

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Joachim Windolf

**Blue light ($\lambda = 453$ nm) nitric oxide dependently
induces β -endorphin production of human skin
keratinocytes *in-vitro* and increases systemic
 β -endorphin levels in humans *in-vivo***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Isabel Albers

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Albers, I., Zernickel, E., Stern, M., Broja, M., Busch, H. L., Heiss, C., Grotheer, V., Windolf, J., Suschek, C. V., (2019), Blue light ($\lambda = 453 \text{ nm}$) nitric oxide dependently induces β -endorphin production of human skin keratinocytes *in-vitro* and increases systemic β -endorphin levels in humans *in-vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*. (145) 78-86 [1]

Zusammenfassung

Das Hormon β -Endorphin ist ein endogenes Opioid, das in analgetische Wirkmechanismen, Belohnungsprozesse, Verhaltensmuster, immunregulierende Mechanismen und Prozesse der Stressbewältigung involviert ist. β -Endorphin wird in Nervenzellen des peripheren und zentralen Nervensystems sowie in peripheren Geweben produziert. Besondere Bedeutung kommt hier der Haut zu, in der ein großer Teil des neuroendokrinen Systems aus Keratinozyten besteht. Die Produktion von β -Endorphin in der Haut wird durch ultraviolette Strahlung induziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von sichtbarem blauen Licht ($\lambda = 453 \text{ nm}$) auf die Produktion von β -Endorphin in humanen Keratinozytenkulturen *in-vitro* untersucht. Es wurde erstmals gezeigt, dass blaues Licht die Produktion von β -Endorphin in humanen Keratinozyten *in-vitro* signifikant induziert. Interessanterweise wurde neben der erhöhten Sekretion von β -Endorphin auch eine signifikant gesteigerte Freisetzung von nicht-enzymatisch erzeugtem Stickstoffmonoxid (NO) detektiert.

Im Rahmen einer *in-vivo* Studie, die ebenfalls Teil der veröffentlichten Publikation ist, wurde gezeigt, dass blaues Licht auch einen Einfluss auf die systemische Freisetzung von β -Endorphin bei ganzkörperexponierten Personen *in-vivo* hat. Blaues Licht führte zu einer signifikanten Steigerung der systemischen β -Endorphin-Spiegel der Probanden *in-vivo*. Parallel dazu konnte bei den Probanden auch eine erhöhte systemische Konzentration bioaktiver Stickstoffmonoxid-Derivate detektiert werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Stickstoffmonoxid (NO) eine zentrale Rolle im molekularen Wirkmechanismus der durch blaues Licht induzierten Freisetzung von β -Endorphin spielt. In weiteren Versuchen induzierte exogen appliziertes Stickstoffmonoxid die β -Endorphin-Produktion in humanen Keratinozytenkulturen *in-vitro* signifikant.

Die Erkenntnis, dass blaues Licht die β -Endorphin-Konzentration *in-vivo* und *in-vitro* steigert, kann plausibel durch die Abfolge folgender Ereignisse erklärt werden: 1.) Die nicht-enzymatische Bildung von NO im exponierten Hautgewebe wird durch blaues Licht induziert. 2.) Kutan produziertes Stickstoffmonoxid wird systemisch verteilt. 3.) Dies führt nachfolgend zu einer NO-abhängigen Induktion der β -Endorphin-Synthese in epidermalen Keratinozyten und 4.) wahrscheinlich führt dies ebenfalls zu einer NO-abhängigen Modulation der β -Endorphin-Synthese in spezialisierten Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems.

Abstract

β -Endorphin is an endogenous opioid neuropeptide and hormone that exerts a broad spectrum of physiological activity on mood, immune functions, pain management, reward effects and behavioral stability. β -Endorphin is produced in certain neurons within the central and peripheral nervous system but also in the skin. The production of β -endorphin in the skin is stimulated in particular by ultraviolet radiation.

In the present work the impact of visible blue light at a wavelength of 453nm on β -endorphin production of primary human skin keratinocytes *in-vitro* has been investigated. It was found that blue light irradiation significantly enhanced keratinocytic β -endorphin production of human skin keratinocyte cultures *in-vitro*. Interestingly, in human skin keratinocyte cultures elevated β -endorphin formation was paralleled by significantly increased levels of non-enzymatically generated nitric oxide (NO).

The published paper also includes work on systemic β -endorphin formation of whole-body exposed subjects *in-vivo*. It was shown that blue light also enhanced systemic β -endorphin concentrations in light exposed healthy subjects. Furthermore elevated systemic β -endorphin values of blue light-exposed subjects were accompanied by enhanced systemic concentrations of bioactive NO derivatives.

These findings point to a pivotal role of nitric oxide in the molecular mechanism of the observed blue light-induced effects, and indeed, exogenously applied NO was able to significantly enhance β -endorphin production in human skin keratinocyte cultures. Thus, our finding of blue light-induced increases in β -endorphin concentration *in-vitro* and *in-vivo* can be plausibly explained by an event sequence comprising 1.) blue light-driven non-enzymatic formation of nitric oxide in the exposed skin tissue, 2.) systemic distribution of cutaneous produced nitric oxide, 3.) a subsequent NO-dependent induction of β -endorphin synthesis in epidermal keratinocytes and 4.) probably also an NO-dependent modulation of β -endorphin synthesis in specialized neurons within the central and peripheral nervous system.

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
bspw.	beispielsweise
CLIP	<i>Corticotropin-like intermediate lobe peptide</i>
cm	Zentimeter
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
DETA/NO	Diethylentriamin/Stickstoffmonoxid-Addukt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
iNOS	induzierte NO-Synthase
J	Joule
LPH	Lipotropin
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
N₂O	Distickstoffmonoxid
PC	Prohormon-Konvertase
POMC	Proopiomelanocortin
qPCR	<i>real-time</i> quantitative Polymerase-Kettenreaktion
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

RX-NO	Nitrosoverbindung
SAD	Saisonal bedingte Depression
UV	ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Zusammenfassung.....	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung in die Thematik.....	1
1.2 Ethikvotum	8
1.3 Ziele der Arbeit.....	8
2 Blue light ($\lambda = 453$ nm) nitric oxide dependently induces β-endorphin production of human skin keratinocytes <i>in-vitro</i> and increases systemic β-endorphin levels in humans <i>in-vivo</i>, Albers, I., et al. Free Free Radical Biology and Medicine 145 (2019) 78-86	10
3 Diskussion	11
Literaturverzeichnis	19
Danksagung.....	25

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Zahlreiche Studien der letzten Jahre ermittelten den Einfluss von Ultraviolettstrahlung (UV-Strahlung) auf die β -Endorphin-Expression in der Haut. Die Forschung über die Effekte des sichtbaren Lichts - insbesondere des blauen Lichts - und seinem Einfluss auf die β -Endorphin-Produktion wurde hingegen vernachlässigt. Im Hinblick auf die klinische Anwendung von Lichttherapien ist aber gerade die Verwendung von blauem Licht von besonderem Interesse, da es im Gegensatz zu UV-Licht keine kanzerogene Wirkung auf die Haut hat. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von sichtbarem blauem Licht ($\lambda = 453 \text{ nm}$) auf die Produktion von β -Endorphin in humanen Keratinozyten der Haut.

Das Hormon β -Endorphin ist ein endogenes Opioid, das im peripheren und zentralen Nervensystem freigesetzt wird und dort in analgetische Wirkmechanismen, Belohnungsprozesse, immunregulierende Mechanismen, Verhaltensmuster und Prozesse der Stressbewältigung involviert ist [2-4].

β -Endorphin bindet im Nervensystem mit hoher Affinität an μ -Opioid-Rezeptoren, an die auch Morphin oder Heroin binden [5]. Es besitzt eine starke analgetische Wirkung, die bis zu 100-fach stärker ist, als die von Morphin [6]. Das Peptid ist in der Lage, das Schmerzempfinden sowohl im peripheren, als auch im zentralen Nervensystem zu modulieren. Die analgetische Wirkung von β -Endorphin ist so stark, dass Menschen mit schwersten Verletzungen in einer Akutsituation zunächst kaum Schmerzen empfinden. [3, 7-9]

β -Endorphin entsteht aus dem Vorläuferpeptid Proopiomelanocortin (POMC), das durch Enzyme, sogenannte Prohormon-Konvertasen, in mehrere Peptidhormone prozessiert wird [10-12]. Der Name des Prohormons POMC setzt sich aus den Einzelnamen seiner Endprodukte zusammen, in die es im Rahmen der Proteinprozessierung gespalten wird. Hierzu zählen β -Lipotropin (β -LPH), von dem das endogene Opioid β -Endorphin in einem zweiten Schritt abgespalten wird [13], sowie das Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH) und das adrenocorticotrope Hormon (ACTH). Die Prohormon-Konvertasen, die für die posttranslationale Proteinmodifikation von POMC verantwortlich sind, werden genauer als Prohormon-Konvertase 1 (auch Prohormon-Konvertase 3 bzw. Prohormon-Konvertase 1/3) und Prohormon-Konvertase 2 bezeichnet [10]. Mittels proteolytischer Spaltung wird POMC zunächst durch das Enzym Prohormon-Konvertase 1 (PC 1) in die größeren Pro-

dukte ACTH und β -LPH [13, 14] sowie in ein N-terminales Fragment (N-POMC) und ein *Joining-Peptid* zerlegt. Anschließend werden diese größeren Peptide mit Hilfe der Prohormon-Konvertase 2 (PC 2) in kleinere Endprodukte zerteilt [12]. Durch die Spaltung von ACTH entstehen α -MSH und CLIP (*Corticotropin-like intermediate lobe peptide*). β -LPH wird durch die PC 2 in γ -LPH und β -Endorphin aufgetrennt. [12, 13, 15]. Auch andere Peptidhormone, die aus POMC entstehen, haben neben β -Endorphin eine relevante Wirkung auf den Organismus. α -MSH regt beispielsweise die Pigmentierung der Haut an, indem es auf Zellebene die Freisetzung von Melanin reguliert [16, 17]. ACTH stimuliert die Cortisol-Freisetzung in der Nebennierenrinde.

Der Hauptsyntheseort von Proopiomelanocortin ist die Hypophyse [18]. Neben der Hypophyse werden POMC und seine Endprodukte aber auch im zentralen Nervensystem und in peripheren Geweben gebildet. Besondere Bedeutung kommt hier der Haut zu, in der ein großer Teil des neuroendokrinen Systems aus Keratinozyten und Melanozyten besteht. [19-23]

In humanen Keratinozyten der Haut induziert UV-Licht die Freisetzung des Hormons β -Endorphin [24]. Bisher beschäftigten sich mehrere Studien damit, den genauen Wirkmechanismus diesbezüglich offen zu legen. Cui et al. zeigten, dass durch die kanzerogene Wirkung des UV-Lichts bei der Bestrahlung der Haut der Tumorsuppressor p53 aktiviert wird und dieser wiederum direkt die Synthese von POMC stimuliert [25]. Der Tumorsuppressor p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle bei der Regulation des Wachstums von Zellen spielt, bei denen es zuvor zu einer Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) gekommen ist. Durch eine Unterbrechung des Zellzyklus verhindert p53 die weitere Proliferation entarteter Zellen und führt sie in die Apoptose über [26-28]. Die UV-induzierte Aktivierung des Tumorsuppressors p53 bewirkt neben der direkten Steigerung der Synthese von POMC auch eine gesteigerte Sekretion der Endprodukte α -MSH und β -Endorphin [25].

β -Endorphin und α -MSH, die in der Haut lokal sezerniert werden, wirken systemisch auf den Organismus [24]. In einer Studie am Mausmodell von Fell. et al. wurden signifikant erhöhte β -Endorphin- und α -MSH-Spiegel im Blut der Mäuse nach einer lokalen Exposition der Haut mit UVB-Licht nachgewiesen [24]. Ursächlich hierfür war die erhöhte Produktion von POMC in den Keratinozyten der Haut sowie die anschließende Freisetzung der Endprodukte aus den Keratinozyten in die Blutbahn. [24]

Die durch UV-Licht induzierten erhöhten β -Endorphin-Plasmaspiegel führten in Tierversuchen zu einer Herabsetzung der Schmerzschwelle [24]. Die analgetische Wirkung des β -Endorphins konnte jedoch durch die Verabreichung des Opioid-Antagonisten Naloxon wieder aufgehoben werden. [24]

Dass eine chronische UV-Exposition abhängig macht, zeigten Fell et. al ebenfalls am Mausmodell [24]. Die Gabe von Naloxon führte nach einer chronischen UV-Exposition zu Entzugserscheinungen der Mäuse. Außerdem entwickelten die Tiere konditionierte Verhaltensmuster, um eine weitere Gabe von Naloxon zu verhindern. So vermieden sie es, sich in Bereichen aufzuhalten, wo ihnen Naloxon verabreicht wurde und bevorzugten einen anderen Platz, wo stattdessen eine Kochsalzlösung injiziert wurde. Mäuse, bei denen das β -Endorphin-Gen oder die durch p53-induzierte POMC-Synthese manipuliert beziehungsweise deaktiviert wurde, zeigten weder Entzugserscheinungen nach einer Naloxon-Gabe noch entwickelten sie die beschriebene Platzaversion. [24]

Neben der Erhöhung der β -Endorphin-Spiegel im Blutplasma bewirkt die Bestrahlung der Haut mit UV-Licht auch eine Erhöhung der β -Endorphin-Spiegel im Nucleus arcuatus des Hypothalamus [29]. Vermutlich beruht dies auf dem retrograden Transport von β -Endorphin aus der Haut in das Gehirn [29].

In der Literatur gibt es viele Hinweise dafür, dass β -Endorphin einen tiefgreifenden Einfluss auf das menschliche Gehirn hat. Dafür spricht zum Beispiel, dass das Hormon in Teilen des Gehirns nachgewiesen wurde, die für die Verarbeitung von Emotionen und für das Gedächtnis verantwortlich sind, wie beispielsweise der Hippocampus, die Amygdala und weitere Teile des limbischen Systems [30-32]. Die aktuelle Datenlage legt nahe, dass β -Endorphin in Pathomechanismen psychiatrischer Erkrankungen und in die Verarbeitung von Stressreaktionen involviert ist [33]. Genaue Wirkmechanismen sind jedoch bisher nicht erforscht worden.

In den bislang veröffentlichten Daten finden sich widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Einflusses von β -Endorphin auf depressive Erkrankungen. Die Depression ist eine psychische Störung, deren Prävalenz deutlich ansteigt. Laut einer Studie der Weltgesundheitsorganisation (WHO) litten 2015 über 300 Millionen Menschen weltweit an einer depressiven Erkrankung [34]. Diese Zahl entspricht 4,4 % der Weltbevölkerung. Häufige Symptome einer Depression sind Traurigkeit, Interesselosigkeit, die Unfähigkeit, Dinge zu genießen, Schuldgefühle und ein geringes Selbstwertgefühl. Hinzu kommen Schlafstörungen, Müdigkeit und Konzentrationsschwäche. Schwere Depressionen können in den schlimm-

sten Fällen zum Suizid führen [34]. Die Ätiologie der Depression beruht auf einer multifaktoriellen Genese. Unter anderem sind Neurotransmitter-Störungen für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich. Die Monoamin-Hypothese ist eine gängige Hypothese zur Entstehung der Depression, die als Ursache der Depression eine verminderte Konzentration der Monoamine Serotonin und Noradrenalin im synaptischen Spalt beschreibt [35]. Sie wird durch die klinische Wirksamkeit der Antidepressiva gestützt, die die Wirkung von Serotonin und Noradrenalin im Gehirn steigern [36]. Es gibt viele Arbeiten, die auch auf eine verringerte Freisetzung von β -Endorphin als Ursache der Depression hinweisen [37]. Unterstützt wird diese Erkenntnis durch den Nachweis einer erhöhten Dichte von μ -Opioidrezeptoren im Gehirn von Suizidopfern post mortem [38]. Außerdem leiden Patienten mit depressiven Symptomen und vermutlich reduzierten β -Endorphin-Spiegeln häufig auch unter chronischen Schmerzen [39]: Wie schon beschrieben hat β -Endorphin eine starke analgetische Wirkung [5-7].

Ein weiteres Gesundheitsproblem, das häufig auch mit Depressionen einhergeht, ist der Drogenmissbrauch [40]. Opioide und Alkohol stimulieren die Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Dopamin in den Synapsen des Mesencephalons, wodurch Belohnungsprozesse aktiviert werden [41]. Bei dem Gebrauch von Alkohol, Kokain oder Amphetaminen wird außerdem β -Endorphin vermehrt im Nucleus accumbens, einem zentralen Teil des limbischen Systems, freigesetzt, was zunächst euphorisierend wirkt [42]. Die Datenlage spricht dafür, dass der chronische Konsum von Rauschmitteln oder die Entstehung von Abstinenzphasen hingegen zu einer Erniedrigung der β -Endorphin-Spiegel im Blutplasma führen [43-45]. In einer Studie, bei der alkoholabhängige Patienten als Entzugstherapie eine Lichttherapie mit Licht einer Wellenlänge von 513 nm erhielten, stieg die β -Endorphin-Konzentration im Blutplasma deutlich an, woraus eine Verminderung der Entzugserscheinungen, eine Minderung der depressiven Symptome und ein Rückgang des Verlangens nach Alkohol der Patienten resultierte [46]. Auch die Behandlung von depressiven Patienten mit weißem und blauem Licht wirkte sich im Vergleich zu rotem Licht positiv auf die depressive Symptomatik aus [47].

Im Leistungssport trägt β -Endorphin, das durch exzessives Training sezerniert wird, zu einer Leistungssteigerung bei [48]. Das endogene Opioid bewirkt ein gesteigertes Wohlbefinden bis hin zur Euphorie und hebt Toleranzgrenzen an. Neben der Herabsetzung des Schmerzempfindens wirkt β -Endorphin auch anxiolytisch, wodurch die Sportler in der Lage sind, ihre individuellen Leistungsgrenzen zu verschieben. [49-53] In mehreren Studien wurde durch körperliche Aktivität ein Anstieg systemischer β -Endorphin-Spiegel er-

zielt, was sich positiv auf die Stimmungslage der Athleten auswirkte [54, 55]. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass regelmäßige sportliche Aktivität signifikant die Wahrscheinlichkeit, an einer Depression zu erkranken, reduziert [56-59].

Neben den beschriebenen Wirkungen hat β -Endorphin auch einen positiven Einfluss auf Wundheilungsprozesse, indem es die Migration von Keratinozyten in der Haut anregt [60]. Außerdem reguliert es komplexe immunologische Prozesse, wie beispielsweise die direkte Einwanderung von Lymphozyten in entzündetes Gewebe oder die humorale Immunantwort, zu der die Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten und die Bildung von B-Lymphozyten gehört [4, 61-63]

Das Immunsystem kontrolliert auch das Wachstum und den Progress tumoröser Prozesse [64]. Es gibt Hinweise dafür, dass Anomalien der durch β -Endorphin gesteuerten Immunregulation mit einer erhöhten Inzidenz von Krebserkrankungen einhergehen [65]. Zhang et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Aktivierung des Immunsystems durch β -Endorphin einen therapeutischen Wert für die Krebsprävention und die Verbesserung des Gesundheitszustands von Krebspatienten haben kann [64]. Anhand des Tiermodells der Ratte (*Rattus rattus*) stellten sie fest, dass eine verstärkte Wirkung von β -Endorphin - durch spezielle β -Endorphin-Neurone im Hypothalamus - die Entstehung von karzinogen- und hormoninduzierten Krebserkrankungen in verschiedenen Geweben unterdrückte und das Wachstum sowie die Metastasierung schon bestehender Tumore verhinderte. Ursächlich hierfür war die Steigerung der angeborenen Immunantwort durch β -Endorphin. Nachweisbare Nebenwirkungen wurden in der Studie nicht detektiert. [64, 66, 67]

Die Wirkung von UV-Licht auf den β -Endorphin-Stoffwechsel und die damit einhergehenden Effekte wurden, wie bereits beschrieben, in zahlreichen Studien untersucht. Ob sichtbares Licht, insbesondere blaues Licht, einen ähnlichen Einfluss auf den β -Endorphin-Stoffwechsel hat, blieb bisher unerforscht. Das für das menschliche Auge sichtbare Licht beinhaltet Wellenlängen zwischen ca. 380 und 780 nm. Kurzwelliges blaues Licht weist als Teil des sichtbaren Spektrums Wellenlängen von 400 bis 490 nm auf. Die energiereichere Ultraviolettstrahlung hingegen umfasst kürzere Wellenlängen und wird in UVA-Strahlung (315-400 nm), UVB-Strahlung (280-315 nm) und UVC-Strahlung (100-280 nm) unterteilt. UVC-Strahlung wird vollständig von der Erdatmosphäre absorbiert und gelangt nicht an die Erdoberfläche, daher ist die Haut unter physiologischen Bedingungen nur der UVA- sowie der UVB-Strahlung ausgesetzt. UVA- und UVB-Licht tragen zur Genese von Sonnenbränden und Hautkrebs bei und beschleunigen die Hautalterung. Außerdem induziert

sowohl die UVA-Strahlung als auch die UVB-Strahlung DNA-Schäden in der Haut, die zu einer Bildung von Mutationen und schließlich zu der Entstehung von Tumoren führen können [68]. Die Eigenschaften der beiden Arten der UV-Strahlung und die photochemischen Prozesse, die in der Haut durch UVA- bzw. UVB-Strahlung ausgelöst werden, sind verschiedenartig [69]. Die langwelligere UVA-Strahlung dringt im Gegensatz zur UVB-Strahlung tiefer in die Haut ein [70] und wird im Vergleich zur UVB-Strahlung schwächer von der DNA absorbiert. Die absorbierten UVA-Strahlen führen in der Haut vor allem zu einer Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche Mutationen bestimmter Basen der DNA auslösen können [71-73]. UVB-Strahlung hingegen schädigt die DNA, indem es eine Verknüpfung von Pyrimidin-Basen der DNA induziert und damit zu der Entstehung sogenannter Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) führt [71, 74]. Können diese DNA-Schäden nicht durch Reparaturmechanismen behoben werden, entstehen Mutationen [75]. Der Tumorsuppressor p53, der bei der Entstehung von DNA-Schäden phosphoryliert wird und das Fortschreiten des Zellzyklus der betroffenen Zellen unterbricht, wird durch UVB-Strahlung stärker aktiviert, als durch UVA-Strahlung [76].

Obwohl die karzinogene und mutagene Wirkung des UV-Lichts allgemein bekannt ist, steigt die Inzidenz für Hautkrebs weltweit stetig an [77, 78]. Laut der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. haben sich die altersstandardisierten Inzidenzraten für das maligne Melanom in Deutschland seit den 1970er Jahren mehr als verfünffacht. In Deutschland erkrankten 2014 über 20.000 Personen am malignen Melanom der Haut. Die Erkrankung gehörte 2014 zu den fünf häufigsten Tumorerkrankungen aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland. Ursachen hierfür sind zunehmende Urlaubsreisen in sonnige Gebiete, aber auch die zunehmende Nutzung künstlicher UV-Quellen. [79, 80]

Im Gegensatz zu UV-Licht gilt die Bestrahlung der Haut mit blauem Licht derzeit als sicher. Bei *in-vitro* und *in-vivo* Studien verursachte blaues Licht keine gesundheitsgefährdenden Prozesse wie DNA-Schädigungen bzw. Krebserkrankungen [81, 82]. Allerdings hat auch blaues Licht unerwünschte Wirkungen. In Tierversuchen wurden Verletzungen der Netzhaut im Auge durch blaues Licht nachgewiesen [83]. Langfristig kann blaues Licht sogar die Entwicklung der altersbedingten Makuladegeneration induzieren [84, 85]. Die Anwendung von blauem Licht sollte daher nur mit einer speziellen Schutzbrille erfolgen.

Parallelen in der Wirkung von UV-Licht und blauem Licht lassen sich in Bezug auf die Hyperpigmentierung der Haut [81] sowie auf den positiven Einfluss auf Wundheilungsprozesse verzeichnen [60, 86]. Des Weiteren kann blaues Licht als Therapie hyperproliferativer Hauterkrankungen wie z.B. Ekzemen oder der Schuppenflechte (Psoriasis vulgaris) appliziert werden. Blaues Licht ($\lambda = 453 \text{ nm}$) beschleunigt den Heilungsprozess dieser Erkrankungen, indem es die Proliferation von Keratinozyten hemmt und ihre Differenzierung steigert. [87-89]

Im Rahmen der Forschung unserer Arbeitsgruppe wurde in vorherigen Studien die Wirkung von energiereichem Licht wie UV-Licht und blauem Licht auf die Haut untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass UV-Licht sowie blaues Licht die nicht-enzymatische Generierung des Moleküls Stickstoffmonoxid (NO) in der Haut *in-vitro* und *in-vivo* induzieren [90, 91]. Stickstoffmonoxid ist ein Gas, das im menschlichen Organismus durch seine Wirkung auf das Endothel der Blutgefäße eine Vasodilatation induziert und somit wesentlich zur Blutdruckregulation beiträgt [90].

Es gibt zwei Wege, die zu der Entstehung von Stickstoffmonoxid in der Haut führen: Die bereits erwähnte nicht-enzymatische Generierung von NO mittels Photolyse sowie die enzymatische Spaltung durch die NO-Synthase. Bei der nicht-enzymatischen Generierung von Stickstoffmonoxid werden NO-Derivate wie Nitrit, Nitrat oder S-Nitroso-Substanzen photolytisch, das heißt durch die Einwirkung elektromagnetischer Strahlung bzw. Licht, gespalten. S-Nitroso-Substanzen sind organische Verbindungen, die eine Nitrosogruppe ($-\text{N}=\text{O}$) enthalten [91, 92]. In der Haut üben S-Nitrosoverbindungen eine ähnliche Funktion wie NO-Moleküle aus [93]. Oplaender et al. zeigten, dass UV-Licht und blaues Licht ($\lambda = 453 \text{ nm}$) in der Lage sind, NO durch die Spaltung von S-Nitrosoalbumin in der Haut zu generieren [91]. Bei der enzymatischen Entstehung von NO wird die Aminosäure L-Arginin mittels der NO-Synthase (NOS) zu L-Citrullin oxidiert. Hierbei wird NO freigesetzt. Es existieren drei Isoformen der NO-Synthase: Die neuronale NO-Synthase (nNOS), die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die induzierte NO-Synthase (iNOS). Alle drei Formen liegen in der Haut vor [94, 95]. In Keratinozyten sind speziell nNOS und iNOS an der NO-Synthese beteiligt [96-98].

Neben der lokalen nicht-enzymatischen Entstehung von Stickstoffmonoxid in der Haut führt eine Ganzkörperexposition menschlicher Probanden mit UVA-Strahlen oder blauem Licht zu signifikant erhöhten systemischen Konzentrationen bioaktiver NO-Derivate im

Blut [90, 99]. Diese erhöhten systemischen NO-Spiegel können physiologische Effekte wie beispielsweise einen Abfall des Blutdrucks hervorrufen [90, 99].

In der aktuellen Literatur gibt es viele Hinweise dafür, dass Stickstoffmonoxid direkt oder indirekt an der Aktivierung des Proopiomelanocortin-Systems in der Hypophyse beteiligt ist. Es wird diskutiert, ob Stickstoffmonoxid eine gesteigerte Bildung der POMC-Derivate und speziell von β -Endorphin im zentralen oder peripheren Nervensystem hervorrufen kann. Wayman et al. zeigten, dass NO Einfluss auf die Freisetzung der POMC-Derivate hat, indem es die durch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-induzierte Sekretion von α -MSH aus dem Hypothalamus von Ratten steigert [100]. In der Hypophyse ist NO außerdem in die basale und die durch Interleukin-1 β -bedingte ACTH-Freisetzung involviert [101]. Die Datenlage spricht auch dafür, dass Distickstoffmonoxid (N_2O), allgemein bekannt als Lachgas, die neuronale Freisetzung von β -Endorphin in Abhängigkeit von NO induziert [102, 103].

1.2 Ethikvotum

Ein Ethikvotum mit der Studiennummer 3634 wurde am 17. Januar 2013 von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ausgestellt. Das Studienprotokoll der *in-vivo* Versuche, die ebenfalls Teil der publizierten Arbeit sind, und in Zusammenarbeit mit der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt wurden, wurde ebenfalls von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Interne Studiennummer: 5273R; Registrierungs-ID: 2015104432).

1.3 Ziele der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist es, herauszufinden, ob blaues Licht einen Einfluss auf den β -Endorphin-Stoffwechsel in humanen Keratinozyten hat. Hierbei soll der mögliche Wirkmechanismus der Freisetzung von β -Endorphin durch blaues Licht in humanen Keratinozyten aufgedeckt werden.

Zahlreiche Studien der letzten Jahre ermittelten den Einfluss von UV-Licht auf die β -Endorphin-Expression in der Haut. Die Forschung über die Effekte des sichtbaren Lichts - insbesondere des blauen Lichts - und seinem Einfluss auf die β -Endorphin-Produktion wurde hingegen vernachlässigt. Im Hinblick auf die klinische Anwendung von Lichtthera-

prien ist aber gerade die Verwendung von blauem Licht von besonderem Interesse, da es im Gegensatz zu UV-Licht keine kanzerogene Wirkung auf die Haut hat.

Um zu eruieren, ob blaues Licht einen Einfluss auf den Stoffwechsel von β -Endorphin hat, wurde die Produktion von β -Endorphin als Endprodukt sowie die Expression seines Vorläuferproteins POMC analysiert. Außerdem wurde die Expression der an der Biosynthese beteiligten Enzyme PC 1 und PC 2 sowie die Freisetzung des für UV-Licht bekannten Mediators p53 untersucht. Hierzu wurden zunächst Keratinozyten aus der Haut von zwölf Patienten, bei denen eine plastische Operation durchgeführt wurde, isoliert und kultiviert. Die Keratinozyten wurden anschließend mit blauem Licht ($\lambda = 453 \text{ nm}$) mit verschiedenen Energiedosen bestrahlt. Die Genexpression von POMC wurde mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) analysiert. Die Proteinexpression von POMC sowie die Proteinexpression von PC 1, PC 2 und p53 wurde mittels *Western Blotting* ermittelt. Die quantitative Bestimmung des Hormons β -Endorphin erfolgte mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

In weiterführenden Versuchen wurde der zugrundeliegende Wirkmechanismus der β -Endorphin-Produktion im Zusammenhang mit einem durch blaues Licht induzierten Anstieg von Stickstoffmonoxid in der Haut untersucht. Hierfür wurde die direkte Wirkung von NO auf den β -Endorphin-Stoffwechsel ermittelt, indem exogen appliziertes Stickstoffmonoxid den Keratinozyten in Form des NO-Donors Diethylentriamin/Stickstoffmonoxid-Addukt (DETA/NO) appliziert wurde.

Um schließlich zu erfassen, ob blaues Licht durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid auch die Sekretion von β -Endorphin in Keratinozyten der Haut *in-vivo* induziert, erfolgten entsprechende *in-vivo* Versuche in Zusammenarbeit mit der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, die ebenfalls Teil der publizierten Arbeit sind. Hierbei wurden Probanden einer Ganzkörperexposition mit blauem Licht ausgesetzt und anschließend die β -Endorphin-Konzentration im Serum mittels ELISA ermittelt. Außerdem wurde zuvor in den identischen Serumproben die Konzentration von Nitrosoverbindungen, die eine ähnliche Funktion wie NO-Moleküle ausüben, bestimmt.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit dienen der Aufdeckung des Wirkmechanismus der Sekretion von β -Endorphin in Keratinozyten der Haut durch blaues Licht *in-vitro* und *in-vivo*.

2 Blue light ($\lambda = 453$ nm) nitric oxide dependently induces β -endorphin production of human skin keratinocytes *in-vitro* and increases systemic β -endorphin levels in humans *in-vivo*, Albers, I., et al. Free Radical Biology and Medicine 145 (2019) 78-86

Free Radical Biology and Medicine 145 (2019) 78–86



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original article

Blue light ($\lambda = 453$ nm) nitric oxide dependently induces β -endorphin production of human skin keratinocytes *in-vitro* and increases systemic β -endorphin levels in humans *in-vivo*



Isabel Albers^a, Erika Zernickel^a, Manuel Stern^b, Melanie Broja^b, Hans Lucas Busch^b,
Christian Heiss^{b,c,d}, Vera Grotheer^a, Joachim Windolf^a, Christoph V. Suschek^{a,*}

^a Department of Trauma and Hand Surgery, Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany^b Division of Cardiology, Pulmonology and Vascular Medicine, Heinrich-Heine University, Medical Faculty, University Düsseldorf, Germany^c Department of Clinical and Experimental Medicine, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, UK^d Surrey and Sussex NHS Healthcare Trust, Redhill, United Kingdom

ARTICLE INFO

Keywords:

Nitric oxide
Beta-endorphin
Blue light
Keratinocytes
POMC
In vivo study

ABSTRACT

β -Endorphin exerts a broad spectrum of physiological activity on mood, immune functions, pain management, reward effects, and behavioral stability. β -Endorphin is produced in certain neurons within the central and peripheral nervous system but also in the skin, especially in response to ultraviolet radiation. In the present study we have investigated the impact of visible blue light at $\lambda = 453$ nm (BL) on β -endorphin production of primary human skin keratinocytes (hKC) *in-vitro* as well as on systemic β -endorphin formation of whole-body exposed subjects *in-vivo*. We found that BL irradiation significantly enhanced both keratinocytic β -endorphin production of hKC cultures as well as systemic β -endorphin concentrations in light exposed healthy subjects. Interestingly, in hKC cultures elevated β -endorphin formation was paralleled by significantly increased levels of non-enzymatically generated nitric oxide (NO), whereas elevated systemic β -endorphin values of BL-exposed subjects were accompanied by enhanced systemic concentration of bioactive NO-derivates. These findings point to a pivotal role of NO in the molecular mechanism of the observed BL-induced effects, and indeed, exogenously applied NO was able to significantly enhance β -endorphin production in hKC cultures. Thus, our finding of BL-induced increases in systemic β -endorphin concentration *in-vivo* can be plausibly explained by an event sequence comprising 1.) BL-driven non-enzymatic formation of NO in the exposed skin tissue, 2.) systemic distribution of cutaneously produced NO in the form of bioactive nitroso compounds, 3.) a subsequent NO-dependent induction of β -endorphin synthesis in epidermal keratinocytes, and 4.) probably also a NO-dependent modulation of β -endorphin synthesis in specialized neurons within the central and peripheral nervous system.

1. Introduction

β -endorphin is an endogenous opioid neuropeptide and hormone that is produced in certain neurons within the central and peripheral nervous system (for review see Refs. [1,2]). β -endorphin exerts local as well as global functions. Global function of this neuropeptide comprises pain management, reward effects, behavioral stability, stress response, immune regulation, and decreasing bodily stress [1–3]. β -endorphin binds with high affinity to the presynaptic μ -opioid receptor, where morphine and heroine bind as well and it exerts pronounced analgesic property [2], which is up to 100 times the analgesic potency of morphine [2]. β -endorphin modulates pain perception both in the central nervous system and the peripheral nervous system [3].

In humans β -endorphin is derived from its precursor protein proopiomelanocortin (POMC), which is predominantly synthesized in the pituitary gland, but also in the central nervous system and in several peripheral tissues (for review see Ref. [2]). POMC is posttranslationally modified by prohormone convertase 1/3 (PC1/3) and PC2. PC1/3 cleaves POMC into adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and β -lipotropin (β -LPH). Subsequently PC2 processes β -LPH to γ -LPH and the C-terminal fragment β -endorphin.

In addition to tissues of the nervous system, also in the skin a part of the neuroendocrine system could be detected in keratinocytes and melanocytes [2,4]. In human skin keratinocytes ultraviolet (UV) B-radiation was shown to induce a pronounced POMC expression by a mechanism comprising activation of the tumor suppressor gene p53

* Corresponding author. Department of Trauma and Hand Surgery, Heinrich Heine University Hospital Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225, Düsseldorf, Germany.
E-mail address: suschek@uni-duesseldorf.de (C.V. Suschek).

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.022>

Received 10 July 2019; Received in revised form 20 September 2019; Accepted 20 September 2019

Available online 22 September 2019

0891-5849/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

[5]. Keratinocytic prohormone convertases can cleave POMC up to β -endorphin that was shown to be secreted in significant amounts in keratinocyte cell culture *in-vitro* after UVB-exposure [2,6]. In rodents a systemic UVB-treatment *in-vivo* was shown to lead to POMC-derived β -endorphin synthesis in the skin and resulted in significantly enhanced plasma levels of β -endorphin and α -MSH [7,8]. Interestingly, UVB exposure of mice was shown to lead in a signaling system in the arcuate nucleus and the expression of the POMC gene, an observation suggesting that exposure of skin to UVB radiation has a profound far-reaching influence on brain activity [8].

As part of our research on the physiological role of nitric oxide (NO) during exposure of human skin to energy-rich radiation we recently could observe that UVA-radiation [9] but also blue light at 453 nm [10] were able to initiate a significant non-enzymatic formation of NO in the irradiated skin area. This NO was the product of photodecomposition of photo-labile NO derivatives. In the case of whole body exposure of healthy volunteers to UVA or blue light the enhanced cutaneous formation of non-enzymatic NO resulted in significantly augmented systemic concentrations of bioactive NO derivatives as well as in markedly increased systemic NO-mediated physiological effects, i. e. reduced blood pressure [9,11].

The last point concerning the systemic effects of NO is of particular importance as there are many hints within the existing literature that NO might be directly or indirectly involved in the activation of the pituitary pro-opiomelanocortin system leading to elevated formation of POMC-derived peptides in the central nervous system or peripheral tissues. In this context it could be demonstrated that nitrous oxide (N_2O) induces neuronal release of β -endorphin formation in a strong NO-dependent manner [12,13], that at pituitary level NO is involved in basal and interleukin-1 β -induced ACTH release *in-vitro* [14], and that N-methyl-D-aspartate (NMDA)-stimulated release of α -MSH from the rat hypothalamus occurs via release of nitric oxide [15]. Furthermore, in mice lacking the neuronal NO synthase (nNOS) β -endorphin-immunoreactivity in the arcuate nucleus [16] and the expression of POMC and POMC-derived peptides in the mouse pituitary was reduced [17]. Finally, Hiramoto et al. could demonstrate that UVA-irradiation of the eye can activate a nitric oxide-dependent hypothalamo-pituitary pro-opiomelanocortin pathway [18].

Against this background we here have investigated the impact of blue light on β -endorphin production of primary human skin keratinocytes *in-vitro* as well as on β -endorphin values of blood samples of whole-body blue light-exposed subjects *in-vivo*.

2. Materials and methods

2.1. Materials

If not otherwise indicated, all chemicals, antibodies, and assay kits were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Munich, Germany).

2.2. LED-arrays

For the *in-vitro* experiments we used a narrow-band LED-device (12 $\times$ 10 cm LED-arrays with 60 LEDs) emitting monochromatic light with a maximum intensity at 453 ± 10 nm (blue). LED-arrays were provided by Philips Research (Aachen, Germany). Prior delivery the irradiance of the LED-device was characterized using an integrating (Ulbricht) sphere. If not otherwise indicated, the device was used at an irradiance of 38 mW/cm² at a distance of 8 cm.

The device used in the *in-vivo* study was a full body blue light device from Philips Light & Health (Eindhoven, The Netherlands). The device was a non-CE marked prototype but it has been built according to the basic electrical safety standard for medical devices IEC 60601-1. It was equipped with 720 LEDs emitting UV-free blue light with a peak wavelength of about 450 ± 5 nm. The irradiance level was about 40 mW/

cm² at a distance of 50 cm from the skin resulting in a fluence of 72 J/cm² within 30 minutes.

2.3. Clinical pilot study

2.3.1. Study design, endpoints, and protocol

This study was designed as a 2 arm randomized, controlled, cross over study, exactly as shown recently [11]. The 14 healthy male volunteers were exposed in random order to monochromatic blue light (450 nm) and control light (filter foil covering the volunteers) each on a different day separated by one week of wash-out delivered by the same irradiation device. The primary endpoint of the study was a significant change in peripheral blood pressure after 30 minutes of blue light (450 nm) irradiation compared to the control irradiation. Secondary endpoints included concentrations of β -endorphin and nitroso-compounds (RX-NO) in plasma and changes in several systemic as well as local hemodynamic parameters.

After placement of an intravenous catheter in the left cubital vein, volunteers rested over 30 minutes in a supine position on the irradiation device in a quite air conditioned room only wearing swimming shorts and safety glasses for acclimatization. Baseline measurements were taken immediately before exposure to 30 min irradiation of blue light or control light and were followed over 2 h. For control light exposure, the volunteers were covered during irradiation with a thin opaque foil. Average skin temperature increase during blue light irradiation was comparable to the temperature increase below the foil used for control irradiations ($\Delta T = 7 \pm 1^\circ\text{C}$). Blood draws for analysis of circulating β -endorphin and nitric oxide derivatives were drawn via an intravenous catheter at baseline (-60 min), immediately after irradiation (0 min) as well as 60 and 120 minutes after light exposure. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Heinrich Heine University Dusseldorf and all volunteers gave written informed consent (Clinicaltrials.gov: NCT03226587).

2.3.2. Study subjects

Fourteen healthy Caucasian men, between 30 and 60 years of age were recruited at the University of Düsseldorf (August 2016–August 2017). The study subjects were screened based on a clinical physical exam including blood pressure measurement, EKG, and routine clinical test (blood lipids, CRP, full blood count, liver enzymes, hemoglobin, glucose). Inclusion criteria for participation in the study were an age of 30–60 years, Caucasian skin type, male gender, and signed consent form. Exclusion criteria were diabetes mellitus, acute inflammation, arrhythmia, active malignancy, terminal renal failure, manifest cardiovascular disease, i.e. coronary artery disease, peripheral artery disease, cerebrovascular disease, heart rhythm other than sinus, arterial hypotension (systolic < 100 mmHg), active medical treatment with blood pressure lowering medication, photodermatitis and/or photosensitivity, porphyria and/or hypersensitivity to porphyrins, congenital or acquired immunodeficiency, subjects with genetic deficiencies attached with increased sensitivity to light or increased risk to dermatologic cancer (i.e. Xeroderma pigmentosum, Cockayne Syndrome, Bloom-Syndrome).

2.4. Blue light-induced emanation of nitric oxide from human skin *in-vivo*

Blue light at 453 nm is able to generate intracutan nitric oxide (NO) formation as a result of photodecomposition of photolabile NO-derivates in human skin [10]. In order to quantify NO emanation from human skin during blue-light exposure, we used a stainless steel collection chamber for the accumulation of emanated gases from human skin. The cylindrical airtight chamber covered a skin area of 16.0 cm², had a height of 2.2 cm and a total volume of 35.2 cm³ [19]. The light transparent front window allowed illumination of the underlying skin. The chamber was placed on the clean inner forearm of volunteers and flushed with an inert gas (nitrogen or helium) for 1 min to remove

oxygen [20]. After stopping the gas flow, NO from untreated as well as irradiated skin (see LED light sources mentioned above) was accumulated in the closed chamber for 180 s. The NO content of the chamber was quantified by flushing the contents with the trace gas into the chemiluminescence-based NO detector CLD 88e from Eco Physics (Duernten, Switzerland).

2.5. Quantification of nitrite and nitroso compounds (RX-NO) in blood plasma by CLD

The concentrations of nitrite and nitrosated compounds (RX-NO), sum of N- and S-nitroso-compounds, which represent the transport form of nitric oxide in blood, were quantified in serum samples obtained from blue light (450 nm)-irradiated as well as sham treated subjects of the study by reductive denitrosation using a mixture of iodine/iodide in glacial acetic acid and subsequent detection of the liberated NO by its gas-phase chemiluminescence reaction with ozone, essentially as described previously [21,22]. Nitrite concentrations were calculated by the difference in peak areas of untreated aliquots and of those subjected to preincubation with 0.5% sulfanilamide/HCl, the latter representing total nitrosated species [23]. The chemiluminescence detector was calibrated weekly using a 100 ppb mixture of NO in N₂ or He₂ and calculated NO amounts were validated by injection of freshly prepared nitrite standards into the reaction mixture.

2.6. Establishment of primary skin keratinocyte cell cultures

Human skin specimens were obtained with patients' consent from twelve male and female patients aged between 20 and 65 who underwent plastic breast or abdominal surgery. The experimental protocol and the use of human material has been approved by the local *Ethics Committee of the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf* (study number: 3634). After rinsing skin specimens in phosphate buffered saline (PBS) subcutaneous fat was removed, the skin was sliced in pieces (1 × 0.5 cm) and incubated in 0.1% Dispase grade II (Roche) at 4 °C, overnight. The next day, the skin was incubated in a water bath for 10 min at 37 °C while constant shaking. After incubation 4 °C cold PBS was added and the epidermis and dermis were separated using forceps. The epidermis was incubated in Trypsin-EDTA/PBS Solution (1:3) with constant shaking for 10 min at 37 °C. After adding 2 ml fetal calf serum (FCS) (PAN Biotech) the tissue mixture was filtered through a cell strainer (pore size: 100 µm), spinned at 250 × g for 10 min and washed with PBS. Supernatant was discarded and the pellet was resuspended in keratinocyte culture medium (Keratinocyte-SFM, Gibco) supplemented by the corresponding manufacturer's supplements, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (PAN Biotech). Cells were cultivated in 100 mm cell culture dishes under standard culture conditions (98% humidity, 37 °C, 5% CO₂).

Medium was changed twice a week and cells were inspected daily with a light microscope. If cells reached approx. 70–80% of confluence, they were sub-cultured, seeded or cryo-conserved. Cells were detached using a cell scraper after incubating in 2 ml 1% trypsin/EDTA solution (Biowest) at 37 °C and neutralizing with 2 ml trypsin neutralizer (Gibco) after remaining 5 min in trypsin. After spinning at 300 × g for 5 min supernatant was discarded, cells were resuspended in keratinocyte culture medium and cell number was determined by using the Neubauer chamber.

For experiments cells (2 × 10⁵ cells/well) were transferred to transparent six-well culture plates and were cultivated in 2 ml Keratinocyte Culture Medium/well for five days to achieve a confluent monolayer of cells. All measurements were performed with cells from passages one to four.

2.7. Irradiation of human keratinocytes with LED-arrays

According to specification of Philips Research the LED device was distance and power adjusted to deliver 38 W/cm². Keratinocytes were exposed to doses of 10, 20, 40 and 80 J/cm². During irradiation the phenol red-containing Keratinocyte Culture Medium in the six-well cell culture plates was replaced through colorless PBS. To avoid heat generation and vaporization of media during irradiation, the irradiated cell culture plates were cooled by ventilation and temperature of the media was measured to ensure to not exceed 35 °C. Control plates were treated similar to irradiated plates and remained outside the incubator at room temperature while irradiation. After irradiation PBS was replaced through keratinocyte culture medium and cells were incubated at 37 °C, 5% CO₂ until harvesting.

2.8. Quantification of S-nitroso-proteins in homogenates of human skin fibroblasts by CLD

Detection of intracellular concentrations of nitrite or nitroso compounds was performed with homogenates of human skin keratinocytes, which were prepared by detaching cells from culture dishes by trypsinization, diluting the pallet of 1 × 10⁷ fibroblasts in 300 µl NEM-buffer (PBS containing 5 mM N-ethyl-maleimide (NEM), 2.5 mM EDTA, protease inhibitor cocktail), and homogenizing the cell suspension by ultrasonification for 1 min. After short centrifugation, supernatants were collected, diluted to a protein content of 10 mg/ml, and immediately used or frozen at –20 °C for a maximum period of two weeks. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad D_c Protein Assay Kits (Bio-Rad, Munich, Germany). All solutions were adjusted to pH 7.4. This pH level has been kept constant during the entire experiment.

Concentrations of S-nitroso species in homogenates of human skin were quantified by reductive denitrosation of skin homogenate samples prepared in the presence or absence of N-ethyl-maleimide (NEM) using a mixture of iodine/iodide in glacial acetic acid and subsequent detection of the released NO by the CLD exactly as described [24]. Discrimination between S-nitrosated molecules (RS-NO) and other nitroso species was achieved by preincubation of sample aliquots with mercuric chloride (HgCl₂; 0.2%), which selectively cleaves S–NO bonds while preserving N-nitroso moieties, followed by sulfanilamide [22].

2.9. Quantitative RT-PCR

For quantitative RT-PCR cells were harvested 0 min, 30 min or 60 min post-irradiation. Medium was discarded and cells were washed with PBS, dislodged from the six-well plates using a cell scraper and transferred into micro-centrifuge tubes. After spinning at 10,000 rpm for 30 s, supernatant was discarded and total RNA was purified from keratinocytes by using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. To remove contaminating DNA, DNase and divalent cations from RNA, Ambion DNA-free DNA Removal Kit was used. Absorbance measurements at 260 nm were performed on a spectrophotometer (Nano Drop ND-1000, Peqlab) to quantify RNA concentration. Total RNA was converted into cDNA using Omniscript-RT-Kit (Qiagen) and subsequently incubated in a thermal cycler at 37 °C for 60 minutes (MyCycler, BioRad).

For PCR reactions 10 ng/4 µl cDNA of each sample were analyzed in triplicate and normalized to 18S rRNA using reactions mixtures containing SYBR green (12.5 µl) (Power SYBR Green, Applied Biosystems), DNase, RNase free water (for POMC-gene: 7 µl, for 18S rRNA: 8 µl) and upper and lower primers (each for POMC-gene: 0.75 µl, for 18S rRNA: 0.25 µl). POMC-gene primer sequences were used as described elsewhere [25]. 18S rRNA primer sequences were 5'-CATGGTGACCACGG GTGAC-3' as forward primer and 5'-TTCCTTGGATGTGGTAGCCG-3' as reverse primer.

Samples were heated at 95 °C for 10 min initially and amplified for 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C by 7300-Real Time PCR

System (Applied Biosystems).

2.10. Western Blotting

For Western Blot analysis cells were harvested 30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 8 h after blue light irradiation of the six-well plates. Adherent cells were washed with PBS, dislodged from tissue culture plate using a cell scraper and transferred into microcentrifuge tubes. After spinning at 10,000 rpm for 30 s, supernatant was discarded and 30 μ l of RIPA lysis buffer (Abcam: 50 mM Tris pH = 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS) was added. By ultrasonic treatment cells were further lysed. The concentration of protein was measured using Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) as described in the instructions provided by the manufacturer and a spectrophotometer. 12% stacking gel and 3% separating gel were used. Samples of 30 μ g protein were mixed with 20% 2-mercaptoethanol and 4 x Laemmli Sample Buffer (252 mM Tris-HCl, 40% glycerol, 8% SDS, 0.01% bromophenol blue). After heating for 5 min at 100 °C, samples were loaded on SDS-PAGE and ran through the separating gel with low voltage of 60 V and through the stacking gel with higher voltage of 130 V. For a further control a sample of murine brain tissue containing the pituitary gland was loaded on each gel. Using the Bio Rad's Trans-Blot Turbo device proteins were transferred within 25 min by 25 V and 2.5 A to a nitrocellulose membrane. All membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) for one hour and incubated with the primary antibody in 5% BSA (1:1000) at 4 °C with gentle shaking, overnight. In order to detect POMC, PC 1/3, PC 2 and p53 we used Goat Polyclonal Anti-POMC Antibody (Novus Biologicals), Rabbit Polyclonal Anti-PC 1/3 Antibody (Cell Signaling), Rabbit Monoclonal Anti-PC 2 Antibody (Cell Signaling) and Mouse Monoclonal Anti-p53 Antibody (Thermo Scientific). After incubating, membranes were washed 3 $\times$ 5 min in TBS-T (0.1% Tween 20) and incubated with secondary antibody in 5% TBS-T (1:1000) for one hour at room temperature. As secondary antibodies Goat Polyclonal Anti-Mouse Antibody, Rabbit Polyclonal Anti-Goat Antibody and Goat Polyclonal Anti-Rabbit Antibody (all Dako) were used. Membranes were washed again as described (3 $\times$ 5 min in TBS-T) and incubated in enhanced luminescence reagents (Thermo Fisher Scientific). To normalize protein loading, Mouse Monoclonal Anti-GAPDH Antibody (Novus Biologicals) was used incubating in 3% BSA overnight at 4 °C.

2.11. β -Endorphin-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

At time points indicated cell culture supernatants were collected and the β -endorphin content was quantified using a specific enzyme-linked immunosorbent assay kit (Cloud-Clone Corp, Katy, TX, USA), which was used in accordance to the manufacturer's instructions.

2.12. Fluorescence-spectroscopic and fluorescence-microscopic detection of NO in resting and irradiated (453 nm) keratinocytes in-vitro

Numerous more or less specific fluorescent dyes are available for research of the role of reactive oxygen and nitric oxide species in biological system, each of them bearing merits and weaknesses [26]. The cell-permeable reagent 3-Amino-4-(N-methylamino)-2',7'-difluorescein diacetate (DAF-FM, Alexis Corporation, Lausen, Switzerland) can be used for the quantitative detection of low levels of NO-adducts. It has been suggested that the primary reaction of DAF-2 does not occur directly with the nitric oxide radical but rather with its oxidation product N_2O_3 [27–29] that may be formed in solutions by autoxidation of NO in the presence of oxygen [27]. The compound is not fluorescent before reacting with the NO product to form a fluorescent benzotriazole. After entry into the cell, DAF-FM is converted by intracellular esterases into the water-soluble dye DAF-FM, which reacts with NO-adducts to form the fluorescing benzotriazole. Benzotriazole fluorescence can be measured by using an excitation wavelength of 488 nm and an emission

wavelength of 505 nm–530 nm.

Here we used DAF-FM for the indirect detection and quantification of blue light (453 nm)-induced NO generation in human skin keratinocytes in-vitro. The final DAF-FM concentration was 10 μ M (prepared from a 5 mM stock solution in DMSO) whereby DAF-FM was added to the keratinocyte cultures (1×10^5 keratinocytes per well of a six-well cell culture plate) prior light exposure and was present during irradiation (80 J/cm²). Immediately after irradiation culture supernatants were discarded, the cells were washed twice with 2 ml of PBS, 2 ml of growth medium was pipetted in each of the wells, and the fluorescent in the cultures was visualized in a fluorescence microscope. Alternatively, cells were lysed and 200 μ l of the lysate was transferred into a 96-well ELISA plate and the resulted fluorescence was quantified by a fluorescence photometer. Importantly, to grasp only the effect of non-enzymatically generated NO, keratinocyte cultures were incubated prior as well as during the irradiation with blue light (453 nm, 80 J/cm²) with 1 mM of N⁵-(1-iminoethyl)-L-ornithine dihydrochloride (L-NIO), a non-selective inhibitor of all nitric oxide synthase (NOS) isoforms.

2.13. Detection of S-nitroso proteins by immunohistochemistry

In resting human skin keratinocyte cultures, fixed by glutaraldehyde (0.2% in TBS, pH 7.0) for 15 min at 4 °C in a moist chamber, followed by inhibition of endogenous peroxidase activity with 0.3% H₂O₂ in ethanol, S-nitrosation of proteins was examined using a S-nitrosocysteine-specific rabbit anti-serum. We routinely check the reliability of the antiserum on nitrosated albumin samples by Western blot. After blocking of unspecific binding with 0.5% BSA in TBS for 30 min and rinsing, specimens were incubated with the rabbit anti-S-nitrosocysteine anti-serum used in a 1:100 dilution in TBS (supplemented with 3% low-fat milk powder and 0.5% Tween 20, pH 7.4). As secondary antibody peroxidase-conjugated goat anti rabbit IgG was used in a final dilution of 1:30 for one hour in TBS. As a negative control, samples were incubated only with the second antibody, i.e. without the application of the first antibody. All steps were performed at 4 °C. Nuclei were stained with hematoxylin for 1 min. Then, samples were incubated with 0.05% diaminobenzidine + 0.015% H₂O₂ for 5 minutes at room temperature. For light microscopy, cell samples were dehydrated, cleared with xylene and embedded in Eukitt as described previously [10,30].

2.14. Impact of nitric oxide and hydrogen peroxide on β -endorphin synthesis of human skin keratinocytes in-vitro

In order to evaluate the role of nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) on β -endorphin synthesis of human keratinocytes, human skin keratinocytes (2×10^5 cells/well) were transferred to transparent six-well culture plates and were cultivated in 2 ml Keratinocyte Culture Medium/well. After reaching a confluent monolayer keratinocyte cultures were incubated for 1, 4 or 24 h with the nitric oxide (NO)-releasing Diethylenetriamine NONOate (Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate (DETA/NO) or the mother substance DETA (Diethylenetriamine) alone at concentrations indicated. Alternatively keratinocyte cultures were incubated for 1, 4 or 24 h with hydrogen peroxide (H₂O₂) at concentrations indicated. At the mentioned time points of incubation cell culture supernatants were collected and the β -endorphin content of the supernatants was quantified by a specific ELISA.

2.15. Statistical analysis

Data were analyzed and compared by Graph Pad Prism (GraphPad Prism 5.0 for Windows) using one-way ANOVA and two-way ANOVA with post-hoc Bonferroni multiple comparison test. The common significance level of 0.05 was used.

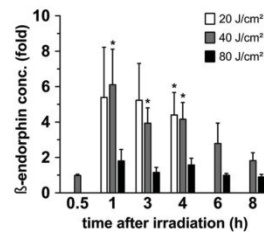


Fig. 1. Blue light irradiation induces the release of β -endorphin in human dermal keratinocytes. Shown are values of relative β -endorphin concentrations (normalized to values obtained with the untreated control) of human skin keratinocyte cultures exposed to 20 (white bars), 40 (gray bars) or 80 J/cm² (black bars) of blue light with a maximum intensity at 453 nm. β -endorphin concentration was quantified by a specific ELISA. Bars represent mean $\pm$ SEM of 10–12 individual experiments. *, $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Blue light enhances β -endorphin production in human epidermal keratinocytes

Human skin keratinocyte cultures growing in confluence were irradiated once with blue light at 453 nm at doses of 20, 40 or 80 J/cm². As shown in Fig. 1, supernatant β -endorphin concentrations were significantly elevated 4 h after irradiation with the dose of 20 J/cm² ($n = 11$). β -endorphin levels also increased significantly 1, 3. And 4 h after irradiation with 40 J/cm² ($n = 10–12$). Six and eight hours after irradiation β -endorphin concentrations were lower as compared to values of supernatant samples that were collected three or four after irradiation with 40 J/cm² (Fig. 1). No significant changes in β -endorphin concentrations were observed in keratinocytes cultures that were irradiated with 80 J/cm² (Fig. 1).

3.2. Effects of blue light exposure on p53, POMC, PC1/3, and PC2 protein expression in human epidermal keratinocytes

It has been demonstrated previously that the tumor suppressor p53 is activated by UV-light and directly modulates the transcriptional activity of the POMC promoter in keratinocytes [5]. In order to determine whether blue light exposure might exert analogue effects, human keratinocyte cultures were irradiated with blue light (20, 40, or 80 J/cm²) and at time points indicated the protein expression of p53, POMC, PC1/3, and PC2 was detected using the Western blot technique.

Results shown in Fig. 2 reveal that blue light exposition of keratinocytes led to an apparently albeit not significantly elevated p53 protein expression at the first four hours after irradiation (Fig. 2A). Elevated p53 protein expression neither did correlate with POMC gene expression (data not shown) nor with POMC protein expression, as shown in Fig. 2B. Furthermore, blue light irradiation had no significant effect on PC1/3 or PC2 protein expression, but 30 minutes after blue light exposure PC1/3 protein levels were up to two-fold higher (Fig. 2D) and PC2 protein expression levels were up to four-fold higher as compared to the non-irradiated control keratinocyte cultures (Fig. 2C).

3.3. S-nitroso-protein content of human skin keratinocytes

The cytoplasm of resting human skin keratinocyte contains a significant amount of S-nitrosated proteins, which we could visualize by using a S-nitrosocysteine-specific rabbit anti-serum (Fig. 3B). As quantified by CLD, human skin keratinocytes contain more than 50 pmol/mg protein of S-nitrosated proteins (Fig. 3C). The intracellular value of this photo-labile NO derivative could be significantly depleted by exposure to 100 J/cm² of 453 nm (Fig. 3C).

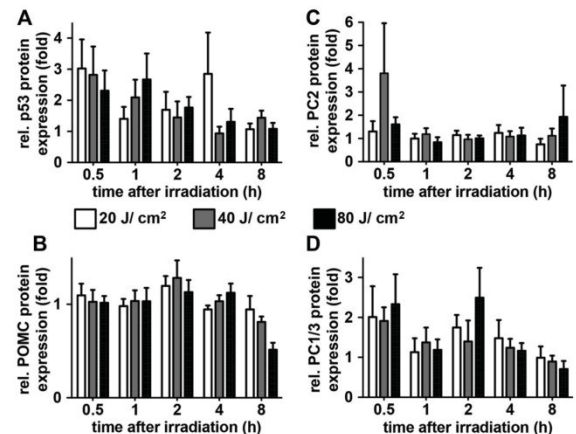


Fig. 2. Impact of blue light irradiation on p53, pro-opiomelanocortin (POMC), pro-hormone convertase 1/3 (PC1/3) as well as pro-hormone convertase 2 (PC2) protein expression of human dermal keratinocytes. Shown are values of relative protein concentration (related to the untreated control) of human skin keratinocyte cultures exposed to 20 (white bars), 40 (gray bars) or 80 J/cm² (black bars) of blue light with a maximum intensity at 453 nm. p53 (A), POMC (B), PC1/3 (C) as well as PC2 protein (D) levels were assessed by Western blot analysis and normalized to GAPDH expression. Bars represent the mean $\pm$ SEM of 10–12 individual experiments.

3.4. Blue light (453 nm) induces intracellular nitric oxide and reactive oxygen species in human skin keratinocytes in-vitro

In order to evaluate the impact of blue light on intracellular NO production in human skin keratinocyte cultures were irradiated with a dose of 80 J/cm² of blue light at 453 nm. Intracellular NO formation, as consequence of blue light-induced decomposition of photolabile S-nitrosated proteins, was visualized and quantified by using the NO-adduct-specific fluorescent dye DAF-FM-DA.

Fluorescence microscopic evaluations of the experiments reveal a strongly enhanced DAF-fluorescence signal in irradiated keratinocytes (Fig. 3D) as compared to non-irradiated keratinocyte cultures (Fig. 3F). After lysing the respective cell cultures with cold isopropanol we quantified the resulted fluorescence signal by a fluorescence spectrometer and normalized the values to the protein content of the respective sample. As shown in Fig. 3F, the NO-specific fluorescence signal was significantly higher in blue light-irradiated keratinocyte cultures. Irradiation of the fluorescence dye by blue light did not have any influence on the fluorescence signals of the dye (data not shown).

3.5. Impact of exogenously applied nitric oxide and hydrogen peroxide on keratinocyte β -endorphin production

Taking into consideration that in exposed keratinocyte cultures blue light induced an significant enhancement of NO and EP, we here studied the impact of exogenously applied NO on β -endorphin formation of cultured keratinocytes (Fig. 4A–C). As NO-Donor we used DETA/NO at concentrations indicated. Additionally, as blue light also is able to induce intracellular H₂O₂ production in irradiated cells we have evaluated the impact of H₂O₂ on β -endorphin secretion of primary human skin keratinocytes (Fig. 4D–F).

We show in Fig. 4 that incubation of keratinocyte cultures with the NO-Donor DETA/NO for one, four or 24 h led to an apparent increase in β -endorphin secretion of the respective keratinocyte culture. At each of the three observation points β -endorphin secretion was significantly increased after incubation with 12.5 μ M DETA/NO. The mother substance DETA alone applied at the respective concentrations (data not

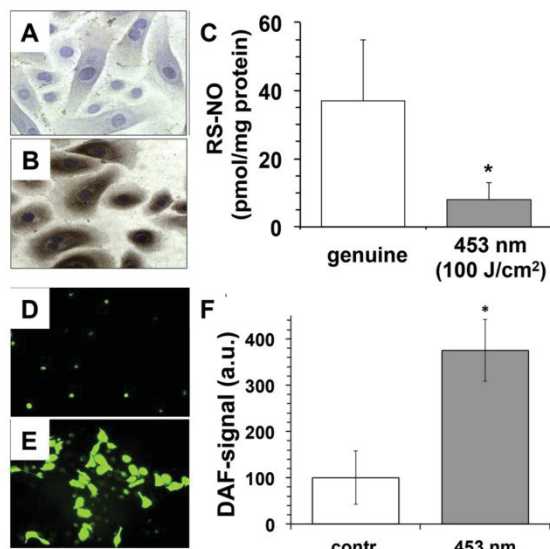


Fig. 3. S-nitroso-protein content of resting human skin keratinocytes and non-enzymatic generation of nitric oxide in blue light (453 nm)-irradiated human skin keratinocytes *in vitro*. A, Control keratinocyte cultures (incubated with a secondary horse-radish peroxidase linked secondary antibody but not with the S-nitrosocysteine-specific rabbit anti-serum). B, S-nitrosated proteins (RS-NO) in resting human skin keratinocyte were detected by using a S-nitrosocysteine-specific rabbit anti-serum (brown signal). C, RS-NO-values (pmol/mg protein) in genuine as well as blue light-irradiated (100 J/cm² of 453 nm) cultures of human skin keratinocytes. Bars represent mean $\pm$ SD of six individual experiments. *, $p < 0.05$ as compared to non-irradiated genuine keratinocyte cultures. D - F, In order to evaluate the impact of blue light on intracellular non-enzymatic NO production of human skin keratinocytes, keratinocyte cultures were irradiated with blue light (453 nm, 80 J/cm²) in the presence of 1.0 mM L-NIO, an effective NO-Synthase inhibitor. Intracellular generation of NO was visualized (D, E) and quantified (F) by using the NO-specific fluorescent dye DAF-FM-DA. D, Fluorescence microscopic evaluation of non-irradiated keratinocyte culture (negative control). E, Fluorescence microscopic evaluation of blue light-irradiated (80 J/cm²) keratinocyte culture. F, NO-specific DAF-fluorescence in lysates of non-irradiated (white bar) and blue light-irradiated (gray bar; 80 J/cm²) keratinocyte cultures. The resulted fluorescence signal was normalized to the protein content of the respective sample. Bars represent the mean $\pm$ SD of six individual experiments. Irradiation of the fluorescence dye alone with blue light did not influence the fluorescence properties of the dye (data not shown). *, $p < 0.05$ as compared to non-irradiated control. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

shown) but also H₂O₂ at concentrations indicated (Fig. 4D–F) did not exert any significant effects on β -endorphin secretion of the keratinocytes.

3.6. Blue light exposure initiates nitric oxide emanation from human skin *in-vivo*

In order to capture and quantify NO emanation from human skin during blue-light exposure, we used a stainless steel collection chamber with a light transparent front window for the accumulation of emanated gases from human skin.

As shown in Fig. 5A, blue light led to a significant and nearly linear exposure-time-dependent emanation of NO from light-exposed human skin *in-vivo*. After switching off the device NO emanation from human skins dropped again to baseline values.

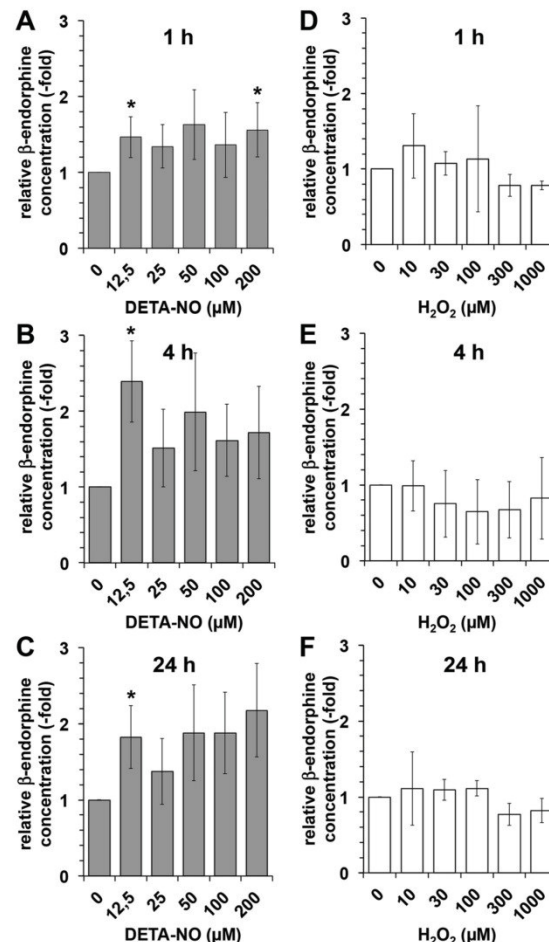


Fig. 4. Impact of exogenously applied nitric oxide or hydrogen peroxide on keratinocytic β -endorphin production. A - C, Impact of nitric oxide at concentrations indicated, here applied in the form of the NO-Donor DETA/NO, on β -endorphin secretion of human skin keratinocyte cultures. Bars represent the mean $\pm$ SD of five individual experiments. The mother substance DETA alone applied at the respective concentrations (data not shown) did not exert any significant effects on β -endorphin secretion of the Keratinocytes. *, $p < 0.05$ as compared to non-treated controls (0 μ M DETA/NO). D - F, Impact of hydrogen peroxide (H₂O₂) at concentrations indicated on β -endorphin secretion in human skin keratinocyte cultures. Bars represent mean $\pm$ SD of three individual experiments.

3.7. Effects of blue light on serum concentration of bioactive nitric oxide derivatives

Using a whole-body irradiation device, fourteen male healthy subjects were irradiated for 30 minutes with blue light (450 nm) with a dose of 72 J/cm², or as control they were sham treated by covering them during the irradiation with an opaque filter foil. Thirty minutes prior irradiation as well as at time points indicated after the light exposure blood samples were collected and serum concentrations of nitrated compounds (RX-NO) which represent a bioactive transport form of nitric oxide.

As shown in Fig. 5B, which contains measured values obtained in the context of a very recently published study describing the impact of blue light on blood pressure of healthy volunteers [11], whole body

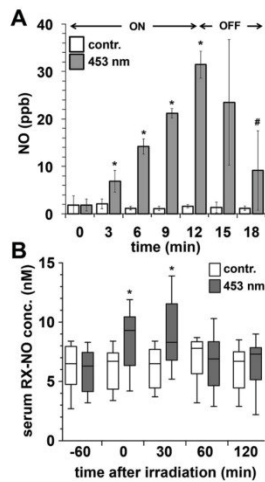


Fig. 5. Impact of blue light on nitric oxide emanation from human skin and serum concentration of bioactive nitric oxide derivatives *in vivo*. A, Quantification of NO emanation from human skin during blue light exposure *in vivo*. Irradiation (38 J/cm^2) was performed for time intervals indicated with blue light at 453 nm. In the sham treated group the transparent window of the chamber was covered with an opaque filter foil. Bars represent mean $\pm$ SD of seven individual experiments. Bars represent the amount of NO (ppb) that accumulated in a light transparent collection chamber during the indicated time intervals of blue light exposure (3, 6, 9 and 12 min). After 12 minutes the light device was switched off. In A: *, $p < 0.05$ as compared to non-irradiated skin (0 min); #, $p < 0.05$ as compared NO values reached after 12 min of irradiation. B, Serum concentration of bioactive nitric oxide derivatives of blue light-irradiated subjects *in vivo*. Thirteen male healthy subjects were whole-body irradiated for 30 minutes with blue light (72 J/cm^2 , 450 nm, gray bars). The control group (white bars) was sham treated by covering the subjects during the irradiation with an opaque filter foil. Thirty minutes prior irradiation (-60 min) as well as at time points indicated after light exposure blood samples were collected and serum concentration of nitrosated compounds (RX-NO) was quantified by chemoluminescence-detection (CLD). Results are presented as Tukey box plots with 25th and 75th percentile as limits of the boxes and a line indicating the median of 13 subjects. In B: *, $p < 0.05$ as compared to samples obtained from the respective sham treated group immediately after irradiation (0 min) or 30 min after irradiation, respectively. Please notice that measured values used for Fig. 5B have been published recently in the context of an other thematic issue [11].

exposure to blue light for 30 minutes led to a significantly enhanced systemic concentration of nitrosated compounds in blood serum as compared to sham-treated subjects. Significant increases in systemic RX-NO concentration could be observed immediately after as well as up to 30 minutes after blue light exposure. Subsequently, the elevated RX-NO concentrations dropped back to baseline values.

3.8. *In-vivo* effects of blue light on serum β -endorphin concentrations and nitric oxide generation

In the identical serum samples that we used for RX-NO detection as described above for Fig. 5B, we quantified the systemic serum concentrations of β -endorphin using a specific ELISA. As shown in Fig. 6, in serum samples obtained from blue light-irradiated subjects immediately after light exposure β -endorphin concentration was significantly higher as compared to serum samples collected prior blue light exposure but also as compared to serum samples obtained from respective sham treated test persons. In the following 120 minutes the serum β -endorphin concentrations dropped down but at time point 120 minutes after light exposure the β -endorphin serum concentration of blue light exposed subjects was still significantly higher than in the respective

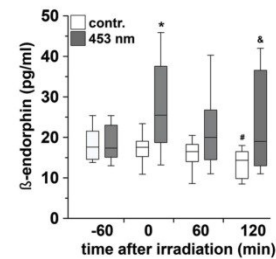


Fig. 6. Blue light exposure enhances serum β -endorphin concentrations *in vivo*. In the identical blood samples from thirteen male healthy subjects, who were whole-body irradiated for 30 minutes with 72 J/cm^2 of blue light at 450 nm that were used for RX-NO quantification as described for Fig. 5B, serum concentrations of β -endorphin (pg/ml) were quantified using a β -endorphin-specific ELISA (gray bars). The control group (white bars) was sham treated by covering the subjects during the irradiation with an opaque filter foil. β -endorphin concentrations were detected in blood samples collected 30 minutes prior irradiation (-60 min) as well as at time points indicated after light exposure. Results are presented as Tukey box plots with 25th and 75th percentile as limits of the boxes and a line indicating the median of 13 subjects. *, $p < 0.05$ as compared samples obtained prior irradiation (-60 min) and samples obtained from the respective sham treated group immediately after light exposure (0 min). #, $p < 0.05$ as compared samples obtained prior irradiation (-60 min). #, $p < 0.05$ as compared to samples obtained from the respective sham treated group 2 h after irradiation (120 min).

serum samples obtained from the sham treated control group.

4. Discussion

In the present work we show with human skin keratinocyte cultures *in-vitro* that exposure of the cells to blue light with a maximum intensity at around 453 nm induced a significant increase in keratinocytic β -endorphin production. Interestingly, elevated β -endorphin formation in the light-exposed cell cultures was paralleled by significantly increased non-enzymatic generation of nitric oxide (NO), which points at a pivotal role of NO in the observed effect. Indeed, the sole exogenous application of NO to cultured keratinocytes significantly enhanced keratinocytic β -endorphin production as well. Moreover, *in-vivo*, whole body exposure of healthy subjects to visible light at $\lambda = 453 \text{ nm}$ significantly enhanced both systemic serum concentration of bioactive NO-derivates as well as of β -endorphin. These data reveal that our observation of a systemic response of blue light exposure on elevated β -endorphin concentrations can be plausibly explained by two mechanisms or, most probably, a combination of them. First, in human skin or skin keratinocytes, respectively, blue light liberates nitric oxide from photo-labile NO metabolites. In human skin *in-vivo*, a relevant fraction of this NO leads to keratinocytic *de novo* synthesis of β -endorphin, which might induce local effects, or after its systemic distribution via the blood circulation might exert a systemic impact. An additional and probably parallel running mechanism comprises the systemic distribution of cutaneously generated NO in the form of fairly stable nitroso compounds. Hereinafter, these bioactive NO derivatives might elicit additional β -endorphin synthesis in peripheral as well as central nervous system and pituitary gland.

The scientific basis of the proposed mechanisms is strongly supported by published data. Thus, in human skin enzyme-dependent production of NO potentially occurs in all cell types by at least one of the three members of the NO synthase family [31]. Some of the NO molecules formed remain at or close to the point of their origin in the form of more stable derivatives, e.g. N- and S-nitroso compounds (RX-NO) or the oxidation products nitrite and nitrate. In healthy human skin nitrite and RX-NO can be found at 25- and 360-times higher concentrations than in blood of healthy volunteers [24]. Due to the

enormity of the “organ” skin, the human cutis represents the greatest storage for NO-derivates [24]. The last information insofar is of distinct relevance as *in-vivo* RX-NOs, especially S-nitroso compounds, exert NO-like activity [32]. More importantly, nitrite and RX-NOs represent photo-labile NO derivatives, which upon exposure to electromagnetic radiation might decompose and release NO. Previously we could show that UVA₁-radiation (340–400 nm) led to an effective decomposition of cutaneous photolabile NO derivatives, which *in-vivo* in human skin resulted in pronounced local NO-dependent biological responses, e.g. enhanced local blood flow [9]. Moreover, in the case of whole body UVA₁-irradiation this UVA-induced cutaneous NO generation led to a significantly enhanced systemic concentration of bioactive NO derivatives and significantly increased systemic NO-dependent hemodynamic parameters, e.g. significant reduction of middle arterial blood pressure [9]. In analogy to reactions induced by UVA radiation, we recently screened the visible light spectrum for its potency to decompose photolabile NO derivatives. We found that in human skin blue light at a wavelength of approx. 450 nm also possesses a strong capacity for photodecomposition of nitrite as well as RX-NO. Following identical molecular and physicochemical mechanisms as described for UVA, local irradiation of human skin with blue light was shown also to induce increases in non-enzymatic local NO formation that were accompanied by the typical NO-specific biological responses, e.g. erythema formation [10]. Furthermore, very recently whole-body exposure of healthy volunteers to blue light was shown to enhance systemic concentration of bioactive NO-derivates, and was accompanied by pronounced effects on systemic hemodynamics [11].

As already mentioned above, in several rat animal models *in-vivo* NO directly or indirectly was involved in the activation of the pituitary pro-opiomelanocortin system and thus might influence metabolic pathways leading to elevated secretory activity of β -endorphin [12,13,15–18]. All these findings support our postulated mechanism of action whereupon in humans blue light-enhanced formation of bioactive NO derivatives might represent the causal mechanism of enhanced β -endorphin production in skin keratinocytes and/or in central as well as peripheral nervous system, respectively.

Due to the lack of data on the biological effect of blue light, our findings and the postulated mechanisms of the impact of blue light on keratinocytic as well as systemic β -endorphin generation only can be discussed in the context of present data obtained from studies covering the impact of ultra violet radiation (UVR) on β -endorphin metabolism. Unfortunately, especially in earlier publications concerning this research field, the information regarding the physical characteristics of the used UV sources was very mistaken. Often, the term UVR was used generically for ultraviolet radiation, without any further specification, whether authors used UVA or UVB radiation. However, this is essential because the mechanisms of action of the two types of energy-rich radiations are completely different. No matter, in all publications where authors verifiably used UVB, irradiation of cells with UVB *in-vitro* or exposure of animal or human subjects to UVB *in-vivo* led to a clear induction of *de-novo* synthesis of pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides, including β -endorphin [7,8,25,33–35]. The mechanism of UVB-induced β -endorphin synthesis seems to be very different from that of blue light: 1.) In contrast to blue light, UVB was shown to induce DNA damage in the skin and skin cells [36], 2.) in contrast to UVB, blue light neither did lead to significantly elevated gene nor protein expression levels of POMC, as described previously for UVB [5], 3.) in analogy to UVB, blue light exposure induced a clear but not significant increase in P53 protein expression that was maximal 30 and 60 minutes after the light exposure, 4.) in UVB-irradiated keratinocytes elevated β -endorphin concentrations were shown to appear 6–8 h after irradiation [25,34,37] and in UVB-irradiated animals significantly enhanced β -endorphin levels could be detected 4–7 days after UVB exposure [7], whereas with blue light significantly enhanced β -endorphin levels were detectable as soon as 30–120 minutes after exposure. This time course was paralleled by increases in protein expression of the pro-hormone

convertases PC1/3 and PC2. Although blue light-elevated expression of PC1/3 and PC2 was not statistically significant, the resulting elevated pro-hormone convertase-activity had obviously been sufficient to effect the mentioned increases in β -endorphin formation.

The available information on the effect of UVA radiation on local or systemic β -endorphin production is not as clear as for UVB. On the one side UVA was shown to induce a rapid raise in keratinocytic β -endorphin production as well as significantly enhanced systemic β -endorphin levels in UVA-exposed humans *in-vivo* [6,38,39], but on the other side data obtained from other very accurately performed studies describe contrary findings after which UVA exposure of humans *in-vivo* had no detectable effects on serum β -endorphin concentrations [40,41]. Here it is important to notice that the UVA doses used for both scenarios were nearly identical and the experimental setups were absolutely comparable.

Of course, the question arises about the therapeutic relevance of our findings. Are there any meaningful clinical applications for blue light? We are convinced that such applications exist. Fell *et al.* demonstrated in their mouse model that β -endorphin easily crosses the blood-brain barrier and that skin-derived β -endorphin exerts systemic effects [7] including neurophysiological effects in central nervous system [2]. β -endorphin binds with high affinity to μ -opioid receptors in the nervous system and has an analgesic effect [2]. In addition, β -endorphin has an influence on immunological processes, wound healing processes, depressive illnesses [3,42,43], and increased performance in competitive sports [44,45]. Furthermore, concerning the positive effects of β -endorphin on prevention of depressive disorders [46–48], it would be conceivable to apply blue light-emitting devices as supportive measure in the therapy of depressive disorder, for instant by improving the mood of patients. Furthermore, the irradiation of athletes with blue light could be successful in competitive sports, as a blue-light-induced increase in the level of β -endorphin might allow athletes to shift their voluntary performance limits. β -endorphin release in response to exercise has been known and studied since at least the 1980s [49]. Studies have demonstrated that serum concentrations of β -endorphin increase in response to acute exercise and training [49]. Several publications have shown that enhanced serum β -endorphin levels, as result of excessive training, induced a raise of tolerance levels, lowered anxiety and pain thresholds, and led to the development of euphoria [44,45,50].

Thus, the described blue light-induced effects that are mediated by bioactive NO-derivates bear a relevant clinical potential to serve as supportive measure in the therapy of several psychiatric disorders. Additionally, due to the positive influence of β -endorphin on the mental state and other psychological parameters of humans, blue light might exert great potential in the home or leisure and sports field. Of course, it has to be considered that some users may develop addictive behaviors as was shown for UVB radiation [7]. However, due to the physical properties of blue light, severe side effects and dermatological complications, as expected in the case when using UV radiation, are not expected.

Sources of funding

This work was supported by the Faculty of Medicine of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf, and was funded by an unrestricted research grant from Philips to Christian Heiss and Christoph V. Suschek

Conflicts of interest

There are no relationships with industry other than stated above. The authors state no conflict of interest.

Disclosures

The authors state no disclosures.

Declaration

The experimental protocol and the use of human material have been approved by the local ethics committee of the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf (study number: 3634). The study protocol of the clinical study was approved by the *Ethics Committee of the Heinrich Heine University Duesseldorf* and all volunteers gave written informed consent (Clinicaltrials.gov: NCT03226587). All experiments described here were conducted in compliance with the *Declaration of Helsinki Principles*.

Acknowledgements

We thank Prof. Dr. Matthias Born and Dr. Joerg Liebmann from Philips Innovative Technologies GmbH (Aachen, Germany) for putting us the LED-arrays at the disposal. We thank Jutta Schneider, Samira Seghrouchni, and Christa Wilkens for their excellent technical assistance.

References

- [1] J.G. Veening, H.P. Barendregt, The effects of beta-endorphin: state change modification, *Fluids Barriers CNS* 12 (3) (2015).
- [2] E. Harno, T. Gali Ramamoorthy, A.P. Coll, A.P.O.M.C. White, The physiological power of hormone processing, *Physiol. Rev.* 98 (2018) 2381–2430.
- [3] N. Kay, J. Allen, J.E. Morley, Endorphins stimulate normal human peripheral-blood lymphocyte natural-killer activity, *Life Sci.* 35 (1984) 53–59.
- [4] A.T. Slominski, M.A. Zmijewski, C. Skobowiat, B. Zbytek, R.M. Slominski, J.D. Stokiet, Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system, *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 212 (2012) 1–115 v, vii.
- [5] R. Cui, H.R. Widlund, E. Feige, J.Y. Lin, D.L. Wilensky, V.E. Igras, J. D'Orazio, C.Y. Fung, C.F. Schanbacher, S.R. Granter, D.E. Fisher, Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation, *Cell* 128 (2007) 853–864.
- [6] P.C. Levins, D.B. Carr, J.E. Fisher, K. Momtaz, J.A. Parrish, Plasma beta-endorphin and beta-lipotropin response to ultraviolet-radiation, *Lancet* 2 (1983) 166–166.
- [7] G.L. Fell, K.C. Robinson, J. Mao, C.J. Woolf, D.E. Fisher, Skin beta-endorphin mediates addiction to UV light, *Cell* 157 (2014) 1527–1534.
- [8] C. Skobowiat, A.T. Slominski, Ultraviolet B stimulates proopiomelanocortin signalling in the arcuate nucleus of the hypothalamus in mice, *Exp. Dermatol.* 25 (2016) 120–123.
- [9] C. Oplander, C.M. Volkmar, A. Paunel-Gorgulu, E.E. van Faassen, C. Heiss, M. Kelm, D. Halmer, M. Murtz, N. Pallua, C.V. Suschek, Whole body UVA irradiation lowers systemic blood pressure by release of nitric oxide from intracutaneous photolabile nitric oxide derivatives, *Circ. Res.* 105 (2009) 1031–1040.
- [10] C. Oplander, A. Deck, C.M. Volkmar, M. Kirsch, J. Liebmann, M. Born, F. Van Abeelen, E.E. Van Faassen, K.D. Kroncke, J. Windolf, C.V. Suschek, Mechanism and biological relevance of blue-light (420–453 nm)-induced nonenzymatic nitric oxide generation from photolabile nitric oxide derivatives in human skin in vitro and in vivo, *Free Radical Bio Med* 65 (2013) 1363–1377.
- [11] M. Stern, M. Broja, R. Sansone, M. Grone, S.S. Skene, J. Liebmann, C.V. Suschek, M. Born, M. Kelm, C. Heiss, Blue light exposure decreases systolic blood pressure, arterial stiffness, and improves endothelial function in humans, *Eur. J. Prev. Cardiol.* (2018) 2047487318800072.
- [12] Y. Ohgami, E. Chung, R.M. Quock, Nitrous oxide-induced NO-dependent neuronal release of beta-endorphin from the rat arcuate nucleus and periaqueductal gray, *Brain Res.* 1366 (2010) 38–43.
- [13] L.M. Zelinski, Y. Ohgami, E. Chung, D.Y. Shirachi, R.M. Quock, A prolonged nitric oxide-dependent, opioid-mediated antinociceptive effect of hyperbaric oxygen in mice, *J. Pain : Off. J. Am. Pain Soc.* 10 (2009) 167–172.
- [14] L. Brunetti, P. Preziosi, E. Ragazzoni, M. Vacca, Involvement of nitric oxide in basal and interleukin-1 beta-induced CRH and ACTH release in vitro, *Life Sci.* 53 (1993) PL219–222.
- [15] C.P. Wayman, N.V. Pike, J.F. Wilson, N-methyl-D-aspartate (NMDA) stimulates release of alpha-MSH from the rat hypothalamus upon release of nitric oxide, *Brain Res.* 666 (1994) 201–206.
- [16] H.G. Bernstein, G. Keilhoff, B. Seidel, A. Stanarius, P.L. Huang, M.C. Fishman, M. Reiser, B. Bogerts, G. Wolf, Expression of hypothalamic peptides in mice lacking neuronal nitric oxide synthase: reduced beta-END immunoreactivity in the arcuate nucleus, *Neuroendocrinology* 68 (1998) 403–411.
- [17] G. Keilhoff, B. Seidel, M. Reiser, A. Stanarius, P.L. Huang, B. Bogerts, G. Wolf, H.G. Bernstein, Lack of neuronal NOS has consequences for the expression of POMC and POMC-derived peptides in the mouse pituitary, *Acta Histochem.* 103 (2001) 397–412.
- [18] K. Hiramoto, Ultraviolet A irradiation of the eye activates a nitric oxide-dependent hypothalamo-pituitary pro-opiomelanocortin pathway and modulates the functions of Langerhans cells, *J. Dermatol.* 36 (2009) 335–345.
- [19] C.V. Suschek, C. Oplander, E.E. van Faassen, Non-enzymatic NO production in human skin: effect of UVA on cutaneous NO stores, *Nitric Oxide* 22 (2010) 120–135.
- [20] C. Oplander, C.M. Volkmar, A. Paunel-Gorgulu, E.E. van Faassen, C. Heiss, M. Kelm, D. Halmer, M. Murtz, N. Pallua, C.V. Suschek, Whole body UVA irradiation lowers systemic blood pressure by release of nitric oxide from intracutaneous photolabile nitric oxide derivatives, *Circ. Res.* 105 (2009) 1031–1040.
- [21] T. Rassaf, N.S. Bryan, M. Kelm, M. Feelisch, Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma, *Free Radical Bio Med* 33 (2002) 1590–1596.
- [22] M. Feelisch, T. Rassaf, S. Mnaimneh, N. Singh, N.S. Bryan, D. Jourdain, M. Kelm, Concomitant S-, N-, and heme-nitrosylation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo, *FASEB J.* 16 (2002) 1775–1785.
- [23] R. Marley, M. Feelisch, S. Holt, K. Moore, A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols, *Free Radic. Res.* 32 (2000) 1–9.
- [24] A.N. Paunel, A. Dejam, S. Thelen, M. Kirsch, M. Horstmann, P. Gharini, M. Murtz, M. Kelm, H. de Groot, V. Kolb-Bachofen, C.V. Suschek, Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms, *Free Radical Bio Med* 38 (2005) 606–615.
- [25] A.K. Chakraborty, Y. Funasaka, A. Slominski, G. Ermak, J. Hwang, J.M. Pawelek, M. Ichihashi, Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B, *Biochim. Biophys. Acta* 1313 (1996) 130–138.
- [26] B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K.J. Davies, P.A. Dennerly, H.J. Forman, M.B. Grisham, G.E. Mann, K. Moore, L.J. Roberts 2nd, H. Ischiropoulos, Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations, *Free Radical Bio Med* 52 (2012) 1–6.
- [27] M.G. Espey, K.M. Miranda, D.D. Thomas, D.A. Wink, Ingress and reactive chemistry of nitroxyl-derived species within human cells, *Free Radical Bio Med* 33 (2002) 827–834.
- [28] H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, T. Nagano, Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2446–2453.
- [29] N. Nakatsubo, H. Kojima, K. Kikuchi, H. Nagoshi, Y. Hirata, D. Maeda, Y. Imai, T. Irimura, T. Nagano, Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins, *FEBS Lett.* 427 (1998) 263–266.
- [30] C.V. Suschek, A. Paunel, V. Kolb-Bachofen, Nonenzymatic nitric oxide formation during UVA irradiation of human skin: experimental setups and ways to measure, *Methods Enzymol.* 396 (2005) 568–578.
- [31] R. Weller, Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology, *Clin. Exp. Dermatol.* 28 (2003) 511–514.
- [32] L.J. Ignarro, H. Lipton, J.C. Edwards, W.H. Baricos, A.L. Hyman, P.J. Kadowitz, C.A. Gruetter, Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218 (1981) 739–749.
- [33] A. Jussila, R. Huotari-Orava, L. Ylianttila, T. Partonen, E. Snellman, Narrow-band ultraviolet B radiation induces the expression of beta-endorphin in human skin in vivo, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 155 (2016) 104–108.
- [34] M. Wintzen, S. de Winter, J.J. Out-Luiting, S.G. van Duinen, B.J. Vermeer, Presence of immunoreactive beta-endorphin in human skin, *Exp. Dermatol.* 10 (2001) 305–311.
- [35] M. Wintzen, M. Yaar, J.P. Burbach, B.A. Gilchrist, Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 106 (1996) 673–678.
- [36] C. Oplander, S. Hidding, F.B. Werners, M. Born, N. Pallua, C.V. Suschek, Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 103 (2011) 118–125.
- [37] M. Wintzen, B.A. Gilchrist, Proopiomelanocortin, its derived peptides, and the skin, *J. Invest. Dermatol.* 106 (1996) 3–10.
- [38] M. Kaur, A. Liguori, A.B. Fleischer Jr., S.R. Feldman, Plasma beta-endorphin levels in frequent and infrequent tanners before and after ultraviolet and non-ultraviolet stimuli, *J. Am. Acad. Dermatol.* 54 (2006) 919–920.
- [39] C. Skobowiat, J.C. Dowdy, R.M. Sayre, R.C. Tuckey, A. Slominski, Cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenal axis homolog: regulation by ultraviolet radiation, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 301 (2011) E484–E493.
- [40] T. Gambichler, A. Bader, M. Vojvodic, A. Avermaete, M. Schenk, P. Altmeyer, K. Hoffmann, Plasma levels of opioid peptides after sunbed exposures, *Br. J. Dermatol.* 147 (2002) 1207–1211.
- [41] M. Wintzen, D.M. Ostijn, M.C. Polderman, S. le Cessie, J.P. Burbach, B.J. Vermeer, Total body exposure to ultraviolet radiation does not influence plasma levels of immunoreactive beta-endorphin in man, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 17 (2001) 256–260.
- [42] P.L. Bigliardi, S. Buchner, T. Ruffi, M. Bigliardi-Qi, Specific stimulation of migration of human keratinocytes by mu-opiate receptor agonists, *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 22 (2002) 191–199.
- [43] K.M. Hegadoren, T. O'Donnell, R. Lanius, N.J. Coupland, N. Lacaze-Masmonteil, The role of beta-endorphin in the pathophysiology of major depression, *Neuropeptides* 43 (2009) 341–353.
- [44] J. Fuss, J. Steinle, L. Bindila, M.K. Auer, H. Kirchherr, B. Lutz, P. Gass, A runner's high depends on cannabinoid receptors in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (2015) 13105–13108.
- [45] M. Sinaei, M. Kargarfard, The evaluation of BMI and serum beta-endorphin levels: the study of acute exercise intervention, *J. Sport. Med. Phys. Fit.* 55 (2015) 488–494.
- [46] A.H. Harris, R. Cronkite, R. Moos, Physical activity, exercise coping, and depression in a 10-year cohort study of depressed patients, *J. Affect. Disord.* 93 (2006) 79–85.
- [47] P. Hassmen, N. Koivula, A. Uutela, Physical exercise and psychological well-being: a population study in Finland, *Prev. Med.* 30 (2000) 17–25.
- [48] R.S. Paffenbarger Jr., I.M. Lee, R. Leung, Physical activity and personal characteristics associated with depression and suicide in American college men, *Acta Psychiatr. Neurol. Scand. Suppl.* 377 (1994) 16–22.
- [49] V.J. Harber, J.R. Sutton, Endorphins and exercise, *Sport. Med.* 1 (1984) 154–171.
- [50] E. Heyman, F.X. Gamelin, M. Goekint, F. Piscitelli, B. Roelands, E. Leclair, V. Di Marzo, R. Meeusen, Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans—possible implications for reward and depression, *Psychoneuroendocrinology* 37 (2012) 844–851.

3 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass blaues Licht ($\lambda = 453 \text{ nm}$) die Freisetzung von β -Endorphin in humanen Keratinozyten *in-vitro* signifikant induziert. Der stärkste Anstieg der β -Endorphin-Konzentration wurde in einem Zeitintervall zwischen einer und vier Stunden nach der Bestrahlung der Haut mit blauem Licht mit einer angewandten Bestrahlungsdosis von 40 J/cm^2 erfasst. Interessanterweise ging der Anstieg der β -Endorphin-Konzentration mit einer signifikant erhöhten nicht-enzymatischen Erzeugung von Stickstoffmonoxid einher. Dies deutet auf eine relevante Rolle von Stickstoffmonoxid im Mechanismus der Freisetzung von β -Endorphin hin. Unterstützt wird diese Hypothese durch weiterführende Versuche, in denen auch die alleinige exogene Anwendung von Stickstoffmonoxid in Form des NO-Donors DETA/NO zu einer signifikant erhöhten Freisetzung der β -Endorphin-Konzentration in humanen Keratinozyten *in-vitro* führte.

Um herauszufinden, ob das in der Haut lokal freigesetzte β -Endorphin auch in der Lage ist, eine systemische Wirkung hervorzurufen, erfolgten weitere *in-vivo* Versuche in Zusammenarbeit mit der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Hierfür wurden Probanden einer Ganzkörperexposition mit blauem Licht ausgesetzt. Infolge der Bestrahlung kam es zu einem signifikanten Anstieg bioaktiver NO-Derivate sowie zu einer signifikant erhöhten β -Endorphin-Konzentration im Serum der Probanden.

Die publizierten Daten legen nahe, dass die Freisetzung von β -Endorphin aus Keratinozyten der Haut durch die Bestrahlung der Haut mit blauem Licht plausibel durch zwei Mechanismen oder sehr wahrscheinlich eine Kombination beider Mechanismen erklärt werden kann: In einem ersten Schritt setzt blaues Licht Stickstoffmonoxid aus photolabilen NO-Metaboliten in der Haut bzw. in humanen Keratinozyten frei. Im Anschluss führt ein relevanter Teil dieses freigesetzten Stickstoffmonoxids zu der Synthese von β -Endorphin in humanen Keratinozyten. Das freigesetzte β -Endorphin kann dann lokale Effekte in der Haut hervorrufen oder nach seiner Verteilung über den Blutkreislauf eine systemische Wirkung entfalten. Ein zusätzlicher und wahrscheinlich parallel stattfindender Mechanismus umfasst die systemische Verteilung des kutan erzeugten Stickstoffmonoxids durch Nitroverbindungen. Diese bioaktiven NO-Derivate könnten nach dem Transport über die Blutbahn im peripheren und zentralen Nervensystem wie auch in der Hypophyse eine zusätzliche Bildung von β -Endorphin hervorrufen.

Die wissenschaftliche Grundlage dieser beiden Mechanismen wird durch aktuell veröffentlichte Daten getragen und wird im Folgenden erläutert:

In der menschlichen Haut erfolgt die enzymabhängige Produktion von Stickstoffmonoxid in allen Zelltypen durch mindestens eine der drei Formen der NO-Synthase [95]. Einige der durch die NO-Synthase entstandenen NO-Moleküle verbleiben am oder nahe dem Ort ihres Ursprungs in Form stabilerer NO-Derivate wie beispielsweise N- und S-Nitrosoverbindungen (RX-NO) oder Nitrit und Nitrat. Nitrit und Nitrosoverbindungen (RX-NO) liegen in der menschlichen Haut in 25- bis 360-fach höherer Konzentration vor als im Blut [104]. Aufgrund der enormen Größe der Haut als Organ stellt die Kutis somit den größten Speicherort für NO-Derivate im menschlichen Körper da [104]. Dies ist von besonderer Relevanz, da Nitrosoverbindungen *in-vivo*, insbesondere S-Nitrosoverbindungen, eine ähnliche Funktion wie NO-Moleküle ausüben [93]. Noch bedeutender ist aber, dass Nitrit und Nitrosoverbindungen photolabile NO-Derivate sind, dessen Bindung durch die Einwirkung elektromagnetischer Strahlung, insbesondere durch Licht, gespalten wird und somit Stickstoffmonoxid freigesetzt wird [91].

In zuvor veröffentlichten Studien wurde gezeigt, dass UVA-Strahlung mit einer Wellenlänge von 340-400 nm eine effektive Spaltung photolabiler NO-Derivate in der Haut auslöst. Diese Freisetzung von Stickstoffmonoxid in der Haut induziert *in-vivo* NO-abhängige Reaktionen wie beispielsweise eine Vasodilatation und eine damit einhergehende gesteigerte Durchblutung der Haut [90]. Neben der lokalen Generierung von Stickstoffmonoxid führt die Bestrahlung der Haut mit UVA-Licht aber auch zu signifikant erhöhten systemischen Konzentrationen bioaktiver NO-Derivate. Dies bewirkt wiederum systemische hämodynamische Reaktionen wie beispielsweise eine signifikante Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks [90].

Analog zur UVA-induzierten Photodissoziation der NO-Derivate wurde das Spektrum des sichtbaren Lichts zum Abbau photolabiler NO-Derivate untersucht. Es zeigte sich, dass blaues Licht mit einer Wellenlänge von ca. 450 nm auch eine starke Kapazität zur Photolyse photolabiler NO-Derivate wie Nitrit und Nitrosoverbindungen besitzt [90, 91]. Außerdem wurde belegt, dass die lokale Bestrahlung der menschlichen Haut mit blauem Licht - nach den identischen molekularen und physikalisch-chemischen Mechanismen, wie sie für die UVA-Strahlung beschrieben wurden [90] - zu einer Zunahme der nicht-enzymatischen lokalen Bildung von Stickstoffmonoxid führt [91]. Auch das durch die

Einwirkung von blauem Licht gebildete Stickstoffmonoxid löst die typischen NO-spezifischen biologischen Reaktionen wie beispielsweise eine Vasodilatation aus [91].

Erst kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, bei der die Ganzkörperexposition gesunder Probanden mit blauem Licht zu einer Erhöhung systemischer Konzentration bioaktiver NO-Derivate führte [99]. Dies rief ausgeprägte systemische Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem hervor. Durch die Freisetzung der NO-Derivate durch blaues Licht wurde eine Reduktion des systolischen Blutdrucks, eine Herabsetzung des vaskulären Widerstands und eine Verbesserung der Endothelfunktion erfasst [99].

In der aktuellen Literatur wird am Modell der Ratte beschrieben, dass Stickstoffmonoxid direkt oder indirekt an der Aktivierung der Freisetzung von Proopiomelanocortin beteiligt ist. [100, 102, 103, 105-107]. Somit könnte Stickstoffmonoxid Stoffwechselwege beeinflussen, die zu einer erhöhten Sekretion von β -Endorphin führen. Die bisher veröffentlichten Erkenntnisse unterstützen den, in der vorliegenden Arbeit postulierten Wirkmechanismus, denn es ist wahrscheinlich, dass blaues Licht die Bildung bioaktiver NO-Derivate in der Haut induziert und diese NO-Derivate in einem nächsten Schritt die Produktion von β -Endorphin in humanen Keratinozyten anregen [100, 102]. Der Prozess könnte einen Kausalmechanismus der Freisetzung von β -Endorphin beschreiben.

Bisher ist der Einfluss von blauem Licht auf den β -Endorphin-Stoffwechsel in Keratinozyten kaum erforscht worden. Andere Studienmodelle beschäftigten sich vor allem mit dem Einfluss von UV-Licht auf den POMC- und den β -Endorphin-Stoffwechsel in Keratinozyten. Aufgrund des Fehlens von Daten über die biologische Wirkung von blauem Licht auf den β -Endorphin-Stoffwechsel müssen die Ergebnisse dieser Arbeit daher in Bezug auf die Wirkung der UV-Strahlung diskutiert werden. Jedoch sind die Informationen über die physikalischen Eigenschaften der verwendeten UV-Lampen insbesondere in früheren Veröffentlichungen zu diesem Forschungsgebiet teilweise missverständlich formuliert worden. Der Begriff UV-Strahlung wird allgemein für ultraviolette Strahlung verwendet ohne weitere Angaben zu machen, ob die Autoren mit UVA- oder mit UVB-Strahlung arbeiteten. Diese Angabe ist jedoch wichtig, da sich die beiden Arten der energiereichen UV-Strahlung unterscheiden. UVA-Strahlung hat eine längere Wellenlänge und dringt tiefer in die Haut ein als UVB-Strahlung [70]. Außerdem unterscheiden sich die photochemischen Prozesse, die durch UVA-Strahlung bzw. durch UVB-Strahlung ausgelöst werden [69]. Sowohl UVA- als auch UVB-Strahlen induzieren DNA-Schäden in der Haut, die zu einer Bildung von Mutationen und schließlich zur Entstehung von Tumoren führen können [68].

UVA-Licht wird hierbei im Gegensatz zu UVB-Licht schwächer von der DNA absorbiert. Die absorbierten UVA-Strahlen führen vor allem zu einer Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die unter anderem Mutationen bestimmter Basen der DNA auslösen können [71-73]. UVB-Strahlung hingegen schädigt die DNA, indem es eine Verknüpfung von Pyrimidin-Basen der DNA induziert und damit zu der Entstehung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) führt [71, 74]. Die Bildung dieser CPD kann zwar auch durch UVA-Strahlung ausgelöst werden, liegt aber bei der Einwirkung von UVB-Strahlung auf die DNA deutlich häufiger vor [74]. Können diese CPD-Schäden nicht durch Reparaturmechanismen behoben werden, entstehen Mutationen [75]. Der Tumorsuppressor p53, der bei der Entstehung von DNA-Schäden phosphoryliert wird und das Fortschreiten des Zellzyklus der betroffenen Zellen unterbricht, wird durch die UVB-Strahlung stärker aktiviert, als durch UVA-Strahlung [76]. Die Aktivierung von p53 führt wiederum zu einer direkten Steigerung der Synthese von POMC sowie zu einer gesteigerten Sekretion seiner Endprodukte α -MSH und β -Endorphin [25]. Passend dazu führte in vielen Publikationen, in denen die Autoren nachweislich UVB-Strahlung verwendeten, die Bestrahlung von Zellen mit UVB-Licht *in-vitro* oder die Exposition von Tieren oder Menschen gegenüber UVB-Strahlung *in-vivo* zu einer deutlichen Induktion der Synthese von POMC und seinen Derivaten, einschließlich β -Endorphin [21, 24, 25, 29, 108-110].

Der Mechanismus, der durch UVB-Licht induziert wird und zur Freisetzung von β -Endorphin führt, scheint sich von dem Mechanismus, der durch blaues Licht aktiviert wird, zu unterscheiden. Im Gegensatz zu UVB-Licht verursacht blaues Licht keine DNA-Schäden in den Zellen der Haut [82]. Außerdem führt blaues Licht weder zur einer signifikanten Steigerung der Gen- noch der Proteinexpression von POMC, was in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit dargestellt wird.

Anhalt für die Hypothese, dass sich der Mechanismus der Freisetzung von β -Endorphin aus Keratinozyten durch blaues Licht von dem Mechanismus, der durch UV-Licht hervorgerufen wird, unterscheidet, geben auch die Ergebnisse von Duteil et al. Sie erfassten in ihrer Studie eine gesteigerte Melanogenese in Hautarealen, die zuvor mit blauem Licht bestrahlt wurden [111]. Diese Steigerung der Melanogenese ging einher mit der vermehrten Expression des POMC-Endprodukts α -MSH. Zu einem signifikanten Anstieg der Expression von POMC selbst kam es jedoch nicht [111]. Wie bereits beschrieben induziert UVB-Strahlung hingegen signifikant die Gen- und Proteinexpression von POMC [25].

Cui et al. erfassten in ihrer Studie einen Anstieg der POMC-Proteinexpression sechs Stunden nach der Bestrahlung von Keratinozyten mit UVB-Licht [25]. Mit blauem Licht konnte dieses Ergebnis in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden, obgleich ein größeres Zeitintervall von unmittelbar nach der Bestrahlung bis acht Stunden nach Bestrahlungsende gewählt wurde. Andere Arbeitsgruppen detektierten einen Anstieg der β -Endorphin-Konzentrationen in humanen Keratinozyten *in-vitro* sechs bis acht Stunden nach einer UVB-Exposition [108, 110, 112]. Bei Tieren, die mit UVB-Licht bestrahlt wurden, wies man signifikant erhöhte β -Endorphin-Spiegel im Serum vier bis sieben Tage nach der UVB-Exposition nach [24]. In der vorliegenden Arbeit wurden signifikant erhöhte β -Endorphin-Konzentrationen bereits eine Stunde nach der Exposition von humanen Keratinozyten *in-vitro* mit blauem Licht nachgewiesen. In der begleiteten *in-vivo* Studie wurden erhöhte β -Endorphin-Spiegel im Serum 30 bis 120 Minuten nach der Ganzkörperexposition von jungen Probanden mit blauem Licht dokumentiert [1]. Diese Ergebnisse sind - im Hinblick auf die deutlichen zeitlichen Unterschiede bezüglich der Freisetzung von β -Endorphin nach einer Bestrahlung der Haut mit UV-Licht bzw. mit blauem Licht - ein weiteres Indiz dafür, dass sich der Wirkmechanismus, der hierbei durch blaues Licht bzw. durch UV-Licht hervorgerufen wird, unterscheidet.

Parallel zu dem zeitlichen Verlauf der Freisetzung von β -Endorphin wurde in der vorliegenden Arbeit eine gesteigerte Proteinkonzentration der Prohormon-Konvertasen PC1/3 und PC 2 in humanen Keratinozyten *in-vitro* 30 Minuten bis zwei Stunden nach der Bestrahlung mit blauem Licht detektiert. Obwohl der Anstieg der Prohormon-Konvertasen statistisch nicht signifikant ist, war die Erhöhung offensichtlich dennoch ausreichend, um eine Bildung von β -Endorphin herbeizuführen.

Die Datenlage bezüglich der Effekte der UVA-Strahlung auf die lokale oder systemische Freisetzung von β -Endorphin ist nicht so eindeutig, wie die Ergebnisse, die über die Effekte der UVB-Strahlung veröffentlicht wurden. Einerseits legen Daten offen, dass die Bestrahlung von humanen Keratinozyten *in-vitro* mit UVA-Strahlung zu einer signifikanten Erhöhung der β -Endorphin-Konzentration führt und dass auch eine Exposition von Probanden mit UVA-Licht zu einem Anstieg der β -Endorphin-Spiegel *in-vivo* führt [25, 113, 114]. Andererseits beschreiben weitere Studien gegenteilige Ergebnisse, die besagen, dass die Exposition von Probanden mit UVA-Licht *in-vivo* keine messbare Wirkung auf die β -Endorphin-Konzentration im Serum *in-vivo* hat [115, 116]. Zu erwähnen ist hierbei, dass die Strahlendosis des UVA-Lichts, die in beiden Studien verwendet wurde, fast identisch war und auch der Versuchsaufbau vergleichbar war.

Im Zusammenhang mit den publizierten Ergebnissen stellt sich die Frage, welchen klinischen und therapeutischen Nutzen sie haben. Die publizierte Arbeit und die aktuelle Studienlage sind ein deutliches Indiz für eine sinnvolle klinische Anwendung von blauem Licht.

Fell et al. belegten am Mausmodell, dass in der Haut synthetisiertes und sekretiertes β -Endorphin zu einer Erhöhung der β -Endorphin-Plasmaspiegel führt und eine systemische Wirkung auf den Organismus hat [24]. Weitere Studien zeigten, dass das endogene Opioid β -Endorphin die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und in der Lage ist, neurophysiologische Prozesse im zentralen Nervensystem zu beeinflussen [3, 117, 118].

Ausgehend von der These, dass die Bestrahlung der menschlichen Haut mit blauem Licht den β -Endorphin-Spiegel im Blut durch den in dieser Arbeit postulierten Wirkmechanismus erhöht und dass β -Endorphin anschließend die Blut-Hirn-Schranke überwindet, sind hier neue therapeutische Möglichkeiten für psychiatrische Erkrankungen wie Suchterkrankungen oder Depressionen denkbar [119]. In vorherigen *in-vivo* Studien wirkten sich Bestrahlungstherapien mit blauem Licht und weißem Licht bereits positiv auf die Symptome der saisonal bedingten Depression (SAD) aus [47, 120]. Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden in den veröffentlichten Arbeiten jedoch nicht dargestellt. Dass mit höheren β -Endorphin-Spiegeln im Serum eine Reduktion depressiver Neuerkrankungen assoziiert wird, ist ebenfalls beschrieben [56-59].

Bezüglich der Therapie von Suchterkrankungen könnte β -Endorphin ähnlich wie Morphin und Alkohol die Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Dopamin in den Synapsen des Mesencephalons insbesondere des Nucleus accumbens und der Area tegmentalis ventralis stimulieren, denen eine bedeutende Rolle in Bezug auf Belohnungsmechanismen bei einem chronischem Drogenabusus zukommt [41]. Es ist vorstellbar, dass eine Lichttherapie mit blauem Licht bei betroffenen Patienten das Verlangen nach Suchtmitteln reduzieren könnte oder vorübergehend als Substitutionsbehandlung bei einer Opiatabhängigkeit eingesetzt werden könnte.

Weitere Studien zeigten, dass regelmäßige körperliche Aktivität signifikant mit einer verringerten Wahrscheinlichkeit, an einer Depression zu erkranken, einhergeht [56-59]. Ursache hierfür könnte der Anstieg des β -Endorphin-Spiegels im Blut sein. Die Freisetzung von β -Endorphin als eine Reaktion auf Sport und Bewegung ist seit den 1980er Jahren bekannt und wird seitdem untersucht. Es wurde gezeigt, dass der β -Endorphin-Spiegel im Serum durch körperliche Aktivität ansteigt [121]. Der molekulare Wirkmechanismus ist diesbe-

züglich aber noch nicht ausreichend erforscht. Es wird vermutet, dass eine Erhöhung der Serumlaktatspiegel oder eine azidotische Stoffwechsellaage ursächlich für den Anstieg der β -Endorphin-Spiegel sein könnten [48, 122]. Im Leistungssport wirkt sich der durch das Training induzierte Anstieg des β -Endorphin-Spiegels positiv auf die Stimmungslage von Athleten aus [54, 55]. Mehrere Studien zeigten, dass ein durch exzessives Training erhöhter β -Endorphin-Spiegel das Anheben von Toleranzgrenzen, die Senkung von Angstschwellen und Schmerzgrenzen sowie die Entstehung von Euphorie induziert [49-53]. Dies sind Merkmale, die für den erfolgreichen Leistungssport beziehungsweise ein zielorientiertes Training förderlich sind. Die Bestrahlung der Haut von Athleten mit blauem Licht könnte im Leistungssport erfolgversprechend sein, da ein durch blaues Licht induzierter Anstieg der β -Endorphin-Spiegel Athleten ermöglichen könnte, ihre willkürlichen Leistungsgrenzen zu verschieben. Dies würde den Athleten dazu verhelfen, sich im Training weiterzuentwickeln ohne einem erhöhten Verletzungsrisiko ausgesetzt zu sein. Auch in der Wettkampfsituation könnten die oben genannten Eigenschaften leistungssteigernd wirken. Zu dieser These gibt es allerdings noch keine Studienmodelle.

β -Endorphin hat auch auf die Immunregulation Einfluss, indem es die Migration von Keratinozyten [60] und die Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten steuert [4, 61, 63]. Es gibt Hinweise dafür, dass Anomalien der durch β -Endorphin gesteuerten Immunregulation mit einer erhöhten Inzidenz von Krebserkrankungen einhergehen [65]. Studien zeigten am Modell der Ratte, dass eine Aktivierung des Immunsystems durch β -Endorphin die Entstehung von karzinogen- und hormoninduzierten Krebserkrankungen einschränkt und eine Metastasierung bestehender Tumore verhindert [66, 67]. Diese Erkenntnisse eröffnen neue Möglichkeiten in der Krebsforschung. In den Versuchen von Zhang et al. wurden spezielle β -Endorphin produzierende Neurone in den Hypothalamus transplantiert, die im Anschluss die angeborene Immunfunktion verstärkten [64]. Dass peripher freigesetztes β -Endorphin die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und eine Erhöhung der β -Endorphin-Spiegel im Nucleus arcuatus des Hypothalamus bewirkt, zeigten Skobowiat und Slominski [29]. Ob β -Endorphin, das auf diesem Weg zur Hypophyse gelangt aber in gleicher Weise wie die transplantierten Neurone fähig ist, die Entwicklung von bestimmten Tumorerkrankungen zu unterdrücken, ist noch unklar. Blaues Licht könnte einen therapeutischen Wert für die Krebsprävention haben und ein potentieller neuer Ansatz onkologischer Therapien sein. Diesbezüglich müssten neue Studiendesigns entwickelt werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit erstmals, dass blaues Licht ($\lambda = 453 \text{ nm}$) einen signifikanten Einfluss auf die Produktion von β -Endorphin in humanen Keratinozy-

ten der Haut hat. Neben der erhöhten Sekretion von β -Endorphin wurde auch eine signifikant gesteigerte Freisetzung von nicht-enzymatisch erzeugtem Stickstoffmonoxid (NO) detektiert, was auf eine bedeutende Rolle von Stickstoffmonoxid im molekularen Mechanismus der Freisetzung von β -Endorphin hindeutet. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass exogen appliziertes Stickstoffmonoxid die β -Endorphin-Produktion in humanen Keratinozytenkulturen *in-vitro* signifikant induziert.

Der molekulare Wirkmechanismus der Freisetzung von β -Endorphin durch blaues Licht kann plausibel durch eine Abfolge mehrerer Ereignisse erklärt werden: Zuerst wird die nicht-enzymatische Bildung von NO im exponierten Hautgewebe durch blaues Licht induziert und das kutan produzierte Stickstoffmonoxid anschließend systemisch verteilt. Nachfolgend führt NO zur Induktion der β -Endorphin-Synthese in epidermalen Keratinozyten und wahrscheinlich ebenfalls zur NO-abhängigen Modulation der β -Endorphin-Synthese in spezialisierten Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems. Das freigesetzte β -Endorphin kann im Anschluss eine systemische Wirkung entfalten.

Diese systemische Erhöhung der β -Endorphin-Spiegel durch blaues Licht eröffnet neue Möglichkeiten bezüglich der klinischen Anwendungen des blauen Lichts. Hier sind neue Therapiemöglichkeiten im Bereich psychiatrischer Erkrankungen sowie im Bereich onkologischer Therapien denkbar.

Literaturverzeichnis

1. Albers, I., et al., *Blue light ($\lambda=453\text{nm}$) nitric oxide dependently induces beta-endorphin production of human skin keratinocytes in-vitro and increases systemic beta-endorphin levels in humans in-vivo*. Free Radic Biol Med, 2019. **145**: p. 78-86.
2. Veening, J.G. and H.P. Barendregt, *The effects of beta-endorphin: state change modification*. Fluids Barriers CNS, 2015. **12**: p. 3.
3. Harno, E., et al., *POMC: The Physiological Power of Hormone Processing*. Physiol Rev, 2018. **98**(4): p. 2381-2430.
4. Kay, N., J. Allen, and J.E. Morley, *Endorphins Stimulate Normal Human Peripheral-Blood Lymphocyte Natural-Killer Activity*. Life Sciences, 1984. **35**(1): p. 53-59.
5. Schoffelmeer, A.N., et al., *Beta-endorphin: a highly selective endogenous opioid agonist for presynaptic mu opioid receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 1991. **258**(1): p. 237-42.
6. Feldberg, W. and D.G. Smyth, *The C-fragment of lipotropin - a potent analgesic [proceedings]*. J Physiol, 1976. **260**(2): p. 30P-31P.
7. Tseng, L.F., H.H. Loh, and C.H. Li, *Beta-Endorphin as a potent analgesic by intravenous injection*. Nature, 1976. **263**(5574): p. 239-40.
8. Loh, H.H., et al., *beta-endorphin is a potent analgesic agent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(8): p. 2895-8.
9. Kastin, A.J., M.T. Jemison, and D.H. Coy, *Analgesia after peripheral administration of enkephalin and endorphin analogues*. Pharmacol Biochem Behav, 1979. **11**(6): p. 713-6.
10. Zhou, A., B.T. Bloomquist, and R.E. Mains, *The prohormone convertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthetic processing*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1763-9.
11. Zhou, Y. and I. Lindberg, *Purification and characterization of the prohormone convertase PC1(PC3)*. J Biol Chem, 1993. **268**(8): p. 5615-23.
12. Thomas, L., et al., *Kex2-like endoproteases PC2 and PC3 accurately cleave a model prohormone in mammalian cells: evidence for a common core of neuroendocrine processing enzymes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5297-301.
13. Benjannet, S., et al., *PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3564-8.
14. Loh, Y.P., *Kinetic studies on the processing of human beta-lipotropin by bovine pituitary intermediate lobe pro-opiomelanocortin-converting enzyme*. J Biol Chem, 1986. **261**(26): p. 11949-55.
15. Vieau, D., et al., *Expression of the prohormone convertase PC2 correlates with the presence of corticotropin-like intermediate lobe peptide in human adrenocorticotropin-secreting tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **79**(5): p. 1503-6.
16. Pathak, M.A. and D.L. Fanselow, *Photobiology of Melanin Pigmentation - Dose-Response of Skin to Sunlight and Its Contents*. Journal of the American Academy of Dermatology, 1983. **9**(5): p. 724-733.
17. Snell, R.S., *Effect of the Alpha Melanocyte Stimulating Hormone of the Pituitary on Mammalian Epidermal Melanocytes*. J Invest Dermatol, 1964. **42**: p. 337-47.
18. Mains, R.E., B.A. Eipper, and N. Ling, *Common precursor to corticotropins and endorphins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(7): p. 3014-8.
19. Rousseau, K., et al., *Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis*. FASEB J, 2007. **21**(8): p. 1844-56.

20. Schauer, E., et al., *Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes*. J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 2258-62.
21. Wintzen, M., et al., *Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1996. **106**(4): p. 673-8.
22. Farooqui, J.Z., et al., *The expression of proopiomelanocortin and various POMC-derived peptides in mouse and human skin*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **680**: p. 508-10.
23. Slominski, A.T., et al., *Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2012. **212**: p. v, vii, 1-115.
24. Fell, G.L., et al., *Skin beta-endorphin mediates addiction to UV light*. Cell, 2014. **157**(7): p. 1527-34.
25. Cui, R., et al., *Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation*. Cell, 2007. **128**(5): p. 853-64.
26. Fields, S. and S.K. Jang, *Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein*. Science, 1990. **249**(4972): p. 1046-9.
27. Lane, D.P. and L.V. Crawford, *T-Antigen Is Bound to a Host Protein in Sv40-Transformed Cells*. Nature, 1979. **278**(5701): p. 261-263.
28. Levine, A.J., W. Hu, and Z. Feng, *The P53 pathway: what questions remain to be explored?* Cell Death and Differentiation, 2006. **13**(6): p. 1027-1036.
29. Skobowiat, C. and A.T. Slominski, *Ultraviolet B stimulates proopiomelanocortin signalling in the arcuate nucleus of the hypothalamus in mice*. Exp Dermatol, 2016. **25**(2): p. 120-3.
30. Civelli, O., N. Birnberg, and E. Herbert, *Detection and Quantitation of Pro-Opiomelanocortin Messenger-Rna in Pituitary and Brain-Tissues from Different Species*. Journal of Biological Chemistry, 1982. **257**(12): p. 6783-6787.
31. Granholm, L., et al., *The expression of opioid genes in non-classical reward areas depends on early life conditions and ethanol intake*. Brain Research, 2017. **1668**: p. 36-45.
32. Haas, B.W. and T. Canli, *Emotional memory function, personality structure and psychopathology: A neural system approach to the identification of vulnerability markers*. Brain Research Reviews, 2008. **58**(1): p. 71-84.
33. Hegadoren, K.M., et al., *The role of beta-endorphin in the pathophysiology of major depression*. Neuropeptides, 2009. **43**(5): p. 341-53.
34. World Health Organization, *Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates*, in Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2017: Geneva.
35. Hirschfeld, R.M.A., *History and evolution of the monoamine hypothesis of depression*. Journal of Clinical Psychiatry, 2000. **61**: p. 4-6.
36. Marathe, S.V., et al., *Effects of Monoamines and Antidepressants on Astrocyte Physiology: Implications for Monoamine Hypothesis of Depression*. Journal of Experimental Neuroscience, 2018. **12**.
37. Gotlib, I.H. and J.P. Hamilton, *Neuroimaging and depression: Current status and unresolved issues*. Current Directions in Psychological Science, 2008. **17**(2): p. 159-163.
38. Gabilondo, A.M., J.J. Meana, and J.A. Garcia-Sevilla, *Increased density of mu-opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims*. Brain Res, 1995. **682**(1-2): p. 245-50.
39. Ohayon, M.M. and A.F. Schatzberg, *Using chronic pain to predict depressive morbidity in the general population*. Archives of General Psychiatry, 2003. **60**(1): p. 39-47.
40. Herz, A., *Endogenous opioid systems and alcohol addiction*. Psychopharmacology, 1997. **129**(2): p. 99-111.
41. Saal, D., et al., *Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons*. Neuron, 2003. **37**(4): p. 577-82.

42. Olive, M.F., et al., *Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine*. J Neurosci, 2001. **21**(23): p. RC184.
43. Kiefer, F., et al., *Is withdrawal-induced anxiety in alcoholism based on beta-endorphin deficiency?* Psychopharmacology (Berl), 2002. **162**(4): p. 433-7.
44. Esel, E., et al., *Plasma levels of beta-endorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol during early and late alcohol withdrawal*. Alcohol Alcohol, 2001. **36**(6): p. 572-6.
45. Vescovi, P.P., et al., *Plasma beta-endorphin, but not met-enkephalin levels are abnormal in chronic alcoholics*. Alcohol Alcohol, 1992. **27**(5): p. 471-5.
46. Zalewska-Kaszuńska, J. and D. Obzejtka, *Use of low-energy laser as adjunct treatment of alcohol addiction*. Lasers Med Sci, 2004. **19**(2): p. 100-4.
47. Glickman, G., et al., *Light therapy for seasonal affective disorder with blue narrow-band light-emitting diodes (LEDs)*. Biological Psychiatry, 2006. **59**(6): p. 502-507.
48. Cravana, C., et al., *Influence of training and competitive sessions on peripheral beta-endorphin levels in training show jumping horses*. Vet World, 2017. **10**(1): p. 67-73.
49. Cunha, G.S., J.L. Ribeiro, and A.R. Oliveira, *[Levels of beta-endorphin in response to exercise and overtraining]*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2008. **52**(4): p. 589-98.
50. Sinaei, M. and M. Kargarfard, *The evaluation of BMI and serum beta-endorphin levels: the study of acute exercise intervention*. J Sports Med Phys Fitness, 2015. **55**(5): p. 488-94.
51. Fuss, J., et al., *A runner's high depends on cannabinoid receptors in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(42): p. 13105-8.
52. Jamurtas, A.Z., et al., *The effects of low and high glycemic index foods on exercise performance and beta-endorphin responses*. J Int Soc Sports Nutr, 2011. **8**: p. 15.
53. Heyman, E., et al., *Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans--possible implications for reward and depression*. Psychoneuroendocrinology, 2012. **37**(6): p. 844-51.
54. Boecker, H., et al., *The runner's high: opioidergic mechanisms in the human brain*. Cereb Cortex, 2008. **18**(11): p. 2523-31.
55. Hoffman, M.D. and D.R. Hoffman, *Exercisers achieve greater acute exercise-induced mood enhancement than nonexercisers*. Arch Phys Med Rehabil, 2008. **89**(2): p. 358-63.
56. Goodwin, G.M., et al., *The elevation of plasma beta-endorphin levels in major depression*. J Affect Disord, 1993. **29**(4): p. 281-9.
57. Harris, A.H., R. Cronkite, and R. Moos, *Physical activity, exercise coping, and depression in a 10-year cohort study of depressed patients*. J Affect Disord, 2006. **93**(1-3): p. 79-85.
58. Hassmen, P., N. Koivula, and A. Uutela, *Physical exercise and psychological well-being: a population study in Finland*. Prev Med, 2000. **30**(1): p. 17-25.
59. Paffenbarger, R.S., Jr., I.M. Lee, and R. Leung, *Physical activity and personal characteristics associated with depression and suicide in American college men*. Acta Psychiatr Scand Suppl, 1994. **377**: p. 16-22.
60. Bigliardi, P.L., et al., *Specific stimulation of migration of human keratinocytes by mu-opiate receptor agonists*. J Recept Signal Transduct Res, 2002. **22**(1-4): p. 191-9.
61. Gein, S.V., et al., *beta-Endorphin Effects on Antibody Production, Proliferation, and Secretion of Th1/Th2 Cytokines In Vivo*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2012. **152**(5): p. 595-599.
62. Bidlack, J.M., et al., *Opioid Receptors and Signaling on Cells from the Immune System*. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2006. **1**(3): p. 260-269.
63. Pomorska, D.K., K. Gach, and A. Janecka, *Immunomodulatory effects of endogenous and synthetic peptides activating opioid receptors*. Mini Rev Med Chem, 2014. **14**(14): p. 1148-55.

64. Zhang, C., et al., *Beta-endorphin cell therapy for cancer prevention*. Cancer Prev Res (Phila), 2015. **8**(1): p. 56-67.
65. Lissoni, P., et al., *Evidence for altered opioid activity in patients with cancer*. Br J Cancer, 1987. **56**(6): p. 834-7.
66. Zhang, C., T. Franklin, and D.K. Sarkar, *Inhibition of Mammary Cancer Progression in Fetal Alcohol Exposed Rats by beta-Endorphin Neurons*. Alcohol Clin Exp Res, 2016. **40**(1): p. 134-40.
67. Sarkar, D.K., et al., *Transplantation of beta-Endorphin Neurons into the Hypothalamus Promotes Immune Function and Restricts the Growth and Metastasis of Mammary Carcinoma*. Cancer Research, 2011. **71**(19): p. 6282-6291.
68. Cadet, J., E. Sage, and T. Douki, *Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA*. Mutat Res, 2005. **571**(1-2): p. 3-17.
69. Syed, D.N., F. Afaq, and H. Mukhtar, *Differential activation of signaling pathways by UVA and UVB radiation in normal human epidermal keratinocytes*. Photochem Photobiol, 2012. **88**(5): p. 1184-90.
70. Polefka, T.G., et al., *Effects of solar radiation on the skin*. J Cosmet Dermatol, 2012. **11**(2): p. 134-43.
71. Kielbassa, C., L. Roza, and B. Epe, *Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light*. Carcinogenesis, 1997. **18**(4): p. 811-6.
72. Greinert, R., et al., *UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(20): p. 10263-73.
73. Oplander, C. and C.V. Suschek, *The role of photolabile dermal nitric oxide derivatives in ultraviolet radiation (UVR)-induced cell death*. Int J Mol Sci, 2012. **14**(1): p. 191-204.
74. Matsunaga, T., K. Hieda, and O. Nikaido, *Wavelength dependent formation of thymine dimers and (6-4) photoproducts in DNA by monochromatic ultraviolet light ranging from 150 to 365 nm*. Photochem Photobiol, 1991. **54**(3): p. 403-10.
75. Matsumura, Y. and H.N. Ananthaswamy, *Molecular mechanisms of photocarcinogenesis*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d765-83.
76. Dumaz, N., et al., *The role of UV-B light in skin carcinogenesis through the analysis of p53 mutations in squamous cell carcinomas of hairless mice*. Carcinogenesis, 1997. **18**(5): p. 897-904.
77. Peak, J.G. and M.J. Peak, *Ultraviolet light induces double-strand breaks in DNA of cultured human P3 cells as measured by neutral filter elution*. Photochem Photobiol, 1990. **52**(2): p. 387-93.
78. Moura Valejo Coelho, M., T.R. Matos, and M. Apetato, *The dark side of the light: mechanisms of photocarcinogenesis*. Clin Dermatol, 2016. **34**(5): p. 563-70.
79. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., *Krebs in Deutschland 2010/2011*, in 10. Ausgabe. 2015, GEKID: Berlin.
80. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., *Krebs in Deutschland 2013/2014*. 2016, GEKID: Berlin.
81. Kleinpenning, M.M., et al., *Clinical and histological effects of blue light on normal skin*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2010. **26**(1): p. 16-21.
82. Oplander, C., et al., *Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts*. J Photochem Photobiol B, 2011. **103**(2): p. 118-25.
83. Okuno, T., *Hazards of solar blue light*. Applied Optics, 2008. **47**(16): p. 2988-2992.
84. Algvere, P.V., J. Marshall, and S. Seregard, *Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard*. Acta Ophthalmologica Scandinavica, 2006. **84**(1): p. 4-15.
85. Krigel, A., et al., *Light-Induced Retinal Damage Using Different Light Sources, Protocols and Rat Strains Reveals Led Phototoxicity*. Neuroscience, 2016. **339**: p. 296-307.

86. Dungal, P., et al., *Low level light therapy by LED of different wavelength induces angiogenesis and improves ischemic wound healing*. Lasers Surg Med, 2014. **46**(10): p. 773-80.
87. Liebmann, J., M. Born, and V. Kolb-Bachofen, *Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(1): p. 259-69.
88. Keemss, K., et al., *Prospective, Randomized Study on the Efficacy and Safety of Local UV-Free Blue Light Treatment of Eczema*. Dermatology, 2016. **232**(4): p. 496-502.
89. Pfaff, S., et al., *Prospective Randomized Long-Term Study on the Efficacy and Safety of UV-Free Blue Light for Treating Mild Psoriasis Vulgaris*. Dermatology, 2015. **231**(1): p. 24-34.
90. Oplander, C., et al., *Whole body UVA irradiation lowers systemic blood pressure by release of nitric oxide from intracutaneous photolabile nitric oxide derivatives*. Circ Res, 2009. **105**(10): p. 1031-40.
91. Oplaender, C., et al., *Mechanism and biological relevance of blue-light (420-453 nm)-induced nonenzymatic nitric oxide generation from photolabile nitric oxide derivatives in human skin in vitro and in vivo*. Free Radical Biology and Medicine, 2013. **65**: p. 1363-1377.
92. Sexton, D.J., et al., *Visible light photochemical release of nitric oxide from S-nitrosoglutathione: potential photochemotherapeutic applications*. Photochem Photobiol, 1994. **59**(4): p. 463-7.
93. Ignarro, L.J., et al., *Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates*. J Pharmacol Exp Ther, 1981. **218**(3): p. 739-49.
94. Dippel, E., et al., *Distribution of constitutive nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase activity in murine telogen and anagen skin*. J Invest Dermatol, 1994. **103**(1): p. 112-5.
95. Weller, R., *Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology*. Clin Exp Dermatol, 2003. **28**(5): p. 511-4.
96. Baudouin, J.E. and P. Tachon, *Constitutive nitric oxide synthase is present in normal human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1996. **106**(3): p. 428-31.
97. Bruch-Gerharz, D., et al., *A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 2007-12.
98. Arany, I., et al., *Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by differentiation and cytokines in human keratinocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **220**(3): p. 618-22.
99. Stern, M., et al., *Blue light exposure decreases systolic blood pressure, arterial stiffness, and improves endothelial function in humans*. Eur J Prev Cardiol, 2018. **25**(17): p. 1875-1883.
100. Wayman, C.P., N.V. Pike, and J.F. Wilson, *N-methyl-D-aspartate (NMDA) stimulates release of alpha-MSH from the rat hypothalamus through release of nitric oxide*. Brain Res, 1994. **666**(2): p. 201-6.
101. Brunetti, L., et al., *Involvement of nitric oxide in basal and interleukin-1 beta-induced CRH and ACTH release in vitro*. Life Sci, 1993. **53**(13): p. PL219-22.
102. Ohgami, Y., E. Chung, and R.M. Quock, *Nitrous oxide-induced NO-dependent neuronal release of beta-endorphin from the rat arcuate nucleus and periaqueductal gray*. Brain Res, 2010. **1366**: p. 38-43.
103. Zelinski, L.M., et al., *A prolonged nitric oxide-dependent, opioid-mediated antinociceptive effect of hyperbaric oxygen in mice*. J Pain, 2009. **10**(2): p. 167-72.
104. Paunel, A.N., et al., *Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(5): p. 606-15.

105. Bernstein, H.G., et al., *Expression of hypothalamic peptides in mice lacking neuronal nitric oxide synthase: reduced beta-END immunoreactivity in the arcuate nucleus*. Neuroendocrinology, 1998. **68**(6): p. 403-11.
106. Keilhoff, G., et al., *Lack of neuronal NOS has consequences for the expression of POMC and POMC-derived peptides in the mouse pituitary*. Acta Histochem, 2001. **103**(4): p. 397-412.
107. Hiramoto, K., *Ultraviolet A irradiation of the eye activates a nitric oxide-dependent hypothalamo-pituitary pro-opiomelanocortin pathway and modulates the functions of Langerhans cells*. J Dermatol, 2009. **36**(6): p. 335-45.
108. Chakraborty, A.K., et al., *Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1313**(2): p. 130-8.
109. Jussila, A., et al., *Narrow-band ultraviolet B radiation induces the expression of beta-endorphin in human skin in vivo*. J Photochem Photobiol B, 2016. **155**: p. 104-8.
110. Wintzen, M., et al., *Presence of immunoreactive beta-endorphin in human skin*. Exp Dermatol, 2001. **10**(5): p. 305-11.
111. Duteil, L., et al., *Differences in visible light-induced pigmentation according to wavelengths: a clinical and histological study in comparison with UVB exposure*. Pigment Cell Melanoma Res, 2014. **27**(5): p. 822-6.
112. Wintzen and Gilchrest, *Proopiomelanocortin, its derived peptides, and the skin (vol 106, pg 3, 1996)*. Journal of Investigative Dermatology, 1996. **107**(3): p. 444-444.
113. Kaur, M., et al., *Plasma beta-endorphin levels in frequent and infrequent tanners before and after ultraviolet and non-ultraviolet stimuli*. J Am Acad Dermatol, 2006. **54**(5): p. 919-20.
114. Skobowiat, C., et al., *Cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenal axis homolog: regulation by ultraviolet radiation*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2011. **301**(3): p. E484-E493.
115. Gambichler, T., et al., *Plasma levels of opioid peptides after sunbed exposures*. Br J Dermatol, 2002. **147**(6): p. 1207-11.
116. Wintzen, M., et al., *Total body exposure to ultraviolet radiation does not influence plasma levels of immunoreactive beta-endorphin in man*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2001. **17**(6): p. 256-60.
117. Banks, W.A. and A.J. Kastin, *Peptide transport systems for opiates across the blood-brain barrier*. Am J Physiol, 1990. **259**(1 Pt 1): p. E1-10.
118. Gerner, R.H., B. Sharp, and D.H. Catlin, *Peripherally administered beta-endorphin increases cerebrospinal fluid endorphin immunoreactivity*. J Clin Endocrinol Metab, 1982. **55**(2): p. 358-60.
119. Tejeda, H.A. and A. Bonci, *Shedding "UV" light on endogenous opioid dependence*. Cell, 2014. **157**(7): p. 1500-1.
120. Golden, R.N., et al., *The efficacy of light therapy in the treatment of mood disorders: a review and meta-analysis of the evidence*. Am J Psychiatry, 2005. **162**(4): p. 656-62.
121. Harber, V.J. and J.R. Sutton, *Endorphins and exercise*. Sports Med, 1984. **1**(2): p. 154-71.
122. Taylor, D.V., et al., *Acidosis Stimulates Beta-Endorphin Release during Exercise*. Journal of Applied Physiology, 1994. **77**(4): p. 1913-1918.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek, für die hervorragende und kompetente Betreuung bei der Durchführung der gesamten Arbeit. Insbesondere danke ich für die immer freundliche, vertrauensvolle, zuverlässige und sehr motivierende Zusammenarbeit sowie die Unterstützung bei der Publikation.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei der gesamten Arbeitsgruppe des Forschungslabors der Klinik für Orthopädie- und Unfallchirurgie der Uniklinik Düsseldorf für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Jutta Schneider, Samira Seghrouchni und Christa Wilkens, denen ich für die tolle Einarbeitung in die Labortechniken und die großartige Unterstützung im Labor danke. Mit euch hatte ich großen Spaß und viel Freude an meiner Forschungsarbeit.

Ich danke auch Herrn PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Des Weiteren danke ich herzlich allen Autoren der gemeinsamen Publikation für die erfolgreiche Zusammenarbeit: Dr. rer. nat. Erika Zernickel, Dr. med. Manuel Stern, Melanie Broja, Dr. med. Hans Lucas Busch, Prof. Dr. med. Christian Heiss, Dr. rer. nat. Vera Grotheer, Prof. Dr. med. Joachim Windolf und natürlich Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Heike und Wolfgang Albers, die mich uneingeschränkt unterstützen und meinen beruflichen Werdegang ermöglicht haben. Danke, dass ihr immer für mich da seid und ich mich jederzeit auf euch verlassen kann.

Ich danke außerdem meinen Großeltern, die mich in meinem Studium sehr unterstützt haben und es mir ermöglichten, meinen Traumberuf zu ergreifen. Euer Interesse an meiner beruflichen und persönlichen Weiterentwicklung motiviert mich sehr.

Zudem danke ich meinem Freund Karsten und meinen Brüdern und von ganzem Herzen für die liebevolle Unterstützung.