
- Babu, M., R. Diegelmann und N. Oliver. "Fibronectin Is Overproduced by Keloid Fibroblasts During Abnormal Wound Healing." *Molecular und cellular biology* 9, no. 4 (1989): 1642-1650.
- Balaban, R. S., S. Nemoto und T. Finkel. "Mitochondria, Oxidants, und Aging." *Cell* 120, no. 4 (2005): 483-95.
- Bundyopadhyay, B., A. Han, J. Dai, J. Fan, Y. Li, M. Chen, D. T Woodley und W. Li. "T β ri/Alk5-Independent T β rii Signaling to Erk1/2 in Human Skin Cells According to Distinct Levels of T β rii Expression." *J Cell Sci* 124, no. 1 (2011): 19-24.

- Barcellos-Hoff, M.H. und T. A. Dix. "Redox-Mediated Activation of Latent Transforming Growth Factor-B 1." *Molecular Endocrinology* 10, no. 9 (1996): 1077-1083.
- Barnes, J. L. und Y. Gorin. "Myofibroblast Differentiation During Fibrosis: Role of Nad (P) H Oxidases." *Kidney international* 79, no. 9 (2011): 944-956.
- Bataller, R. und D. A. Brenner. "Liver Fibrosis." *Journal of Clinical Investigation* 115, no. 2 (2005): 209-218.
- Becker, D., E. Langer, M. Seemann, G. Seemann, I. Fell, J. Saloga, S. Grabbe und E. von Stebut. "Clinical Efficacy of Blue Light Full Body Irradiation as Treatment Option for Severe Atopic Dermatitis." *PLoS One* 6, no. 6 (2011): e20566.
- Beckman, K. B. und B. N. Ames. "The Free Radical Theory of Aging Matures." *Physiological reviews* 78, no. 2 (1998): 547-581.
- Bedard, K. und K.H.Krause. "The Nox Family of Ros-Generating Nadph Oxidases: Physiology und Pathophysiology." *Physiological reviews* 87, no. 1 (2007): 245-313.
- Bellocq, A., E. Azoulay, S. Marullo, A. Flahault, B. Fouqueray, C. Philippe, J. Cadranet und L. Baud. "Reactive Oxygen und Nitrogen Intermediates Increase Transforming Growth Factor-B 1 Release from Human Epithelial Alveolar Cells through Two Different Mechanisms." *American journal of respiratory cell und molecular biology* 21, no. 1 (1999): 128-136.
- Benninghoff, A. und D. Drenckhahn. *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*: Elsevier, Urban & Fischer, 2008.
- Bergeron, A., P. Soler, M. Kambouchner, P. Loiseau, B. Milleron, D. Valeyre, A. J. Hance und A. Tazi. "Cytokine Profiles in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Suggest an Important Role for Tgf-B und Il-10." *European Respiratory Journal* 22, no. 1 (2003): 69-76.
- Berman, B. und F. Flores. "Comparison of a Silicone Gel-Filled Cushion und Silicon Gel Sheeting for the Treatment of Hypertrophic or Keloid Scars." *Dermatologic surgery* 25, no. 6 (1999): 484-486.
- Berman, B., O.A. Perez, S. Konda, B. E Kohut, M. H Viera, S. Delgado, D. Zell und Q. Li. "A Review of the Biologic Effects, Clinical Efficacy, und Safety of Silicone Elastomer Sheeting for Hypertrophic und Keloid Scar Treatment und Management." *Dermatologic surgery* 33, no. 11 (2007): 1291-1303.
- Bitencourt, S., F. Mesquita, B. Basso, J. Schmid, G. Ferreira, L. Rizzo, M. Bauer, R. Bartrons, F. Ventura, J. L. Rosa, I. Mannaerts, L. A. van Grunsven und J. Oliveira. "Capsaicin Modulates Proliferation, Migration, und Activation of Hepatic Stellate Cells." *Cell Biochem Biophys* 68, no. 2 (2014): 387-96.
- Blyth, A Wynter. "Lvi.—the Composition of Cows' Milk in Health und Disease." *Journal of the Chemical Society, Transactions* 35, (1879): 530-539.
- Bock, O., H. Yu, S. Zitron, A.r Bayat, M. WJ Ferguson und U. Mrowietz. "Studies of Transforming Growth Factors B 1–3 und Their Receptors I und Ii in Fibroblast of Keloids und Hypertrophic Scars." (2005).
- Bonatti, S., B. Hochman, V. M. Tucci-Viegas, F. Furtado, C. E. Pinfieldi, A. C. Pedro und L. Masako Ferreira. "In Vitro Effect of 470 Nm Led (Light Emitting Diode) in Keloid Fibroblasts." *Acta Cirurgica Brasileira* 26, no. 1 (2011): 25-30.
- Bondi, C. D., N. Manickam, D. Y. Lee, K. Block, Y. Gorin, H. E. Abboud und J. L. Barnes. "Nad(P)H Oxidase Mediates Tgf-B1-Induced Activation of Kidney Myofibroblasts." *J Am Soc Nephrol* 21, no. 1 (2010): 93-102.

- Borsi, L., P. Castellani, A. M. Risso, A. Leprini und L. Zardi. "Transforming Growth Factor-B Regulates the Splicing Pattern of Fibronectin Messenger Rna Precursor." *FEBS letters* 261, no. 1 (1990): 175-178.
- Bouzari, N., S. C. Davis und K. Nouri. "Laser Treatment of Keloids und Hypertrophic Scars." *International journal of dermatology* 46, no. 1 (2007): 80-88.
- Brund, M. D. "The Sites und Topology of Mitochondrial Superoxide Production." *Experimental Gerontology* 45, no. 7-8 (2010): 466-472.
- Brundes, R.P, N. Weissmann und K. Schröder. "Nox Family NADPH Oxidases: Molecular Mechanisms of Activation." *Free Radical Biology und Medicine* 76, (2014): 208-226.
- Broekelmann, T. J, U. H Limper, T. V. Colby und J. A. McDonald. "Transforming Growth Factor B 1 Is Present at Sites of Extracellular Matrix Gene Expression in Human Pulmonary Fibrosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, no. 15 (1991): 6642-6646.
- Broughton 2nd, G, J. E. Janis und C. E. Attinger. "The Basic Science of Wound Healing." *Plastic und reconstructive surgery* 117, no. 7 Suppl (2006): 12S-34S.
- Bullard, K.M., M.T. Longaker und H.P. Lorenz. "Fetal Wound Healing: Current Biology." *World journal of surgery* 27, no. 1 (2003): 54-61.
- Castro, D. J., R. P. Abergel, C. Meeker, R. M. Dwyer, M. A. Lesavoy und J. Uitto. "Effects of the Nd: Yag Laser on DNA Synthesis und Collagen Production in Human Skin Fibroblast Cultures." *Annals of plastic surgery* 11, no. 3 (1983): 214-222.
- Chin, G. S., W. Liu, Z. Peled, T.Y. Lee, D. S. Steinbrech, M. Hsu und M. T. Longaker. "Differential Expression of Transforming Growth Factor-B Receptors I und II und Activation of Smad 3 in Keloid Fibroblasts." *Plastic und reconstructive surgery* 108, no. 2 (2001): 423-429.
- Chomczynski, P. und N. Sacchi. "Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction." *Analytical biochemistry* 162, no. 1 (1987): 156-159.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. und K. Burridge. "Rho-Stimulated Contractility Drives the Formation of Stress Fibers und Focal Adhesions." *The Journal of cell biology* 133, no. 6 (1996): 1403-1415.
- Clark, R.. *The Molecular und Cellular Biology of Wound Repair*: Springer Science & Business Media, 1996.
- Clydesdale, G. J., G. W. Dundie und H. K. Muller. "Ultraviolet Light Induced Injury: Immunological und Inflammatory Effects." *Immunology und Cell Biology* 79, no. 6 (2001): 547-568.
- Cocolakis, E., S. Lemay, S. Ali und J. J. Lebrun. "The P38 Mapk Pathway Is Required for Cell Growth Inhibition of Human Breast Cancer Cells in Response to Activin." *J Biol Chem* 276, no. 21 (2001): 18430-6.
- Cucoranu, I., R. Clempus, A. Dikalova, P. J. Phelan, S. Ariyan, S. Dikalov und D. Sorescu. "NAD(P)H Oxidase 4 Mediates Transforming Growth Factor-B1-Induced Differentiation of Cardiac Fibroblasts into Myofibroblasts." *Circ Res* 97, no. 9 (2005): 900-7.
- Danon, D., M.A. Kowatch und G. S. Roth. "Promotion of Wound Repair in Old Mice by Local Injection of Macrophages." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, no. 6 (1989): 2018-2020.
- Derynck, R. und X.-Hua Feng. "TGF- β Receptor Signaling." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1333, no. 2 (1997): F105-F150.
- Derynck, R. und Y. E. Zhang. "Smad-Dependent und Smad-Independent Pathways in TGF- β Family Signalling." *Nature* 425, no. 6958 (2003): 577-584.

- Desai, V. D., H. C. Hsia und J. E. Schwarzbauer. "Reversible Modulation of Myofibroblast Differentiation in Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells." *PloS one* 9, no. 1 (2014): e86865.
- Desmoulière, A., I.A. Darby und G. Gabbiani. "Normal und Pathologic Soft Tissue Remodeling: Role of the Myofibroblast, with Special Emphasis on Liver und Kidney Fibrosis." *Laboratory Investigation* 83, no. 12 (2003): 1689-1707.
- Desmoulière, A., M. Redard, I. Darby und G. Gabbiani. "Apoptosis Mediates the Decrease in Cellularity During the Transition between Granulation Tissue und Scar." *The American journal of pathology* 146, no. 1 (1995): 56.
- Dhillon, A.S., S. Hagan, O. Rath und W. Kolch. "Map Kinase Signalling Pathways in Cancer." *Oncogene* 26, no. 22 (2007): 3279-3290.
- Diegelmann, R. F. und M. C. Evans. "Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic und Delayed Healing." *Front Biosci* 9, no. 1 (2004): 283-289.
- Docherty, A.J., A. Lyons, B.J. Smith, E. M. Wright, P. E. Stephens, T.J. Harris, G. Murphy und J. J. Reynolds. "Sequence of Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinases und Its Identity to Erythroid-Potentiating Activity." *Nature* 318, no. 6041 (1984): 66-69.
- Doussière, J. und P. V. Vignais. "Diphenylene Iodonium as an Inhibitor of the NADPH Oxidase Complex of Bovine Neutrophils." *European Journal of Biochemistry* 208, no. 1 (1992): 61-71.
- Edlund, S., M. Lundström, C.-H. Heldin und P. Aspenström. "Transforming Growth Factor- β -Induced Mobilization of Actin Cytoskeleton Requires Signaling by Small GTPases Cdc42 und Rho." *Molecular Biology of the Cell* 13, no. 3 (2002): 902-914.
- Edlund, S., M. Lundström, C.-H. Heldin und P. Aspenström. "Smad7 Is Required for TGF- β -Induced Activation of the Small GTPase Cdc42." *Journal of cell science* 117, no. 9 (2004): 1835-1847.
- Ehrlich, H. P., A. Desmoulière, R. F. Diegelmann, I. Kelman Cohen, C. C. Compton, W. L. Garner, Y. Kapanci und G. Gabbiani. "Morphological und Immunochemical Differences between Keloid und Hypertrophic Scar." *The American journal of pathology* 145, no. 1 (1994): 105.
- Emonet, N., M.T. Leccia, A. Favier, J.C. Beani und M.J. Richard. "Thiols und Selenium: Protective Effect on Human Skin Fibroblasts Exposed to UVA Radiation." *Journal of Photochemistry und Photobiology B: Biology* 40, no. 1 (1997): 84-90.
- Evans, R. A., Y. C. Tian, R. Steadman und A. Owain Phillips. "TGF- β 1-Mediated Fibroblast–Myofibroblast Terminal Differentiation—the Role of Smad Proteins." *Experimental cell research* 282, no. 2 (2003): 90-100.
- Feng, X.-H. und R. Derynck. "Specificity und Versatility in TGF- β Signaling through Smads." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, (2005): 659-693.
- Ffrench, C., C., L. Van De Water, H. F. Dvorak und R. O. Hynes. "Reappearance of an Embryonic Pattern of Fibronectin Splicing During Wound Healing in the Adult Rat." *The Journal of cell biology* 109, no. 2 (1989): 903-914.
- Foley, T. D., J. J. Armstrong und B. R. Kupchak. "Identification und H₂O₂ Sensitivity of the Major Constitutive MAPK Phosphatase from Rat Brain." *Biochem Biophys Res Commun* 315, no. 3 (2004): 568-74.
- Forman, J.H. und J. Kennedy. "Superoxide Production und Electron Transport in Mitochondrial Oxidation of Dihydroorotic Acid." *Journal of Biological Chemistry* 250, no. 11 (1975): 4322-4326.
- Frederick, J.E., H.E. Snell und E.K. Haywood. "Solar Ultraviolet Radiation at the Earth's Surface." *Photochemistry und Photobiology* 50, no. 4 (1989): 443-450.

- Funaba, M.i, C. M. Zimmerman und L. S. Mathews. "Modulation of Smad2-Mediated Signaling by Extracellular Signal-Regulated Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 44 (2002): 41361-41368.
- Gabbiani, G., C. Chaponnier und I. Hüttner. "Cytoplasmic Filaments und Gap Junctions in Epithelial Cells und Myofibroblasts During Wound Healing." *The Journal of cell biology* 76, no. 3 (1978): 561-568.
- Garrison, G., S. K. Huang, K. Okunishi, J. P. Scott, L. R. Kumar Penke, A. M. Scruggs und M. Peters-Golden. "Reversal of Myofibroblast Differentiation by Prostaglandin E(2)." *Am J Respir Cell Mol Biol* 48, no. 5 (2013): 550-8.
- Gaston, P, M.D. Humzah und A.A. Quaba. "The Pulsed Tuneable Dye Laser as an Aid in the Management of Postburn Scarring." *Burns* 22, no. 3 (1996): 203-205.
- Gauglitz, G. G., H. C. Korting, T. Pavicic, T. Ruzicka und M. G. Jeschke. "Hypertrophic Scarring und Keloids: Pathomechanisms und Current und Emerging Treatment Strategies." *Mol Med* 17, no. 1-2 (2011): 113-25.
- Gill, S. E. und W. C. Parks. "Metalloproteinases und Their Inhibitors: Regulators of Wound Healing." *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, no. 6 (2008): 1334-1347.
- Godley, B. F., F. A. Shamsi, F. Q. Liang, S. G. Jarrett, S. Davies und M. Boulton. "Blue Light Induces Mitochondrial DNA Damage und Free Radical Production in Epithelial Cells." *J Biol Chem* 280, no. 22 (2005): 21061-6.
- Goffin, J. M., P. Pittet, G. Csucs, J. W. Lussi, J.-J. Meister und B. Hinz. "Focal Adhesion Size Controls Tension-Dependent Recruitment of A-Smooth Muscle Actin to Stress Fibers." *The Journal of cell biology* 172, no. 2 (2006): 259-268.
- Gold, M. H., W. Sensing und J. A. Biron. "Clinical Efficacy of Home-Use Blue-Light Therapy for Mild-to Moderate Acne." *J Cosmet Laser Ther* 13, no. 6 (2011): 308-14.
- Goldman, M. P. und R. E. Fitzpatrick. "Laser Treatment of Scars." *Dermatologic Surgery* 21, no. 8 (1995): 685-687.
- Gorin, Y., J. M. Ricono, N.-H. Kim, B. Bhundari, G. Ghosh Choudhury und H. E Abboud. "Nox4 Mediates Angiotensin Ii-Induced Activation of Akt/Protein Kinase B in Mesangial Cells." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 285, no. 2 (2003): F219-F229.
- Greene, J., M. Wang, Y. E. Liu, L. A. Raymond, C. Rosen und Y. E. Shi. "Molecular Cloning und Characterization of Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4." *Journal of Biological Chemistry* 271, no. 48 (1996): 30375-30380.
- Gurtner, G. C., S. Werner, Y. Barrundon und M. T. Longaker. "Wound Repair und Regeneration." *Nature* 453, no. 7193 (2008): 314-321.
- Halliday, G. M. "Inflammation, Gene Mutation und Photoimmunosuppression in Response to Uvr-Induced Oxidative Damage Contributes to Photocarcinogenesis." *Mutat Res* 571, no. 1-2 (2005): 107-20.
- Haurani, M. J., M. E. Cifuentes, A. D. Shepard und P. J. Pagano. "Nox4 Oxidase Overexpression Specifically Decreases Endogenous Nox4 Mrna und Inhibits Angiotensin Ii-Induced Adventitial Myofibroblast Migration." *Hypertension* 52, no. 1 (2008): 143-9.
- Hayashida, T., M. Decaestecker und H. W. Schnaper. "Cross-Talk between Erk Map Kinase und Smad Signaling Pathways Enhances Tgf-B-Dependent Responses in Human Mesangial Cells." *The FASEB journal* 17, no. 11 (2003): 1576-1578.
- He, T., T. Quan, Y. Shao, J. J. Voorhees und G. J. Fisher. "Oxidative Exposure Impairs Tgf-B Pathway Via Reduction of Type Ii Receptor und Smad3 in Human Skin Fibroblasts." *AGE* 36, no. 3 (2014): 9623.

- Hecker, L., R. Jagirdar, T. Jin und V. J. Thannickal. "Reversible Differentiation of Myofibroblasts by Myod." *Exp Cell Res* 317, no. 13 (2011): 1914-21.
- Hecker, L., R. Vittal, T. Jones, R. Jagirdar, T. R. Luckhardt, J. C. Horowitz, S. Pennathur, F. J. Martinez und V. J. Thannickal. "Nadph Oxidase-4 Mediates Myofibroblast Activation und Fibrogenic Responses to Lung Injury." *Nature medicine* 15, no. 9 (2009): 1077-1081.
- Hecker, L., R. Vittal, T. Jones, R. Jagirdar, T. R. Luckhardt, J. C. Horowitz, S. Pennathur, F. J. Martinez und V. J. Thannickal. "Nadph Oxidase-4 Mediates Myofibroblast Activation und Fibrogenic Responses to Lung Injury." *Nat Med* 15, no. 9 (2009): 1077-81.
- Heldin, C.-H., M. Lundström und A. Moustakas. "Mechanism of Tgf-B Signaling to Growth Arrest, Apoptosis, und Epithelial-Mesenchymal Transition." *Current opinion in cell biology* 21, no. 2 (2009): 166-176.
- Henderson, D. L., T. A. Cromwell und L.G. Mes. "Argon und Carbon Dioxide Laser Treatment of Hypertrophic und Keloid Scars." *Lasers in surgery und medicine* 3, no. 4 (1984): 271-277.
- Hinz, B. "Formation und Function of the Myofibroblast During Tissue Repair." *Journal of Investigative Dermatology* 127, no. 3 (2007): 526-537.
- Hinz, B. "The Myofibroblast: Paradigm for a Mechanically Active Cell." *Journal of biomechanics* 43, no. 1 (2010): 146-155.
- Hinz, B., D. Mastrangelo, C. E. Iselin, C. Chaponnier und G. Gabbiani. "Mechanical Tension Controls Granulation Tissue Contractile Activity und Myofibroblast Differentiation." *The American journal of pathology* 159, no. 3 (2001): 1009-1020.
- Hinz, B., S. H. Phan, V. J. Thannickal, U. Galli, M.-L. Bochaton-Piallat und G. Gabbiani. "The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins." *The American journal of pathology* 170, no. 6 (2007): 1807-1816.
- Hu, T., S. P. RamachandraRao, S. Siva, C. Valancius, Y. Zhu, K. Mahadev, I. Toh, B. J. Goldstein, M. Woolkalis und K. Sharma. "Reactive Oxygen Species Production Via Nadph Oxidase Mediates Tgf-B-Induced Cytoskeletal Alterations in Endothelial Cells." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 289, no. 4 (2005): F816-F825.
- Hu, Y., J. Peng, D. Feng, L. Chu, X. Li, Z. Jin, Z. Lin und Q. Zeng. "Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase, P38 Kinase, und Activator Protein-1 in Transforming Growth Factor-B1-Induced Alpha Smooth Muscle Actin Expression in Human Fetal Lung Fibroblasts in Vitro." *Lung* 184, no. 1 (2006): 33-42.
- Huang, L.-C., K. C. Clarkin und G.M. Wahl. "Sensitivity und Selectivity of the DNA Damage Sensor Responsible for Activating P53-Dependent G1 Arrest." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, no. 10 (1996): 4827-4832.
- Hussain, S. P., P. Amstad, P. He, A. Robles, S. Lupold, I. Kaneko, M. Ichimiya, S. Sengupta, L. Mechanic und S. Okamura. "P53-Induced up-Regulation of Mnsod und Gpx but Not Catalase Increases Oxidative Stress und Apoptosis." *Cancer research* 64, no. 7 (2004): 2350-2356.
- Itoh, S. und P. ten Dijke. "Negative Regulation of Tgf-B Receptor/Smad Signal Transduction." *Curr Opin Cell Biol* 19, no. 2 (2007): 176-84.
- Karagoz, H., C. Sever, Y. Bayram, C. Sahin, Y. Kulahci und E. Ulkur. "A Review of the Prevention und Treatment of Hypertrophic Scars: Part I Clinical Aspects." *Archives of Clinical und Experimental Surgery (ACES)* 1, no. 4 (2012): 237-248.
- Kefaloyianni, E., C. Gaitanaki und I. Beis. "Erk1/2 und P38-Mapk Signalling Pathways, through Msk1, Are Involved in Nf-Kappab Transactivation During Oxidative Stress in Skeletal Myoblasts." *Cell Signal* 18, no. 12 (2006): 2238-51.

- Kim, H. S., M.-C. Song, I. H. Kwak, T. J. Park und I. K. Lim. "Constitutive Induction of P-Erk1/2 Accompanied by Reduced Activities of Protein Phosphatases 1 und 2a und Mkp3 Due to Reactive Oxygen Species During Cellular Senescence." *Journal of Biological Chemistry* 278, no. 39 (2003): 37497-37510.
- Kim, S. Y., J. Zhu und T. K. Woodruff. "A Truncated, Activin-Induced Smad3 Isoform Acts as a Transcriptional Repressor of Fsh β Expression in Mouse Pituitary." *Mol Cell Endocrinol* 342, no. 1-2 (2011): 64-72.
- Kolodney, M. S. und E. L. Elson. "Correlation of Myosin Light Chain Phosphorylation with Isometric Contraction of Fibroblasts." *Journal of Biological Chemistry* 268, no. 32 (1993): 23850-23855.
- Kretzschmar, M., J. Doody, I. Timokhina und J. Massagué. "A Mechanism of Repression of Tgf β /Smad Signaling by Oncogenic Ras." *Genes & development* 13, no. 7 (1999): 804-816.
- Kuhn, M. A., M. R. Moffit, P. D. Smith, W. G. Lyle, F. Ko, D. D. Meltzer und M. C. Robson. "Silicone Sheeting Decreases Fibroblast Activity und Downregulates Tgf β 2 in Hypertrophic Scar Model." *International journal of surgical investigation* 2, no. 6 (2000): 467-474.
- Lambeth, J. D. "Nox Enzymes, Ros, und Chronic Disease: An Example of Antagonistic Pleiotropy." *Free Radic Biol Med* 43, no. 3 (2007): 332-47.
- Lundström, M.. "The Tak1–Traf6 Signalling Pathway." *The international journal of biochemistry & cell biology* 42, no. 5 (2010): 585-589.
- Larson, D. L., S. Abston, Barbara W., H. Linares, M. Dobrkovsky, E. B. Evans und S. R. Lewis. "Contracture und Scar Formation in the Burn Patient." *Clinics in plastic surgery* 1, no. 4 (1974): 653.
- Larson, D. L., S. Abston, E. B. Evans, M. Dobrkovsky und H. A. Linares. "Techniques for Decreasing Scar Formation und Contractures in the Burned Patient." *Journal of Trauma und Acute Care Surgery* 11, no. 10 (1971): 807-823.
- Leask, U. und D. J. Abraham. "Tgf-B Signaling und the Fibrotic Response." *The FASEB Journal* 18, no. 7 (2004): 816-827.
- Leibovich, S. J., P. J. Polverini, H. M. Shepard, D. M. Wiseman, V. Shively und N. Nuseir. "Macrophage-Induced Angiogenesis Is Mediated by Tumour Necrosis Factor- α ." *Nature* 329, no. 6140 (1987): 630-632.
- Leusen, J. H. W., A. J. Verhoeven und D. Roos. "Interactions between the Components of the Human NADPH Oxidase: Intrigues in the Phox Family." *Journal of Laboratory und Clinical Medicine* 128, no. 5 (1996): 461-476.
- Li, B. und J. H.-C. Wang. "Fibroblasts und Myofibroblasts in Wound Healing: Force Generation und Measurement." *Journal of tissue viability* 20, no. 4 (2011): 108-120.
- Li, Y. und J. Huard. "Differentiation of Muscle-Derived Cells into Myofibroblasts in Injured Skeletal Muscle." *The American journal of pathology* 161, no. 3 (2002): 895-907.
- Li, Y. und M. A. Trush. "Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H Oxidase Inhibitor, Also Potently Inhibits Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production." *Biochemical und biophysical research communications* 253, no. 2 (1998): 295-299.
- Liebmann, J., M. Born und V. Kolb-Bachofen. "Blue-Light Irradiation Regulates Proliferation und Differentiation in Human Skin Cells." *J Invest Dermatol* 130, no. 1 (2010): 259-69.
- Lorenz, H. P., D. J. Whitby, M. T. Longaker und N. S. Adzick. "Fetal Wound Healing. The Ontogeny of Scar Formation in the Non-Human Primate." *Annals of surgery* 217, no. 4 (1993): 391.

- Losi, A. "Flavin-Based Blue-Light Photosensors: A Photobiophysics Update." *Photochem Photobiol* 83, no. 6 (2007): 1283-300.
- Lu, D. und P. A. Insel. "Hydrolysis of Extracellular Atp by Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase (Entpd) Establishes the Set Point for Fibrotic Activity of Cardiac Fibroblasts." *Journal of Biological Chemistry* 288, no. 26 (2013): 19040-19049.
- Mahmoud, B. H., C. L. Hexsel, I. H. Hamzavi und H. W. Lim. "Effects of Visible Light on the Skin." *Photochemistry und photobiology* 84, no. 2 (2008): 450-462.
- Majno, G, G. Gabbiani, B. J. Hirschel, G. B. Ryan und P. R. Statkov. "Contraction of Granulation Tissue in Vitro: Similarity to Smooth Muscle." *Science* 173, no. 3996 (1971): 548-550.
- Mamalis, A., M. Garcha und J. Jagdeo. "Light Emitting Diode-Generated Blue Light Modulates Fibrosis Characteristics: Fibroblast Proliferation, Migration Speed, und Reactive Oxygen Species Generation." *Lasers Surg Med* 47, no. 2 (2015): 210-5.
- Mundang, S, U. Manuelpillai und E. M. Wallace. "Oxidative Stress Increases Placental und Endothelial Cell Activin a Secretion." *J Endocrinol* 192, no. 3 (2007): 485-93.
- Martin, P. "Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration." *Science* 276, no. 5309 (1997): 75-81.
- Martyn, K. D., L. M. Frederick, K. von Loehneysen, M. C. Dinauer und U. G. Knaus. "Functional Analysis of Nox4 Reveals Unique Characteristics Compared to Other Nadph Oxidases." *Cell Signal* 18, no. 1 (2006): 69-82.
- Matsumura, Y. und H. N. Ananthaswamy. "Toxic Effects of Ultraviolet Radiation on the Skin." *Toxicology und applied pharmacology* 195, no. 3 (2004): 298-308.
- Mattey, D. L., P. T. Dawes, N. B. Nixon und H. Slater. "Transforming Growth Factor B1 und Interleukin 4 Induced A Smooth Muscle Actin Expression und Myofibroblast-Like Differentiation in Human Synovial Fibroblasts in Vitro: Modulation by Basic Fibroblast Growth Factor." *Annals of the rheumatic diseases* 56, no. 7 (1997): 426-431.
- McAnulty, R. J. "Fibroblasts und Myofibroblasts: Their Source, Function und Role in Disease." *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, no. 4 (2007): 666-671.
- McAnulty, R. J., J. S. Campa, A. D. Cambrey und G. J. Laurent. "The Effect of Transforming Growth Factor B on Rates of Procollagen Synthesis und Degradation in Vitro." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1091, no. 2 (1991): 231-235.
- Moll, I., M. Augustin, F. A. Bahmer und E. G. Jung. *Duale Reihe Dermatologie 7th Ed*, 2005.
- Moll, I. und F. A. Bahmer. *Dermatologie*, 2016.
- Morley, N, A Curnow, L Salter, S Campbell und D Gould. "N-Acetyl-L-Cysteine Prevents DNA Damage Induced by Uva, Uvb und Visible Radiation in Human Fibroblasts." *Journal of Photochemistry und Photobiology B: Biology* 72, no. 1 (2003): 55-60.
- Mu, Y., S. K. Gudey und M. Lundström. "Non-Smad Signaling Pathways." *Cell und tissue research* 347, no. 1 (2012): 11-20.
- Munz, B., H. Smola, F. Engelhardt, K. Bleuel, M. Brauchle, I. Lein, L. W. Evans, D. Huylebroeck, R. Balling und S. Werner. "Overexpression of Activin a in the Skin of Transgenic Mice Reveals New Activities of Activin in Epidermal Morphogenesis, Dermal Fibrosis und Wound Repair." *The EMBO Journal* 18, no. 19 (1999): 5205-5215.
- Murphy, G. "Tissue Inhibitors of Metalloproteinases." *Genome biology* 12, no. 11 (2011): 1.

- Murphy, M. P. "How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species." *Biochem J* 417, no. 1 (2009): 1-13.
- Murray, J. C. "Keloids und Hypertrophic Scars." *Clinics in dermatology* 12, no. 1 (1994): 27-37.
- Nakano, Y., B. Banfi, A. J. Jesaitis, M. C. Dinauer, L. A. Allen und W. M. Nauseef. "Critical Roles for P22phox in the Structural Maturation und Subcellular Targeting of Nox3." *Biochem J* 403, no. 1 (2007): 97-108.
- Nimni, M. E. "Collagen: Structure, Function, und Metabolism in Normal und Fibrotic Tissues." In *Seminars in arthritis und rheumatism*, 13, 1-86: WB Saunders, 1983.
- Nisimoto, Y., H. M Jackson, H. Ogawa, T. Kawahara und J. D. Lambeth. "Constitutive NADPH-Dependent Electron Transferase Activity of the Nox4 Dehydrogenase Domain." *Biochemistry* 49, no. 11 (2010): 2433-2442. A
- Nisimoto, Y., H. M. Jackson, H. Ogawa, T. Kawahara und J. D. Lambeth. "Constitutive NADPH-Dependent Electron Transferase Activity of the Nox4 Dehydrogenase Domain." *Biochemistry* 49, no. 11 (2010): 2433-42. B
- Nissen, N. N, P. J Polverini, A. E. Koch, M. V. Volin, R. L. Gamelli und L. A. DiPietro. "Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Angiogenic Activity During the Proliferative Phase of Wound Healing." *The American journal of pathology* 152, no. 6 (1998): 1445.
- Nissen, N. N., P. J. Polverini, R. L. Gamelli und L. A. DiPietro. "Basic Fibroblast Growth Factor Mediates Angiogenic Activity in Early Surgical Wounds." *Surgery* 119, no. 4 (1996): 457-465.
- O'Donnell, V. B., G. C. Smith und O. T. Jones. "Involvement of Phenyl Radicals in Iodonium Inhibition of Flavoenzymes." *Molecular pharmacology* 46, no. 4 (1994): 778-785.
- O'Donnell, V. B., D. G. Tew, O. T. G. Jones und P. J. Englund. "Studies on the Inhibitory Mechanism of Iodonium Compounds with Special Reference to Neutrophil NADPH Oxidase." *Biochemical Journal* 290, no. 1 (1993): 41-49.
- Ogihara, T., H. Watada, R. Kanno, F. Ikeda, T. Nomiya, Y. Tanaka, A. Nakao, M. S. German, I. Kojima und R. Kawamori. "P38 Mapk Is Involved in Activin α - und Hepatocyte Growth Factor-Mediated Expression of Pro-Endocrine Gene Neurogenin 3 in Ar42j-B13 Cells." *J Biol Chem* 278, no. 24 (2003): 21693-700.
- Oliver, N., M. Babu und R. Diegelmann. "Fibronectin Gene Transcription Is Enhanced in Abnormal Wound Healing." *Journal of investigative dermatology* 99, no. 5 (1992): 579-586.
- Oplunder, C., S. Hidding, F. B. Werners, M. Born, N. Pallua und C. V. Suschek. "Effects of Blue Light Irradiation on Human Dermal Fibroblasts." *J Photochem Photobiol B* 103, no. 2 (2011): 118-25.
- Orr, A. L., C. L. Quinlan, I. V. Perevoshchikova und M. D. Brund. "A Refined Analysis of Superoxide Production by Mitochondrial Sn-Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase." *J Biol Chem* 287, no. 51 (2012): 42921-35.
- Park, S., J.-Y. Ahn, M.-J. Lim, M.-H. Kim, Y.-S. Yun, G. Jeong und J.-Y. Song. "Sustained Expression of NADPH Oxidase 4 by P38 Mapk-Akt Signaling Potentiates Radiation-Induced Differentiation of Lung Fibroblasts." *Journal of molecular medicine* 88, no. 8 (2010): 807-816.
- Pattison, D. I. und M. J. Davies. "Actions of Ultraviolet Light on Cellular Structures." In *Cancer: Cell Structures, Carcinogens und Genomic Instability*, 131-157: Springer, 2006.
- Pavloff, N., P. W. Staskus, N.S. Kishnani und S. P. Hawkes. "A New Inhibitor of Metalloproteinases from Chicken: Chimp-3. A Third Member of the Timp Family." *Journal of Biological Chemistry* 267, no. 24 (1992): 17321-17326.

- Pfaff, S., J. Liebmman, M. Born, H. F. Merk und V. von Felbert. "Prospective Runderomized Long-Term Study on the Efficacy und Safety of Uv-Free Blue Light for Treating Mild Psoriasis Vulgaris." *Dermatology* 231, no. 1 (2015): 24-34.
- Polverini, P. J., R. S. Cotran, M. A. Gimbrone und E. R. Unanue. "Activated Macrophages Induce Vascular Proliferation." (1977).
- Prives, C. und P. A. Hall. "The P53 Pathway." *The Journal of pathology* 187, no. 1 (1999): 112-126.
- Puzey, G. "The Use, of Pressure Garments on Hypertrophic Scars." *Journal of tissue viability* 12, no. 1 (2002): 11-15.
- Quan, T, Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, J. J. Voorhees und G. J. Fisher. "Matrix-Degrading Metalloproteinases in Photoaging." In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 14, 20-24: Elsevier, 2009.
- Quinlan, C. L., A. L. Orr, I. V. Perevoshchikova, J. R. Treberg, B. A. Ackrell und M. D. Brund. "Mitochondrial Complex Ii Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward und Reverse Reactions." *Journal of Biological Chemistry* 287, no. 32 (2012): 27255-27264.
- Ra, H.-J. und W. C. Parks. "Control of Matrix Metalloproteinase Catalytic Activity." *Matrix biology* 26, no. 8 (2007): 587-596.
- Ramos, C., C. Becerril, M. Montañño, C. García-De-Alba, R. Ramírez, M. Checa, A. Pardo und M. Selman. "Fgf-1 Reverts Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Tgf-B1 through Mapk/Erk Kinase Pathway." *American Journal of Physiology-Lung Cellular und Molecular Physiology* 299, no. 2 (2010): L222-L231.
- Rassner, G. *Dermatologie: Lehrbuch Und Atlas*, 2007.
- Rassner, G. *Dermatologie: Lehrbuch Und Atlas*: Elsevier Health Sciences Germany, 2013.
- Roberts, A. B. "Tgf-B Signaling from Receptors to the Nucleus." *Microbes und Infection* 1, no. 15 (1999): 1265-1273.
- Rowlatt, U. "Intrauterine Wound Healing in a 20 Week Human Fetus." *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy und histology* 381, no. 3 (1979): 353.
- Sunder, C. S., H. Chang, S. Salzmann, C. S. L. Müller, S. Ekanayake-Mudiyanselage, P. Elsner und J. J. Thiele. "Photoaging Is Associated with Protein Oxidation in Human Skin in Vivo." *Journal of Investigative Dermatology* 118, no. 4 (2002): 618-625.
- Scheithauer, M. O. und H. Riechelmann. "Grundlagen Der Kutanen Wundheilung. Übersicht Teil I." *Laryngo-Rhino-Otol* 82, (2003): 31-35.
- Schilling, J. A. "Wound Healing." *Surg Clin North Am* 56, no. 4 (1976): 859-74.
- Schmid, P., P. r Itin, G. Cherry, C. Bi und D. A. Cox. "Enhanced Expression of Transforming Growth Factor-B Type I und Type Ii Receptors in Wound Granulation Tissue und Hypertrophic Scar." *The American journal of pathology* 152, no. 2 (1998): 485.
- Schroder, K., K. Wundzioch, I. Helmcke und R. P. Brundes. "Nox4 Acts as a Switch between Differentiation und Proliferation in Preadipocytes." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, no. 2 (2009): 239-45.
- Schultz-Cherry, S. und J.E. Murphy-Ullrich. "Thrombospondin Causes Activation of Latent Transforming Growth Factor-B Secreted by Endothelial Cells by a Novel Mechanism." *The Journal of cell biology* 122, no. 4 (1993): 923-932.

- Schuman Jorns, M., G. Schöllnhammer und P. Hemmerich. "Intramolecular Addition of the Riboflavin Side Chain." *European Journal of Biochemistry* 57, no. 1 (1975): 35-48.
- Schürch, W., T. A. Seemayer, B. Hinz und G. Gabbiani. *The Myofibroblast*. Lippincott Williams et Wilkins, 2006.
- Seifert, E. L., C. Estey, J. Y. Xuan und M. E. Harper. "Electron Transport Chain-Dependent und -Independent Mechanisms of Mitochondrial H₂O₂ Emission During Long-Chain Fatty Acid Oxidation." *J Biol Chem* 285, no. 8 (2010): 5748-58.
- Serini, G., M.-L. Bochaton-Piallat, P. Ropraz, A. Geinoz, L. Borsi, L. Zardi und G. Gabbiani. "The Fibronectin Domain Ed-a Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor-B1." *The Journal of cell biology* 142, no. 3 (1998): 873-881.
- Shakespeare, P. G., E. Tiernan, A. E. Dewar und J. Hambleton. "Using the Pulsed Dye Laser to Influence Scar Formation after Breast Reduction Surgery: A Preliminary Report." *Annals of plastic surgery* 45, no. 4 (2000): 357-368.
- Shepherd, J. P. und R. P. R. Dawber. "The Response of Keloid Scars to Cryosurgery." *Plastic and reconstructive surgery* 70, no. 6 (1982): 677-681.
- Shi, Y., J. E. O'Brien, A. Fard und U. Zalewski. "Transforming Growth Factor-B1 Expression und Myofibroblast Formation During Arterial Repair." *Arteriosclerosis, Thrombosis, und Vascular Biology* 16, no. 10 (1996): 1298-1305.
- Shiose, A., J. Kuroda, K. Tsuruya, M. Hirai, H. Hirakata, S. Naito, M. Hattori, Y. Sakaki und H. Sumimoto. "A Novel Superoxide-Producing Nad(P)H Oxidase in Kidney." *J Biol Chem* 276, no. 2 (2001): 1417-23.
- Singer, A. J. und R. A.F. Clark. "Cutaneous Wound Healing." *New England Journal of Medicine* 341, no. 10 (1999): 738-746.
- Skalli, O., W. Schürch, T. Seemayer, R. Lagace, D. Montundon, B. Pittet und G. Gabbiani. "Myofibroblasts from Diverse Pathologic Settings Are Heterogeneous in Their Content of Actin Isoforms und Intermediate Filament Proteins." *Laboratory investigation; a journal of technical methods und pathology* 60, no. 2 (1989): 275-285.
- Slemp, A. E. und R. E. Kirschner. "Keloids und Scars: A Review of Keloids und Scars, Their Pathogenesis, Risk Factors, und Management." *Current opinion in pediatrics* 18, no. 4 (2006): 396-402.
- Sorrentino, A., N. Thakur, S. Grimsby, U. Marcusson, V. von Bulow, N. Schuster, S. Zhang, C.-H. Heldin und M. Lundström. "The Type I Tgf- β Receptor Engages Traf6 to Activate Tak1 in a Receptor Kinase-Independent Manner." *Nature cell biology* 10, no. 10 (2008): 1199-1207.
- Spanakis, S. G., S. Petridou und S. K. Masur. "Functional Gap Junctions in Corneal Fibroblasts und Myofibroblasts." *Investigative ophthalmology & visual science* 39, no. 8 (1998): 1320-1328.
- Stadtman, Earl R. "Protein Oxidation und Aging." *Science* 257, no. 5074 (1992): 1220-1224.
- Stefano, J. T., B. Cogliati, F. Santos, V. M. Lima, D. C. Mazo, U. Matte, M. R. Alvares-da-Silva, T. R. Silveira, F. J. Carrilho und C. P. Oliveira. "S-Nitroso-N-Acetylcysteine Induces De-Differentiation of Activated Hepatic Stellate Cells und Promotes Antifibrotic Effects in Vitro." *Nitric Oxide* 25, no. 3 (2011): 360-5.
- Stuehr, D. J., O. A. Fasehun, N. S. Kwon, S. S. Gross, J. A. Gonzalez, R. Levi und C. F. Nathan. "Inhibition of Macrophage und Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase by Diphenyleneiodonium und Its Analogs." *The FASEB Journal* 5, no. 1 (1991): 98-103.

- Sturrock, A., B. Cahill, K. Norman, T. P. Huecksteadt, K. H., Karl-Sundens, S. V. Karwunde, J. C. Stringham, D. A. Bull und M. Gleich. "Transforming Growth Factor-B1 Induces Nox4 NAD(P)H Oxidase und Reactive Oxygen Species-Dependent Proliferation in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells." *American Journal of Physiology-Lung Cellular und Molecular Physiology* 290, no. 4 (2006): L661-L673.
- Svobodova, A., D. Walterova und J. Vostalova. "Ultraviolet Light Induced Alteration to the Skin." *Biomedical Papers-Palacky University in Olomouc* 150, no. 1 (2006): 25.
- Taflinski, L., E. Demir, J. Kauczok, P. C. Fuchs, M. Born, C. V. Suschek und C. Oplunder. "Blue Light Inhibits Transforming Growth Factor-B1-Induced Myofibroblast Differentiation of Human Dermal Fibroblasts." *Exp Dermatol* 23, no. 4 (2014): 240-6.
- Taoufik, K., E. Mavrogonatos, T. Eliades, L. Papagiannoulis, G. Eliades und D. Kletsas. "Effect of Blue Light on the Proliferation of Human Gingival Fibroblasts." *Dent Mater* 24, no. 7 (2008): 895-900.
- Thannickal, V. J. und B. L. Fanburg. "Activation of an H₂O₂-Generating NADH Oxidase in Human Lung Fibroblasts by Transforming Growth Factor B1." *Journal of Biological Chemistry* 270, no. 51 (1995): 30334-30338.
- Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier und R. A. Brown. "Myofibroblasts und Mechano-Regulation of Connective Tissue Remodelling." *Nature reviews Molecular cell biology* 3, no. 5 (2002): 349-363.
- Tornaletti, S. und G. P. Pfeifer. "UV Damage und Repair Mechanisms in Mammalian Cells." *Bioessays* 18, no. 3 (1996): 221-228.
- Trautinger, F. "Mechanisms of Photodamage of the Skin und Its Functional Consequences for Skin Ageing." *Clinical und experimental dermatology* 26, no. 7 (2001): 573-577.
- Tyrell, R. M. und M. Pidoux. "Endogenous Glutathione Protects Human Skin Fibroblasts against the Cytotoxic Action of UVB, UVA und near-Visible Radiations." *Photochemistry und Photobiology* 44, no. 5 (1986): 561-564.
- Tzortzaki, E. G., K. M. Antoniou, M. I. Zervou, I. Lambiri, A. Koutsopoulos, N. Tzanakis, M. Plataki, G. Maltezas, D. Bouros und N. M. Siafakas. "Effects of Antifibrotic Agents on TGF- β 1, CTGF und IFN- γ Expression in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Respir Med* 101, no. 8 (2007): 1821-9.
- Ulrich, D., F. Ulrich, F. Unglaub, U. Piatkowski und N. Pallua. "Matrix Metalloproteinases und Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Patients with Different Types of Scars und Keloids." *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 63, no. 6 (2010): 1015-1021.
- Vaid, M., T. Singh und S. K. Katiyar. "Grape Seed Proanthocyanidins Inhibit Melanoma Cell Invasiveness by Reduction of PGE₂ Synthesis und Reversal of Epithelial-to-Mesenchymal Transition." *PLoS One* 6, no. 6 (2011): e21539.
- Vaughan, M. B., E. W. Howard und J. J. Tomasek. "Transforming Growth Factor-B1 Promotes the Morphological und Functional Differentiation of the Myofibroblast." *Experimental cell research* 257, no. 1 (2000): 180-189.
- Vayalil, P. K., K. E. Iles, J. Choi, A.-K. Yi, E. M. Postlethwait und R.-M. Liu. "Glutathione Suppresses TGF- β -Induced PAI-1 Expression by Inhibiting p38 und JNK MAPK und the Binding of AP-1, Sp-1, und Smad to the PAI-1 Promoter." *American Journal of Physiology-Lung Cellular und Molecular Physiology* 293, no. 5 (2007): L1281-L1292.
- Vozenin-Brotans, M.-C., V. Sivan, N. Gault, C. Renard, C. Geffrotin, S. Delanian, J.-L. Lefaix und M. Martin. "Antifibrotic Action of Cu/Zn SOD Is Mediated by TGF- β 1 Repression und Phenotypic Reversion of Myofibroblasts." *Free Radical Biology und Medicine* 30, no. 1 (2001): 30-42.

- Wang, H. und I. E. Kochevar. "Involvement of Uvb-Induced Reactive Oxygen Species in Tgf-B Biosynthesis und Activation in Keratinocytes." *Free Radic Biol Med* 38, no. 7 (2005): 890-7.
- Ward, R Scott. "Pressure Therapy for the Control of Hypertrophic Scar Formation after Burn Injury: A History und Review." *Journal of Burn Care & Research* 12, no. 3 (1991): 257-262.
- Wataha, J. C., J. B. Lewis, P. E. Lockwood, S. Hsu, R. L. Messer, F. A. Rueggeberg und S. Bouillaguet. "Blue Light Differentially Modulates Cell Survival und Growth." *Journal of dental research* 83, no. 2 (2004): 104-108.
- Welsch, U.und T. Deller. *Sobotta Lehrbuch Histologie: Unter Mitarbeit Von Thomas Deller*, 2010.
- Werner, S. und R. Grose. "Regulation of Wound Healing by Growth Factors und Cytokines." *Physiological reviews* 83, no. 3 (2003): 835-870.
- Wheelund, R. G. und S. Dhawan. "Evaluation of Self-Treatment of Mild-to-Moderate Facial Acne with a Blue Light Treatment System." *Journal of drugs in dermatology: JDD* 10, no. 6 (2011): 596-602.
- White, T. A., N. Krishnan, D. F. Becker und J. J. Tanner. "Structure und Kinetics of Monofunctional Proline Dehydrogenase from *Thermus Thermophilus*." *J Biol Chem* 282, no. 19 (2007): 14316-27.
- Wolfram, D., A. Tzankov, P. Püzl und H. Piza-Katzer. "Hypertrophic Scars und Keloids—a Review of Their Pathophysiology, Risk Factors, und Therapeutic Management." *Dermatologic Surgery* 35, no. 2 (2009): 171-181.
- Wu, J. J. und A. M. Bennett. "Essential Role for Mitogen-Activated Protein (Map) Kinase Phosphatase-1 in Stress-Responsive Map Kinase und Cell Survival Signaling." *J Biol Chem* 280, no. 16 (2005): 16461-6.
- Yamashita, M., K. Fatyol, C. Jin, X. Wang, Z. Liu und Y. E. Zhang. "Traf6 Mediates Smad-Independent Activation of Jnk und P38 by Tgf-B." *Molecular cell* 31, no. 6 (2008): 918-924.
- Yoon, Y. S., J. H. Lee, S. C. Hwang, K. S. Choi und G. Yoon. "Tgf B1 Induces Prolonged Mitochondrial Ros Generation through Decreased Complex Iv Activity with Senescent Arrest in Mv1lu Cells." *Oncogene* 24, no. 11 (2005): 1895-903.
- Yu, Q. und I. Stamenkovic. "Cell Surface-Localized Matrix Metalloproteinase-9 Proteolytically Activates Tgf-B und Promotes Tumor Invasion und Angiogenesis." *Genes & development* 14, no. 2 (2000): 163-176.
- Zavadil, J. und E. P. Böttinger. "Tgf-B und Epithelial-to-Mesenchymal Transitions." *Oncogene* 24, no. 37 (2005): 5764-5774.
- Zhang, L., M. Deng, R. Parthasarathy, L. Wang, M. Mongan, J. D. Molkentin, Y. Zheng und Y. Xia. "Mekk1 Transduces Activin Signals in Keratinocytes to Induce Actin Stress Fiber Formation und Migration." *Mol Cell Biol* 25, no. 1 (2005): 60-5.
- Zouboulis, C. C., E. Zouridaki, A. Rosenberger und A. Dalkowski. "Current Developments und Uses of Cryosurgery in the Treatment of Keloids und Hypertrophic Scars." *Wound repair und regeneration* 10, no. 2 (2002): 98-102.

8 Anhang

8.1 Die Zellproliferation und α -SMA-Expression unter Einfluss von 453 nm

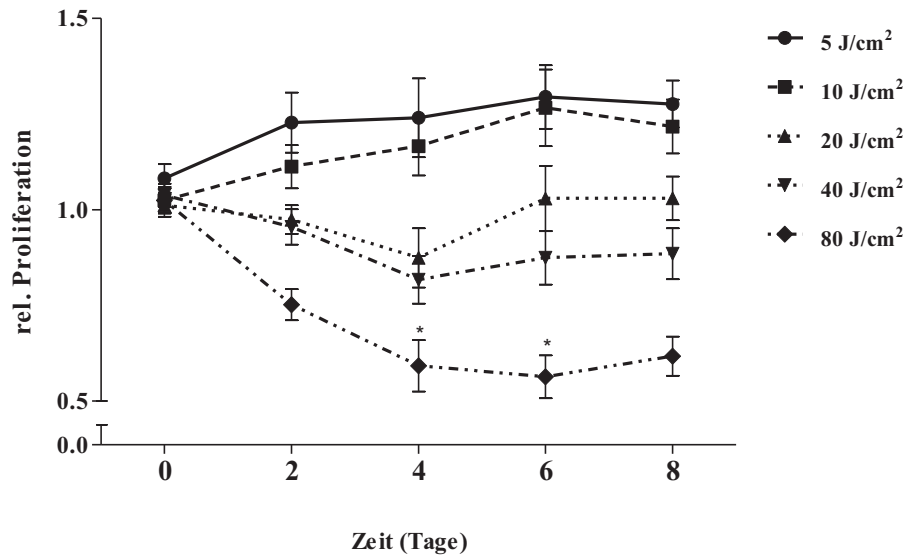


Abbildung 44: Die relative Zellproliferation von Fibroblasten nach Bestrahlung. Ein Zellpool aus humanen dermalen Fibroblasten wurden über acht Tage mit Dosen von 0–80 J/cm² bestrahlt. Die Proliferation wurde mittels CellTiter Blue-Assay bestimmt und anschließend auf die unbestrahlten Zellen normiert (* = signifikant zu unbestrahlten Zellen [$p < 0,05$]; $n = 7 - 15$; technisches Replikat).

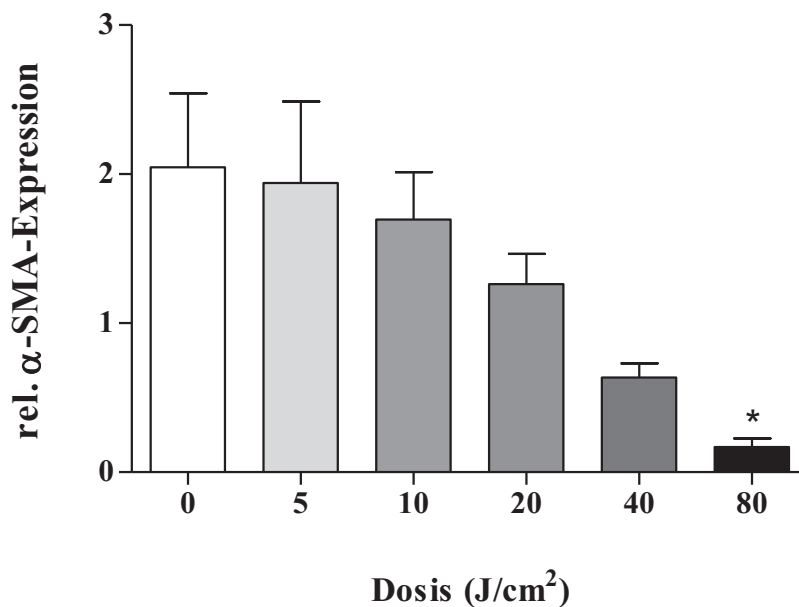


Abbildung 45: Die relative Expression des Proteins α -SMA in Relation zum Kontrollprotein GAPDH.

Humane dermale Fibroblasten wurden über fünf Tage mit Dosen von 0–80 J/cm² bestrahlt und mit 5 ng/ml TGF- β aktiviert. (* = signifikant zu unbestrahlten Zellen [$p < 0,05$]; $n = 6$).

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Christoph V. Suschek und bei Prof. Dr. Joachim Windolf für die Möglichkeit bedanken diese Arbeit im Forschungslabor der Unfall- und Handchirurgie anfertigen zu dürfen. Christoph, du bist der Coolste! Ein großer Dank gilt Frau Prof. Dr. Heise für die Bereitschaft zur Annahme der Zweitbetreuung.

In diesem Labor bin ich nun seit insgesamt 5 Jahren und es ist wie mein zweites Zuhause. Ich habe hier nicht nur nette Arbeitskollegen gefunden, sondern ganz liebe Freunde, die mir in schwierigen Zeiten sowohl beruflich als auch privat immer zur Seite standen. Für dieses Klima sind nicht zuletzt Samira Seghrouchni, Jutta Schneider und Christa Wilkens verantwortlich, da sie mit Ihrem großen Herzen und Ihrem fachlichen Know-how den Laden zusammenhalten. Ich danke euch sehr für eure Hilfe.

Für die ganzen hilfreichen Tipps und netten Gespräche möchte ich mich bei Dr. Vera Grotheer, Benita Sahlender, Christine Volkmar und Anne Bollmann bedanken. Auch wenn mal was schief ging, beim gemeinsamen Frühstück haben wir immer viel gelacht.

In den letzten Jahren sind viele nette Kollegen gekommen und gegangen und es wären nun zu viele, um sie alle aufzuzählen, aber ich danke Olga, Samet, Martha, Jule, Flo, Alex, Pony, Vanessa, Julian, Nadine und natürlich Max für den Spaß, den wir zusammen hatten. Ganz besonders danke ich der Resi, denn aus Arbeitskolleginnen sind enge Freunde geworden. Du hast mir in einer ganz schweren Zeit geholfen und immer an mich geglaubt.

Ohne meine liebe Familie und meine besten Freunde wäre ich nie so weit gekommen. Danke Mama und Papa für die Unterstützung über all die Jahre. Danke auch an meine Schwester Annette und an Micha für eure Unterstützung.

Ebenfalls bedanke ich mich auch bei meinen Hühnern, allen voran meiner besten Freundin Laura. Mittlerweile sind es 23 Jahre Freundschaft und ich freu mich auf die nächsten 23 Jahre. Danke auch an Martha und Ariane für eure Freundschaft.

Last but not least bedanke ich mich bei meinem Schatz Fabian und unserer pelzigen Mitbewohnerin Nola. Ich weiß dass ich im letzten Jahr sehr anstrengend war und du hast nicht nur einmal verhindert, dass ich den PC aus dem Fenster werfe. Wenn ich traurig war und nichts lief, hast du mich zusammen mit der Maus immer wieder aufgemuntert. Ich liebe euch beide, ihr seid meine kleine Familie.

Wissenschaftliche Beiträge

Vorträge

Chirurgische Forschungstage 2013

„Einfluss von hochintensivem blauem LED-Licht auf die Physiologie humaner Fibroblasten“

Julia Krassovka

Deutscher Kongress der Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) 2014

„Molekulare Grundlagen der durch blaues Licht induzierten Differenzierungshemmung humaner Fibroblasten zu Myofibroblasten“

Julia Krassovka¹, Christoph V. Suschek¹, Joachim Windolf¹

European Society for Photobiology 2015 Congress

“Molecular basis of blue light (453 nm)-induced inhibition of fibroblast differentiation to myofibroblasts”

Julia Krassovka¹, Jörg Liebmann², Matthias Born², Christoph V. Suschek¹, Joachim Windolf¹

Deutscher Kongress der Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) 2016

„Die NADPH-Oxidase 4 als molekulares Zielelement der durch blaues Licht induzierten Differenzierungshemmung humaner Fibroblasten zu Myofibroblasten“

Julia Krassovka¹, Christoph V. Suschek¹, Joachim Windolf¹

Poster

Deutscher Kongress der Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) 2013

„Modulation Fibrose-relevanter Parameter humaner Hautfibroblasten durch hochintensives blaues LED-Licht“

Julia Krassovka¹, Christian Opländer², Matthias Born², Christoph V. Suschek¹, Joachim Windolf¹

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Julia Marie Krassovka