

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Joachim Windolf

Charakterisierung molekularer Mechanismen der Modulation der Myofibrogenese humaner Hautfibroblasten durch blaues Licht ($\lambda=453$ nm)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Pia Steentjes

2021

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

Gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Viktor Suschek

Zweitgutachter/in: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

*Für meine Familie,
insbesondere für Oma & Opa.*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	
Zusammenfassung	III
Summary	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau der Haut	1
1.1.1 Epidermis	1
1.1.2 Dermis	2
1.1.3 Subkutis	3
1.2 Phasen der menschlichen Wundheilung	3
1.2.1 Fibroblasten und Myofibroblasten	6
1.2.2 TGF- β 1 Signalweg	8
1.3 Fibrotische Erkrankungen	11
1.4 Hypertrophe Narben & Keloide: Pathogenese und Therapie	12
1.5 Licht	16
1.5.1 Sichtbares Licht und dessen Anwendung in der Medizin	18
1.6 Blaues Licht und dessen Effekte	21
1.7 Redox-Systeme am Beispiel Glutathion	24
2 Ziele der Arbeit	25
3 Materialien	26
3.1 Verbrauchsmaterialien	26
3.2 Substanzen und Lösungen	27
3.3 Geräte	29
3.4 Puffer, Antikörper und KIT-Systeme	32
4 Methoden	34
4.1 Zellkultur	34
4.1.1 Zellisolation und Probengenerierung	34
4.1.2 Zellernte	34
4.1.3 Zellen „splitten“	35
4.1.4 Zellzahlbestimmung	35
4.1.5 Zellen einfrieren – Kryokonservierung	36
4.2 Bestrahlung mit blauem Licht (453 nm)	36
4.3 DNA-Bestimmung mittels NanoDrop	37
4.4 Proteinbestimmung (BCA Protein Assay)	38
4.5 Western Blot Analyse	39

4.5.1	Stimulation der Zellen mit TGF- β 1 (Differenzierung & Inkubation)	39
4.5.2	Das Western Blot Verfahren	39
4.5.3	Probenvorbereitung	40
4.5.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	40
4.5.5	Das Blotting	41
4.5.6	Immunodetektion	41
4.5.7	Antikörper	42
4.6	Celltiter Blue Assay	42
4.7	MTT-Assay	42
4.8	Neutral Rot Messung	43
4.8.1	Lyso Tracker	44
4.9	Glucose-Glo-Assay	44
4.10	ATP-Assay	45
4.11	Glutathion-Analyse	45
4.11.1	Glutathion Colorimetric Detection Kit	46
4.11.2	Glutathion Peroxidase Assay Kit	46
4.11.3	Glutathion Reductase Fluorescent Activity Kit	46
4.12	Statistische Auswertung	47
5	Ergebnisse	48
5.1	Western Blot Analyse der Expression verschiedener Gene der Myofibrogenese und des oxidativen Stoffwechsels nach 3-tägiger Bestrahlung mit blauem Licht	48
5.1.1	Western Blot Analyse der Proteine Nrf2, FoxO1, NOX4, α -SMA und GAPDH	49
5.1.2	Expression von α -SMA	49
5.1.3	Expression von NOX4	50
5.1.4	Expression von FoxO1	51
5.1.5	Expression von Nrf2	52
5.2	Celltiter Blue Viability Assay: Messung der metabolischen Aktivität der Atmungskette als indirekter Nachweis der Zellviabilität	53
5.3	MTT-Assay: metabolische Aktivität und Zellviabilität	54
5.4	Neutral Rot Messung: Nachweis der Zellviabilität durch Einbau des Farbstoffes in Lysosomen	56
5.4.1	Lyso Tracker	58
5.5	Glucose-Glo-Assay: Stoffwechselaktivität und Glucose-Verbrauch der Zellen	60
5.6	ATP-Assay: Aktivität der Atmungskette anhand der ATP-Generierung	62
5.7	Glutathion-Analyse: Beeinflussung des Glutathion-Stoffwechsels durch blaues Licht	64
5.7.1	Glutathion Colorimetric Detection Kit	65
5.7.2	Glutathion Peroxidase Assay Kit	67
5.7.3	Glutathion Reductase Fluorescent Activity Kit	68

6	Diskussion.....	70
6.1	Der inhibierende Effekt von nicht-toxischem blauem Licht auf die Myofibrogenese	72
6.2	Der Einfluss von blauem Licht auf die Atmungskette und die Rolle von Flavinen als Photoakzeptoren.....	73
6.3	Der Effekt von blauem Licht auf die ATP-Produktion.....	78
6.4	Der Einfluss der Bestrahlung auf den Glucose-Stoffwechsel	80
6.4.1	Effekt der Bestrahlung auf die FOXO1-Proteinexpression	82
6.5	Der Effekt der Blaulicht Bestrahlung auf die Zellviabilität	84
6.6	Die Rolle der antioxidativen Abwehr bei der Bestrahlung mit blauem Licht	87
6.6.1	Einfluss/Effekt der Bestrahlung auf die Proteinexpression von Nrf2	92
7	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	96
8	Anhang.....	105
8.1	Der ATP-Gehalt der Zellen mit und ohne Einfluss der Bestrahlung mit 453 nm	105

Zusammenfassung

Eine gestörte Regulation der Fibroblasten-Differenzierung (FBD) zu Myofibroblasten (MyFB) korreliert mit der Pathogenese fibrotischer Erkrankungen, wie zum Beispiel der Entstehung hypertropher Narben oder Keloide sowie der Pathogenese des Morbus Dupuytren (MD).

Der zugrunde liegende Pathomechanismus besteht einerseits aus einer erhöhten Proliferationsrate von Fibroblasten sowie einer vermehrten, anhaltenden Differenzierung zu MyFB, andererseits aus einer verminderten Apoptoserate dieser Zellen. Da die Differenzierung über den *Transforming growth factor* β (TGF- β)-Signalweg abläuft, spielt dieser eine entscheidende Rolle in dem Prozess. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die physiologisch im Rahmen der Aktivität verschiedener Flavin-haltiger Enzyme generiert werden können, beispielsweise der NADPH-Oxidasen (NOX) oder der mitochondrialen NADH-Dehydrogenase, übernehmen ebenso eine wichtige Aufgabe in der Progression der FBD. Um die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten nachzuweisen, gilt das Protein *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) weiterhin als verlässlichster Marker.

In vorangehenden Studien konnte gezeigt werden, dass eine Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453$ nm) die spontane, sowie TGF- β -induzierte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten signifikant und dosisabhängig reduzieren konnte.

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte unter Verwendung einer Blaulicht-emittierenden Lichtquelle ($\lambda=453$ nm) aufgeklärt werden, welcher molekulare Mechanismus der Differenzierungsinhibition zugrunde liegt und welche Rolle die Flavin-haltigen Enzyme und ihre ROS-Produktion bei der Myofibrogenese spielen. Flavine sind Photoakzeptoren für blaues Licht und kommen als Ko-Faktoren bei einer Reihe von Enzymen vor.

Vor diesem Hintergrund untersuchte ich den Einfluss von blauem Licht auf die Flavin-haltigen Komplexe der Atmungskette. Ich beobachtete, dass die Bestrahlung mit blauem Licht mit nicht-toxischen Höchstdosen von 80 J/cm^2 eine erhöhte Aktivität des mitochondrialen, Flavin-haltigen Komplex I (NADH-Dehydrogenase) auslöste. Dieser Befund stimmt überein mit der Beobachtung, dass Flavine durch blaues Licht photoreduziert werden können und die NADH-Dehydrogenase dadurch entkoppelt wird. In diesem Prozess werden vermehrt Elektronen transportiert, jedoch kein Substrat (NADH) verbraucht. Als Folge werden vermehrt ROS generiert, jedoch beobachtete ich auch eine signifikant verringerte ATP-Produktion der bestrahlten Zellen. Zudem konnte ich ebenfalls beobachten, dass neben der Atmungskette auch die Glykolyse und damit ein weiterer Teil des Energiemetabolismus der Zellen durch die Bestrahlung signifikant eingeschränkt wurde. Vermutlich als Folge der verringerten ATP-Synthese beobachtete ich eine deutlich signifikante Abnahme der Lysosomenfunktion, die bekanntermaßen stark ATP-abhängig ist. Außerdem untersuchte ich weitere mögliche Gründe für den erhöhten oxidativen Stress nach Lichtexposition. Dabei wurde deutlich, dass blaues Licht zu einer signifikanten Abnahme der Konzentration des reduzierten Glutathions (GSH) als auch der Aktivität der Glutathion Peroxidase und des antioxidativen Regulationsproteins Nrf2 führte.

Die hier vorgelegten Daten weisen stark darauf hin, dass die durch blaues Licht induzierte Differenzierungshemmung humaner Fibroblasten durch eine vermehrte ROS-Produktion infolge einer eingeschränkten antioxidativen Kapazität der bestrahlten Zellen und zusätzlich durch eine Energiedepletion vermittelt wird. Als zugrundeliegender Mechanismus kann die Photoreduktion Flavin-haltiger Enzyme des Energiemetabolismus angenommen werden, was in zukünftigen Projekten weiter bestätigt werden muss.

Unabhängig von der noch unsicheren Datenlage kann jedoch festgehalten werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse dazu beitragen können, eine neue, effektive und nebenwirkungsarme Therapieoption zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen, hypertropher Narben und Keloide zu entwickeln.

Summary

A disturbed regulation of fibroblast differentiation (FBD) to myofibroblasts (MyFB) correlates with the pathogenesis of fibrotic disorders, such as the development of hypertrophic scars or keloids as well as the pathogenesis of Dupuytren's disease (MD).

The underlying pathomechanism consists of an increased proliferation rate of fibroblasts and an increased, sustained differentiation to MyFB, as well as a decreased apoptosis rate of these cells. Since the differentiation occurs via the transforming growth factor (TGF) signaling pathway, it plays a crucial role in this process. Reactive oxygen species (ROS), which can be physiologically generated as part of the activity of various flavin-containing enzymes, such as NADPH oxidases (NOX) or mitochondrial NADH dehydrogenase, also play an important role in the progression of FBD. To detect the differentiation of fibroblasts to myofibroblasts, the most reliable marker is still considered to be the protein alpha-smooth muscle actin (α -SMA).

In previous studies, it could be demonstrated that irradiation with blue light ($\lambda=453$ nm) could significantly and dose-dependently reduce spontaneous, as well as TGF- β -induced differentiation of fibroblasts to myofibroblasts.

The intention of this study is to elucidate the effect of the irradiation with a blue light-emitting light source ($\lambda=453$ nm), on the molecular mechanism underlying the inhibition of differentiation and the role of flavin-containing enzymes, and their ROS production in myofibrogenesis. Flavins are photoacceptors of blue light and occur as co-factors in a number of enzymes.

Considering this, the effect of blue light on flavin-containing complexes of the respiratory chain was investigated. It could be observed that irradiation with blue light at maximum non-toxic doses of 80 J/cm² triggered an increased activity of the mitochondrial flavin-containing complex I (NADH dehydrogenase). This is consistent with the observation that flavins can be photoreduced by blue light, thereby uncoupling the NADH dehydrogenase. In this process, an increased electron transfer occurred but no substrate (NADH) was consumed. As a result, increased ROS are generated, and also a significantly decreased ATP production of the irradiated cells could be observed. In addition, the glycolysis, and thus another part of the energy metabolism of the cells, besides the respiratory chain, was significantly reduced by irradiation. Presumably as a consequence of the reduced ATP synthesis, a strongly significant decrease in lysosome function, which is known to be strongly ATP-dependent, could be observed. Furthermore, other possible reasons for the increased oxidative stress after light exposure were investigated. It was shown that blue light led to a significant decrease in the concentration of reduced glutathione (GSH) as well as in the activity of glutathione peroxidase and the antioxidant regulatory protein Nrf2.

The presented data strongly suggest that blue light-induced inhibition of differentiation of human fibroblasts is mediated by increased ROS production resulting from impaired antioxidant capacity of the irradiated cells and additionally by energy depletion. The underlying mechanism can be assumed to be the photoreduction of flavin-containing enzymes of the energy metabolism, which needs to be further confirmed in future projects. Regardless of the still uncertain data situation, it can be stated that the knowledge gained in this work may contribute to the development of a new, effective therapy option with few side effects for the treatment of fibrotic disorders, hypertrophic scars, and keloids.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Querschnitt des Aufbaus der Haut.....	1
Abb. 2: a: Wundheilungsphasen; b: phasenweise vorherrschende Zelltypen; c: Matrixbestandteile der Wund entsprechend der Phasen.	3
Abb. 3: Modell der Myofibroblasten Differenzierung.....	8
Abb. 4: Veranschaulichung des Smad-abhängigen TGF- β Signalwegs.....	10
Abb. 5: schematische Darstellung des Spektrums des Lichts unterschiedlicher Wellenlängen.....	16
Abb. 6: Schematische Abbildung der elektromagnetischen Strahlung und ihrer Eindringtiefe in die verschiedenen Hautschichten.....	18
Abb. 7: Neubauer-Zählkammer; Anzahl gezählter Zellen $\times 2 \times 10^4$ = Zellzahl pro ml...36	
Abb. 8: LED-Array mit einer Wellenlänge von 453 nm (Firma Philips).....	37
Abb. 9: Aufbau der Western-Blot-Kassette.....	41
Abb. 10: Funktionsweise des Glucose-Glo Assays.....	44
Abb. 11: Darstellung eines typischen repräsentativen Ergebnisses der Western Blot Analyse des Proteins Nrf2, FoxO1, NOX4, α -SMA und des Kontrollproteins GAPDH.	49
Abb. 12: Western Blot Analyse des Proteins α -SMA. Darstellung der relativen Proteinexpression gegenüber der Behandlung mit/ohne TGF- β 1.....	50
Abb. 13: Western Blot Analyse des Proteins NOX4 und des Kontrollproteins GAPDH. Darstellung der relativen Proteinexpression gegenüber der Behandlung mit/ohne TGF- β 1.....	51
Abb. 14: Western Blot Analyse des Proteins FoxO1 und des Kontrollproteins GAPDH. Darstellung der relativen Proteinexpression gegenüber der Behandlung mit/ohne TGF- β 1.....	52
Abb. 15: Western Blot Analyse des Proteins Nrf2 und des Kontrollproteins GAPDH. Darstellung der relativen Proteinexpression gegenüber der Behandlung mit/ohne TGF- β 1.....	52
Abb. 16: Darstellung der Umsetzung von Resazurin zu Resorufin durch zelluläre NADH-abhängige Oxidoreduktasen anhand der Fluoreszenz (540 nm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende.....	53
Abb. 17: Darstellung der Umsetzung von Resazurin zu Resorufin durch zelluläre NADH-abhängige Oxidoreduktasen anhand der Fluoreszenz (540 nm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende.....	54
Abb. 18: Darstellung der Umsetzung von Tetrazolium zu unlöslichem Formazan durch die zelluläre, mitochondriale Succinat-Dehydrogenase (SDH) anhand der optischen Dichte bei 540 nm in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende.	55
Abb. 19: Darstellung der Umsetzung von Tetrazolium zu unlöslichem Formazan durch die zelluläre, mitochondriale Succinat-Dehydrogenase (SDH) anhand der optischen Dichte bei 540 nm in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende.	56
Abb. 20: Darstellung der Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot in die Lysosomen anhand der optischen Dichte bei 540 nm bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende.	57
Abb. 21: Darstellung der Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot in die Lysosomen anhand der optischen Dichte bei 540 nm bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende.	58
Abb. 22: Mikroskopische Aufnahmen des Anreicherungsverhaltens der Zellen im Rahmen des Lyso-Tracker Assays.	60
Abb. 23: Die relative Glucosekonzentration bezogen auf die DNA-Menge in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende und Bestrahlungsdosis.	61

Abb. 24: Die relative Glucosekonzentration bezogen auf die DNA-Menge in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende und Bestrahlungsdosis.	62
Abb. 25: Relative ATP-Konzentration pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende.	63
Abb. 26: Relative ATP-Konzentration pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende.	64
Abb. 27: Darstellung der durch die Glutathion Peroxidase und Glutathion Reduktase katalysierten Reaktionen inklusive derer Co-Faktoren.	65
Abb. 28: Die Gesamtkonzentration des totalen GSH bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende.	66
Abb. 29: Glutathion Peroxidase Aktivität bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende.	67
Abb. 30: Glutathion Reduktase Aktivität bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende.	68
Abb. 31: Absorption von FAD mit und ohne Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm (100 J/cm²).	73
Abb. 32: Möglicher Effekt der Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453$ nm) auf flavinhaltige Oxidoreduktasen am Beispiel der NADPH-Oxidase 4.	74
Abb. 33: Einfluss der Bestrahlung mit blauem Licht auf den NOX4 Signalweg im Rahmen der TGFβ1 abhängigen Aktivierung von Fibroblasten.	75
Abb. 34: Schematische Darstellung des Effekts der Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453$ nm) auf die flavinhaltige NADH-Dehydrogenase (Komplex I) der Atmungskette.	76
Abb. 35: schematische Darstellung des Einflusses der Bestrahlung mit blauem Licht auf die Komplexe der Atmungskette und nachfolgend auf die ATP-Produktion.	79
Abb. 36: Darstellung des FOXO1 Signalwegs und dessen Beeinflussung durch die Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453$ nm).	84
Abb. 37: Schematische Darstellung des Glutathion-Stoffwechsels, beeinflusst durch die Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453$ nm).	92
Abb. 38: Die reine ATP-Konzentration pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende.	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	27
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Substanzen und Lösungen.	29
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte.	31
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer, Antikörper und KIT-Systeme.....	33
Tabelle 5: Pipettierschema des BSA-Standards zur Bestimmung der Proteinkonzentration.....	38
Tabelle 6: Auflistung des TGF-β1 Zusatz mit der entsprechenden Konzentration, Zugabe-Zeitpunkt und Inkubationsdauer.....	39
Tabelle 7: Auflistung der für den Western Blot benötigten Gele und Puffer und deren spezifische Zusammensetzung.....	40
Tabelle 8: Auflistung der im Western Blot verwendeten Antikörper und deren Eigenschaften.....	42

Abkürzungsverzeichnis

°C	-----	Grad Celsius
µl	-----	Mikroliter
5-FU	-----	5-Fluorouracil
A	-----	Ampere
ANOVA	-----	Analysis of Variance
ARE	-----	antioxidative Reaktions-Elemente
ATP	-----	Adenosintriphosphat
BCA	-----	Bicinchoninsäure
BMP	-----	bone morphogenetic proteins
BSA	-----	bovines Serumalbumin
bZIP	-----	Cap'n'Collar (CNC)-basic leucine zipper
Ca ²⁺	-----	Calcium
CCO	-----	Cytochrom C Oxidase
cm	-----	Zentimeter
CO ₂	-----	Kohlenstoffdioxid
CTB	-----	Celltiter Blue
CTGF	-----	connective tissue growth factor
Cu ²⁺	-----	Kupfer
DMEM	-----	Dulbecco's modified eagle Medium
DMSO	-----	Dimethylsulfoxid
DNA	-----	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	-----	Dulbecco's phosphate buffered Saline
EDA-FN	-----	fibronectin containing extra domain A
EDTA	-----	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	-----	epidermal growth factor
ER	-----	endoplasmatisches Retikulum
ESC	-----	embryonale Stammzellen
FAD	-----	flavin adenin dinucleotide
FCS	-----	fetal calf serum
FGF	-----	fibroblast growth factor
FMN	-----	flavin mononucleotide
FoxO1	-----	Forkhead box protein O1
g	-----	Gramm
G6PD	-----	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	-----	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glr	-----	Glutathion Reduktase
GPx	-----	Glutathion Peroxidase
GPX	-----	Glutathion Peroxidase
GSH	-----	Glutathion; γ-glutamylcysteinyl-glycin
GSR	-----	Glutathion Reduktase
GSSG	-----	Glutathiondisulfid, oxidiertes Glutathion
H ₂ O	-----	Wasser
HDR	-----	high dose rate
HLA	-----	human leucozyte antigen
IDH 1	-----	Isocitrat-Dehydrogenase 1
IFN-γ	-----	Interferon gamma
IGF	-----	insulin like growth factor
IL-1	-----	Interleukin 1
IL-1β	-----	Interleukin 1 beta
IL-2	-----	Interleukin 2
IL-6	-----	Interleukin 6
IL-8	-----	Interleukin 8

IPL	intense pulse laser
J	Joule
kDa	Kilodalton
KGF	keratinozyt growth factor
LDR	low dose rate
LED	light emitting diode
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mg ²⁺	Magnesium
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	matrix metalloproteasen
Mn-SOD	mangnese superoxide dismutase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mW	Milliwatt
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
NO	nitric oxide, Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
ONOO	Peroxynitrit
P/S	Penicillin-Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBM	Photobiomodulation
PBS	Phosphate buffered Saline
PDGF	paletet derived growth factor
PDL	pulse dye laser
PGD	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
pH	potentia Hydrogenii
PI3K	phosphatidylinositol 3 Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RF	Riboflavin
RIPA	Radioimmunoprezipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Stickstoffspezies
ROS	reactive oxygen species
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulfat)
TAC	Triamcinolonacetomid
TBS	Tris buffer Saline
TBS-T	Tris buffered Saline mit Tween
TGF-β	transforming growth factor beta
TGX	Tris-Glycerin extended
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteases
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
UV	ultra violet
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
α-SMA	alpha smooth muscle actin
λ (lamda)	Wellenlänge

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut (Kutis) bildet die Körperoberfläche des Menschen und stellt mit einer Gesamtfläche von 1,5 – 2 m² dessen größtes Organ dar. Es lassen sich zwei verschiedene Hautarten unterscheiden, die Leisten- und die Felderhaut. Der Unterschied liegt in dem Vorhandensein von Haarfollikeln und Talgdrüsen, welche sich in der Felderhaut befinden und jeweils an den Schnittpunkten von kleinen Hautfurchen gelegen sind. Sie bedeckt den Großteil des Körpers. In der Leistenhaut, die sich palmar und plantar befindet, gibt es hingegen nur Schweißdrüsen. Ihr Muster ist einzigartig und ermöglicht die genaueste individuelle Zuordnung. Des Weiteren gliedert sich die Haut histologisch in drei Schichten. Zuoberst befindet sich die Epidermis (Oberhaut), welche mit der darunter liegenden Dermis (Korium, Lederhaut) die Kutis bildet (siehe Abb. 1). Unter der Kutis liegt die Subkutis, auch Unterhaut genannt. Die Funktionen der Haut sind vielfältig. Zum einen bietet sie einen mechanischen Schutz, wobei sie vor allem durch ihre Elastizität und Zugfestigkeit gekennzeichnet ist (Moll, 2010). Zum anderen übernimmt die Haut die Funktion einer protektiven Barriere gegenüber der Umwelt. Sie begrenzt den Körper nach außen hin (Singer, 1999) und schützt ihn damit zum Beispiel vor Austrocknung, Strahlen- und Hitzeeinwirkungen (mechanischen, thermischen und toxischen Einwirkungen), Krankheitserregern und reguliert die Körpertemperatur. Eine weitere wichtige Aufgabe der Haut liegt in der Reiz- und Sinneswahrnehmung, wobei sie durch unterschiedliche Nervenfasern und Rezeptoren in der Lage ist, verschiedenste Reize (Tast-/Schmerzsinn, Temperatur) wahrzunehmen. (Moll et al., 2010) (Benninghoff et al., 2011)

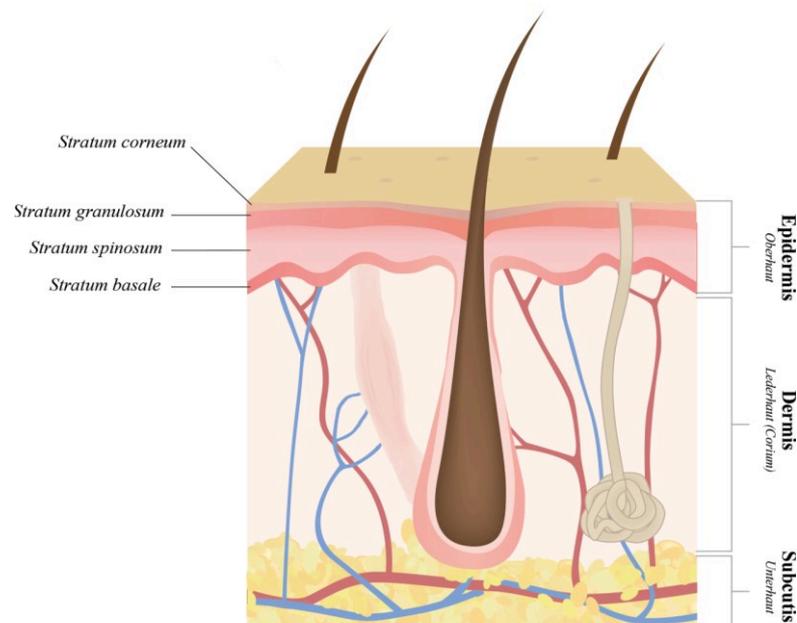


Abb. 1: Schematischer Querschnitt des Aufbaus der Haut. Quelle: (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017)

1.1.1 Epidermis

Die Epidermis besteht aus einem mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel und bildet damit die Oberfläche des Körpers. Ihre Dicke ist unter anderem abhängig von dem Alter, dem Geschlecht und der Lokalisation und beträgt zwischen 0,03 – 0,3 mm. Die Epidermis

ist ein Proliferationsgewebe, das sie sich durch die Fähigkeit der ständigen Erneuerung, auch terminale, epidermale Differenzierung genannt, auszeichnet. Grund dafür sind die verschiedenen histologischen Zellschichten, durch welche die Zellen von innen nach außen wandern und sich differenzieren. Von außen beginnend, stellt das Stratum corneum mit etwa 8 – 13 µm Dicke die erste Zellschicht und damit die Begrenzung nach außen hin dar. Sie enthält sowohl die Hornzellen als auch das Keratin als wichtige Bestandteile. Das Keratin durchzieht das Zytoplasma in Form von Tonofilamenten und bildet dadurch das Zytoskelett. Angrenzend an das Stratum corneum befindet sich das Stratum granulosum, welches durch das Vorhandensein von Körnerzellen auch als Körnerzellschicht bezeichnet wird. Diese Schicht bildet durch Zellkontakte eine Wasser-abweisende Barriere, die auch vor Wasserverlust schützt. Das dazwischen liegende Stratum lucidum stellt die Übergangszone von toten zu lebenden Zellen dar. Daruntergelegen ist das vielschichtige Stratum spinosum, welches die Keratinozyten (Stachelzellen) enthält. Sie sind durch Interzellularbrücken, auch Desmosomen genannt, verbunden, was ihnen ein stachelartiges Aussehen verleiht. Keratinozyten sind in nahezu allen Schichten in unterschiedlichen Stadien zu finden. Sie sind am Aufbau der Epidermis und des Plattenepithels beteiligt, indem sie auf ihrem Weg durch die Schichten immer weiter verhornen (terminalen Differenzierung). Zu unterst, an die Dermis grenzend, liegt das Stratum basale, auch Kompartiment der Proliferation genannt, da hier die Mitosen stattfinden. Zudem enthält es verschiedene Zellorganellen, wie zum Beispiel die Mitochondrien und die Melanozyten. Generell enthält die Epidermis noch Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen, Lymphozyten und Nervenfasern, jedoch keine Gefäße. Daher wird sie über die gefäßreiche Dermis via Diffusion versorgt. (Moll et al., 2010) (Welsch and Deller, 2010)

1.1.2 Dermis

Die Dermis ist zwischen der Epidermis und dem subkutanen Fettgewebe gelegen und besteht zum größten Teil aus Bindegewebe. Ihre Dicke ist ebenso variabel wie die der Epidermis und abhängig von der Lokalisation. Zu ihren wichtigsten Aufgaben zählt die Wasserspeicherung und der Schutz vor äußeren Einwirkungen. Die Dermis ist über Kollagenfibrillen aus Typ VII Kollagen (sog. Verankerungsfibrillen) eng mit der Epidermis verbunden und versorgt diese mit Nährstoffen. Histologisch lässt sich die Dermis ebenfalls in zwei Schichten einteilen, das Stratum papillare oberflächlich und das Stratum reticulare tiefer gelegen. Das Stratum papillare ist von Zellen und extrazellulärer Matrix dominiert, weniger von elastischen Fasern. Den Großteil der Zellen stellen die Fibroblasten in ihrer aktiven Form dar, deren inaktive Form auch Fibrozyten genannt wird. Fibroblasten sind spindelförmige Zellen, welche netzartig miteinander verbunden sind und für die Bildung der extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Daneben sind in der Dermis auch Histiozyten, deren aktive Form die Makrophagen sind, vorhanden. Deren Aufgabe besteht in der Phagozytose von Abbauprodukten und sie übernehmen immunologische Funktionen. Eine weitere Zellgruppe, die in der Dermis vorzufinden ist, sind die Mastzellen, welche an allergischen und entzündlichen Prozessen beteiligt sind. Außerdem finden sich wenige Melanozyten, Langerhans-Zellen und Lymphozyten in der Dermis.

Das Stratum reticulare hingegen ist eine dicke Bindegewebsschicht, welche mehr Kollagenfasern und bandartig angeordnete, elastische Fasern enthält. Dafür ist sie weniger zellreich. Die Kollagenfasern formen ein Netzwerk und sind damit für die mechanische Stabilität, Widerstandsfähigkeit und gleichzeitig Dehnbarkeit der Haut verantwortlich. Insgesamt gibt es etwa 20 verschiedene Kollagenarten in unterschiedlichen Bindegewebsformen, wobei hier das Kollagen Typ I am häufigsten vorkommt. Wie oben

schon erwähnt liegen alle Bestandteile, Fasern und Zellen der Dermis in der extrazellulären Matrix integriert vor, welche von den Fibroblasten und Keratinozyten gebildet wird. Zusätzlich haben im unteren Anteil der Dermis Haarfollikel und Schweißdrüsen ihren Ursprung, welche bis in die darunter liegende Subkutis reichen. (Moll et al., 2010) (Benninghoff et al., 2011) (Welsch and Deller, 2010)

1.1.3 Subkutis

Die Subkutis ist unterhalb der Kutis gelegen. Ihr Hauptbestandteil ist Fettgewebe, welches durch bindegewebige Septen gegliedert ist und für die Verschiebbarkeit gegenüber den darunterliegenden Strukturen sorgt. Sie ist, abhängig vom Geschlecht, unterschiedlich stark ausgeprägt und enthält außerdem in der Haut verlaufende Nerven und Gefäße. Zu ihren Aufgaben zählt unter anderem die Druckpolsterung, zum Beispiel an der Fußsohle, und der Isolation des Körpers, zum Beispiel durch Depotfett. (Welsch and Deller, 2010) (Benninghoff et al., 2011)

1.2 Phasen der menschlichen Wundheilung

Die Wundheilung des Menschen ist ein komplexer und interaktiver Vorgang, welcher aus einer Vielzahl von Reaktionen und Interaktionen zwischen Zellen und Mediatoren besteht. Traditionell lässt sich dies in die 3 Phasen der Wundheilung einteilen (siehe Abb. 2). Diese lassen sich nicht immer eindeutig voneinander trennen und können sich überschneiden (Broughton et al., 2006a) (Mutschler, 2012) (Singer and Clark, 1999). Eine Wunde ist definiert als eine begrenzte Durchtrennung von unterschiedlichen Geweben, wie Haut, Schleimhaut oder Organen. Dabei sind einfache Wunden auf die Oberfläche begrenzt, wohingegen komplizierte Wunden bis in tiefere Gewebeschichten reichen (Mutschler, 2012). Unmittelbar nach einer Verletzung startet der Heilungsprozess mit der Wiederherstellung des verletzten Gewebes (Darby et al., 2014). Dabei werden verschiedene intra- und interzelluläre Signalwege aktiviert und koordiniert, um die Integrität und Homöostase wiederherzustellen (Gurtner et al., 2008).

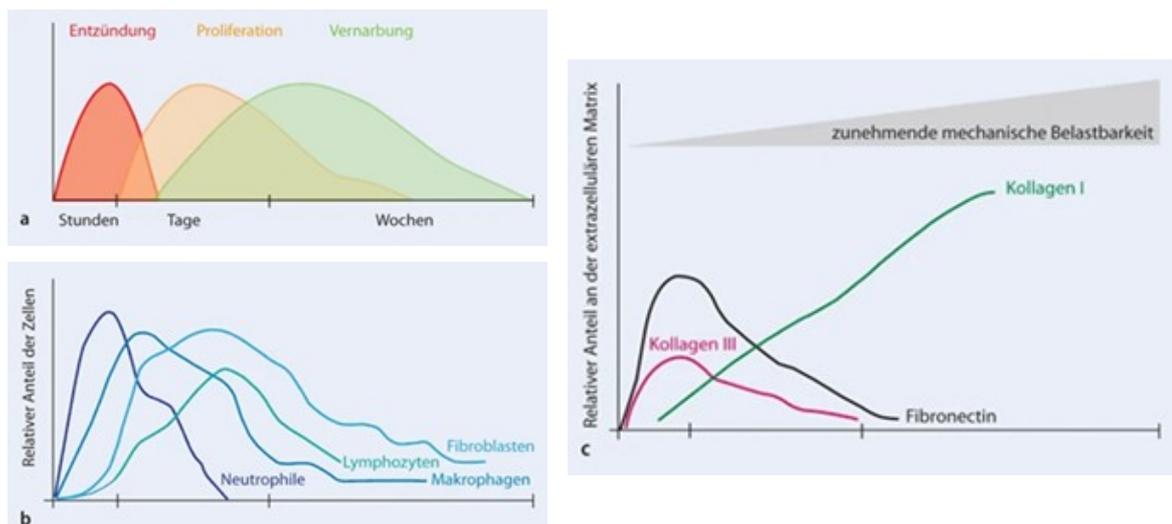


Abb. 2: a: Wundheilungsphasen; b: phasenweise vorherrschende Zelltypen; c: Matrixbestandteile der Wund entsprechend der Phasen. Quelle: (Mutschler, 2012)

Der Heilungsprozess beginnt mit der inflammatorischen Phase, welche unmittelbar nach der Verletzung beginnt und bis zu vier bis sechs Tage andauern kann. Hier wird zunächst die Hämostase eingeleitet (Broughton et al., 2006a), indem es zu einer etwa zehn Minuten

anhaltenden Vasokonstriktion des verletzten Gefäßes kommt. Dies reduziert den Blutfluss, führt allerdings auch zu einer lokalen Minderperfusion, einhergehend mit einem Mangel an Sauerstoff und pH-Wert Veränderungen (Reinke and Sorg, 2012). Zusätzlich wird durch freiliegendes subendotheliales Kollagen und den Gewebefaktor die Thrombozytenaggregation initiiert (Wang et al., 2018) und die Gerinnungskaskade aktiviert. Es entsteht ein Gerinnsel bestehend aus Kollagen, Thrombozyten, Thrombin und Fibronectin (Broughton et al., 2006a), welches durch Bildung einer provisorischen Matrix die Wunde vorübergehend verschließt (Darby et al., 2014). Die strukturellen Moleküle der provisorischen Matrix wie Fibrin und Fibronectin, tragen zur Bildung des Granulationsgewebes bei (Singer and Clark, 1999), indem sie ein Gerüst für einwandernde Zellen wie Neutrophile, Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen bilden (Darby et al., 2014). Die einwandernden Zellen, vor allem Thrombozyten und Leukozyten setzen eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren frei, um die Inflammation zu initiieren. Die frühe Phase der Inflammation beginnt mit dem Erscheinen der Neutrophilen, die späte Phase mit dem Auftreten und der Transformation von Monozyten (Reinke and Sorg, 2012).

Thrombozyten ermöglichen die Hämostase durch Bildung eines Thrombus. Zudem sezernieren sie Mediatoren wie zum Beispiel PDGF, wodurch Makrophagen und Fibroblasten aktiviert werden (Singer and Clark, 1999). Beim Zerfall der Thrombozyten setzen sie weitere Zytokine, Wachstumsfaktoren und Matrixproteine aus den α -Granula frei, worunter beispielsweise Hämostasefaktoren, Adhäsionsproteine, Proteoglykane und Proteaseinhibitoren sind (Mutschler, 2012).

Die Neutrophilen werden durch chemotaktische Substanzen wie Prostaglandine, Leukotriene, Histamin und Wachstumsfaktoren angelockt und sind die dominierenden Zellen in den ersten 24-48 Stunden nach dem Trauma. Sie sezernieren proteolytische Enzyme zur Phagozytose von Bakterien und avitalem Gewebe sowie Zelldetritus (Mutschler, 2012). Zudem können sie freie Sauerstoffradikale bilden, um Bakterien abzutöten und den Wundbereich zu reinigen. Eine weitere Aufgabe der Neutrophilen ist die Synthese von Prostaglandinen (Broughton et al., 2006a), wodurch es im Verlauf zu einer Vasodilatation kommt. Damit ist eine bessere Versorgung mit den notwendigen Zellen und Nährstoffen möglich (Broughton et al., 2006b). Im Anschluss werden sie mit der Kruste abgestoßen oder durch Makrophagen phagozytiert (Singer and Clark, 1999).

Die Monozyten werden unter anderem durch Fragmente der extrazellulären Matrix und TGF- β angelockt und infiltrieren die Wunde etwa nach 48-96 Stunden. Sie wandeln sich zu aktivierten Makrophagen (Broughton et al., 2006b), welche Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF- β 1, TNF- α , EGF, IGF und VEGF sezernieren (Mutschler, 2012; Singer and Clark, 1999) und damit die Entstehung des Granulationsgewebes fördern. Dadurch stimulieren sie die Fibroblasten zur Proliferation und vermitteln die Angiogenese (Singer and Clark, 1999). Außerdem phagozytieren sie Pathogene und Gewebereste und setzen Chemo- und Zytokine frei. Damit halten sie den Heilungsprozess aufrecht, indem sie den Übergang zur nächsten Phase der Wundheilung initiieren (Mutschler, 2012; Reinke and Sorg, 2012).

In der Proliferationsphase, etwa vom vierten bis zum 14. Tag nach Trauma, findet die Epithelialisierung und die Angiogenese statt (Broughton et al., 2006a). Ebenso wird ab dem vierten Tag das Granulationsgewebe (Singer and Clark, 1999), welches aus extrazellulärer Matrix inklusive Proteoglykanen, Hyaluronsäure, Kollagen und Elastin besteht, gebildet (Wang et al., 2018). Dieses ersetzt als Übergangsgewebe die bisher gebildete provisorische

Matrix und ist charakterisiert durch eine hohe Dichte an Fibroblasten, Granulozyten, Makrophagen, Kapillargefäßen und locker organisierten Kollagenbündeln.

Die vorherrschenden Zelltypen sind Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen (Mutschler, 2012). Die Fibroblasten produzieren reichlich Kollagen, bilden eine neue extrazelluläre Matrix und sind für deren Umbau verantwortlich (Mutschler, 2012; Singer and Clark, 1999). Diese besteht aus Proteoglykanen, Fibronectin und Kollagen Typ III. Von Thrombozyten und Makrophagen sezernierte Substanzen, halten die Fibroblasten in der Wunde und aktivieren diese. Dabei gelten PDGF und EGF als die potentesten Wachstumsfaktoren für die Proliferation der Fibroblasten (Broughton et al., 2006a; Mutschler, 2012). Durch das ebenfalls von Makrophagen sezernierte TGF- β 1 werden die Fibroblasten aktiviert, differenzieren zu Myofibroblasten und exprimieren als Zeichen dessen α -SMA (Broughton et al., 2006b; Pakshir et al., 2020; Vaughan et al., 2000). Die Myofibroblasten weisen durch die Ausbildung von Mikrofilamenten und Stressfasern kontraktile Eigenschaften auf, mit welchen sie zur Wundkontraktion und zur Reifung des Granulationsgewebes beitragen (Darby et al., 2014). Es entsteht eine protektive Barriere gegen Flüssigkeitsverlust sowie zum Schutz vor eindringenden Bakterien (Broughton et al., 2006a). Gegen Ende dieser Phase reduziert sich die Zahl der Fibroblasten, zum einen durch die Differenzierung zu Myofibroblasten zum anderen durch den nachfolgenden Zelltod (Reinke and Sorg, 2012).

Bei diesen Abläufen spielt der komplexe Vorgang der Angiogenese eine wichtige Rolle, da hierdurch das Gewebe mit Nährstoffen, Immunzellen und Sauerstoff versorgt wird und die Fibroblasten proliferieren können (Darby et al., 2014; DiPietro, 2016). Dabei werden die Endothelzellen der intakten Venolen durch VEGF und anderen Wachstumsfaktoren wie TGF- β , FGF und PDGF, als auch durch eine verminderte Sauerstoffkonzentration im Wundbereich zur Bildung neuer Kapillaren angeregt (Broughton et al., 2006a; Mutschler, 2012). VEGF-A gilt dabei als potentester pro-angiogenetischer Faktor der Wundheilung, erhöht aber auch die vaskuläre Durchlässigkeit und trägt damit zur Entstehung eines Wundödems bei (DiPietro, 2016). Die ebenfalls ablaufende Epithelialisierung wird durch inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α angestoßen. Dadurch wird der *Keratinozyten growth factor* (KGF) in den Fibroblasten hochreguliert, welche daraufhin KGF-1, KGF-2 und IL-6 synthetisieren. Dies veranlasst die Keratinozyten in den Wundbereich zu migrieren, zu proliferieren und sich in der Epidermis zu differenzieren (Abschnitt 1.1.1) (Broughton et al., 2006a).

In der dritten Phase, der regenerativen Phase der Wundheilung, stehen Umbau- und Reifungsprozesse im Vordergrund, welche ab dem achten Tag bis zu einem Jahr nach Verletzung andauern können (Broughton et al., 2006a). Dies wird auch als die wahrscheinlich wichtigste Phase der Wundheilung betrachtet, da es bei Störungen einerseits zu einer reduzierten Festigkeit des Narbengewebes, andererseits aber auch zu der Entstehung hypertropher Narben oder Keloiden durch vermehrte Kollagensynthese kommen kann. In der Regenerationsphase findet eine schrittweise Umstrukturierung des Granulationsgewebes statt (Broughton et al., 2006b) wodurch die mechanische Belastbarkeit des Narbengewebes wiederhergestellt wird (Mutschler, 2012). Die Myofibroblasten sind an der Reorganisation der Wunde sowie der Wundkontraktion maßgeblich beteiligt. Ihre Differenzierung wird neben TGF- β 1 auch durch mechanischen Stress reguliert (Tomasek et al., 2002). Mit Abnahme der mechanischen Spannung, also mit zunehmendem Verschluss der Wunde, begeben sich die Zellen in Apoptose und die Kollagensynthese fährt herunter (Broughton et al., 2006a; Tomasek et al., 2002).

Ist von den Fibroblasten reichlich Matrix gebildet worden, beenden diese ihre Produktion und das fibroblastenreiche Granulationsgewebe wird durch zellooses Narbengewebe ersetzt. Der Abbau des Kollagens wird durch proteolytische Enzyme reguliert, die sogenannten *Matrix Metalloproteasen* (MMPs) (Singer and Clark, 1999) und ihren Inhibitoren, den *tissue inhibitor of metalloproteases* (TIMPs) (McAnulty, 2007). Dabei werden die MMPs von epidermalen und endothelialen Zellen, Makrophagen und Fibroblasten sezerniert (Singer and Clark, 1999). Das zuvor im Granulationsgewebe synthetisierte Kollagen Typ III wird durch das stärkere Kollagen Typ I ersetzt, welches sich in kleinen, parallelen Bündeln orientiert (Darby et al., 2014; Reinke and Sorg, 2012), sodass sich in der reifen Narbe schließlich nur noch etwa 10 % Kollagen Typ III befindet (Broughton et al., 2006a). Dieser Umbau von Typ III zum prädominanten Typ I Kollagen dauert etwa sechs bis zwölf Monate. Dadurch gewinnt das Gewebe mit der Zeit an Kraft, es erreicht aber niemals die gleiche Stärke wie unverletztes Gewebe (Gurtner et al., 2008). Nach drei Wochen liegt die Reißfestigkeit der Wunde bei etwa 30 %, nach 3 Monaten bei 80 % der ursprünglichen Festigkeit (Mutschler, 2012).

Die Eigenschaften der Myo-/Fibroblasten und der Differenzierungsvorgang wird in Abschnitt 1.2.1 genauer beschrieben. Insgesamt gehen die meisten der Endothelzellen, Makrophagen und Myofibroblasten in dieser letzten Phase in Apoptose oder verlassen die Wunde (Gurtner et al., 2008). Hierdurch wird sowohl die Zellzahl als auch die Kapillardichte und der Proteoglykangehalt der extrazellulären Matrix deutlich verringert (Mutschler, 2012). Ebenso vermindern sich der Blutfluss und die metabolische Aktivität. Außerdem gibt es einige Hautbestandteile, welche sich nicht vollständig erholen, wie Haarfollikel oder Schweißdrüsen (Reinke and Sorg, 2012). Diverse Faktoren haben einen Einfluss auf die Wundheilung und können diese sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Dazu zählen zum Beispiel Ischämie, Infektionen, Druck oder Ödeme (Broughton et al., 2006b).

1.2.1 Fibroblasten und Myofibroblasten

Fibroblasten sind in der Dermis gelegene (Welsch and Deller, 2010), mesenchymale, metabolisch aktive Zellen, die in einer Vielzahl der Gewebe des Körpers zu finden sind. Sie übernehmen eine wichtige Rolle im Aufbau der extrazellulären Matrix, in der Regulierung des intrazellulären Flüssigkeitshaushalts und osmotischen Drucks sowie in der Wundheilung. Charakteristisch ist die Expression von Vimentin. Sie besitzen sowohl ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum (ER) als auch einen Golgi-Apparat. Dadurch synthetisieren sie extrazelluläre Matrixmoleküle, wie Kollagen, Proteoglykane, Laminin und Fibronectin (McAnulty, 2007).

Durch eine Verletzung werden Fibroblasten aktiviert und produzieren extrazelluläre Matrix, um einen Wundverschluss zu initiieren (Li and Wang, 2011). Dies findet in der proliferativen Phase der Wundheilung statt, in der die Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren und das Granulationsgewebe bilden. Die Myofibroblasten besitzen stärkere kontraktile Kräfte und fördern damit den Wundverschluss (Serini and Gabbiani, 1999). Außerdem synthetisieren sie extrazelluläre Matrixbestandteile, welche die provisorische Matrix ersetzen (Sarrazy et al., 2011).

Myofibroblasten sind zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen einzuordnen, da sie ähnliche kontraktile Eigenschaften wie letztere zeigen (Gabbiani et al., 1972). Allerdings weisen sie nicht die typischen Marker glatter Muskelzellen auf, wie Smoothelin (Tomasek et al., 2002), Desmin oder Myosin (McAnulty, 2007). Im Gegensatz zu Fibroblasten exprimieren sie jedoch α -SMA, was der verlässlichste Marker für die Differenzierung zu

Myofibroblasten ist und deren Phänotyp definiert (Darby et al., 2014). Sie sind charakterisiert durch einen vergrößerten Golgi-Apparat und untereinander durch Gap junctions verbunden. Außerdem zeichnen sie sich durch *microfilament bundles* (Carthy, 2018) und *stress fibers* aus (Li and Wang, 2011). Ihre kontraktile Kräfte entwickeln sie durch große fokale Adhäsionskomplexe, die als *Fibronexus* oder *supermature focal adhesions* bezeichnet werden. Damit sorgen sie für den Umbau und die Festigung des Narbengewebes. Um eine kontinuierliche und langanhaltende Kontraktion zu erzeugen, wird diese durch den *Rho-ROCK-myosin light chain phosphatase pathway* aktiviert (Carthy, 2018). Ihre Funktion liegt außerdem in der Synthese von extrazellulärer Matrix, Kollagen Typ I – VI und XVIII, von Glycoproteinen und Proteoglykanen. Damit sind sie insgesamt für Wachstum, Differenzierung und Wundheilung verantwortlich und sind, ähnlich wie Fibroblasten, nahezu überall in der Haut und den Organen zu finden (Li and Wang, 2011). Zudem sind sie prädominanter Zelltyp im Granulationsgewebe (Tomasek et al., 2002) als auch in fibrotischen Läsionen. Außerdem sind sie assoziiert mit pathologischen Kontraktionen wie dem Morbus Dupuytren und hypertrophen Narben (Chambers et al., 2003).

In diesem Zusammenhang haben Tomasek et al. ein Modell für die Differenzierung entwickelt (siehe Abb. 3). Demnach haben Fibroblasten selbst keine kontraktile Kräfte und initiieren lediglich den Start der Wundheilung. Erst durch die Differenzierung zu Myofibroblasten findet eine für den Wundverschluss ausreichende Kontraktion statt. Zunächst üben Fibroblasten also lineare Zugkräfte aus und erzeugen mechanischen Stress, welcher über einen längeren Zeitraum konstant gehalten wird. Dadurch wird die Differenzierung zu Proto-Myofibroblasten angeregt, welche zytoplasmatische, aktinhaltige Stressfasern ausbilden. Diese wiederum enden in Fibronexus-Adhäsions-Komplexen und können so kontraktile Kräfte ausüben (Tomasek et al., 2002). Bereits die Proto-Myofibroblasten exprimieren α -SMA (McAnulty, 2007). Um die Differenzierung aufrecht zu erhalten muss eine konstante Interaktion und damit Spannung gegeben sein. Schließlich differenzieren sie, durch Stimulation mit TGF- β 1, zu Myofibroblasten. Dies führt zu einer höheren Expression von α -SMA und damit einhergehend einer vermehrten Ausbildung von Stressfasern und stärkeren Adhäsionen. Hier entsteht ein positiver Feedbackmechanismus: Je mehr Spannung vorhanden ist, desto mehr TGF- β 1 und damit auch α -SMA werden exprimiert. Aufgrund dessen entstehen vermehrt kontraktile Kräfte und die Formation von Fibronexus-Adhäsions-Komplexen wird gefördert (Tomasek et al., 2002). Im Anschluss können Myofibroblasten nur durch Apoptose entfernt werden, was einen kritischen Schritt bei der Wiederherstellung der normalen Homöostase des Gewebes darstellt.

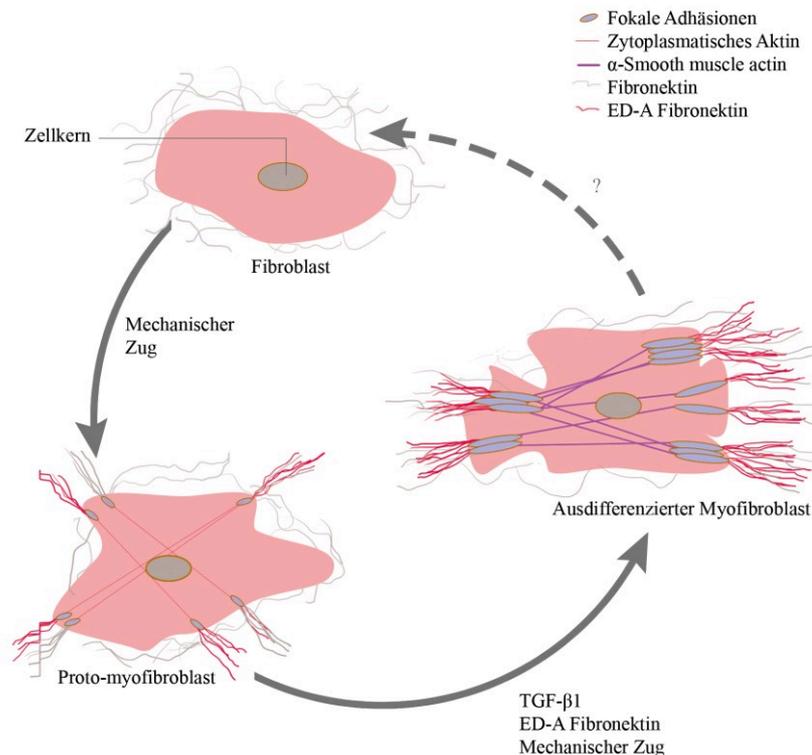


Abb. 3: Modell der Myofibroblasten Differenzierung. Quelle: (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017)

Eine anhaltende Aktivierung der Myofibroblasten über den Wundverschluss hinaus kann zu kontinuierlichen Veränderungen der extrazellulären Matrix führen und ist mit der Entstehung von Fibrose assoziiert. Diese kann alle Gewebe und Organe des Körpers betreffen, meist in Form einer chronischen Entzündung (Carthy, 2018; Tomasek et al., 2002). Ebenso könnte die Überaktivität eine Kollagenvermehrung begünstigen und damit auch die Entstehung fibrotischer und sklerotischer Erkrankungen fördern (Welsch and Deller, 2010). Werden außerdem zu starke kontraktile Kräfte ausgeübt, kann dies zu Fehlfunktionen und überschießender Narbenbildung sowie zu Kontrakturen führen (Darby et al., 2014; Li and Wang, 2011).

1.2.2 TGF- β 1 Signalweg

Wie bereits in den vorangehenden Kapiteln erwähnt, spielt TGF- β 1 eine entscheidende Rolle in der Aktivierung von Myofibroblasten mit einhergehender Expression von α -SMA (Pakshir et al., 2020). Außerdem gilt es als pro-fibrotischer Marker, da eine Überexpression von TGF- β 1 in fibrotischen Geweben gefunden wurde (Wang et al., 2018). Durch die vermehrte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten unterstützt TGF- β die Produktion und die Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen (Blobe et al., 2000; Chambers et al., 2003). Dieser Signalweg wird im Folgenden genauer beleuchtet.

Die TGF- β Familie besteht aus drei Isoformen, TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3, welche sich strukturell und funktionell ähnlich sind (Border and Ruoslahti, 1992). Diese gehören zu einer Superfamilie mit über 30 Mitgliedern verschiedener Zytokine, wie *Activin* und *bone morphogenetic proteins* (BMP) (Blobe et al., 2000; Border and Ruoslahti, 1992;Carthy, 2018), welche vielfältige Wachstums- und Differenzierungssignale übermitteln (Wrana, 1994). Die TGF- β Isoformen weisen jeweils eine unterschiedliche Bindungsaffinität für den TGF- β Rezeptor auf. Diese werden im Rahmen eines großen Vorläufermoleküls

synthetisiert und enthalten eine Propeptid-Region. Nach der Spaltung vom Vorläufermolekül bleibt TGF- β über nicht-kovalente Bindungen am Propeptid befestigt und bildet zusammen mit dem *TGF- β binding protein* einen Komplex, welcher in der extrazellulären Matrix gelagert wird. Durch die zusätzliche Verknüpfung mit dem Binding-Protein über Disulfidbrücken, wird eine Bindung an den TGF- β Rezeptor verhindert. Das multifunktionale Matrix-Glykoprotein Thrombospondin-1 setzt TGF- β schließlich durch eine Änderung der Konformation des *TGF- β binding Proteins* oder durch eine plasmin-gesteuerte Abspaltung vom Komplex frei (Blobe et al., 2000).

Insgesamt gibt es drei hochaffine Zelloberflächen-Rezeptoren Typ I, II und III, welche durch Bindung zelluläre Prozesse regulieren. Dabei hat Rezeptor Typ III selbst keine signalübertragende Wirkung. Bei der Bindung von TGF- β wird daher das Signal dem Typ II Rezeptor präsentiert und dadurch weitergegeben (Blobe et al., 2000). Es sind fünf verschiedene Typ II Rezeptoren und sieben verschiedene Typ I Rezeptoren bekannt, wodurch diverse Möglichkeiten zur Regulierung des Signalwegs bestehen (David and Massagué, 2018). Diese Rezeptoren zählen zu den Serin-Threonin Kinase Rezeptoren, welche eine transmembrane Komponente aufweisen (Attisano and Wrana, 2002).

Bei der Bindung von TGF- β 1 an die Zelloberflächenrezeptoren bildet sich ein Rezeptorkomplex, bestehend aus zwei Typ I und zwei Typ II Rezeptoren (Chambers et al., 2003). Nach der Komplexbildung aktiviert der nun konstitutiv aktive Typ II Rezeptor die Typ I Rezeptor-Kinase durch Phosphorylierung der juxtamembranen Domäne (Chambers et al., 2003; Wrana et al., 1994). Da der TGF- β 1 Signalweg SMAD-abhängig ist, phosphoryliert der nun aktivierte Typ I Rezeptor daraufhin SMAD2 und SMAD3. Dieser aktivierte SMAD2-SMAD3 Komplex setzt sich anschließend mit SMAD4 zusammen und wird in den Nukleus verlagert (Pakshir et al., 2020). Dort können SMADs mit verschiedenen Bindungspartnern, sowie Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren interagieren und damit die Genexpression sowohl positiv als auch negativ beeinflussen (siehe Abb. 4) (Attisano and Wrana, 2002). Außerdem kann TGF- β 1 noch weitere Signalwege aktivieren, wie zum Beispiel den MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), PKA und PKC (*proteinkinase A and C*), PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) (Pakshir et al., 2020; Wang et al., 2018) als auch den Rho GTPase Signalweg (Carthy, 2018).

Die von TGF- β aktivierten SMADs übernehmen verschiedenste Aufgaben, wie die Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ESCs), Proliferation von Knorpelzell-Vorläufern, Wachstumsinhibition von Epithelzellvorläufern, Apoptose in prä-malignen Zellen sowie die Metastasierung von Karzinomzellen (David and Massagué, 2018). Sie können in drei Klassen eingeteilt werden. Die rezeptor-regulierten R-Smads, zu denen SMAD1, 2, 3, 5 und 8 zählen, welche direkt durch den Typ I Rezeptor phosphoryliert werden. Das Co-Smad, nur SMAD4, welches nach Phosphorylierung der R-Smads mit diesen einen heteromeren Komplex bilden. Die dritte Gruppe sind die inhibitorischen Smads, welche einen hemmenden Effekt auf den TGF- β Signalweg haben und zu denen SMAD6 und 7 gehören (Border and Ruoslahti, 1992).

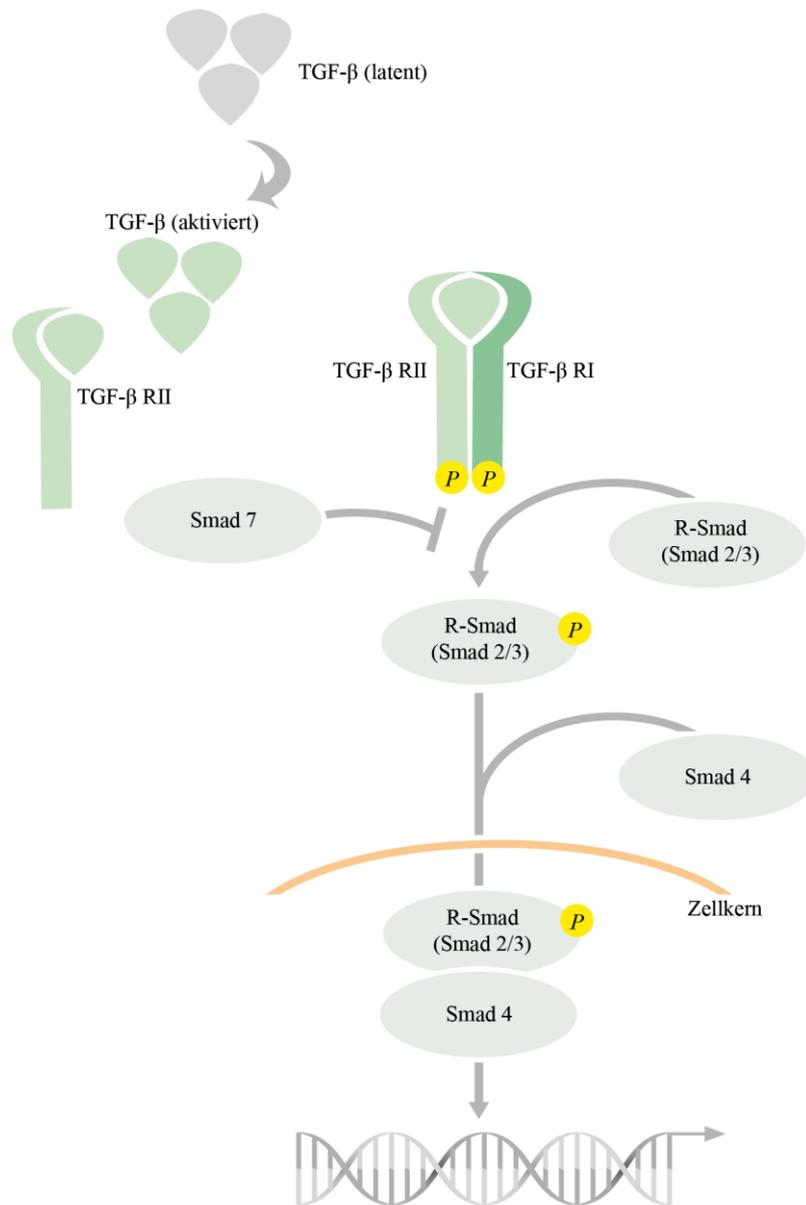


Abb. 4: Veranschaulichung des Smad-abhängigen TGF- β Signalwegs. Quelle: (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017)

Im Rahmen der Wundheilung übernimmt TGF- β diverse Aufgaben. Es dient als Chemotaxin für Monozyten und Leukozyten, es induziert die Angiogenese, kontrolliert die Produktion von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren und stimuliert die Synthese von Matrixkomponenten wie Fibronectin, Tenascin, Kollagen und Proteoglykanen (Border and Ruoslahti, 1992). Zu den zwei wichtigsten Funktionen von TGF- β im Rahmen einer Verletzung zählt sowohl die Autoinduktion der TGF- β Produktion, als auch die Möglichkeit der gesteigerten Ablagerung von extrazellulärer Matrix, was sich positiv auf die Wundheilung auswirken kann (Border and Ruoslahti, 1992).

Obwohl TGF- β essentiell für die Wundheilung ist, spielt dessen Überproduktion eine wichtige Rolle im Rahmen der pathologischen Krankheitsentstehung, zum Beispiel bei Lungen-, Leber- und Nierenfibrosen, Sklerodermie, Keloiden oder arterieller Intimaverdickung (Chambers et al., 2003). Ebenso kann es bei einer kardialen Fibrose nach Infarkt, fibrotischen Erkrankungen des Auges oder im Rahmen von postoperativen

intraabdominalen Adhäsionen eine Rolle spielen (Border and Ruoslahti, 1992). Daher gilt TGF- β 1 als zentraler Punkt in der Pathogenese hypertropher Narben und fibrotischer Erkrankungen (Chambers et al., 2003; Darby et al., 2014). Jeder Schritt im Signalweg kann bei krankhaften Prozessen verändert sein und bietet damit das Potenzial als therapeutisches Ziel genutzt zu werden (Blobe et al., 2000). Zum Beispiel konnte die Anwendung von Pirfenidone bei Lungenfibrose die TGF- β Expression reduzieren. Durch eine Inhibition des Transkriptionsfaktors SMAD3 konnte sowohl eine Reduktion der Fibroblasten Aktivierung als auch der Bildung der extrazellulären Matrix gezeigt werden. Ebenso zeigen HMG-CoA-Reduktase Hemmer (Statine) antifibrotische Effekte (Darby et al., 2014).

1.3 Fibrotische Erkrankungen

Wie zuletzt erwähnt, spielen Pathologien durch TGF- β und die dadurch ausgelöste Differenzierung zu Myofibroblasten eine wichtige Rolle bei der Entstehung von hypertrophen Narben, Leberfibrose/-zirrhose, renaler Fibrose, Lungenfibrose und möglicherweise auch in epithelialen Tumoren (Darby et al., 2014). Die genaue Ursache für fibrotische Erkrankungen ist unbekannt. Allgemein sind fibrotische Erkrankungen charakterisiert durch eine exzessive Narbenbildung, welche aufgrund von vermehrter Produktion, Ablagerung und Kontraktion der extrazellulären Matrix entsteht. Zudem sind reichlich Myofibroblasten in fibrotischen Läsionen zu finden, sodass diese zur exzessiven Narbenbildung beitragen. Der Entstehungsprozess dauert meist Monate bis Jahre und kann von Organdysfunktionen bis hin zum Tod führen. Beispiele für fibrotische Erkrankungen sind die diabetische Nephropathie, Leberzirrhose, idiopathische Lungenfibrose, rheumatoide Arthritis, Fibrosarkom, Arteriosklerose und Sklerodermie (systemische Sklerose) (Leask and Abraham, 2004) sowie Keloide, hypertrophe Narben und der Morbus Dupuytren (Chambers et al., 2003).

Morbus Dupuytren ist eine fibroproliferative Erkrankung der palmaren Faszie, welche sich durch pathologische Knoten- und Strangbildung der Palmaraponeurose auszeichnet (Khashan et al., 2011). Dabei sind Männer häufiger betroffen als Frauen und die Symptome beginnen normalerweise in der dritten bis vierten Lebensdekade (Rödel et al., 2017). Die Entstehung verläuft in drei Phasen, wobei Fibroblasten durch eine exzessive Kollagenproduktion für die Knotenbildung verantwortlich gemacht werden (Khashan et al., 2011). Ebenso sind Myofibroblasten und deren Persistenz ursächlich für die Ausbildung von Kontraktionen, welche die typischen Flexionskontrakturen an den Metacarpophalangeal- und proximalen Interphalangealgelenken bilden (Feldman et al., 2017). Trotz diverser nicht-operativer Möglichkeiten, ist die Therapie der Wahl im fortgeschrittenen Stadium weiterhin die operative Fasziotomie oder Fasziektomie in unterschiedlichster Ausführung (Khashan et al., 2011).

Wie auch in der Haut, verläuft der Heilungsprozess zur Wiederherstellung des Gewebes nach einer Verletzung innerer Organe ähnlich. Persistiert die Verletzung jedoch, kommt es auch hier zur exzessiven Ablagerung von extrazellulärer Matrix, was schließlich in einer Organfibrose endet. So führt zum Beispiel eine chronische Lebererkrankung zu einer ausgeprägten Fibrose, welche mit erhöhter Morbidität und Mortalität einhergeht. Außerdem kann hierdurch das Risiko für Krebs erhöht sein (Sarrazy et al., 2011). Durch die Tatsache, dass es meist noch keine effektive Therapie gibt, ist oft eine Organtransplantation der einzige Ausweg (Leask and Abraham, 2004).

Wie schon in Abschnitt 1.2.1 das Modell zur Differenzierung, liefert Tomasek et al. außerdem eine Erklärung für die anhaltende Kontraktion und Entstehung von Kontrakturen bei fibrotischen Erkrankungen. Grundlage dafür ist, dass im Granulationsgewebe das Kollagen Typ I zum Großteil durch Kollagen Typ III ersetzt ist. Myofibroblasten sind in dieses Kollagenetz eingebettet und binden über Fibronexus-Adhäsionskomplexe an Kollagenfibrillen, welche wiederum mit den intrazellulären Stressfasern (*stress fibers*) verbunden sind. Dadurch können die Myofibroblasten eine Kontraktion und Verkürzung der Matrix auslösen und das umliegende Kollagenetzwerk bündeln. Anschließend werden neue Matrixkomponenten gebildet, um das entstandene Kollagenetzwerk zu festigen und die Kollagendichte und -ausrichtung nimmt zu. Dieser Vorgang wiederholt sich im Rahmen des Umbaus der Kollagenmatrix mehrfach, sodass die Matrix im kontrahierten Zustand gehalten wird und keine mechanischen Kräfte mehr auf die Myofibroblasten wirken. Bei einer normalen Wundheilung gehen die Myofibroblasten im Anschluss in Apoptose. Ist dies nicht der Fall (im Rahmen von fibrotischen Erkrankungen/hypertrophen Narben), führt dies zu einer kontinuierlichen Veränderung der extrazellulären Membran und zur Entstehung von Kontrakturen (Tomasek et al., 2002).

Im Folgenden wird auf die Eigenschaften und Therapiemöglichkeiten hypertropher Narben und Keloide, als fibrotische Erkrankungen von Interesse, genauer eingegangen.

1.4 Hypertrophe Narben & Keloide: Pathogenese und Therapie

Kommt es während der Phasen der Wundheilung, wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, zu einer Störung der physiologischen Reaktion, führt dies zur Bildung einer unerwünschten Narbe, einer hypertrophen Narbe oder eines Keloids, welche durch ein dysreguliertes Wachstum und übermäßige Kollagenbildung charakterisiert ist (Berman et al., 2017). Dies kann nach jeder Verletzung der tiefen Schichten der Dermis, wie beispielsweise nach Verbrennungen, Riss-/Platzwunden, Operationen, Piercings und Impfungen, auftreten (Gauglitz et al., 2011). Die Symptome können Schmerzen, Juckreiz und Kontrakturen sein, wodurch die Lebensqualität der Patienten sowohl physisch als auch psychisch beeinträchtigt wird (Gauglitz et al., 2011; Lee and Jang, 2018). Da hypertrophe Narben und Keloide vorrangig im Kopf- und Halsbereich vorkommen stehen für die Patienten vor allem auch kosmetische und funktionale Probleme im Vordergrund (Berman et al., 2017; Wolfram et al., 2009). Beide Geschlechter sind etwa gleichhäufig betroffen, wobei die höchste Inzidenz in der zweiten bis dritten Lebensdekade liegt (Gauglitz et al., 2011; Ghazawi et al., 2018).

Die genaue Pathophysiologie der Erkrankungen ist unbekannt (Aarabi et al., 2007). Es werden verschiedene ursächliche Prozesse diskutiert. Unter anderem scheint eine Überproduktion von Proteinen wie TGF- β und PDGF zu anhaltenden Signalen für die Wundheilung oder einem Fehler bei der adäquaten Herunterregulierung der Zellen und ihrer Signale zu führen (Slemp and Kirschner, 2006; Wolfram et al., 2009). So konnte zum Beispiel eine vermehrte Expression von TGF- β und seiner Rezeptoren in Fibroblasten aus hypertrophen Narben und Keloiden nachgewiesen werden (Berman et al., 2017; Gauglitz et al., 2011). Des Weiteren scheint eine erhöhte mechanische Ladung in der frühen proliferativen Phase eine Inhibition der zellulären Apoptose über einen Akt-abhängigen Mechanismus auszulösen. Die damit einhergehende erhöhte Zellularität mit vermehrter Kollagenablagerung begünstigt die Entstehung hypertropher Narben (Aarabi et al., 2007; Sarrazy et al., 2011). Diverse Zytokine, wie IL-1 β , TNF- α , VEGF, CTGF, PDGF und vor allem TGF- β und seine Isoformen, sind fehlreguliert in hypertrophen Narben und Keloiden

(Ghazawi et al., 2018). Die verlängerte Entzündungsreaktion, die Überexpression von Wachstumsfaktoren und damit auch verstärkte Aktivierung von Fibroblasten stellen vermutlich das passende Milieu für eine abnormale Kollagenproduktion dar (Berman et al., 2017; Lee and Jang, 2018). Außerdem sind erhöhte Level von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und erniedrigte Level des Transkriptionsfaktors *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) vor allem in Keloiden aber auch in hypertrophen Narben nachweisbar (Ghazawi et al., 2018).

Zwischen hypertrophen Narben und Keloiden bestehen Ähnlichkeiten, aber auch klinische, histologische und epidemiologische Unterschiede, welche auch im Rahmen der Behandlung zu berücksichtigen sind (Gauglitz et al., 2011). Beide sind histologisch charakterisiert durch eine dicke, stark vaskularisierte Dermis, welche reichlich Entzündungszellen und Kollagen enthält, sowie eine meist unbeeinträchtigte Epidermis (Ghazawi et al., 2018). Hypertrophe Narben sind typischerweise erhaben, rötlich gefärbt, hart und können gelegentlich symptomatisch werden (Berman et al., 2017; Wolfram et al., 2009). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie den Rand der ursprünglichen Wunde nicht überschreiten (Slemp and Kirschner, 2006). Innerhalb von vier bis acht Wochen nach einer Verletzung treten sie auf und können sich, nach einer zunächst schnellen Wachstumsphase, schrittweise zurückbilden. Hypertrophe Narben treten vor allem an Stellen mit hoher Spannung auf, vorwiegend an der Schulter, dem Nacken, dem Brustbein, dem Knie und am Knöchel (Berman et al., 2017; Gauglitz et al., 2011), da die Haut dort durch dauerhafte Bewegung beansprucht wird (Wolfram et al., 2009). Histologisch enthalten sie knotige Strukturen, welche Zellen, Kollagen und α -SMA positive Myofibroblasten enthalten (Broughton et al., 2006b; Ghazawi et al., 2018). Die Kollagenbündel bestehen primär aus Typ III Kollagen, dessen Fasern wellenartig und vorwiegend parallel zur Epitheloberfläche angeordnet sind (Wolfram et al., 2009).

Keloide hingegen wachsen über die eigentliche Narbengrenze hinaus, infiltrieren das umliegende, gesunde Gewebe und bilden sich meist nicht von selbst zurück (Slemp and Kirschner, 2006; Wang et al., 2018; Wolfram et al., 2009). Sie gehören zu den benignen hyperproliferativen Erkrankungen (Rödel et al., 2017) und können sich bis zu einigen Jahren nach einer Verletzung oder spontan entwickeln. Typischerweise treten sie an der vorderen Brust, den Schultern, den Ohrläppchen, den Oberarmen und den Wangen auf. Zudem können sie in allen Bevölkerungsrasen und Nationalitäten vorkommen, wobei die dunkelhäutige Bevölkerung häufiger, Albinos hingegen gar nicht betroffen sind (Gauglitz et al., 2011). Ebenso scheinen genetische Faktoren für die Entstehung von Keloiden eine Rolle zu spielen, unter anderem eine autosomal dominante Vererbbarkeit oder die *human leucozyte antigen* (HLA) Subtypen (Ghazawi et al., 2018; Ledon et al., 2013). Histologisch enthalten sie α -SMA negative Zellen und Fibronektin (Ghazawi et al., 2018). Es lassen sich dicke, unorganisierte Kollagenfasern/-bündel erkennen (Wang et al., 2018), bestehend aus einer erhöhten Rate von Kollagen Typ I zu Typ III Fasern (Berman et al., 2017; Ghazawi et al., 2018), welche in zufälliger Orientierung zur Oberfläche liegen (Berman et al., 2017; Slemp and Kirschner, 2006). Die Kollagensynthese in Keloiden ist zwanzigmal so hoch wie in normaler Haut und etwa dreimal höher als in hypertrophen Narben (Berman et al., 2017; Wolfram et al., 2009). Außerdem weisen sie eine erhöhte Anzahl an Wachstumsfaktor-Rezeptoren, welche gleichzeitig sensitiver für TGF- β und PDGF sind, und eine Überexpression von TGF- β 1 und 2 auf (Berman et al., 2017; Slemp and Kirschner, 2006). Durch eine Resistenz gegenüber Apoptose, haben Keloide eine verlängerte Proliferationsphase und produzieren dauerhaft vermehrt Kollagen (Ghazawi et al., 2018).

Unabhängig davon, dass der Prävention eine besondere Rolle zur Vorbeugung von hypertrophen Narben und Keloiden zukommt, gibt es bereits diverse Therapiemöglichkeiten, wobei keine bisher eine optimale Behandlung bietet (Wolfram et al., 2009). Diese lassen sich grob in konservative Behandlungen, intraläsionale Injektionstherapien, Laserbehandlungen und chirurgische Interventionen unterscheiden. Im Rahmen der konservativen Behandlung kommen Maßnahmen wie die Kryotherapie, die Narbenmassage und die Anwendung von topischen Silikonen in verschiedensten Ausführungen zum Einsatz (Branski et al., 2012). Letztere existieren seit den 1980er Jahren und sollten nach Abschluss der Reepithelialisierung für mindestens zwei Monate und zwölf Stunden täglich angewandt werden, um eine hypertrophe Narbenbildung zu verhindern (Gauglitz et al., 2011; Wolfram et al., 2009). Dazu trägt eine verbesserte Feuchtigkeitsversorgung und lokale Erhöhung der Sauerstoffkonzentration bei (Branski et al., 2012). Die Kompressions- beziehungsweise Drucktherapie ist bereits seit den 1970er Jahren bekannt. Möglicherweise wird hierbei durch eine Reduktion des Blut-, Sauerstoff- und Nährstoffangebots die Kollagensynthese vermindert und die Apoptoserate erhöht (Gauglitz et al., 2011). Sie sollte ebenfalls unmittelbar nach der Reepithelialisierung begonnen (Wolfram et al., 2009) und für sechs Monate über 8-24 Stunden täglich mit einem gleichmäßigen Druck von 24-30 mmHg angewendet werden. Die Radiotherapie als konservative Therapie wird häufig in Kombination mit chirurgischen Verfahren zur Behandlung eingesetzt (Broughton et al., 2006b). Dabei kommt die externe Strahlentherapie oder die *low-/high dose* Brachytherapie (LDR, HDR) zum Einsatz (Berman et al., 2017). Dadurch wird direkt die Fibroblasten Proliferation durch die Induktion von Apoptose beeinflusst. Aufgrund des Risikos für eine bestrahlungsinduzierte maligne Entartung (Broughton et al., 2006b), sollte die Intensität und Frequenz der Bestrahlung an die Lokalisation des betroffenen Bereichs angepasst werden, vor allem im Brust- und Schilddrüsenbereich (Branski et al., 2012). In großen Studien zur Behandlung von Keloiden konnte bisher keine bestrahlungsinduzierte Malignität beobachtet werden (Berman et al., 2017).

Zeigt die konservative Therapie keine Wirkung, ist die intraläsionale Injektion von Glukokortikoiden eine der Hauptbehandlungsmethoden für hypertrophe Narben und Keloide. Diese kann alleine oder in Kombination mit anderen Therapien, wie der Kryotherapie oder der chirurgischen Therapie, angewandt werden und ist seit Mitte der 1960er Jahre bekannt (Branski et al., 2012; Gauglitz et al., 2011). Hierbei wird meist Triamcinolonacetonid (TAC) in einer Konzentration von 5-10 (teilweise auch 10-40) mg/ml in die obere Dermis der sich entwickelnden Narbe injiziert in einem Intervall von drei bis sechs Wochen. Dies wirkt antiinflammatorisch, hemmt die Proliferation der Fibroblasten sowie die Kollagen- und Glykosaminoglykansynthese (Berman et al., 2017; Wolfram et al., 2009). Vor allem das TAC hemmt die Expression von TGF- β 1 und vermittelt die Apoptose in Fibroblasten (Ledon et al., 2013). Außerdem können andere, meist „off-label“ Medikamente injiziert werden, wie Bleomycin oder 5-Fluorouracil (5-FU), deren Wirksamkeit noch weiter erforscht wird (Branski et al., 2012; Gauglitz et al., 2011). Vielversprechende Ergebnisse liefert die Kombinationstherapie von intraläsionalem TAC und 5-FU nach vorheriger operativer Entfernung der Narbe (Ledon et al., 2013).

Die chirurgische Therapie findet nach nicht erfolgreichen konservativen Behandlungen und je nach funktioneller oder ästhetischer Beeinträchtigung Anwendung (Branski et al., 2012). Der Zeitpunkt und die Indikation für die chirurgische Behandlung sollte genauestens überlegt werden, da einerseits hypertrophe Narben noch reifen und sich von selbst zurückbilden können, andererseits Keloide ohne zusätzliche Therapie hohe Rezidivraten (45-100%) aufweisen (Gauglitz et al., 2011). Generell ist ein vorsichtiger Umgang mit der Wunde sowie

ein angemessener Wundverschluss zur Vermeidung von Spannungen im Wundbett essentiell (Berman et al., 2017; Lee and Jang, 2018). Insgesamt können kleinere Defekte im Rahmen hypertropher Narben im Ganzen exzidiert werden, wohingegen größere oder gelenkübergreifende Vernarbungen durch verschiedene Lappenplastiken behandelt werden müssen. Zum Einsatz kommen Z-, W- und V-Y-Plastiken, sowie lokale, gestielte oder freie Lappenplastiken, welche individuell dem Defekt und dem Patienten angepasst werden. Zusätzlich kann ein Expander, zur Vordehnung des Gewebes, eine Ersatzmatrix oder neuere Verfahren wie das „medical needling“ zur Anwendung kommen (Branski et al., 2012). Generell sollte die chirurgische Therapie durch eine adjuvante Behandlung wie Kompressions-, Kortikosteroid- oder Radiotherapie ergänzt werden (Wolfram et al., 2009).

Seit Beginn der Lasertherapie zur Behandlung von Keloiden und hypertropher Narben Mitte der 1980er Jahre, wurden diverse Laser mit verschiedensten Wellenlängen erforscht (Gauglitz et al., 2011). Es lassen sich grob zwei Arten unterscheiden: Die ablativen, wozu der CO₂-, der Er:YAG-Laser (2940 nm) und der Er:YSGG-Laser (2790nm) zählt, und die nichtablativen Laser, wozu der *pulse dye* (PDL) und der *intense pulse light laser* (IPL) mit Wellenlängen zwischen 500 bis 1200 nm gehören. Beide Arten können entweder als konfluente Anwendung die Narbe als Ganzes behandeln oder als fraktioniertes Verfahren kleine Löcher in dem Narbengewebe verursachen (Branski et al., 2012). Bisher am vielversprechendsten sind die Ergebnisse des 585 nm PDL zur Behandlung junger hypertropher Narben und primärer Keloide (Gauglitz et al., 2011). Dies führt möglicherweise zu einer Veränderung des Signalwegs, zum Kollagenabbau, zu einer verminderten Fibroblastenproliferation sowie zu einer vermehrten Apoptose (Gauglitz et al., 2011; Slemp and Kirschner, 2006; Wolfram et al., 2009). Außerdem soll es durch die Erwärmung zu einer Dissoziation von Disulfid-Brücken und damit einer Neuausrichtung der Kollagenfasern kommen (Gauglitz et al., 2011). Auch hier werden die besten Ergebnisse in Kombination mit einer zusätzlichen Therapie erzielt (Wolfram et al., 2009). Es besteht jedoch bei allen Laser-Anwendungen die Gefahr der Verdickung und Verhärtung der Narbe durch zum Teil profibrotische Eigenschaften der Laser (Branski et al., 2012).

Weitere neuartige Therapien sind zum Beispiel die intraläsionale Injektion von Interferon- $\alpha\beta$, welches ebenfalls antiproliferative Eigenschaften aufweist und sogar effektiver als Kortikosteroid-Injektionen zu sein scheint (Gauglitz et al., 2011). Ein weiteres Beispiel ist die topische Anwendung von 5 % Imiquimod-Creme, welche in Studien als adjuvante Therapie nach chirurgischer Entfernung verwendet wurde (Berman et al., 2017). Außerdem werden verschiedene Immunsuppressiva wie Tacrolimus oder Sirolimus erforscht. Tacrolimus soll dabei über eine Blockierung des TGF- β /SMAD-Signalwegs die TGF- β Rezeptoren herunterregulieren und damit die Fibroblastenproliferation und -migration sowie die Kollagenproduktion senken. Sirolimus hingegen ist ein Inhibitor des mTOR-Signalwegs, welcher in Keloiden erhöht ist. Bei Anwendung reduziert dieser die Expression von Kollagen und α -SMA und hemmt die Ablagerung der extrazellulären Matrix (Berman et al., 2017). Auch der Nutzen einer mesenchymalen Stammzelltherapie mit immunmodulatorischen und antifibrotischen Eigenschaften wird diskutiert (Lee and Jang, 2018).

Dies sind nur einige Beispiele der Vielzahl an neuen potenziellen Behandlungsmöglichkeiten für hypertrophe Narben und Keloide, wobei bisher noch keine optimale und zufriedenstellende Therapie gefunden wurde und daher noch weitere Forschung notwendig ist.

1.5 Licht

Elektromagnetische Strahlung unterteilt sich in, mit dem menschlichen Auge, sichtbare und nicht sichtbare Anteile. Das sichtbare Licht erstreckt sich über eine Wellenlänge von 400 – 760 nm. Die anderen Bereiche des Spektrums bestehen aus Radiowellen, Mikrowellen, Infrarotstrahlung (Wärme), UV-Strahlung, Röntgenstrahlung und Gamma-Strahlung (Mahmoud et al., 2008) (siehe Abb. 5). Nur ein Teil der elektromagnetischen Strahlung durchdringt die Ozonschicht und erreicht damit die Erdoberfläche (Singer and Berneburg, 2018). Auf Meeresebene besteht die Sonnenenergie zu 3-7 % aus UV-Strahlung, 44 % sichtbarem Licht und zu 53 % aus Infrarot-Strahlung (Liebel et al., 2012). UV-Strahlung bis 310 nm wird von der Ozonschicht absorbiert, sodass die komplette UVC-Strahlung (100 – 280 nm) und 95 % der UVB-Strahlung (280 – 315 nm) nicht die Erdoberfläche erreichen. Damit machen 5 % der gesamten UV-Strahlung des Sonnenlichts, welches die Erde erreicht, die UVB-Strahlung aus, die übrigen 95 % bestehen aus UVA-Strahlung (315 – 400 nm) (Sklar et al., 2013; Svobodova et al., 2006). Die Einteilung der UV-Strahlung hier erfolgt nach der Definition der *International Commission on Illumination* (Svobodova et al., 2006). Eine alternative Klassifikation, die in der Photodermatologie Anwendung findet, sieht folgendermaßen aus, UVC-Strahlung (200 – 290 nm), UVB-Strahlung (290 – 320 nm) und UVA-Strahlung (320 – 400 nm) (Sklar et al., 2013). Außerdem lässt sich die UVA-Strahlung nochmal in UVA1-Strahlung, von 340 – 400 nm und UVA2-Strahlung, von 320 – 340 nm unterteilen (Mahmoud et al., 2008). Dabei haben die kürzeren Wellenlängen ein höheres Schädigungspotential (Sklar et al., 2013).

Ebenso erreicht die Infrarot-Strahlung (760 nm – 1 mm) die Erdoberfläche (Cohen et al., 2020; Sklar et al., 2013). Diese macht etwa 40 % der gesamten Sonnenenergie auf der Erde aus und kann nochmal in Infrarot-A-Strahlung (760 – 1400 nm), Infrarot-B-Strahlung (1400 – 3000 nm) und Infrarot-C-Strahlung (3000 nm – 1 mm) unterteilt werden. Dabei wird die Infrarot-C-Strahlung, aufgrund des Wassergehalts der Epidermis, nahezu vollständig von dieser absorbiert, wohingegen die Infrarot-A und Infrarot-B Strahlung bis in das subkutane Gewebe eindringen können (Sklar et al., 2013).

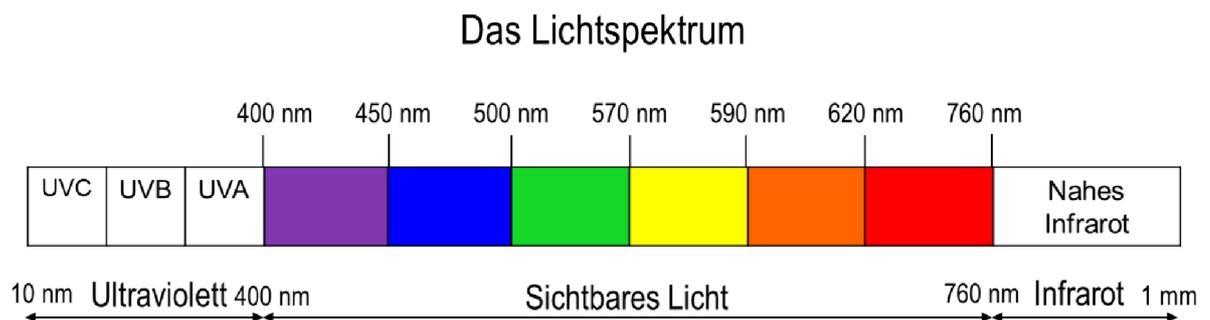


Abb. 5: schematische Darstellung des Spektrums des Lichts unterschiedlicher Wellenlängen.
Quelle: Adaptiert nach (Sklar et al., 2013)

Um Effekte ausüben zu können muss das Energie geladene Photon des Lichtes in der Haut von einem zellulären Molekül absorbiert werden. Dabei gibt es zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen werden Photonen, die als UV-Strahlung oder sichtbares Licht in die Haut eindringen, absorbiert und die Energie des Photons auf ein Chromophor übertragen. Das Chromophor wird auf diese Weise in einen angeregten Zustand versetzt, wodurch chemische Veränderungen entstehen (Svobodova et al., 2006). Daher ist die Eindringtiefe der Strahlung abhängig von der Position und dem Absorptionsspektrum der

Chromophoren in der Haut. Beispiele für endogene Chromophoren, welche sichtbares Licht absorbieren, sind Melanin, Wasser, Riboflavin, Hämoglobin oder Bilirubin. In der Epidermis gelegene, UV-Strahlung absorbierende Chromophoren, sind zum Beispiel Nukleinsäuren oder aromatische Aminosäuren, NADH/NADPH, Häm, Flavine oder Porphyrine (Mahmoud et al., 2008; Svobodova et al., 2006).

Zum anderen können Effekte über den Mechanismus der Photosensibilisierung ausgeübt werden. Hierbei wird das UV-Licht durch endogene oder exogene Sensibilisatoren absorbiert, wodurch diese ebenfalls angeregt werden. Durch die Absorption der Energie der Photonen, verändert sich die Verteilung der Elektronen in den Chromophoren und Photosensibilisatoren und es entsteht ein erregter Singlet-Zustand. In diesem Zustand können die Moleküle Fluoreszenz emittieren, Energie in Form von Wärme abgeben, photochemischen Reaktionen unterlaufen um Photoprodukte zu bilden oder in den erregten Triplet-Zustand wechseln. Eine dieser nachfolgenden Reaktionen kann zum Beispiel zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen. Diese sind hochreaktive Spezies, welche oxidativen Schaden verursachen, indem sie mit zellulären Makromolekülen wie der DNA, Proteinen oder Fettsäuren interagieren. Dennoch sind sie ein natürlicher Teil des Metabolismus. Übertrifft jedoch die Menge produzierter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) die Kapazität der antioxidativen Abwehrmechanismen resultiert dies in oxidativem Stress (Svobodova et al., 2006).

In Abhängigkeit von der Wellenlänge, hat die Bestrahlung diverse Effekte auf die menschliche Haut (Abb. 6). So vermittelt UVB-Strahlung (290 – 320 nm) seine Effekte hauptsächlich durch direkte Schäden an der DNA (Mahmoud et al., 2008) und ist damit für einen Großteil der Hautmalignitäten verantwortlich (Afaq and Mukhtar, 2001). Aufgrund der kurzwelligeren Strahlung wird sie verstärkt von der Epidermis absorbiert und nur ein kleiner Anteil dringt in die oberflächliche Dermis ein (Singer and Berneburg, 2018). UVA-Strahlung (320 – 400 nm) hingegen wirkt durch indirekte Schäden zum Beispiel über die Entstehung von ROS (Mahmoud et al., 2008). Sie werden langsamer absorbiert und können in tiefere Schichten der Dermis eindringen (Singer and Berneburg, 2018).

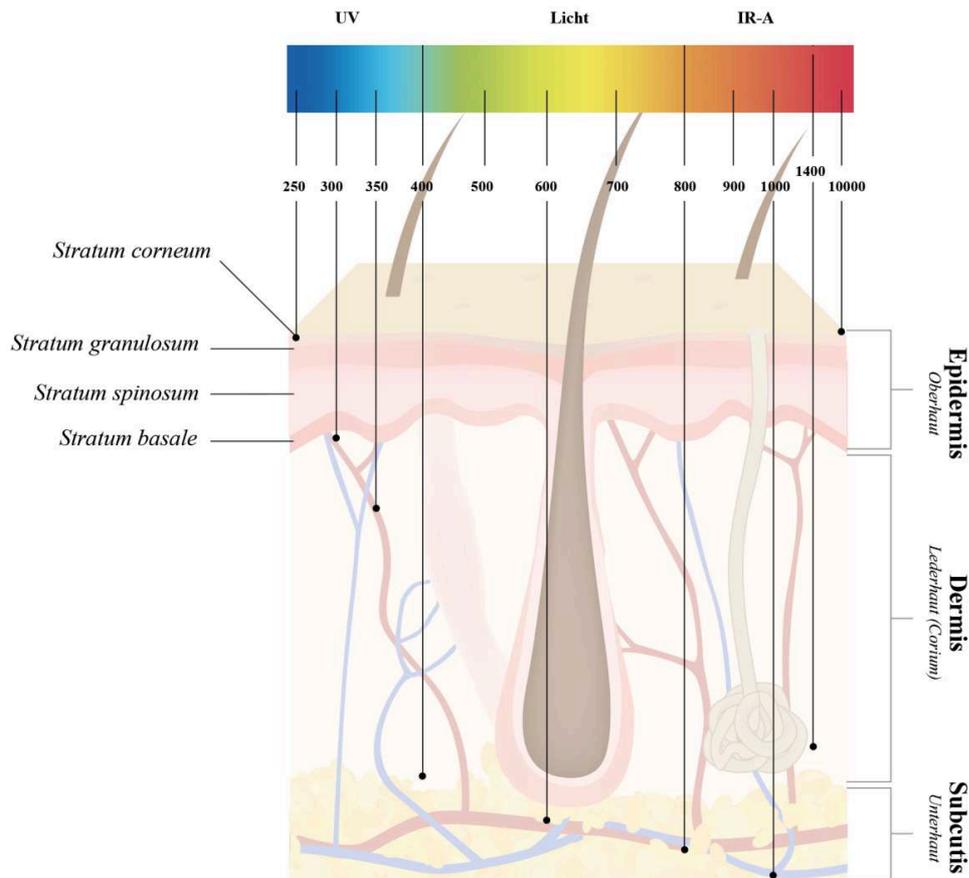


Abb. 6: Schematische Abbildung der elektromagnetischen Strahlung und ihrer Eindringtiefe in die verschiedenen Hautschichten. Quelle: (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017)

Elektromagnetische Strahlung ist einerseits an der Entstehung von Photodermatosen beteiligt und übernimmt andererseits eine wichtige Rolle im Rahmen der Phototherapie zur Behandlung dermatologischer Krankheitsbilder und der Wundheilung. Photodermatosen sind eine Gruppe von Hauterkrankungen, welche durch Exposition gegenüber UV-Strahlung und sichtbarem Licht ausgelöst oder verschlimmert werden. Beispiele sind die chronische aktinische Dermatitis oder die kutane Porphyriasis (Mahmoud et al., 2008). Ebenso kann chronische UV-Exposition zu Hautentzündung und in dem Rahmen auch zur Entwicklung von Hautkrebs beitragen (Svobodova et al., 2006). Trotz allem kann UV-Strahlung auch zur Behandlung von Hautkrankheiten genutzt werden. UVB-Strahlung eignet sich gut zur Behandlung von Psoriasis, atopischer Dermatitis, Vitiligo, Pruritus, Lichenoid pityriasis oder seborrhöischer Dermatitis. Die Phototherapie mit UVA-Strahlung wird vor allem bei atopischer Dermatitis und bei sklerosierenden Hauterkrankungen, beispielsweise der Acrosclerosis, angewandt. Durch oxidative Zellschäden, einhergehend mit der Apoptose proinflammatorischer Zellen, übt UVA-Strahlung einen antiinflammatorischen Effekt aus. Dazu kommt eine antifibrotische Wirkung, durch die Expression der Hämoxigenase-1 (HO-1), die Induktion von MMPs und die Inhibition von Fibroblasten (Singer and Berneburg, 2018).

1.5.1 Sichtbares Licht und dessen Anwendung in der Medizin

Aufgrund des in dieser Arbeit verwendeten blauen Lichtes, möchte ich mich an dieser Stelle auf die generellen Effekte des sichtbaren Lichtes beschränken.

Der Anteil der elektromagnetischen Strahlung, die mit dem menschlichen Auge sichtbar ist, bildet das sichtbare Licht (400 – 700 nm). Die Wellenlängen des sichtbaren Lichtes stellen sich in verschiedenen Lichtfarben dar. Blaues Licht besitzt die kürzeste Wellenlänge mit ungefähr 400 - 470 nm, dann folgt das grüne Licht (470 – 550 nm) und anschließend rotes Licht mit ungefähr 620 – 700 nm. Daran schließt sich der nahe Infrarot-Bereich von 700 – 1200 nm an (Barolet, 2008; Cohen et al., 2020). Generell lässt sich sagen, dass je länger die Wellenlänge, desto tiefer ist die Eindringtiefe in das Gewebe (Barolet, 2008). Das Sonnenlicht stellt eine natürliche Quelle sichtbaren Lichts dar, wobei dies etwa 39 – 44 % der Sonnenstrahlung ausmacht (Cohen et al., 2020; Sklar et al., 2013). Dies ist für die Produktion von etwa 50 % des totalen oxidativen Stresses verantwortlich (Zastrow et al., 2009). Die Nutzung von Sonnenlicht zur Behandlung von Hautkrankheiten wird seit mehr als 1000 Jahren praktiziert und 1903 von dem dänischen Physiker Niels Ryberg Finsen wiederentdeckt. Ebenso gibt es künstliche Quellen sichtbaren Lichts, wie Glühbirnen, Computer, Laser und andere therapeutische Geräte (Cohen et al., 2020). Bereits in den 1960er Jahren führte Endre Mester, ein ungarischer Physiker, die low-level Laser Therapie zur Photobiostimulation (PBM) ein. Seitdem ist die Anwendung von kohärenten Lichtquellen, in Form von Lasern, oder von nicht-kohärentem Licht, in Form von LEDs (*light emitting diodes*), in der Medizin verbreitet. Vor allem die Anwendung von LEDs ist eine der neueren Formen der Lichttherapie, die in der Dermatologie zum Einsatz kommt ohne Wärme zu erzeugen (Barolet, 2008). Auch hier müssen die vom LED-Licht emittierten Photonen von einem Chromophor oder einem Photoakzeptor absorbiert werden, um einen Effekt auf den Organismus ausüben zu können. Dabei sind die biologischen Effekte abhängig von Faktoren wie der Wellenlänge, der Dosis, der Intensität, der Bestrahlungszeit und dem Modus (Barolet, 2008). Generell konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung menschlicher Haut mit sichtbarem Licht zur dosisabhängigen erhöhten Produktion von ROS und proinflammatorischen Zytokinen führt (Liel et al., 2012). Dadurch können indirekt Schäden an der DNA entstehen, ähnlich wie bei langwelliger UVA-Strahlung (Mahmoud et al., 2008).

Wie in Abschnitt 1.5 bereits erwähnt ist das Vorhandensein von Chromophoren und deren Absorptions-Fähigkeiten essentiell für die therapeutische Anwendung von sichtbarem Licht (Cohen et al., 2020; Garza et al., 2018). Bei der Photobiomodulation (PBM) wird Licht der Wellenlängen 400-1100 nm appliziert, wodurch verschiedene Prozesse beeinflusst werden können, unter anderem wird der Heilungsprozess gefördert und eine Entzündung reduziert. Traditionell wird rotes Licht verwendet, allerdings haben auch andere Wellenlängen des sichtbaren Spektrums, zum Beispiel blaues oder grünes Licht, nützliche Effekte. Die PBM hat verschiedene Wirkmechanismen (Serrage et al., 2019).

Ein Chromophor, welches Rotes Licht absorbiert, ist die Cytochrom C Oxidase (CCO), welche den Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette bildet. Sie ist ein komplexes Molekül mit zwei verschiedenen Kupferzentren und zwei Häm-Zentren, welche alle in reduziertem oder oxidiertem Zustand vorliegen können. Die CCO hält den Protonengradienten aufrecht und damit auch die Aktivität der ATP-Synthase (Garza et al., 2018; Hamblin, 2018; Serrage et al., 2019). Am häufigsten wurde beobachtet, dass die Menge der ROS durch PBM verändert wird. Durch die Bestrahlung mit rotem Licht, welches in den Mitochondrien durch die CCO absorbiert wird, entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Durch ein Elektronen-Leck werden Superoxid-Anionen produziert. Außerdem wird durch die PBM das mitochondriale Membranpotential erhöht, was zu einem vermehrten Elektronentransport führt. Bei anhaltendem oxidativem Stress kann die Konzentration der ROS einen Grenzwert erreichen, sodass dies zur Öffnung von mitochondrialen Kanälen

führt. Durch die Öffnung bricht das Membranpotential zusammen und es werden vermehrt ROS durch die Atmungskette gebildet (Hamblin, 2018). Weitere Chromophoren, neben der CCO, welche durch die Photobiomodulation angesprochen werden sind Opsine, Flavine und Flavoproteine oder Porphyrine (Serrage et al., 2019).

In der Dermatologie wird sichtbares Licht seit Jahren sowohl bei verschiedenen medizinischen als auch bei kosmetischen Indikationen angewandt. Darunter fällt die Behandlung von entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Akne, prä-/kanzerösen Hautläsionen oder zur Modulation von Hautfibroblasten, sowie zur Hauterneuerung/-verjüngung (Cohen et al., 2020). Im Rahmen der Photobiomodulationstherapie (PBM) wird rotes oder nahes Infrarot-Licht verwendet, um Schmerzen, Entzündung und Ödeme zu reduzieren und beschädigte Knochen-, Sehnen- oder Wundgewebe zu regenerieren (Hamblin, 2018).

Blaues Licht dagegen findet Anwendung bei diversen dermatologischen und entzündlichen Erkrankungen, beispielsweise bei Psoriasis, atopischer Dermatitis, Rosazea, Akne, dem kutanen T-Zell Lymphom, neonatalem Ikterus, prä-/kanzerösen Hautläsionen und zur Wundheilung. Dort wirkt es vor allem aufgrund seiner anti-inflammatorischen und anti-proliferativen Eigenschaften (Cohen et al., 2020; Garza et al., 2018; Vandersee et al., 2015). Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften des Lichtes kann rotes Licht erfolgreicher zur Behandlung tiefer gelegener Ziele und blaues Licht eher zur Behandlung von Vorgängen in der Epidermis genutzt werden (Barolet, 2008).

Außerdem gibt es weitere Beispiele, wie die LED-Therapie mit sichtbarem Licht in der Praxis angewandt wird. Die Behandlung mit sichtbarem und Infrarot-nahem LED-Licht unterschiedlicher Wellenlängen führt scheinbar zu einer beschleunigten Wundheilung und vermehrten Epithelialisierung nach Hauttransplantation beim Menschen. Ebenso konnten einige Studien ein anti-inflammatorisches Potential von LEDs zeigen unter anderem durch Reduktion der MMPs. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Narbenprävention. Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, sind hypertrophe Narben und Keloide charakterisiert durch vermehrte Proliferation von Fibroblasten und vermehrter Kollagenablagerung. Bei diesem Prozess spielt auch der IL-6 Signalweg eine zentrale Rolle, weshalb eine Inhibition dessen ein weiteres therapeutische Ziel zur Narbenprävention darstellt. Die LED-Therapie führt zu einem verminderten IL-6 mRNA Nachweis und bietet daher einen erfolgsversprechenden Therapieansatz. Allgemein ist die LED-Therapie eine sichere, nicht-toxische und nicht-invasive Behandlungsalternative, bei der bisher kaum Nebeneffekte in der Literatur berichtet wurden (Barolet, 2008).

Eine weitere wichtige Erkenntnis über die Anwendung der Photobiomodulation ist die biphasische Dosis-Reaktion, auch Arndt-Schulz Gesetz genannt. Dies beinhaltet, dass Lichttherapie gegensätzliche Effekte haben kann. Geringe Dosen an Licht haben keinen Effekt. Etwas höhere Dosen haben solange einen positiven Effekt bis ein Plateau erreicht wird. Nimmt die Lichtdosis darüber hinaus zu, verringert sich der Nutzen zunehmend, sodass bei weiterem Anstieg schädigende Effekte entstehen können. Demnach sind biologische Effekte durch photobiomodulatorische Therapie abhängig von der Leistungsdichte (mW/cm^2) und vermutlich weniger von der totalen Dosis (J/cm^2) (Hamblin, 2018; Serrage et al., 2019).

1.6 Blaues Licht und dessen Effekte

Wie zuvor bereits beschrieben können die Wellenlängen des sichtbaren Lichts (400-1100 nm) photophysikalische und -chemische Effekte auslösen. Dadurch modulieren sie biologische Prozesse, die zelluläre Proliferation sowie mitochondriale Funktionen und beeinflussen Entzündungssignale. Jedoch ist das Wissen über die molekularen Effekte sehr begrenzt, wobei Wellenlängen unter 600 nm noch wenig erforscht sind (Serrage et al., 2019).

Das blaue Licht breitet sich auf einen breiten Wellenlängen-Bereich aus und wird nochmals in Farbspektren unterteilt. Dazu gehört Violett (390-425 nm), Indigo (425-450 nm), Royal Blue (450-475 nm) und Blau Grün (475-500 nm). Aufgrund dessen scheint es möglich, dass blaues Licht von verschiedenen Chromophoren absorbiert werden kann (Hamblin, 2018). Es wurden vier verschiedene Photoakzeptoren, welche blaues Licht absorbieren, gefunden. Dies sind Flavine, Porphyrine, nitrosatierten Proteine und Opsine. Durch diese wird die Bildung von ROS initiiert, NO freigesetzt und verschiedene Signale über G-Protein-gekoppelte Proteine aktiviert (Garza et al., 2018; Tafilinski et al., 2014).

Die Wellenlängen in dem Spektrum zwischen 380-496 nm werden von verschiedenen Opsinen absorbiert, unter anderem dem Enzephalopsin (OPN3), Melanopsin (OPN4) oder dem Neuropsin (OPN5). Opsine generell sind Licht-sensitive G-Protein-gekoppelte Proteine und können verschiedene Signalwege initiieren. Sie werden vor allem durch blaues oder grünes Licht angeregt (Garza et al., 2018; Serrage et al., 2019). Die Aktivierung von retinalem Opsin mit blauem Licht führt zur Entstehung von ROS, was für die Phototoxizität von violetter/blauem Licht an den Augen verantwortlich gemacht wird (Hamblin, 2018). Ein weiterer Mechanismus, über den blaues Licht wirkt, ist die Absorption durch Porphyrine, welche ein Absorptionsmaximum bei 410-440 nm besitzen (Garza et al., 2018; Lewis et al., 2005). Dies ist eine Gruppe von heterozyklischen aromatischen Stoffen, welche aus vier, untereinander durch Methan-Brücken verbundene Pyrol-Untereinheiten besteht (Garza et al., 2018). Sie sind Bestandteil von diversen Komplexen wie Hämoglobin oder der Cytochrom C Oxidase und sind damit in der Atmungskette vorzufinden (Liebmann et al., 2010; Serrage et al., 2019). Die Interaktion mit blauem Licht führt zum Transfer von Energie und es werden ebenfalls ROS produziert (Garza et al., 2018). Ein weiteres potentielles Chromophor sind Flavoproteine (Cryptochrome), die sensitiv für blaues Licht sind und vor allem in Pflanzen vorkommen (Hamblin, 2018). Es ist bekannt, dass Flavine und Flavoproteine ein Absorptionsmaximum bei etwa 450 nm haben und daher blaues Licht absorbieren (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017; Lewis et al., 2005; Serrage et al., 2019). Das Riboflavin (RF) ist, als Derivat des Isoalloxazins, einer der Hauptbestandteile von FMN (*flavin mononucleotide*) und FAD (*flavin adenin dinucleotide*) in den meisten Flavoproteinen. Es ist als Ko-Faktor an vielen Redox-Reaktionen beteiligt (Garza et al., 2018). Flavinhaltige Oxidasen beziehungsweise die Photorezeptoren sind hauptsächlich in den Peroxisomen, Mitochondrien und im Zytosol vorhanden (Garza et al., 2018; Hockberger et al., 1999; Liebmann et al., 2010). Das FMN ist Bestandteil des Komplex I (NADH-Dehydrogenase) der Atmungskette. Durch die Bestrahlung mit blauem Licht soll die Aktivierungsenergie geliefert werden, die das FMN benötigt, um Sauerstoff (O_2) in Superoxid (O_2^-) umzuwandeln. Daher werden durch die Exposition mit blauem Licht verschiedener Wellenlängen erhöhte Mengen an ROS und damit an intrazellulärem oxidativem Stress produziert (Opländer et al., 2011; Serrage et al., 2019). Auch der Komplex II (Succinatdehydrogenase) der Atmungskette enthält ein flavin-haltiges Cytochrom, das FADH₂ und ist damit ebenso durch blaues Licht beeinflussbar (Serrage et al., 2019). Durch die Absorption von Licht verändern

sich die elektronischen Eigenschaften ihres charakteristischen Isoalloxazin-Rings, wodurch lokale chemische Veränderungen entstehen (Garza et al., 2018). Bereits 1999 haben Hockberger et al. die Theorie aufgestellt, dass Flavine durch blaues Licht photoreduziert werden, was zur Produktion von H_2O_2 führt (Hockberger et al., 1999). Ebenso postulierte Opländer et. al eine Interaktion von blauem Licht mit porphyrin-haltigen Enzymen und Flavoproteinen sowie die daraus resultierende Bildung von ROS in Form von Singlet Sauerstoff und Hydrogen Peroxid. Vor allem die Bestrahlung mit der Wellenlänge 453 nm scheint zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Hydrogen Peroxid zu führen (Opländer et al., 2011). Auch Krassovka konnte nachweisen, dass die Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453$ nm) durch eine Abnahme der Absorption zu einer Reduktion der Flavine führt (Dipl. - Biol. Krassovka, 2017; Garza et al., 2018; Krassovka et al., 2020). Die Bestrahlung verursacht eine Dosis-abhängige Reduktion, sodass Dosen von 80 – 100 J/cm^2 eine totale Extinktion des maximalen Peaks bei 455 nm auslösen. Insgesamt war die Menge an intrazellulärem oxidiertem FAD nach der Bestrahlung mit blauem Licht vermindert (Krassovka et al., 2020).

Aufgrund der Exzitation von Flavinen entstehen erregte Zustände (Singlet oder Triplet) und ROS werden gebildet (Garza et al., 2018). Blaues Licht längerer Wellenlängen (>440 nm) soll einen geringeren schädlichen Einfluss auf die Zellviabilität ausüben (Krassovka et al., 2020). Generell ist jedoch Licht der Wellenlänge 453 nm bis zu Dosen von 500 J/cm^2 als nicht toxisch anzusehen (Liebmann et al., 2010; Serrage et al., 2019). Auch Opländer et. al konnte in Hautproben keine Zeichen für Apoptose nach Exposition gegenüber blauem Licht mit Dosen bis zu 200 J/cm^2 nachweisen (Opländer et al., 2013).

Der zugrundeliegende Mechanismus der ROS-Entstehung durch blaues Licht ist allerdings nicht so gut bekannt wie der des roten Lichts oder des UV-Lichts (Abschnitt 1.5.1) (Hamblin, 2018; Lewis et al., 2005). An Fettstammzellen konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 415 nm eine dosis-abhängige Erhöhung von ROS, einhergehend mit einer Reduktion der ATP-Konzentration und des mitochondrialen Membranpotentials, sowie der Inhibition der Proliferation auslöst (Hamblin, 2018). In Keratinozyten führt die Bestrahlung mit blauem Licht unterschiedlicher Wellenlängen ebenfalls zu einer Reduktion der Proliferation. Als Grund dafür vermutet man die Initiation der Differenzierung, da keine vermehrte Apoptose nachgewiesen werden konnte (Liebmann et al., 2010). Diese verminderte Proliferation ist ebenso in Endothelzellen und Fibroblasten dosis-abhängig nachweisbar, jedoch ist unklar über welchen Photorezeptor dies abläuft und ob proliferierende Fibroblasten möglicherweise empfänglicher für blaues Licht sind (Garza et al., 2018; Krassovka et al., 2020; Opländer et al., 2011). Da die Mitochondrien der Haupt-Absorptionsort für blaues Licht zu sein scheinen, wird hier die Ursache gesucht. Einige erklären sich die reduzierte Proliferation so, dass die Beeinflussung der Atmungskette zur Erschöpfung des Energiemetabolismus der Zelle führt, wodurch die Zellteilung behindert und möglicherweise die Differenzierung beeinflusst wird (Garza et al., 2018; Krassovka et al., 2019). Magni et al. konnten kürzlich auch die dosisabhängige Inhibition der Proliferation von Fibroblasten aus keloidalem Gewebe nach Bestrahlung mit blauem Licht (410-430 nm) nachweisen. Dies haben sie auf die Beeinflussung der Cytochrom C Oxidase zurückgeführt (Magni et al., 2020). Zudem konnte durch die Bestrahlung mit blauem Licht (442 nm) eine signifikante Erhöhung sowohl der Aktivität des Komplex IV (CCO) der Atmungskette als auch der metabolischen Aktivität beobachtet werden (Serrage et al., 2019). Weitere Ergebnisse zeigen, dass die Exposition mit blauem Licht die Aktivität der Succinat Dehydrogenase (SDH, Komplex II) in gesunden Keratinozyten leicht erhöht, wohingegen diese in oralen Tumorzellen signifikant vermindert ist. Dennoch resultiert die Exposition in

einer erhöhten Produktion von ROS sowohl in normalen als auch in tumorösen Epithelzellen (Lewis et al., 2005). Außerdem soll die Anwendung von blauem Licht die Entzündung in oberflächlichem Gewebe reduzieren, die Wundheilung fördern und bakterielles Wachstum hemmen (Rossi et al., 2021; Serrage et al., 2019). Die anti-inflammatorischen Eigenschaften blauen Lichts sind vermutlich NO-vermittelt und es werden weniger pro-inflammatorische Zytokine wie IL-8, IL-1 β , IL-2, IFN- γ und TNF- α freigesetzt (Garza et al., 2018). Die Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm führt ebenfalls zur Bildung von Stickoxid (NO) (Liebmann et al., 2010; Opländer et al., 2013).

Taflinski et al untersuchten außerdem, ob die Bestrahlung mit blauem Licht (420 nm), aufgrund seiner bekannten anti-proliferativen Eigenschaften, einen Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation von humanen, dermalen Fibroblasten hat. Sie fanden heraus, dass die wiederholte Bestrahlung mit nicht-toxischen Dosen zu einer Inhibition der TGF- β 1 induzierten Differenzierung zu Myofibroblasten führt. Dies konnten sie durch eine verminderte Expression des Markerproteins α -SMA via Immunocytochemie und Western Blot belegen (Taflinski et al., 2014). Krassovka konnte dies bestätigen, indem Sie ebenfalls eine signifikant verminderte Proteinexpression von α -SMA und EDA-FN in humanen Fibroblasten nach Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm und vorheriger Aktivierung mit TGF- β 1 nachwies (Krassovka et al., 2019, 2020). Der gleiche Effekt der reduzierten α -SMA Expression konnte auch bei Fibroblasten des Morbus Dupuytren beobachtet werden (Krassovka et al., 2019). In dem Rahmen wurde auch die Expression der ROS sowohl in Morbus Dupuytren als auch in Fibroblasten der Palmarfaszie bestimmt. Sie stellten fest, dass Fibroblasten des Morbus Dupuytren tendenziell mehr ROS generierten, die Bestrahlung allerdings zu einer Erhöhung der ROS in beiden Zellgruppen führte. GleichermäÙen konnten sie feststellen, dass dieser Effekt nicht durch die Induktion der Apoptose, sondern vermutlich durch die Generierung von ROS (Singlet Sauerstoff oder Hydrogen Peroxid) reguliert wird (Krassovka et al., 2019, 2020). Ebenso konnte durch die Zugabe von Hydrogen Peroxid, in dem gleichen Maße wie durch die Bestrahlung, eine Reduktion der α -SMA Expression und damit Inhibition der Differenzierung induziert werden. Zudem konnten sie sowohl eine reduzierte Proteinexpression der Katalase und Reduktion der FAD-Konzentration, als auch ein vermindertes NADP⁺/NADPH⁺ Verhältnis beobachten (Krassovka et al., 2020).

Bei dem Einfluss von blauem Licht scheint es zelltyp-spezifische Unterschiede zu geben (Lewis et al., 2005; Liebmann et al., 2010). Ebenso sind die Effekte abhängig von der Wellenlänge und der emittierten Energie. Es existieren deutliche Unterschiede in den experimentellen Bedingungen bezüglich Lichtquelle, Lichtexposition, der Strahlungsdichte, der Fluenz und dem Zelltyp (auch bei Produktion von ROS) (Garza et al., 2018; Serrage et al., 2019). Ein weiterer entscheidender Punkt ist die Fähigkeit der Zellen mit oxidativem Stress umzugehen, welcher durch ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von ROS und der antioxidativen Abwehr entsteht (Garza et al., 2018).

Daher haben wir in dieser Arbeit untersucht, inwiefern blaues Licht der Wellenlänge 453 nm über die Interaktion mit Flavinen als Photoakzeptoren, der vermehrten ROS Entstehung durch Fotoreduktion, im Rahmen der Dunkelreaktion, sowie einer Beeinflussung der antioxidativen Eigenschaften der Zellen und einer möglichen Entkopplung der Atmungskette, in der Lage ist, die Myofibrogenese zu inhibieren. Außerdem sollte der zugrundeliegende Mechanismus weiter entschlüsselt werden, da blaues Licht durch die Beeinflussung der Differenzierung, der Proliferation und der Aktivität von Myo-/Fibroblasten sowie seinen antifibrotischen Eigenschaften einen vielversprechenden neuen

Therapieansatz zur Behandlung von fibrotischen Hauterkrankungen, wie auch von Keloiden und hypertrophen Narben darstellt.

1.7 Redox-Systeme am Beispiel Glutathion

Die Haut besitzt aufwendige enzymatische, untereinander verbundene, antioxidative Abwehrmechanismen, um mit konstanten Umweltschäden umzugehen (Afaq and Mukhtar, 2001; Vandersee et al., 2015). Schon die Exposition gegenüber UV-Strahlung führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche Schäden an der DNA oder anderen zellulären Bestandteilen verursachen. Zu den ROS gehört zum Beispiel Singlet Sauerstoff, Peroxy-Radikale, Superoxid-Anionen und Hydroxyl-Radikale. Überschreitet deren Konzentration die antioxidativen Abwehrfähigkeiten der Zelle, entsteht oxidativer Stress (Afaq and Mukhtar, 2001). Zu den in der Haut enthaltenen Systemen, welche diese davor schützen, zählen Enzyme wie die Katalase, Glutathion Peroxidase oder die Superoxid Dismutase. Zudem sind Substanzen, wie Vitamin C und E, Karotenoide, Flavonoide oder Phytoestrogene, welche nicht vom Menschen selbst gebildet werden können, in der Lage oxidativen Stress abzuwehren (Vandersee et al., 2015).

Glutathion (GSH) ist ein nicht-enzymatischer Bestandteil des antioxidativen Abwehrsystems und in den meisten Geweben vorhanden. Es ist ein endogenes Tripeptid, bestehend aus γ -Glutaminsäure, Cystein und Glycin, und spielt eine zentrale Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress, da GSH ein direkter freier Radikalfänger ist (Afaq and Mukhtar, 2001; Hornig-Do et al., 2007). Durch die Oxidation eines Wasserstoffatoms der Sulfhydrylgruppe (-SH) des Cysteins durch die Glutathion Peroxidase (GPX) bildet sich eine Disulfidbrücke aus Glutathiondisulfid (GSSG) mit einem weiteren Glutathion. Dadurch kann H_2O_2 abgefangen werden. Im Anschluss kann oxidiertes Glutathion (GSSG) wieder reduziert werden, indem die Glutathion Reduktase NADPH-abhängig die Disulfidbrücke auflöst. Die Aktivität der Glutathion Reduktase in der Haut ist sehr hoch, um möglichst schnell wieder funktionsfähiges Glutathion herzustellen. Das notwendige NADPH für die Reduktion wird mit Hilfe der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase durch Oxidation von Glucose-6-Phosphat bereitgestellt (Afaq and Mukhtar, 2001).

Wie eben schon erwähnt, katalysiert die Glutathion Peroxidase (GPX) die Umwandlung von H_2O_2 zu Wasser (H_2O) durch Oxidation von GSH. Die Glutathion Peroxidase ist ein tetrameres Selenoprotein, von dem zwei Formen existieren. Die Selen-abhängige GPX stellt das wichtigste antioxidative Abwehrsystem der Haut dar und ist besonders reaktiv gegenüber H_2O_2 und organischen Hydroperoxiden. Es ist vor allem im Zytosol und den Mitochondrien zu finden. Ein Selenmangel führt damit zu verminderter Aktivität der GPX in der Haut und folglich zu vermehrten Licht-induzierten Schäden. Außerdem trägt die Catalase zum Abfangen von H_2O_2 bei (Afaq and Mukhtar, 2001). Ebenso die Mn-Superoxid-Dismutase (Mn-SOD), welche in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert ist (Hornig-Do et al., 2007).

2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte, aufbauend auf vorangehenden Arbeiten des Labors, weiter eruiert werden, welche molekularen Mechanismen der Bestrahlung durch blaues Licht der Wellenlänge 453 nm induzierten Reduktion der Faktor-induzierten Myofibrogenese zugrunde liegen.

Folgenden Parametern wurde eine besondere Beachtung geschenkt:

1. Der Einfluss von blauem Licht auf die Myofibrogenese/Differenzierung durch eine quantitative Proteinbestimmung des Myofibroblastenmarkers α -SMA
2. Der Einfluss von blauem Licht auf flavinhaltige Enzyme:
 - a. Zum einen durch Bestimmung der Aktivität der Komplexe I und II der Atmungskette im Rahmen des CellTiter Blue und MTT Assays
 - b. Zum anderen durch die quantitative Proteinbestimmung der flavinhaltigen NADPH-Oxidase (NOX4) mittels Western Blot
3. Der Effekt von blauem Licht auf die ATP-Synthese/Produktion
4. Die Auswirkung der Bestrahlung mit blauem Licht auf die relative Anzahl an Zellen mittels Durchführung des NeutralRot Assays
5. Der Einfluss von blauem Licht auf den Glucose-Stoffwechsel/ die Glykolyse
6. Veränderung des Glutathion-Stoffwechsels nach der Bestrahlung mit blauem Licht

3 Materialien

3.1 Verbrauchsmaterialien

0,5 ml Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes™ 0,5 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
12- <i>well</i> -Platte (12- <i>well</i> CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
15 ml Falcons	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich Art.-Nr.: 188171
2,0 ml Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes™ 2,0 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
2,0 ml Qia Shredder	<i>Qiagen GmbH; Hilden; Deutschland</i>
24- <i>well</i> -Platte (24- <i>well</i> CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
50 ml Falcons	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich Art.-Nr.: 227261
6- <i>well</i> -Platte (CytoOne 6- <i>well</i> TC plate)	STARLAB GmbH; Hamburg; Deutschland
96- <i>well</i> -Platte (GREINER 96-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Einwegskalpel	Feather Safety Razor co., Ltd.; Osaka; Japan
Einweg-Wägeschalen (diamond weighting boats, white, antistatic)	Vwr International GmbH; Darmstadt; Deutschland
Fusselarme Papiertücher (KIMTECH SCIENCE* Präzisionstücher weiß/klein)	Kimberly-Clark Global Sales Inc.; Rosewell; USA
Handschuhe (Micro-Touch® Nitra-Tex® Nitrile Powder-Free Examination Gloves)	Ansell GmbH; München; Deutschland
Kryogefäße (Cryo.s™ 2 ml)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich

Nitrocellulose Blotting-Membran Porengröße 0,2 µm	Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen; Deutschland
Papiertücher (tapira plus Kosmetiktücher)	GVS Großverbraucherspezialisten eG; Heidenheim; Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas (ISO 7712)	BRAND GmbH + CO KG; Wertheim; Deutschland
Sterilfilter (Millex®-GS 0,22 µm)	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Stripetten (10 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Münschen; Deutschland
Stripetten (25 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Münschen; Deutschland
Stripetten (5 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Münschen; Deutschland
T75er Flaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 75 cm ² red filter cap
Verschlussfolie (Parafilm „M“)	Bemis Company Inc., Neenah; USA
Whatman Papier	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Zellschaber (28 cm)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Zellsieb (EASYstrainer, 100 µm, für 50 ml Röhrchen, gelb, steril)	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen; Deutschland

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

3.2 Substanzen und Lösungen

Aqua destillata (Demi-Wasser)	Otto Fischar GmbH & Co KG; Saarbrücken, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutschland
Dispase Typ II (Dispase II (neutral protease, grade II); from Bacillus polymyxa, lyophilizate)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim; Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)(1X), liquid (High Glucose))	Life Technologies Ltd.; Paisley; UK

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture)	Sigma-Aldrich Co.; St. Louis; USA
Ethanol (70 %) zur Desinfektion (Technisol) Ethanol 70 % (V/V) denaturated Eurodenaturant	Vwr Internation S.A.S.; Fontenay-sous-Bois; Frankreich
FCS (Sera Plus special processed FBS; sterile filtered)	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
HEPES (HEPES solution, 1 M, pH 7,0-7,6, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture)	Sigma-Aldrich Co.; St. Louis; USA
Isopropranol-Lösung	1 ml 1% iges HCL in 99 ml Isopropanol (1:100)
Kollagenase Typ I (Collagenase Type I, CLS I, 355 U/mg, from Clostridium histolyticum (not sterile))	Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol, for electrophoresis)	Sigma-Aldrich Co.; St. Louis; USA
Methanol	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Milch (Milchpulver, blotting grade, pulv., fettarm)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl (Sodium chloride)	Vwr International GmbH; Darmstadt; Deutschland
PBS (phosphate buffered saline)	Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
Ponceau S (Ponceau S, BioReagent, suitable for electrophoresis)	Sigma-Aldrich Co.; St. Louis; USA
Roti-Mark Western Protein-Marker	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Trypsin (Trypsin-EDTA 10 X, sterile filtered)	Biowest; Nuaille; Frankreich
Tween (Tween 20 for molecular biology, viscous liquid)	Sigma-Aldrich Co.; St. Louis; USA

Western Blot Gel Kit (TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 12 %)	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules; USA
Western Blot Substrat (Immobilon Forte Western HRP Substrate)	Millipore Corporation; Billerica; USA

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Substanzen und Lösungen.

3.3 Geräte

Aluminiumständer zur kühlen Probenlagerung (Rotilabo-Alu.Rack 1,5)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Autoklav (Systemc DX-90)	Systemc GmbH; Linden; Deutschland
Bechergläser (DURAN Becher niedrige Form und Ausguss)	DWK Life Science GmbH; Wertheim/Main; Deutschland
Blotting Gerät (Trans-Blot Turbo)	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules; USA
Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂) (HERACELL 150 i CO ₂ -Inkubator)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Eismaschine (RF 0244 A)	Manitowoc Ice; Manitowoc; USA
Eiswanne zur kühlen Probenlagerung (neoLab Eisbad klein aus PS)	neoLab Migge GmbH; Heidelberg; Deutschland
Elektrophorese Spannungsquelle (PowerPac Basic Power Supply)	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules; USA
Folie (Microtiter Sealing Tape)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Gefrierschrank -20 °C (GUw 1213)	Liebherr-International Deutschland GmbH; Biberach an der Riß, Deutschland
Heizbad	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Heizblock (dry bath)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Kühlschrank 4 °C (KUw1740)	Liebherr-International Deutschland GmbH; Biberach an der Riß; Deutschland
Kühlschrank 4 °C mit Glastür (QCR2304U14)	Queue Systems Inc.; Asheville; USA
Magnetrührgerät (620 Standard)	Vwr International GmbH; Darmstadt; Deutschland

Mehrfachdispenser (Multipipette plus)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Messbecherglas (Pyrex Beakers, low form, Griffin)	SciLabware Ltd.; Stoke-on-Trent; UK
Messzylinder (PP, Klasse B, niedere Form, erhabene Skala)	VITLAB GmbH; Grossostheim; Deutschland
Messzylinder (Borosilikatglas 3,3; niedrige Form, Klasse B)	vwr International GmbH; Darmstadt; Deutschland
Messzylinder (PP, durchscheinend, hohe Form, Klasse B)	vwr International GmbH; Darmstadt; Deutschland
Mikroskop (Axiovert 40 C)	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Photometer (multilabel plate reader Victor 3)	Perkin Elmer Inc.; Waltham; USA
Photometer PC (Optiplex GX620)	Dell Inc.; Round Rock; USA
Photometer Software (WorkOut 2.0)	DAZDAQ LTD.; Brighton; UK
Pipetten (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) (Eppendorf research/research plus/reference)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Pipettierhilfe (accu-jet pro)	BRAND GmbH & Co. KG; Wertheim; Deutschland
Pipettierhilfe (pipetus)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG; Eberstadt; Deutschland
Pipettierhilfe (Omega Pipettor)	Argos Technologies Inc.; Vernon Hills; USA
Pumpe (LABOPORT)	KNF Neuberger GmbH; Freiburg; Deutschland
Rüttelplatte (Kleinschüttler KM-2)	Edmund Bühler GmbH; Bodelshausen; Deutschland
Schwarze Tonne (Kontaminationsabfall)	MAUSER Corporate GmbH; Brühl; Deutschland
Sicherheitswerkbank mit Abzug (TA 1500 x 900 – 900 (Laborsystem mc6))	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG; Wangen; Deutschland

Sonifizierer (UP50H (Cycle 0,5; Amplitude 80 %) mit Sonotrode MS1)	Hielscher Ultrasonics GmbH; Teltow; Deutschland
Sterile Werkbank (Herasafe KS 18)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Sterile Werkbank (Euroflow EFA5)	Clean Air Techniek bv; Woerden; NL
Taumelrollenmischer (RM5; RM 10 W)	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH; Ballrechten-Dottingen; Deutschland
Thermostat für Wasserbad (Thermomix BU)	B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland
Vortexer (IKA MS3 basic (3000 U/min)	IKA-Werke GmbH & Co. KG; Staufen; Deutschland
Vortexer (Vortex mixer)	vwr International GmbH; Darmstadt; Deutschland
Vortexer (Reax top)	(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach; Deutschland
Vortexer (L46 Power Mixer)	Labinco BV; Breda; NL
Waage (d = 0,1 mg) (ABJ 220-4M)	Kern & Sohn GmbH; Balingen-Frommern; Deutschland
Waage (d = 10 mg) (Adventurer Pro AV412)	Ohaus Corporation, Pine Brook; USA
Wärme-Bad 37 °C (Aqualine AL 12)	LAUDA DR. R. WOBSEER GmbH & Co. KG; Lauda-Königshöfen; Deutschland
Western Blot Imaging Instrument (ChemiDoc MP Imaging System)	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules; USA
Western Blot Software (ImageLab 6.0)	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules; USA
Zählkammer/Hämocytometer (Neubauer, Tiefe 0,1 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG; Lauda-Königshöfen, Deutschland
Zentrifuge (Heraeus Fresco 17)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland Thermo Elextron Heraeus Megafuge 16 R Thermo Elextron Heraeus Pico 17 Microcentrifuge

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte.

3.4 Puffer, Antikörper und KIT-Systeme

Anti α -SMA (alpha smooth muscle actin) Antikörper (ab7817) (mouse monoclonal IgG2a)	Abcam plc; Cambridge; Großbritannien
ATP Determination Kit	Biaffin GmbH & Co. KG; Kassel; Deutschland
BCA Protein Assay KIT (Proteinbestimmung)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Blottingpuffer (gelöst in Aqua dest.)	150 ml 10x Transferpuffer; 1200 ml H ₂ O; 150 ml Methanol
Zellviabilitäts Assay	Promega Corporation; Madison; USA
Dispase Lösung (gelöst in Aqua dest.)	PBS; 0,1 % Dispase Typ II; 5 % Hepes
Einfriermedium zur Kryokonservierung	FCS; 10 % DMSO; Verhältnis 10:1
FoxO1-Antikörper (C29H4) (Rabbit IgG)	Cell Signaling Technology®; Leiden; Niederlande
GAPDH-Antikörper (Anti-GAPDH hFAB Rhodamine Antibody)	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules; USA
Glucose Glo™ Assay (J6021, J6022)	Promega Corporation; Madison; USA
Glutathion Colorimetric Detection Kit (Invitrogen; EIAGSHC)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Glutathion Peroxidase Assay Kit (Abnova; KA0882)	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH; Eching; Deutschland
Glutathion Reductase Fluorescent Activity Kit (Invitrogen; EIAGRF)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Goat anti Mouse (Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP)	Dako Denmark A/S; Glostrup; Dänemark
Goat anti Rabbit (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP)	Dako Denmark A/S; Glostrup; Dänemark
anti-Human GAPDH IMG-6665A	IMGEX; Novus Biologicals; Cambridge; Großbritannien
Kit zur RNA-Isolation	Qiagen N.V.; Hilden; Deutschland
Kollagenase Lösung (gelöst in Aqua dest.)	0,001 M CaCl ₂ ; 0,005 M Glucose; 0,1 M HEPES; 0,12 M NaCl ₂ ; 0,05 M KCl; 0,2 % Kollagenase Typ I; 1,5 % BSA
Laemmli Puffer (Lagerung bei 4 °C; Gelöst in Aqua dest.)	250 mM Tris-HCl, Ph 6,8; 40 % Glycerol; 8 % SDS; 0,1 % Bromphenolblau; vor Gebrauch 20 % Mercaptoethanol zusetzen
LysoTracker® Green DND-26	Cell Signaling Technology®; Leiden; Niederlande

MTT Assay (Produkt Nummer M2128)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Neutral Rot Assay	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
NOX4 Antikörper (3H2G11) (mouse monoclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg; Deutschland
Nrf2 Antikörper (D1Z9C) (Rabbit IgG)	Cell Signaling Technology®; Leiden; Niederlande
Protein Assay Kit (Pierce BCA Protein Assay Kit)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Rabbit anti Goat (Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP) (NOX4)	Dako Denmark A/S; Glostrup; Dänemark
RIPA-Puffer nach Abcam (für die Proteinlysate; Lagerung bei 4 °C; gelöst in Aqua dest.)	Abcam plc; Cambridge; Großbritannien 50 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 1 % NP-40; 0,5 % Na-deoxycholat; 0,1 % SDS; Vor Gebrauch dem Puffer Phosphataseinhibitor und Proteinaseinhibitor zugesetzt
TGF- β Antikörper (Recombinant Human TGF- β 1 (HEK293 derived))	PeproTech Inc.; Rocky Hill; USA
Transferpuffer (gelöst in Aqua dest.)	25 mM Tris-Base; pH 8,0-10,5; 192 mM Glycin
Western Marker Antikörper (Roti-Mark WESTERN HRP-Konjugat, anti-WESTERN Marker Antikörper) (Kanninchen)	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Zellkulturmedium	500 ml Dupleccos MEM (Gibco™); 5 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer, Antikörper und KIT-Systeme.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Die Verwendung der humanen primären Fibroblastenkulturen dieser Studie ist von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studiennummer: 3634 der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) genehmigt worden. Die verwendeten Fibroblasten wurden nach etablierten Standardprotokollen aus Hautpräparaten isoliert, welche im Rahmen von chirurgischen Eingriffen anfielen und von den jeweiligen Patienten nach entsprechender Aufklärung und Genehmigung uns zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt wurden.

4.1.1 Zellisolation und Probengenerierung

Die verwendeten humanen Fibroblasten wurden aus Hautpräparaten isoliert und kultiviert, welche in Kooperation mit der Universität Köln im Rahmen von plastischen Eingriffen zur Verfügung gestellt worden sind. Der Transport der Präparate von der Uniklinik Köln in das Labor nach Düsseldorf fand in gekühlten, sterilen Beuteln oder Gefäßen statt.

Für die Isolierung der Zellen wurde zunächst die Haut von dem darunterliegenden Fettgewebe gelöst, in 5 x 5 mm große Quadrate geschnitten und in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend wurde 30 ml Dispase Lösung hergestellt (Zusammensetzung Abschnitt 3.4), in welcher die Hautstücke über Nacht auf dem Taumelrollenmischer bei 4 °C inkubiert wurden. Am darauffolgenden Tag wurden dann aus den Hautpräparaten parallel sowohl Fibrozyten als auch Keratinozyten isoliert.

Dafür wurden zunächst die Hautproben in der Dispase-Lösung für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert und die Reaktion anschließend mit kaltem PBS gestoppt. Die Lösung ist in eine Petrischale geschüttet worden, in welcher die obere graue Phase, die Epidermis, von der restlichen Haut getrennt wurde.

Für die Isolierung der Keratinozyten wurde die Epidermis in ein 50 ml Falcon mit 15 ml 1:3 verdünntem Trypsin/EDTA (1x) gegeben und erneut für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Reaktion mit kaltem FCS gestoppt wurde, sind die Hautstücke durch ein Teflonsieb mit 100 µm Porengröße in ein frisches 50 ml Falcon gestrichen worden. Im letzten Schritt wurde die Suspension für fünf Minuten bei 350 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anhand der Größe des Zellpellets wurden die Zellen auf eine geeignete Anzahl Petrischalen verteilt und in Keratinozytenmedium aufgenommen.

Für die Fibrozyten-Isolierung wurde die restliche Haut, nach Entfernung der Epidermis, in ein 50 ml Falcon mit Kollagenase-Lösung überführt (Zusammensetzung Abschnitt 3.4). Nach dem Zusammenführen der Bestandteile wurde die Lösung gevortext mit anschließender steriler Filtration. Die Hautproben in der Lösung wurden erneut für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und geschüttelt. Im Anschluss wurden auch diese durch ein Teflonsieb mit der Porengröße 100 µm gepresst worden. Nachdem die Proben ebenfalls für fünf Minuten bei 350 g zentrifugiert worden sind, wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet der Größe entsprechend in DMEM 4,5 g Glucose + FCS + P/S in T75 Kulturflaschen überführt und im Brutschrank inkubiert.

4.1.2 Zellernte

Für die Zellernte wurde 1x Trypsin/EDTA-Lösung verwendet. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und je T75-Kulturflasche 5 ml Trypsin/EDTA (1x) Lösung hinzugegeben. Damit wurden die Zellen für etwa fünf Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Das Ablösen der Zellen wurde im Anschluss unter dem Mikroskop kontrolliert und eventuell durch leichtes Schlagen gegen die Kulturflasche (dem sogenannten *Shake off Verfahren*) unterstützt. Alternativ wurden die Zellen mittels Zellschaber vom Boden gelöst. Danach wurde die Reaktion mit der gleichen Menge an FCS-haltigem Medium gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem 50 ml Falcon für fünf Minuten bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet konnte dann je nach Vorhaben weiterverwendet werden.

4.1.3 Zellen „splitten“

Zum „Splitten“ der Zellen waren die ersten Arbeitsschritte identisch mit denen der Zellernte. Darunter versteht man die Subkultivierung der Zellen, indem die Zellen einer Zellkulturflasche auf mehrere Flaschen aufteilt werden, um ein weiteres Wachstum dieser zu ermöglichen. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde ebenfalls der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit neuem Medium wieder aufgenommen. Nachdem das Pellet sich gut gelöst hatte, wurde die Suspension auf die gewünschte Anzahl an T75-Kulturflaschen aufgeteilt und mit der entsprechenden Menge FCS-haltigem Zellkulturmedium aufgefüllt.

4.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl fand mittels Neubauer-Zählkammer statt (siehe Abb. 7). Dazu wurde zunächst das Medium in den Zellkulturflaschen abgesaugt und 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Fibrozyten gegeben. Diese wurde anschließend für mindestens fünf Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, da Trypsin als Serinprotease dort seine größte Aktivität entfaltet. Nach dem Ablösen aller Zellen (Abschnitt 4.1.2) wurde die Reaktion mit der gleichen Menge FCS-haltigem Zellkulturmedium gestoppt. Nach wiederholtem Resuspendieren wurde die Suspension in ein 50 ml Falcon überführt und für fünf Minuten bei 350 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einer entsprechenden Menge, etwa 5 ml, Zellkulturmedium aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden schließlich 10 µl in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 10 µl Trypan-Blau hinzugegeben (Verhältnis 1:1). Hiervon wurden schließlich 10 µl auf die Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen gezählt. Zuvor ist hier ein Deckglas so auf der Zählkammer angebracht worden, dass es fest darauf haftete, wobei vor allem auf das Erscheinen der Newton'schen Ringe geachtet wurde. Zur Bestimmung wurde meist ein Großquadrat ausgezählt und mit folgender Formel auf die Zellzahl pro ml geschlossen.

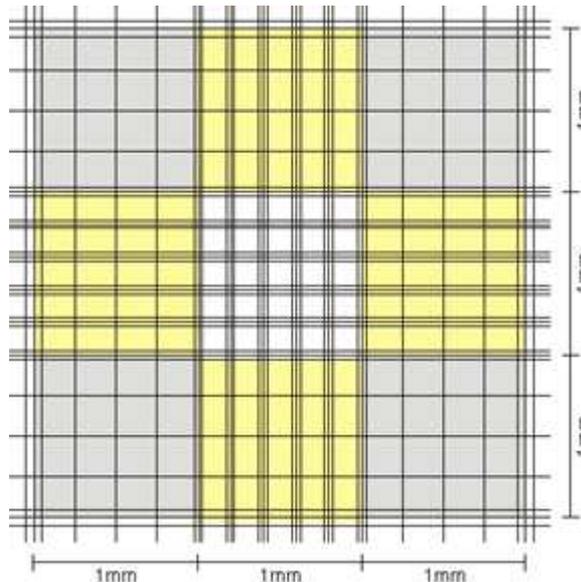


Abb. 7: Neubauer-Zählkammer; Anzahl gezählter Zellen $\times 2 \times 10^4$ = Zellzahl pro ml. Quelle: (Alcibiades, 2006)

4.1.5 Zellen einfrieren – Kryokonservierung

Bei der Kryokonservierung wurden die Fibroblasten in Dimethylsulfoxid (DMSO) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Das dafür verwendete Einfriermedium (Zusammensetzung Abschnitt 3.4), wurde je nach Bedarf immer frisch angesetzt. Außerdem musste, aufgrund der zytotoxischen Wirkung des DMSO bei Raumtemperatur, zügig und auf Eis gearbeitet werden. Vorab fand eine Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer (Abschnitt 4.1.4) statt, da pro Kyroröhrchen und ml Einfriermedium etwa 1 Millionen Zellen eingefroren worden sind. Demnach wurde nach dem Trypsinieren, Zentrifugieren und Auszählen der Zellen die Zellsuspension in der entsprechenden Menge gekühltem Einfriermedium aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde je 1 ml der Suspension in die benötigte Anzahl Kryoröhrchen überführt. Mittels Gefrierbehälter (*Mister Frosty*), welcher 100 % Isopropylalkohol enthält, wurden die Zellen schonend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ konserviert, da mit diesem Verfahren die Zellen um $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Minute heruntergekühlt werden.

4.2 Bestrahlung mit blauem Licht (453 nm)

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit zuvor kalibrierten LED-Lampen der Firma Philips. Die in dieser Arbeit eingesetzte Lampe emittiert blaues Licht im Bereich der Wellenlänge von 453 nm. Es befanden sich 60 LEDs (6 x 10) gleichmäßig verteilt auf einer Gesamtgröße von $10 \times 12\text{ cm}^2$ (siehe Abb. 8).

Über den Abstand zwischen der Lampe und der zu bestrahlenden Fläche konnte sowohl die Bestrahlungsstärke als auch die Intensität reguliert werden. Die elektrische Leistung lag bei 68,87 W und die maximale Intensität bei $23,81\text{ mW/cm}^2$ mit einem Abstand von 3 cm zum bestrahlten Gegenstand. In dieser Arbeit wurde mit einem Abstand von 5 cm gearbeitet, was der Intensität von $20,7\text{ mW/cm}^2$ entsprach.

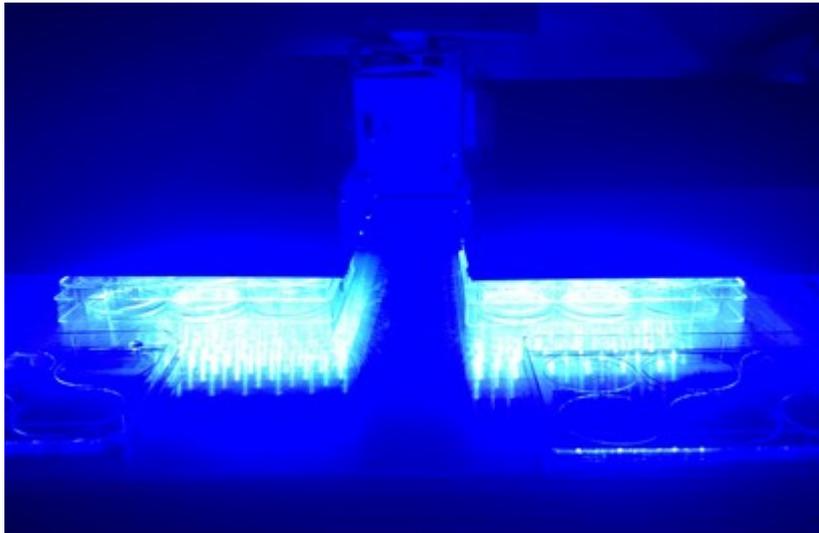


Abb. 8: LED-Array mit einer Wellenlänge von 453 nm (Firma Philips) (5 cm; 20,7 mW/cm²).

In dieser Arbeit wurden die humanen dermalen Fibroblasten je nach Protokoll entweder einmalig oder über einen Zeitraum von drei Tagen mit unterschiedlicher Dosis (20 J/cm² (16,6 Min.), 40 J/cm² (33,3 Min.), 80 J/cm² (66,6 Min.)) bestrahlt. Für die Dauer der Bestrahlung wurde das Kulturmedium abgesaugt und die entsprechende Menge an PBS (+ Ca²⁺; + Mg²⁺) hinzugegeben, angepasst an die Größe des Wells und das verwendete Kulturgefäß. Danach wurden die Zellen mittig unter die LED-Lampe gestellt, während die Zellen der Kontrollgruppe für die gleiche Zeit unter der sterilen Werkbank standen. Somit wurde versucht, über alle Versuche hinweg möglichst analoge Versuchsbedingungen zu schaffen.

4.3 DNA-Bestimmung mittels NanoDrop

Die Methode der DNA-Bestimmung via NanoDrop findet bei diversen Versuchsansätzen Anwendung. Zum Beispiel, um die umgesetzte Menge eines Stoffes in ein Verhältnis mit der zugrundeliegenden Zellzahl zu setzen. Dabei wurden im Anschluss an die Probenentnahme die Zellen isoliert und als trockenes Pellet bei -80 °C eingefroren.

Für die DNA-Bestimmung wurden die Zellpellets langsam aufgetaut, mit 300 µl kochendem Aqua dest gelöst und bei starker Intensität auf den Vortex gehalten. Alternativ wurde normaltemperiertes Aqua dest verwendet, das Pellet gelöst, gevortext und für zehn Minuten bei 95 °C auf den Heizblock gestellt. Anschließend wurde die Suspension in den Quia-Shredder überführt und für zwei Minuten bei 350 g zentrifugiert.

Um einen Zellaufschluss herbeizuführen wurden die Zellen sonifiziert. Dabei werden via hoch-energetischem Ultraschall rasche Druckänderungen erzeugt, welche zu einer Zerstörung der Zellwände und Membranen führen. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert, aufgrund der hohen Energie und Wärmeerzeugnisse während des Vorganges.

Schließlich wurden je 2 x 2,0 µl jeder Probe in Doppelbestimmung mittels NanoDrop gemessen. Zur Kalibrierung wurde vorher eine 2,0 µl Probe Aqua dest gemessen. Bei geöffneter Klappe wurde die Probe auf den Vorsatz pipettiert und anschließend wieder geschlossen. Es entstand eine Säule und das Gerät adjustierte automatisch für optimale Messbedingungen.

4.4 Proteinbestimmung (BCA Protein Assay)

Bevor die Methodik des Western Blots durchgeführt werden konnte, musste hierfür obligat eine Bestimmung der Proteinkonzentration stattfinden, da die Fibroblasten für diesen Versuch über mehrere Tage kultiviert worden sind und jeweils ein individuelles Wachstum aufwiesen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mittels Biocinonic-Assay (BCA) der Firma Thermo Fisher durchgeführt. Diese Reaktion lief in zwei Schritten ab und mit einem zuvor hergestellten Standard wurde schließlich die Proteinkonzentration der Proben photometrisch ermittelt.

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

Tabelle 5: Pipettierschema des BSA-Standards zur Bestimmung der Proteinkonzentration.

Der erste Teil der Reaktion war die Biuret-Reaktion, bei der es im alkalischen Milieu zur Chelatbildung, also einer Komplexbildung von Kupfer (Cu^{2+} -Ionen) und Proteinen, kommt. Dabei entstand ein hellblauer Komplex. In einem zweiten Reaktionsschritt reagierte dann die Biocininsäure mit den im ersten Schritt von Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduzierten Kupferkation. Dabei bildete sich ein Komplex zwischen zwei Moleküle der Biocininsäure und einem Cu^{1+} -Ionen. Dieser Komplex war ein violetter, wasserlöslicher Farbstoff, welcher bei 562 nm sein Absorptionsmaximum hat.

Zunächst wurden die sich in RIPA Puffer befindenden Proben zehn Sekunden sonifiziert und anschließend im Verhältnis von 1:6 mit PBS (20 µl) verdünnt. Sowohl die verdünnten Proben als auch der vorher angesetzte Proteinstandard (Tabelle 5) wurden dann in Doppelbestimmung in eine 96-Well Mikrotiterplatte mit je 10 µl/Well pipettiert. Im Anschluss wurde das sogenannte Working Reagenz (je 200 µl) in jedes mit Probe versehene Well hinzugegeben. Dieses besteht aus Reagent A, der Biocinonsäure, und Reagent B, 4 %-igem Kupfersulfat, welches zuvor in einem Verhältnis von 50:1 (A:B) miteinander gemischt wurde. Nach Zugabe des Working Reagenz wurde die Platte abgeklebt und unter lichtgeschützten Bedingungen für etwa 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mittels Victor die Absorption photometrisch bei 562 nm gemessen und mit Hilfe des Workout Programms die Proteinkonzentration ermittelt.

4.5 Western Blot Analyse

4.5.1 Stimulation der Zellen mit TGF- β 1 (Differenzierung & Inkubation)

Zusätzlich zu den zuvor beschriebenen einmaligen Bestrahlungen, sind die Fibroblasten in diesem Versuchsansatz über Intervalle von drei Tagen mit jeweils 20 J/cm², 40 J/cm² und 80 J/cm² bestrahlt worden. Außerdem wurden sie während dieser Zeit mit TGF- β 1 als Zusatz kultiviert und inkubiert, welches die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten einleitete (Tabelle 6).

Die Fibroblasten wurden ebenfalls 24 Stunden vor der Bestrahlung auf 12-Well Platten ausplattiert ($0,5 \times 10^5$ /ml) und jeweils 24 Stunden nach der dreitägigen Bestrahlung geerntet. Das Zellpellet wurde dann mit 30 μ l RIPA Puffer für die Western Blot Untersuchung bei -80 °C eingefroren.

Zusatz	Konzentration	Zeitpunkt der Zugabe	Inkubationsdauer
TGF- β 1	5 ng/ml	Unmittelbar nach der Bestrahlung	24 Std.

Tabelle 6: Auflistung des TGF- β 1 Zusatz mit der entsprechenden Konzentration, Zugabe-Zeitpunkt und Inkubationsdauer.

4.5.2 Das Western Blot Verfahren

Zum Nachweis von relevanten Proteinen für die Differenzierung und den Stoffwechsel wurde eine semi-quantitative Messung der exprimierten Proteine mittels Western Blot Analyse durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran und anschließender Detektion unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern. Für diese Vorgänge werden außerdem verschiedene Puffersysteme benötigt (Tabelle 7).

Gel/Puffer	Zusammensetzung
Laemmli - Puffer	4x Tris-glycin-SDS sample Buffer 252 mmol TrisHCL pH 6,8 40 % Glycerin 8 % SDS 0,01 % Bromphenolblau + 20 % Mercaptoethanol
Mini-Protean TGX Stain-Free Precast Gels	4-20 %, 15-well comb, 15 μ l/well; Cat. #456-8096; Bio-Rad
Laufpuffer (10x Puffer)	30,3 g Tris (pH 8,3-8,8) (Endkonzentration in 1x Puffer: 25 mM) 144,2 g Glycin (Endkonzentration in 1x Puffer: 192 mM) 10 g SDS (Endkonzentration in 1x Puffer 0,1 %)

	Ad 1000 ml H ₂ O Gebrauchsfertiger Puffer 10x Puffer 1:10 in Aqua dest
Tris-Glycin Transferpuffer (25x Puffer)	18,2 g Tris Base (Endkonzentration in 1x Puffer: 12 mM) 90 g Glycin (Endkonzentration in 1x Puffer 96 mM) 500 ml H ₂ O
Blotting Puffer	60 ml Tris-Glycin Transferpuffer 75 ml Methanol 750 ml H ₂ O

Tabelle 7: Auflistung der für den Western Blot benötigten Gele und Puffer und deren spezifische Zusammensetzung.

Das standardisierte Verfahren des Western Blots bezeichnet die Übertragung von Proteinen auf eine Membran. Bevor dies geschieht, wurden die zu untersuchenden Proteine, welche vorher durch eine Proteinbestimmung quantifiziert worden sind (Abschnitt 4.4), durch die Technik der Gel-Elektrophorese getrennt. Diese Auftrennung erfolgte entsprechend der Größe der Proteine. Anschließend wurden die elektrophoretisch getrennten Proteine via Protein-Blotting auf eine Membran übertragen. Der Erfolg der Übertragung konnte durch die Ponceau-Färbung überprüft werden bevor es dann zum Nachweis der Proteine mittels Immunmarkierung kam.

4.5.3 Probenvorbereitung

Die für den Western Blot benötigten Proben wurden wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben eingefroren. Diese Proben wurden mit Hilfe der Daten der Proteinbestimmung auf eine einheitliche Konzentration von 10 µg Protein mit Aqua dest verdünnt. Jede Probe wurde anschließend mit 4 µl Laemmli-Puffer (4:1) versehen und für fünf Minuten bei 95 °C gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Im Anschluss wurden die Proben und der Western Marker auf Eis gelagert und in die jeweiligen Taschen des Gels pipettiert. Zur Orientierung und um später eine genaue Einordnung der Proteine zu ermöglichen, wurde der Western Marker (Proteinleiter) jeweils in die erste Tasche pipettiert.

4.5.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Um die Proteine der Proben nach ihrer Größe zu trennen, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt. Wichtig hierbei war, der den Proben vorher hinzugegebene Laemmli-Puffer. Dieser enthielt SDS, welches eine denaturierende Wirkung auf Proteine hat und deren nicht-kovalenten Bindungen zerstört. Außerdem wurde die Eigenladung der Proteine überdeckt, sodass dadurch alle identisch negativ geladen sind.

In diesem Fall wurden gekaufte 4-20%ige Gele von Bio-Rad verwendet, da die zu detektierenden Proteine beziehungsweise Antikörper sehr unterschiedliche Größen aufwiesen. Auch diese Gele bestanden aus einem Trenn- und einem Sammelgel, wobei das Sammelgel die Proteine an der Grenze zum Trenngel konzentrierte und das Trenngel diese schließlich nach ihrer Ladung aufgetrennt hat.

Nachdem die Gele eingespannt, der Kamm entfernt und die Wanne mit Elektrophorese-Puffer gefüllt worden sind, wurden die vorbereiteten Proben inklusive Western Marker (je

12 µl) in die Taschen pipettiert. Anschließend wurde der Deckel geschlossen und zunächst eine Spannung von 65 V für etwa 15-30 Minuten angelegt. Die Spannung wurde dann auf 120 V erhöht für weitere 30 Minuten oder solange gewartet, bis die Proben durch das Gel gelaufen waren.

4.5.5 Das Blotting

Der Blotting-Vorgang ist eine Übertragung von Proteinen in einem Gel auf eine Membran, wodurch diese schließlich für weitere Methoden zugänglich gemacht werden. Hierfür wurde eine PVDF-Membran verwendet. Diese wurde vor Verwendung in dem Blotting-Puffer, welcher Methanol enthält, aktiviert, um die Hydrophobie zu mindern und Zugänglichkeit zu verbessern. Anschließend wurde das Gel auf der Membran platziert und zwischen zwei Whatman Papieren in einer Kassette geschichtet (Abb. 9). Diese wurde anschließend in die Trans-Blot Turbo-Apparatur der Firma BioRad eingelegt und eine Spannung von 25 V und 2,5 A für 20 Minuten angelegt. Bei diesem Vorgang gelangten die Proteine aus dem Gel auf die darunterliegende Membran.

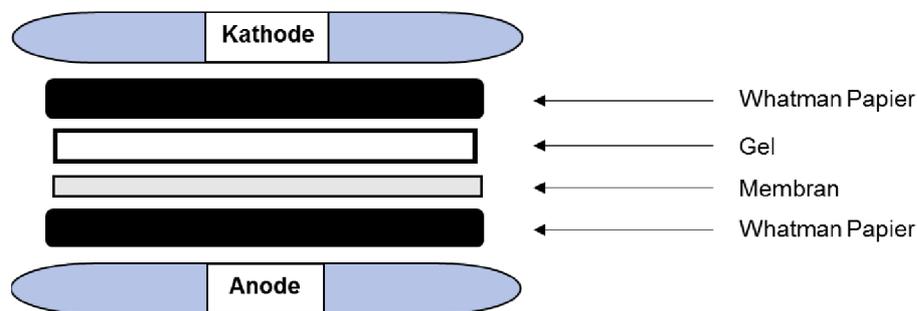


Abb. 9: Aufbau der Western-Blot-Kassette. Das gegossene Gel und die Membran liegen zwischen den beiden Whatman Papieren. Alle Bestandteile werden zunächst mit Puffer befeuchtet.

Der Erfolg des Blotting-Vorgangs konnte schließlich mittels Ponceau-S-Färbung überprüft werden. Der Farbstoff band reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen aller membrangebundenen Proteine. Dazu wurde die PVDF-Membran nach Abschluss des Blottings in eine saubere Schale überführt und mit der Ponceau-S-Lösung übergossen. Für eine genauere Darstellung der Proteinbanden wurde die Ponceau-S-Lösung mit Wasser abgespült. Vor der anschließenden spezifischen Immunodetektion einzelner Proteine wurde die Membran mittels TBS-T (*Tris Buffer Saline mit Tween*) wieder komplett entfärbt.

4.5.6 Immunodetektion

Im Rahmen der Immunodetektion können spezifische Proteine mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Die verwendeten Antikörper mit ihren Konzentrationen sind unter Abschnitt 4.5.7 zu finden (Tabelle 8). Das Verfahren besteht in etwa aus zwei Schritten.

Zunächst wurde die mit Proteinen beladene Membran mit 5 % BSA geblockt, um alle unspezifischen Bindungen zu besetzen. Dies wurde entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Anschließend erfolgte direkt die Inkubation mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4 °C. Dieser band dann spezifisch an den gewünschten Antigenen.

Nach der Inkubation wurde der Blot drei Mal für etwa fünf Minuten mit TBS-T im Dunkeln gewaschen, um die restlichen, ungebundenen Antikörper zu entfernen. In dem zweiten Schritt wurde dann die Membran mit dem Zweitantikörper sowie dem anti-Western-Marker (1:1000 in TBS-T gelöst) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der zweite Antikörper war gegen den primär verwendeten Antikörper gerichtet und mit einem Enzym gekoppelt, welches schließlich die Farbentstehung und Detektion mittels Immunfluoreszenz möglich machte. Auch nach diesem Schritt wurde die Membran drei Mal

für fünf Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend für 30 Minuten in TBS auf den Schüttler gestellt.

Zur Detektion der Antikörper wurden die Membranen zunächst mit Entwicklerlösung beschichtet und in das Western Blot Imaging Gerät gelegt. Die markierten Proteinbanden wurden dann mittels UV-Licht detektiert. Um eine spätere densitometrische Auswertung mit der Software ImageLab zu ermöglichen, wurden die Ergebnisse photographisch festgehalten. Für eine mögliche erneute Verwendung der Blots wurden diese lichtgeschützt bei 4 °C in TBS aufbewahrt.

4.5.7 Antikörper

Antikörper	Art	Größe	Verwendung
α -SMA	Monoklonal, Maus	38 kDa	1:1000 in BSA (5 %)
FoxO1	Monoklonal, Kaninchen IgG	78-82 kDa	1:1000 in BSA (5 %)
GAPDH	Monoklonal, Maus	36 kDa	1:5000 in BSA (3 %) direkt gekoppelt an Rhodamine
Nrf2	Monoklonal, Kaninchen IgG	97-100 kDa	1:1000 in Milchsäure
NOX4	Monoklonal, Maus	70 kDa	1:1000 in BSA (5 %)

Tabelle 8: Auflistung der im Western Blot verwendeten Antikörper und deren Eigenschaften.

4.6 Celltiter Blue Assay

Für die Durchführung des Celltiter Blue Viability Assays wurden 1×10^5 Zellen/ml/Well in 6-Well Platten ausplattiert, jeweils 24 Stunden vor der Bestrahlung. Die Bestrahlung fand mit 20 J/cm^2 , 40 J/cm^2 und 80 J/cm^2 und in 1 ml PBS (+ Ca^{2+} ; + Mg^{2+}) statt. Währenddessen wurde das CTB-Medium im Verhältnis 1:20 (1 ml CTB + 19 ml Zellkulturmedium) angesetzt. Im Anschluss an die Behandlung wurde das PBS wieder abgesaugt und je 1 ml CTB-Medium zum entsprechenden Messzeitpunkt nach Bestrahlungsende hinzugegeben. Damit wurden die Zellen dann für 60 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 in Dunkelheit inkubiert.

Für die anschließende Messung wurden $3 \times 100 \mu\text{l}$ auf eine 96-Well Platte überführt und mittels Victor (Programm: Wallac) die Absorption bei 540 nm gemessen. Dabei ist ein Blank zu jeder Messung entsprechend mitgeführt worden. Die Messungen erfolgten unmittelbar sowie eine, vier und 24 Stunden nach der Bestrahlung.

Der restliche Überstand des CTB auf der Platte wurde abgesaugt und die Zellen trypsinisiert, abgelöst und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen trocken bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren, sodass im Anschluss eine DNA-Messung gemacht werden konnte. Die gemessene Fluoreszenz wurde schließlich auf die DNA-Menge im entsprechenden Well normiert.

4.7 MTT-Assay

Der MTT-Assay (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*) der Firma Sigma Aldrich diente der Untersuchung der Zellviabilität durch Bestimmung der metabolischen Aktivität. Dabei wurde das wasserlösliche, gelbe Tetrazoliumbromid (MTT) in die Mitochondrien vitaler Zellen

aufgenommen und dort durch mitochondriale Dehydrogenasen gespalten, wodurch Formazan entstand. Dieses wasserunlösliche, stark blaue Formazan konnte in dieser Form die Zelle nicht mehr verlassen, sodass dieser Farbstoff nach der Zellyse und Zugabe eines organischen Lösungsmittels quantitativ bestimmt werden konnte. Folglich war die Menge des gebildeten Formazans proportional zur Anzahl der vitalen Zellen.

Das MTT wurde in der Konzentration von 5 mg/ml in PBS gelöst und als Stammlösung bei 4 °C im Dunkeln gelagert aufgrund der Lichtempfindlichkeit. Daraus wurde zunächst die Gebrauchslösung angesetzt, indem die Stammlösung 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt wurde. Der Versuchsansatz fand in durchsichtigen 96-Well Mikrotiterplatten statt, mit je 1×10^4 Zellen/Well, welche wieder 24 Stunden vor der Bestrahlung ausgesät worden sind. Die anschließende Bestrahlung mit 20 J/cm², 40 J/cm² und 80 J/cm² wurde in 100 µl PBS (+ Mg²⁺, + Ca²⁺) durchgeführt und die Messung der Absorption erfolgte je null, einer, zwei, vier, sechs und 24 Stunden nach Bestrahlungsende.

Zur Durchführung des Assays wurden nach Ende der Bestrahlung je 100 µl MTT-Gebrauchslösung zum entsprechenden Messzeitpunkt in jedes bewachsene Well pipettiert und jeweils zwei Blank-Wells mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde der Überstand entfernt und je 200 µl DMSO pro Well hinzugegeben, damit das blaue Formazan wieder aus den Zellen gelöst und für eine quantitative Messung zugänglich gemacht werden konnte. Nachdem die Platte für weitere zehn Minuten inkubiert worden ist, wurde der Überstand auf eine neue 96-Mikrotiterplatte pipettiert, in welcher schließlich die Messung stattfand. Dabei wurde mit Hilfe des Wallac-Programms des Victors bei einer Wellenlänge von 540 nm die Absorption gemessen, wobei die Menge des Formazans und damit die Dichte proportional zur Anzahl der lebenden Zellen war.

4.8 Neutral Rot Messung

Der Neutral-Rot Assay wurde ebenfalls zur Bestimmung der Zellviabilität beziehungsweise für die Messung der relativen Anzahl an Zellen angewandt. Dabei wurde der Farbstoff durch Endozytose und Diffusion in die Lysosomen vitaler Zellen aufgenommen und hat dort an die anionischen Reste der lysosomalen Membran gebunden. Durch das saure Milieu in den Lysosomen mit einem pH-Wert von fünf wurde Neutralrot zum Ion, färbte sich rot und konnte so das Lysosom nicht mehr verlassen („Ionenfalle“). Waren die Zellen durch die Bestrahlung beeinträchtigt, konnte es sowohl zu einer Veränderung der Zellmembran als auch der lysosomalen Membran kommen, sodass diese Zellen weniger Farbstoff aufgenommen haben.

Für diesen Assay wurden je vier Spender auf 12-Well Platten a zwei Wells pro Spender ausplattiert. Demnach gab es für jede Bestrahlungsintensität (20 J/cm², 40 J/cm² und 80 J/cm²) und jeden Messzeitpunkt (null, eins, zwei, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende) eine eigene Platte. Im Rahmen dieses Versuchsansatzes wurde nur eine Kontrolle mitgeführt, welche für den Bestrahlungszeitraum von 66,6 Minuten (80 J/cm²) unter der Sterilbank stand. Zur Herstellung des Neutralrot-Mix wurde die Neutralrot-Lösung 1:100 mit Zellkulturmedium verdünnt, folglich 1 ml Neutralrot-Lösung auf 99 ml DMEM.

Nachdem in 0,5 ml PBS (+ Mg²⁺, + Ca²⁺) /Well bestrahlt worden ist, wurde zum entsprechenden Messzeitpunkt 0,5 ml des Neutralrot-Mix pro Well hinzugegeben. Damit wurden die Zellen für 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und die Zellen trocken im Dunkeln gelagert.

Für die Durchführung des Assays wurde eine Isopropanol-Lösung (Zusammensetzung Abschnitt 3.2) angesetzt. Von dieser Lösung wurden 0,5 ml in jedes Well pipettiert und

anschließend für fünf bis zehn Minuten auf den Schüttler gestellt, bis sich der Farbstoff des Neutralrot aus den Zellen gelöst und gleichmäßig verteilt hatte. Die Messung der Absorption erfolgte bei 540 nm mittels Victor und dem Programm Wallac.

4.8.1 Lyso Tracker

Mit dem LysoTracker der Firma *Cell Signaling Technologie* konnten die Lysosomen von vitalen Zellen angefärbt werden. Dabei handelte es sich um einen zell-permeablen, grünen Farbstoff, welcher sich in den sauren Kompartimenten lebender, nicht fixierter Zellen, den Lysosomen, anreicherte.

Nach der einmaligen Bestrahlung der Zellen mit 40 J/cm^2 wurde jeweils null, eins, zwei, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende der LysoTracker Farbstoff auf die Zellen gegeben und direkt via Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und dokumentiert. Dazu wurden $1,1 \mu\text{l}$ des Farbstoffes in $20,9 \text{ ml}$ Zellkulturmedium gelöst.

4.9 Glucose-Glo-Assay

Um den Stoffwechsel der Fibroblasten detaillierter und die durch die Bestrahlung ausgelösten Veränderungen genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich der Glucose-Verbrauch im Medium der Zellen mittels Luminzenssens-Assay gemessen.

Die Glucose Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Glucose unter Verbrauch von NAD^+ zu NADH . In Anwesenheit von NADH reduziert die Reduktase pro-Luciferin zu Luciferin unter Verbrauch von NADH zu NAD^+ . Luciferin wurde dann unter Reaktion von Luciferase und ATP in Form von Licht detektiert (siehe Abb. 10). Die Menge an produziertem Licht war proportional zu der Menge an Glucose in der Probe. Es sind jeweils $10 \mu\text{l}$ des Glucose-reduzierten Mediums für die Messung entnommen worden, sodass die gemessenen Werte den verbleibenden Glucose-Gehalt im Medium widerspiegeln.

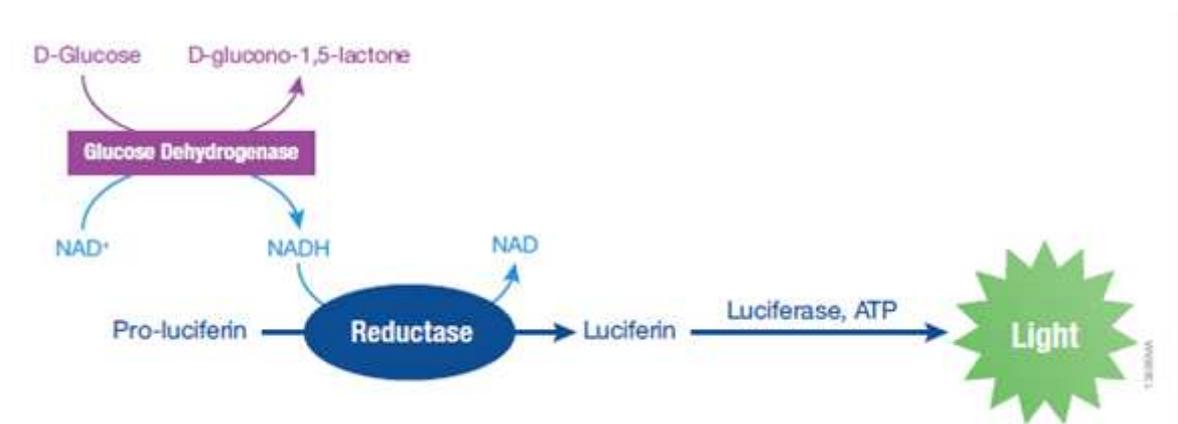


Abb. 10: Funktionsweise des Glucose-Glo Assays. Quelle: (Promega Corporation, 2017)

Für den Assay wurden 1×10^5 Zellen/ml/Well auf 6-Well Platten in Glucose-reduziertem DMEM ($1,0 \text{ g/L}$ Glucose + PS + FCS + Glutamin) 24 Stunden vor der Bestrahlung ausplattiert. Die Bestrahlung mit 20 J/cm^2 , 40 J/cm^2 und 80 J/cm^2 fand auch hier in 1 ml/Well PBS (+ Mg^{2+} , + Ca^{2+}) statt mit je einer entsprechenden Kontrolle unter der Sterilbank. Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die Zellen erneut mit Glucose-reduziertem DMEM inkubiert. Zum entsprechenden Messzeitpunkt, also null, eins, zwei, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende, wurden jeweils $10 \mu\text{l}$ des Überstandes abgenommen und mit $190 \mu\text{l}$ PBS gemischt. Diese Emulsion wurde bis zur Durchführung des Assays bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die Zellen wurde schließlich geerntet (Abschnitt 4.1.2), sodass die DNA-

Bestimmungen durchgeführt (Abschnitt 4.3) und die Werte des Glucose-Assays darauf normiert werden konnten.

Das Assay wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Das Glucose Detections Reagent sowie der Standard wurden immer frisch angesetzt. 50 µl der eingefrorenen Proben wurden auf eine 96-Well Platte überführt, mit 50 µl des Glucose Detections Reagent gemischt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Lumineszens bei einer Wellenlänge von 562 nm mittels Workout-Programm gemessen.

4.10 ATP-Assay

Mittels des zeitstabilen ATP-Detektions-Kits der Firma Biaffin GmbH & Co KG wurde die quantitative Menge an ATP bestimmt. Bei diesem Biolumineszenz Assay wurde das Substrat Luciferin in einer ATP-abhängigen Reaktion durch die Luciferase oxidiert und Chemilumineszenz bei einer Wellenlänge von 560 nm generiert.



Es wurden 1 x 10⁵ Zellen/ml/Well Fibroblasten einen Tag vor der Bestrahlung in 6-Well-Platten ausgesät. Die anschließende Bestrahlung mit 20 J/cm², 40 J/cm² und 80 J/cm² erfolgte in 1 ml PBS (+ Mg²⁺, + Ca²⁺) und eine entsprechende Kontrolle befand sich jeweils für den gleichen Zeitraum unter der Sterilbank. Die Zellen wurden entsprechend der verschiedenen Messzeitpunkte null, zwei, vier, sechs und 24 Stunden nach Bestrahlungsende aus dem Well gelöst. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und für fünf Minuten bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 300 µl kochendem destilliertem Wasser resuspendiert und gelöst, was zum Aufbrechen der Zellmembranen führte. Im Anschluss wurde die Suspension in die Qia Shredder überführt und erneut für zwei Minuten bei 350 g zentrifugiert, wodurch ein homogenes Zelllysat entstand. Dieses wurde für die darauffolgende ATP Messung bei -80 °C gelagert.

Für die Durchführung des Assays wurden zunächst der Standard und die Stock-Lösungen wie im Herstellerprotokoll beschrieben angesetzt. Für die Herstellung des Standards wurde ATP der Firma Sigma Aldrich mit einer Höchstkonzentration von 20 µM (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 µM) verwendet. Zeitgleich wurden die zuvor eingefrorenen Proben langsam aufgetaut und sonifiziert. Je 50 µl jeder Probe wurden in Doppelbestimmung auf eine weiße 96-Well Platte pipettiert und mit 50 µl D-Luciferin Lösung (*Reaction Mix*) gemischt. Diese Suspension wurde daraufhin im Dunkeln inkubiert und die Chemilumineszenz nach zehn und 30 Minuten bei 560 nm mit dem WorkOut Programm gemessen. Das Programm berechnete automatisch die ATP-Menge pro Well anhand des Standards. Die gemessene Menge ATP wurde mit der Molmasse von ATP (507,8 nM) verrechnet und dann auf die Zellzahl normiert, durch DNA-Messung mittels Nano-Drop, um so die ATP-Konzentration pro Zelle zu erhalten.

4.11 Glutathion-Analyse

Glutathion spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung schädlicher Stoffe im Körper, indem es freie Sauerstoffradikale bindet und ausscheidbar macht. Außerdem hilft es bei der Strukturgebung von Proteinen sowie bei Entwicklungs- und Alterungsprozessen. Als Tripeptid besteht es aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein und kann unter ATP-Verbrauch aus diesen gebildet werden.

Um einen Überblick zu bekommen, inwiefern diese wichtigen Enzyme durch die Bestrahlung beeinflusst werden, wurden drei verschiedene Assays durchgeführt. Bei allen Assays wurden die Zellen mit 40 J/cm² und 80 J/cm² bestrahlt und jeweils null, vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende geerntet.

4.11.1 Glutathion Colorimetric Detection Kit

Dieser Assay wurde entwickelt, um die Menge an reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) in Proben zu messen. Dazu wurde ein kolorimetrisches Substrat benutzt, welches mit der freien Thiol Gruppe des GSH reagiert und das Produkt ein Farbsignal erzeugt.

Bei dem *Glutathion Colorimetric Detection Kit* wurde 5 % SSA 1:5 mit Assay Buffer verdünnt und jeweils 200 µl auf die Pellets der zuvor bestrahlten Zellen gegeben. Im Anschluss wurden diese wieder für zehn Sekunden sonifiziert und unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Ebenso wurde hier der Überstand für die folgende Durchführung des Kits eingefroren.

Für die Durchführung des Assays musste vorher das *Colorimetric Detection Reagent* und der *Reaction Mix* angesetzt werden. Es wurden zunächst je 50 µl jeder Probe sowie des Standards in eine 96-Well Platte pipettiert und 25 µl des *Detection Reagent* hinzugegeben. Im Anschluss wurden je 25 µl des *Reaction Mix* zu jedem Well hinzugegeben und die Platte für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Absorption bei 405 nm erfolgte dann mit Hilfe des Workout Programms.

4.11.2 Glutathion Peroxidase Assay Kit

Die Glutathion Peroxidase repräsentiert eine Enzym-Familie mit Peroxidase Aktivität, deren Hauptaufgabe es ist, den Organismus vor oxidativem Stress zu schützen. Es verhindert die Lipidperoxidation, indem es freie Radikale unschädlich macht. Folgende Reaktion wird durch die Glutathion Peroxidase katalysiert:



Das Glutathion Peroxidase Assay Kit hat direkt den NADPH Verbrauch innerhalb der genannten Reaktion gemessen. Die schließlich gemessene Abnahme der optischen Dichte bei 340 nm war direkt proportional zur Enzymaktivität in der Probe.

Zur Durchführung des Glutathion Peroxidase Assays wurden dafür die Pellets der geernteten Zellen in 200 µl kaltem PBS aufgenommen. Jede Probe wurde sonifiziert und für zehn Minuten bei 4 °C und 350 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und für die Messung eingefroren.

Der Assay wurde schließlich nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 10 µl jeder Probe sowie eines Standards und der Hintergrundkontrolle in eine 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurden 90 µl eines Working Reagent sowie weitere 100 µl der 1X Substrat Solution hinzugegeben und zum Zeitpunkt null, fünf und zehn Minuten nach Zugabe der Substratlösung mittels Workout Programm gemessen.

4.11.3 Glutathion Reductase Fluorescent Activity Kit

Mit dem fluoreszenten *Glutathion Reductase Activity Kit* konnte direkt die Aktivität der Glutathion Reduktase in den Proben gemessen werden. Das Kit enthielt ein nicht-fluoreszentes Molekül, welches durch kovalente Bindung an das Thiol Produkt der Reaktion zwischen Substrat GSSG und Glutathion Reduktase ein Fluoreszenzsignal (nach Protokoll: Emission 510 nm; Excitation 390 nm) erzeugte. Die Glutathion Reduktase ist ein 100-120 kDa großes, dimeres Flavoprotein, welches die Reduktion von oxidiertem Glutathion

(GSSG) zu reduziertem Glutathion katalysiert. Dessen Aufgabe ist es, die Zelle vor oxidativem Stress zu schützen.

Für das Glutathion Reductase Fluorescent Activity Kit wurden die Pellets nach der Bestrahlung mit je 200 µl 1x Assay Buffer versehen. Auch diese wurden anschließend sonifiziert und für zehn Minuten bei 4 °C und 350 g zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand abgenommen und für die Messung eingefroren.

Um das Assay durchzuführen wurde zunächst der Standard und das *Detection Reagent* nach Herstellerangaben angesetzt. Danach wurden 25 µl jeder Probe und des Standards in eine 96-Well Platte pipettiert und anschließend je 15 µl *Detection Reagent* hinzugegeben. Nach der Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenz Emission bei 535 nm und Exzitation 355 nm mittels Workout Programm gemessen. Danach wurden weitere 25 µl oxidiertes Glutathion und 25 µl NADPH in jedes Well pipettiert und erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde erneut die Fluoreszenz gemessen.

4.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5.0. Dabei wurde zunächst auf eine Normalverteilung der Werte getestet. Lag eine Normalverteilung vor, wurde der *Repeated-measure ANOVA* (in Einzelfällen der *Two-way ANOVA* mit anschließendem *Bonferroni post-Test*) angewandt. Bei nicht-normalverteiltem Datensatz wurde der *Friedman-Test* oder *Kruskal-Wallis Test* durchgeführt.

Es erfolgte eine statistische Beratung bei Frau Dr. rer. medic. Veronika Müller am Institut für systemische Neurowissenschaften der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Diese fand am 15.03.2019 um 14 Uhr persönlich und bei Nachfragen im Verlauf per E-Mail statt.

5 Ergebnisse

Um den Einfluss von blauem Licht auf die Proliferation, die Differenzierung und den Stoffwechsel von Fibroblasten zu untersuchen, wurden humane dermale Fibroblasten aus Hautpräparaten verwendet und mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm in unterschiedlichen Dosen bestrahlt. Wie bereits in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, galt eine tägliche Bestrahlung mit 80 J/cm² als subletale Dosis und erzielte den stärksten Effekt der Proliferations- und Differenzierungshemmung (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017).

Zu Beginn der Versuche erfolgte eine Adjustierung und Berechnung der Bestrahlungsintensität, sodass bei einem Abstand von 5 cm zwischen der Lampe und der Platte eine maximale Intensität von 21 mW/cm² erzeugt wurde. Dementsprechend wurde eine Bestrahlungsdosis von 20 J/cm² bei einer Bestrahlungszeit von 16,6 Minuten erreicht, sowie 40 J/cm² bei einer Zeit von 33,3 Minuten und 80 J/cm² bei 66,6 Minuten.

In dieser Arbeit wurden über alle Versuchsansätze hinweg mehrere Bestrahlungsdosen gewählt. Damit sollten die Effekte der unterschiedlich starken Bestrahlung auf die Zellen und deren Reaktion bestmöglich abgebildet werden. Somit könnte schließlich das optimale therapeutische Fenster mit den entsprechenden, wünschenswerten Effekten auf die Zellen gefunden und eine weitere Optimierung sowohl der präklinischen Versuche als auch der klinischen Anwendung in Zukunft ermöglicht werden.

5.1 Western Blot Analyse der Expression verschiedener Gene der Myofibrogenese und des oxidativen Stoffwechsels nach 3-tägiger Bestrahlung mit blauem Licht

In der folgenden Versuchsreihe wurde mittels Western Blot der Einfluss der Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda = 453 \text{ nm}$) auf die Proteinexpression verschiedener Marker der Myofibrogenese und des oxidativen Stoffwechsels untersucht. Der Versuchsablauf war bei der Messung aller Marker identisch.

Hierfür wurden die Zellen über drei Tage mit jeweils 20 J/cm², 40 J/cm² und 80 J/cm² täglich bestrahlt sowie je eine entsprechende Kontrolle mitgeführt (siehe Absatz 4.2). Zudem wurde ein Teil der Zellen ab dem Zeitpunkt der Ausplattierung mit TGF- β 1 kultiviert, um die Differenzierung der Fibroblasten einzuleiten. Ebenso wurde auch hier eine Kontrollgruppe mitgeführt, in welcher die Zellen nicht mit TGF- β 1 behandelt worden sind. Anschließend wurden die Western Blots mit den entsprechenden Antikörpern versehen, photographisch dokumentiert und densitometrisch mittels ImageLab Software ausgewertet. Hierbei wurden die Proben jeweils auf die unbehandelte und unbestrahlte Kontrolle der entsprechenden Bestrahlungsdosis normiert.

Als Referenz wurde bei jedem Blot eine GAPDH-Bande (*Housekeeping Gene*) mitgeführt und bestimmt, um die Daten der verschiedenen Spender und deren Proteine schließlich in ein Verhältnis miteinander setzen und somit kleinere experimentelle Variationen im Versuchsablauf minimieren zu können.

5.1.1 Western Blot Analyse der Proteine Nrf2, FoxO1, NOX4, α -SMA und GAPDH

Die Darstellung der Western Blot Banden der Proteine Nrf2, FoxO1, NOX4, α -SMA und GAPDH erfolgte nach der Immunodetektion mittels Western Blot Imaging Gerät (Abb. 11). Die Proteine wurden ihrer Größe entsprechend von unten nach oben aufgetragen, beginnend mit GAPDH (36 kDa) und endend mit Nrf2 (100 kDa).

Wie bereits zuvor erwähnt, wurden humane dermale Fibroblasten über drei Tage hinweg mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt und immer eine entsprechende unbestrahlte Kontrolle mitgeführt. Zudem bestand der Vergleich zwischen Fibroblasten mit TGF- β 1 Behandlung, wodurch die Differenzierung zu Myofibroblasten eingeleitet worden ist, als auch ohne entsprechende TGF- β 1-Aktivierung.

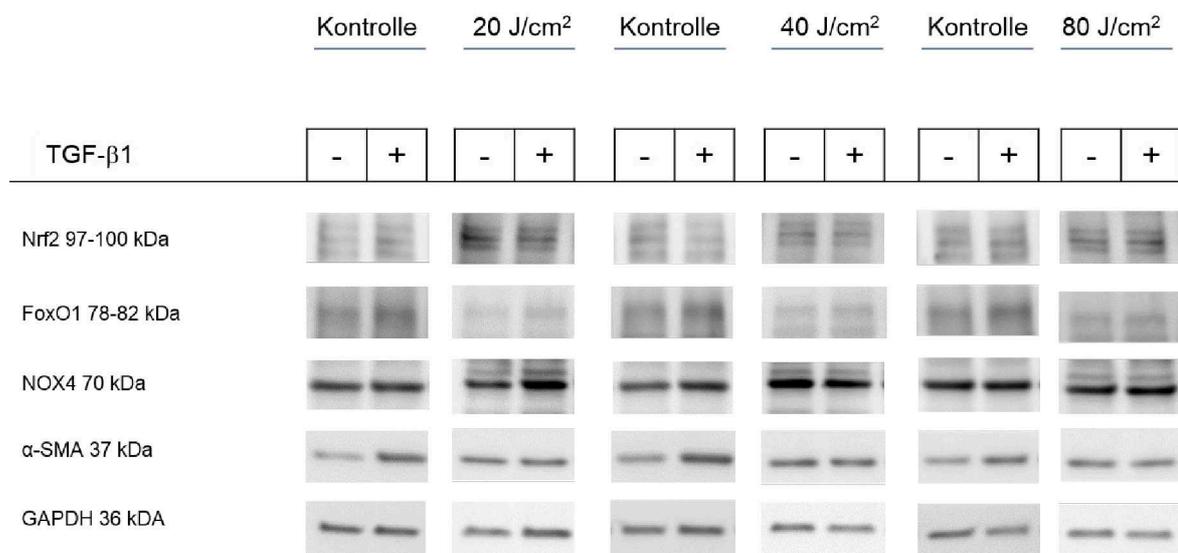


Abb. 11: Darstellung eines typischen repräsentativen Ergebnisses der Western Blot Analyse des Proteins Nrf2, FoxO1, NOX4, α -SMA und des Kontrollproteins GAPDH. Humane dermale Fibroblasten wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF- β 1 (5 ng/ml) aktiviert.

5.1.2 Expression von α -SMA

Im Rahmen der Ergebnisse der Proteinexpression von α -SMA im Western Blot konnten wir zeigen, dass allein die Bestrahlung mit 80 J/cm² in Kombination mit der Aktivierung durch TGF- β 1 einen signifikanten Einfluss auf die Proteinexpression der Fibroblasten hat (Abb. 12). Dies führte zu einer signifikant verringerten Expression des Markerproteins α -SMA in den bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten und nicht mit TGF- β 1 behandelten Kontrollzellen.

Dennoch ließ sich bei den übrigen Bestrahlungsdosen der Trend erkennen, dass nach der Behandlung mit TGF- β 1 und der wiederholten Bestrahlung, die α -SMA-Expression im Vergleich zur TGF- β 1 behandelten, aber nicht bestrahlten Gruppe reduziert war. Diese Reduktion der Proteinexpression war allerdings nicht signifikant.

Generell konnten wir beobachten, dass die Behandlung mit TGF- β 1 zu einer, mindestens um das drei-fache, erhöhten Expression von α -SMA führte, was die Induktion der Differenzierung zu Myofibroblasten abbildete. Dadurch, dass die Proteinexpression von α -SMA nach der Bestrahlung deutlich reduziert war, ließ dies auf eine Hemmung der Zelldifferenzierung durch die Bestrahlung schließen.

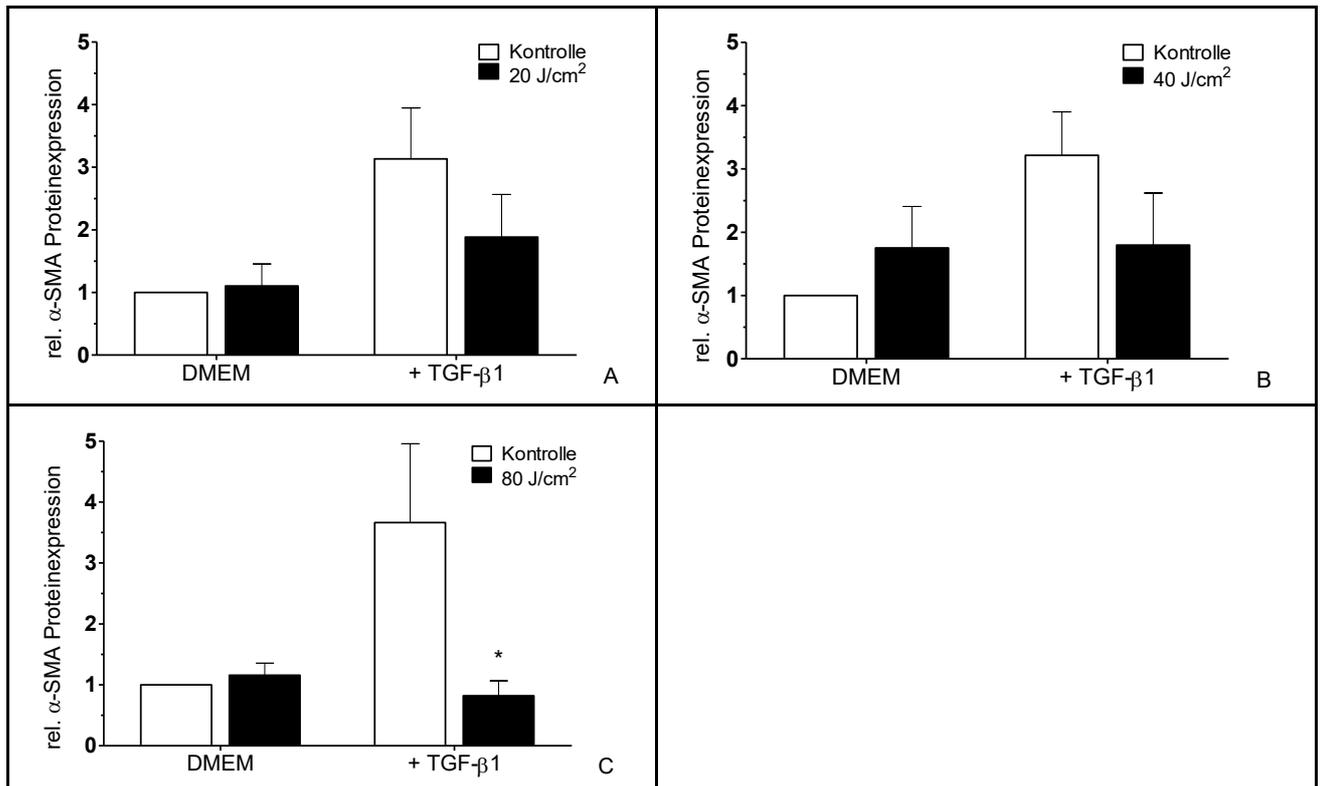
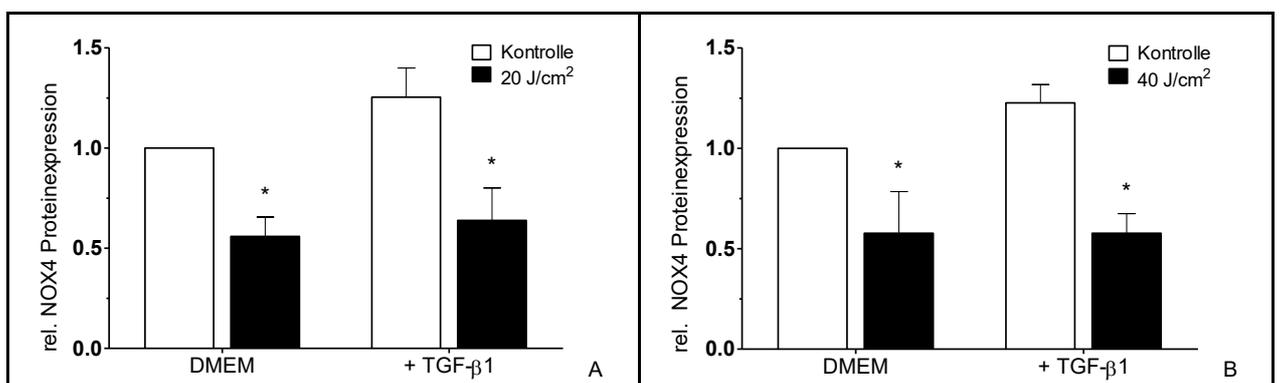


Abb. 12: Western Blot Analyse des Proteins α -SMA. Darstellung der relativen Proteinexpression gegenüber der Behandlung mit/ohne TGF- β 1. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF- β 1 (5 ng/ml) aktiviert. Die relative Proteinexpression ergab sich aus der Normierung auf GAPDH sowie auf die unbestrahlte, nicht aktivierte Kontrolle im zweiten Schritt. (*= signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; $n=8$)

5.1.3 Expression von NOX4

Als nächstes führten wir die Western Blot Analyse des Proteins NOX4 durch. Dabei konnten wir zeigen, dass die Bestrahlung mit jeder Dosis zu einem signifikanten Unterschied in der Proteinexpression von NOX4 im Vergleich zur Expression in der unbestrahlten Kontrolle führt (Abb. 13).

Unabhängig davon, ob die Zellen zuvor mit TGF- β 1 aktiviert wurden oder nicht, konnten wir eine signifikante, etwa um die Hälfte verminderte Expression von NOX4 bei jeder Bestrahlungsdosis beobachten. Außerdem führte die Behandlung mit TGF- β 1 zu einer geringgradigen Zunahme der NOX4-Expression in den unbestrahlten Zellen.



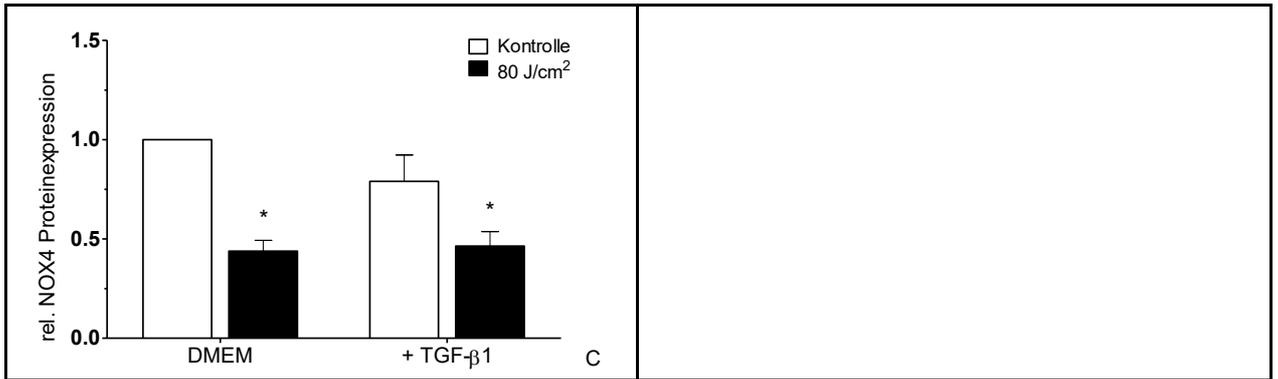


Abb. 13: Western Blot Analyse des Proteins NOX4 und des Kontrollproteins GAPDH. Darstellung der relativen Proteinexpression gegenüber der Behandlung mit/ohne TGF-β1. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF-β1 (5 ng/ml) aktiviert. Die relative Proteinexpression ergab sich aus der Normierung auf GAPDH sowie auf die unbestrahlte, nicht aktivierte Kontrolle im zweiten Schritt. (*= signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; $n=8$)

5.1.4 Expression von FoxO1

Anschließend untersuchten wir die FoxO1-Proteinexpression mit der Western Blot Analyse. Aus dieser wurde deutlich, dass lediglich die Bestrahlung mit 80 J/cm² in Kombination mit einer TGF-β1-Behandlung zu einer signifikant verringerten Expression von FoxO1 im Vergleich zur nicht bestrahlten, aber ebenso mit TGF-β1-aktivierten Kontrolle führte (Abb. 14).

Bei den mit TGF-β1 behandelten Zellen, konnte zwischen den mit 40 J/cm² als auch mit 20 J/cm² bestrahlten Zellen und derer unbestrahlter Kontrolle kein wesentlicher Unterschied in der Expression des FoxO1 Proteins beobachtet werden. In Abwesenheit von TGF-β1 hingegen führte eine Bestrahlung zu einer geringen Abnahme der FoxO1-Proteinexpression.

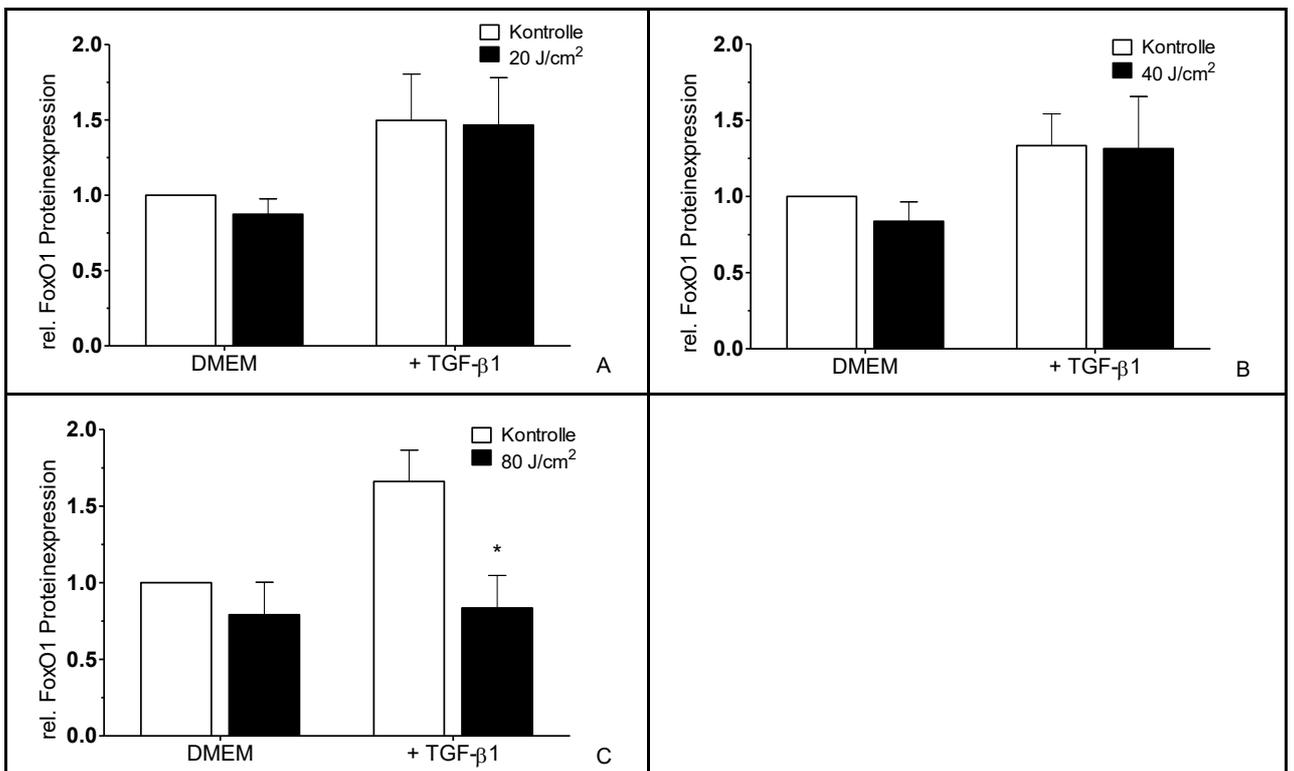


Abb. 14: Western Blot Analyse des Proteins FoxO1 und des Kontrollproteins GAPDH. Darstellung der relativen Proteinexpression gegenüber der Behandlung mit/ohne TGF- β 1. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF- β 1 (5 ng/ml) aktiviert. Die relative Proteinexpression ergab sich aus der Normierung auf GAPDH sowie auf die unbestrahlte, nicht aktivierte Kontrolle im zweiten Schritt. (*= signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; $n = 8$)

5.1.5 Expression von Nrf2

Als viertes Markerprotein wurde die Expression von Nrf2 mittels Western Blot Analyse untersucht. Dabei konnten wir bei einer Blaulichtbestrahlung mit 80 J/cm² als auch mit 40 J/cm² eine signifikante Reduktion der Nrf2-Expression beobachten unabhängig davon, ob die Zellen vorher mit TGF- β 1 behandelt wurden oder nicht. Diese Reduktion ist bei einer 20 J/cm² Bestrahlung, ob mit oder ohne TGF- β 1 Behandlung, nicht mehr nachweisbar. Dort führt die Bestrahlung lediglich nach vorheriger Aktivierung mit TGF- β 1 zu einer leichten Reduktion der Proteinexpression (Abb. 15).

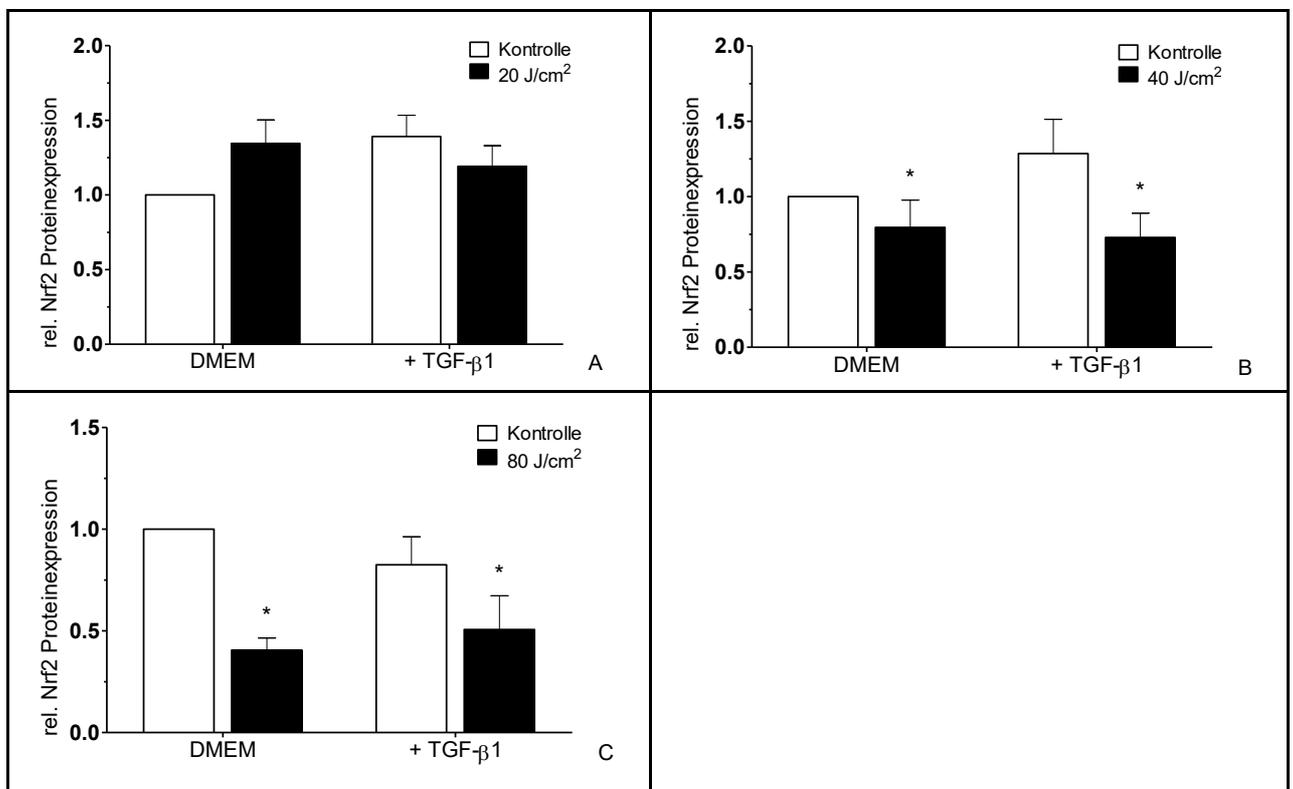


Abb. 15: Western Blot Analyse des Proteins Nrf2 und des Kontrollproteins GAPDH. Darstellung der relativen Proteinexpression gegenüber der Behandlung mit/ohne TGF- β 1. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden täglich über drei Tage bestrahlt und mit/ohne TGF- β 1 (5 ng/ml) aktiviert. Die relative Proteinexpression ergab sich aus der Normierung auf GAPDH sowie auf die unbestrahlte, nicht aktivierte Kontrolle im zweiten Schritt. (*= signifikant zu unbehandelten Zellen [$p < 0,05$]; $n = 8$).

Insgesamt ließ sich bereits anhand der Western Blot Ergebnisse schlussfolgern, dass die Bestrahlung mit nur 20 J/cm² einen deutlich geringeren Einfluss auf die Zellen, ihre Differenzierung und ihren Stoffwechsel hat, als die höheren Bestrahlungsdosen.

5.2 Celltiter Blue Viability Assay: Messung der metabolischen Aktivität der Atmungskette als indirekter Nachweis der Zellviabilität

Anhand des folgenden *Celltiter Blue Viability Assays* wurde die Aktivität von NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktasen, zum Beispiel der NADH-Dehydrogenase, gemessen und damit die Zellviabilität im Rahmen der Metabolisierung und Reduktion von Resazurin zu Resorufin dargestellt. Ein Anstieg der Fluoreszenz war damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Hierfür wurden die Fibroblasten einmalig mit 20 J/cm², 40 J/cm² und 80 J/cm² bestrahlt und anschließend die Fluoreszenz null, eine, vier und 24 Stunden nach der Bestrahlung gemessen (Abb. 16). Dazu wurde den behandelten Zellen zu dem entsprechenden Messzeitpunkt das Celltiter Blue Reagenz zugefügt und dies für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Dunklen inkubiert. Im Anschluss wurde mittels Victor und dem Programm Wallac die Fluoreszenz gemessen und auf die DNA-Menge pro Well normiert.

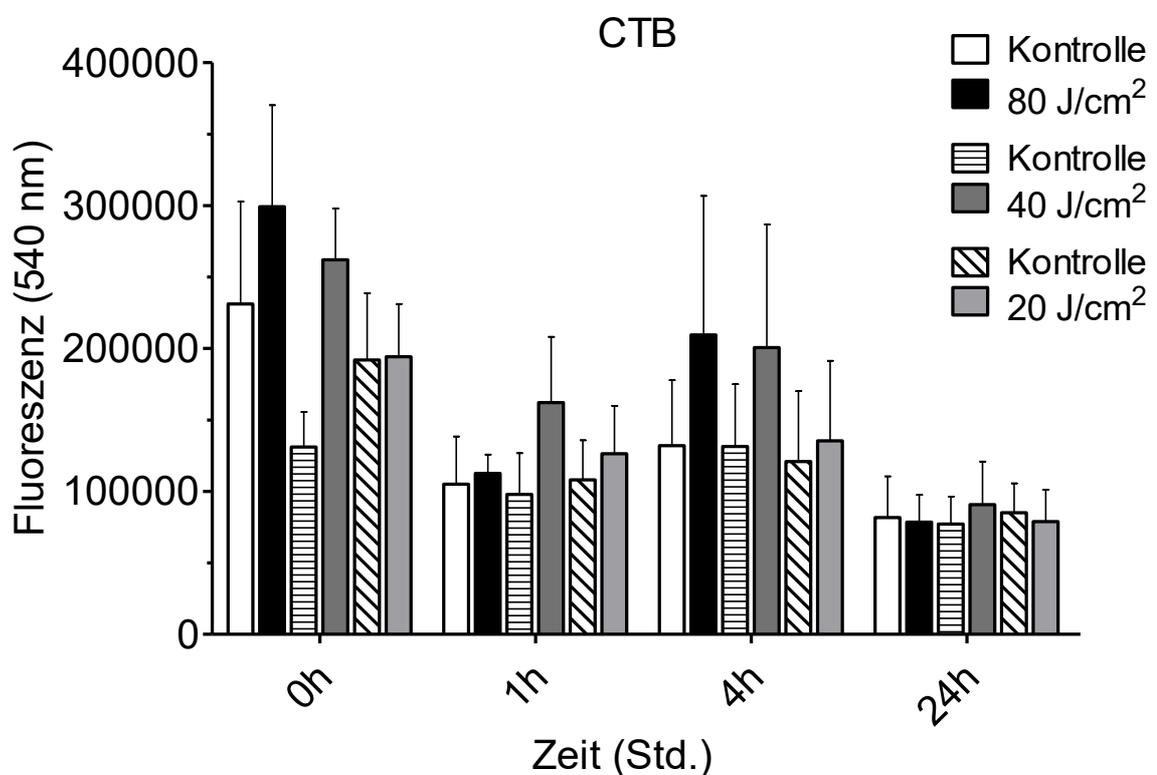


Abb. 16: Darstellung der Umsetzung von Resazurin zu Resorufin durch zelluläre NADH-abhängige Oxidoreduktasen anhand der Fluoreszenz (540 nm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Die hellen und gestreiften Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit einer Dosis von 80 J/cm², 40 J/cm² und 20 J/cm² bestrahlt. Die Werte wurden normiert auf die DNA-Konzentration. Die Signifikanz wurde mittels two-way ANOVA ermittelt (keine Signifikanz; n=4).

Die Messung der Zellviabilität mittels *Celltiter Blue Viability Assay* ergab zu keinem Zeitpunkt signifikante Ergebnisse. Wir konnten lediglich erkennen, dass eine Bestrahlung mit 80 J/cm² und 40 J/cm² sowohl null als auch vier Stunden nach Bestrahlungsende zu einem Anstieg der Fluoreszenz führte. Dies deutete darauf hin, dass die (mitochondriale) NADH-Dehydrogenase der bestrahlten Zellen weniger Resazurin zu Resorufin umgesetzt hatte. Dieser Effekt war nach 24 Stunden nahezu komplett reversibel und nicht mehr nachweisbar. Im zeitlichen Verlauf nahm der Umsatz ebenso wieder zu, sodass nach 24 Stunden die

Fluoreszenz aller Zellen wieder deutlich geringer war und sich auf dem gleichen Niveau befand (Abb. 17).

Dies könnte ein Hinweis auf eine vorübergehende Blockierung der NADH-Dehydrogenase durch die Bestrahlung mit dem blauen Licht der Wellenlänge 453 nm sein. In Zukunft könnte dieser Mechanismus detaillierter im Rahmen weiterer Assays und an einer höheren Fallzahl untersucht werden.

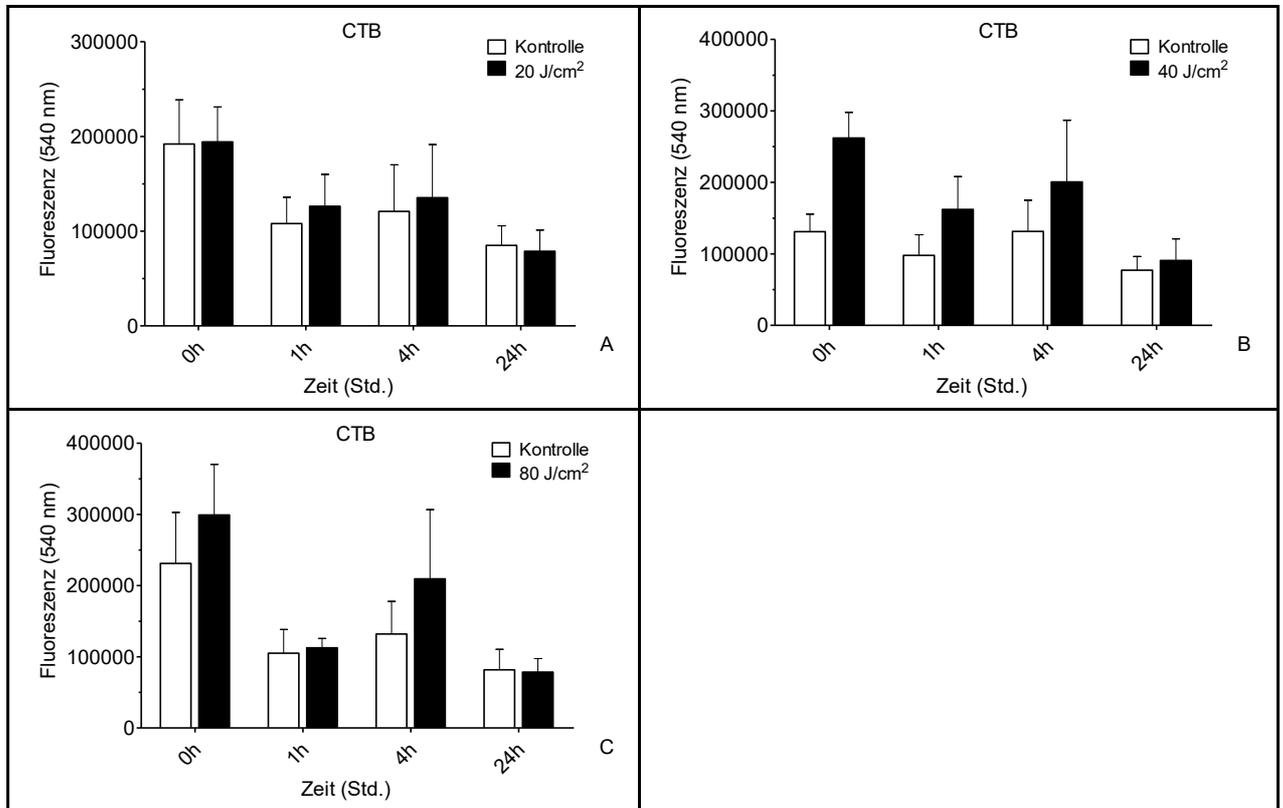


Abb. 17: Darstellung der Umsetzung von Resazurin zu Resorufin durch zelluläre NADH-abhängige Oxidoreduktasen anhand der Fluoreszenz (540 nm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit Licht der Wellenlänge 453nm bestrahlt. Die Werte wurden normiert auf die DNA-Konzentration. Die Signifikanz wurde mittels two-way ANOVA ermittelt (keine Signifikanz; n=4).

5.3 MTT-Assay: metabolische Aktivität und Zellviabilität

Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen führten wir den MTT-Assay durch, um erneut den Effekt der Bestrahlung auf die mitochondriale Aktivität zu untersuchen.

Bei diesem Assay wurde Tetrazolium durch vitale Zellen in Formazan umgewandelt. Hierdurch wurde die mitochondriale Aktivität der Zellen abgebildet. Durch die Bestimmung der Formazan-Konzentration konnten also Rückschlüsse auf die Menge an lebenden Zellen beziehungsweise auf deren mitochondriale Aktivität gezogen werden (van Meerloo et al., 2011). Je höher die Konzentration an Formazan war, desto mehr vitale Zellen beziehungsweise mehr mitochondriale Aktivität war vorhanden.

Im Rahmen des MTT-Assays wurden Fibroblasten in 96-Well Platten in PBS einmalig mit je 20 J/cm², 40 J/cm² und 80 J/cm² bestrahlt. Anschließend wurde die Absorption nach je null, einer, zwei, vier, sechs und 24 Stunden nach Bestrahlungsende mit dem Programm Wallac des Victors gemessen (Abb. 18).

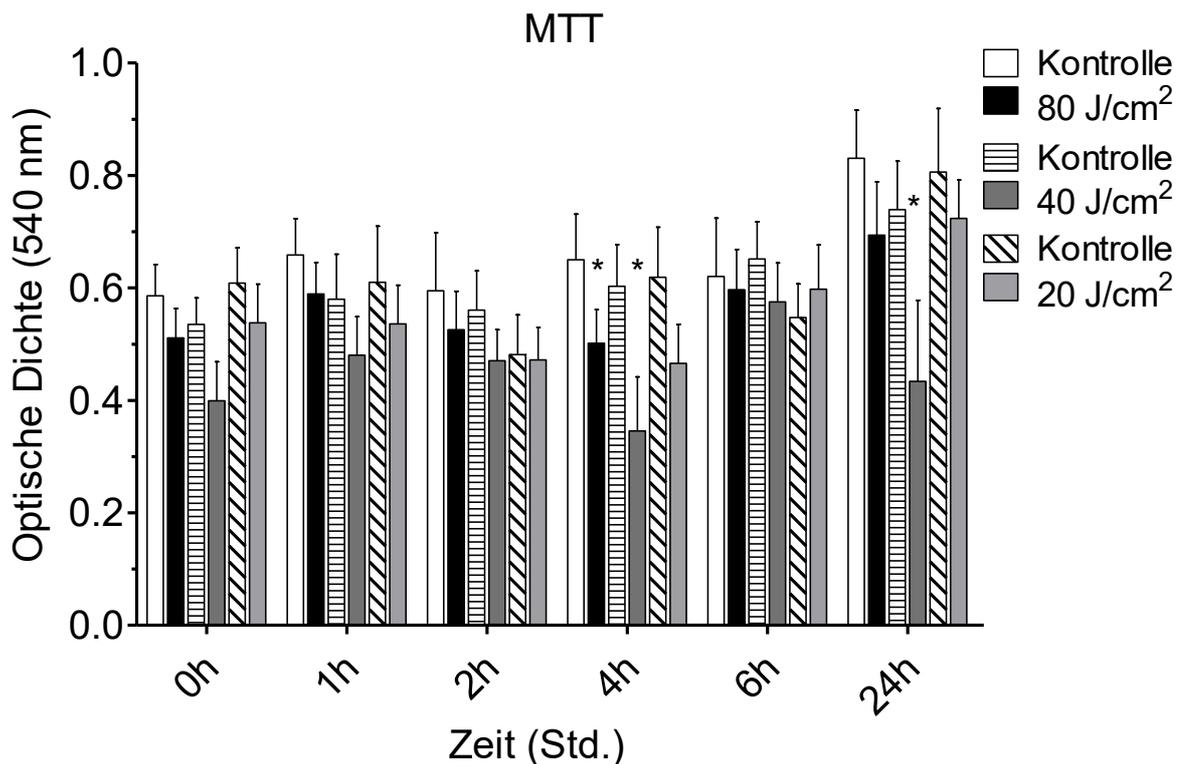


Abb. 18: Darstellung der Umsetzung von Tetrazolium zu unlöslichem Formazan durch die zelluläre, mitochondriale Succinat-Dehydrogenase (SDH) anhand der optischen Dichte bei 540 nm in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Die hellen und gestreiften Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm², 40 J/cm² und 20 J/cm² bestrahlt. Die Signifikanz wurde mittels Two-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Posttest ermittelt (*=signifikant zu entsprechender, unbestrahlter Kontrolle; n=5).

Die einmalige Bestrahlung von Fibroblasten sowohl mit einer Dosis von 80 J/cm² als auch mit 40 J/cm² induzierte eine Reduktion der optischen Dichte und damit auch der metabolischen Aktivität beziehungsweise Vitalität der Zellen. Vor allem vier und 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde signifikant weniger Tetrazolium zu Formazan umgesetzt. Hier zeigte sich folglich auch noch keine Erholung der Zellen nach 24 Stunden.

Daher konnten wir bei den mit 40 J/cm² bestrahlten Zellen nach dieser Zeit eine anhaltende signifikante Verringerung beobachten, wohingegen bei den mit 80 J/cm² bestrahlten Zellen über die Zeit eine leichte Erholung zu beobachten war. Ebenso führte hier wiederum die Bestrahlung mit 20 J/cm² nur zu einer geringen Beeinflussung der metabolischen Aktivität der Fibroblasten. Generell war die Aktivitätsreduktion nur zum Zeitpunkt von vier Stunden nach der Bestrahlung signifikant und bei einer Bestrahlung mit 40 J/cm² auch nach 24 Stunden (Abb. 19).

Zum einen könnte anhand dieser Ergebnisse überlegt werden, ob die 40 J/cm² die effektivere Dosis zur Bestrahlung der Zellen wäre. Zum anderen blieb weiterhin zu diskutieren, ob der reduzierte Umsatz des Tetrazoliums tatsächlich durch eine verminderte Vitalität der Zellen, zum Beispiel durch die vorübergehende Blockierung der Atmungskette, zu erklären ist oder ob eine Reduktion der Zellzahl eine Rolle spielt.

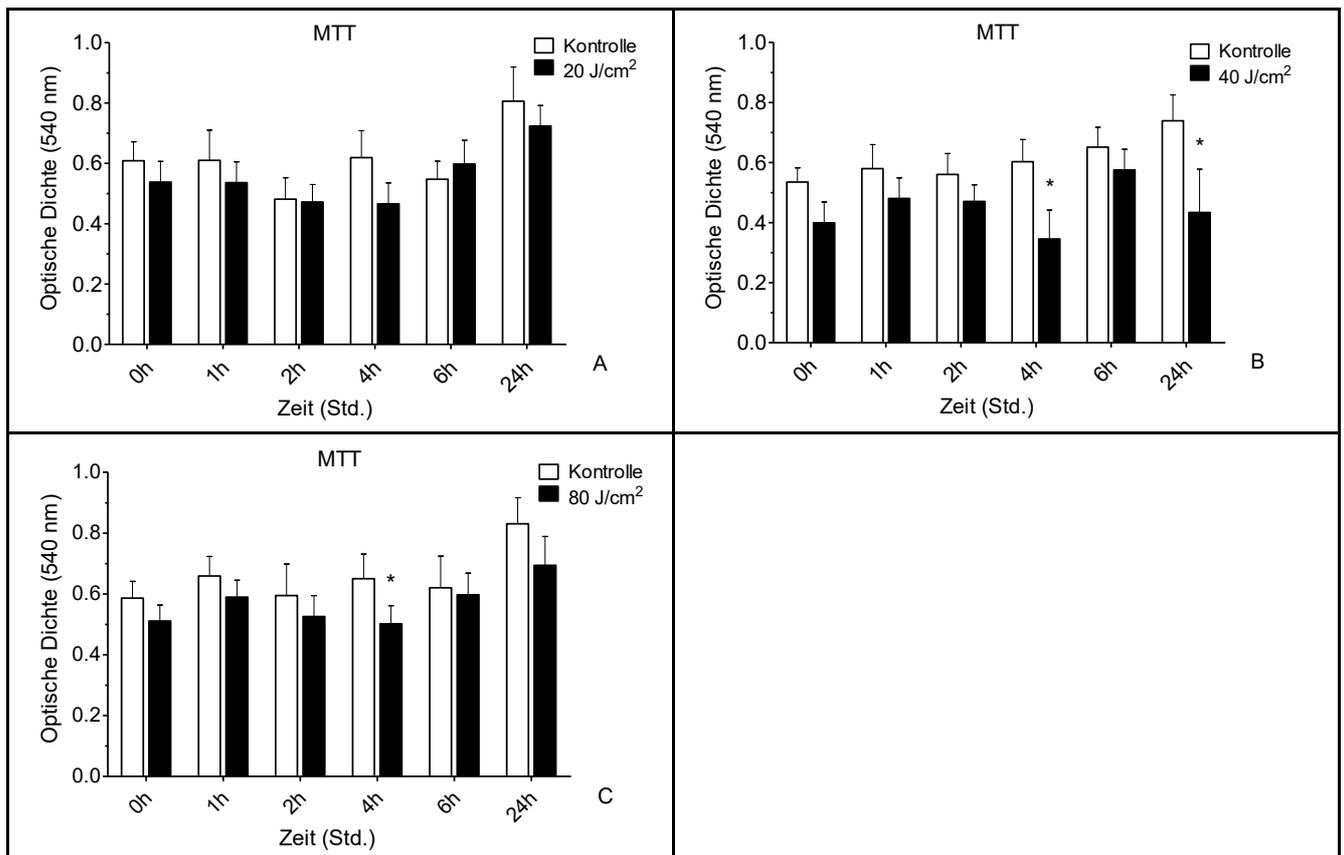


Abb. 19: Darstellung der Umsetzung von Tetrazolium zu unlöslichem Formazan durch die zelluläre, mitochondriale Succinat-Dehydrogenase (SDH) anhand der optischen Dichte bei 540 nm in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 20 J/cm² (A), 40 J/cm² (B) und 80 J/cm² (C) bestrahlt. Die Signifikanz wurde mittels Two-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Posttest ermittelt (*=signifikant zu entsprechender, unbestrahlter Kontrolle; n=5).

5.4 Neutral Rot Messung: Nachweis der Zellviabilität durch Einbau des Farbstoffes in Lysosomen

Zur Evaluation der Zellviabilität der bestrahlten Zellen und zur Abschätzung der relativen Zellzahl, führten wir den Neutral-Rot Assay durch. Hierbei ging es nicht um die Untersuchung der Mitochondrien der Fibroblasten, sondern vielmehr um die Aktivität der Lysosomen. Lysosomen enthalten hydrolytische Verdauungsenzyme, welche nur in saurem Milieu aktiv sind, weshalb Lysosomen im Inneren einen pH-Wert von fünf haben. Dieser wird durch die Hydrolyse von zwei H⁺-Ionen und deren Transport in die Zelle unter Verbrauch von einem ATP aufrechterhalten. Ihre Aufgabe ist es, zelleigenes und zellfremdes Material zu Verdauen und sie übernehmen eine wichtige Rolle bei Regulation der Apoptose.

Im Rahmen dieses Assays wurde der Farbstoff Neutralrot in die Lysosomen vitaler Zellen aufgenommen und konnte diese aufgrund des sauren Milieus und der entstehenden sogenannten Ionenfalle nicht mehr verlassen (Abschnitt 4.8) (Abb. 20).

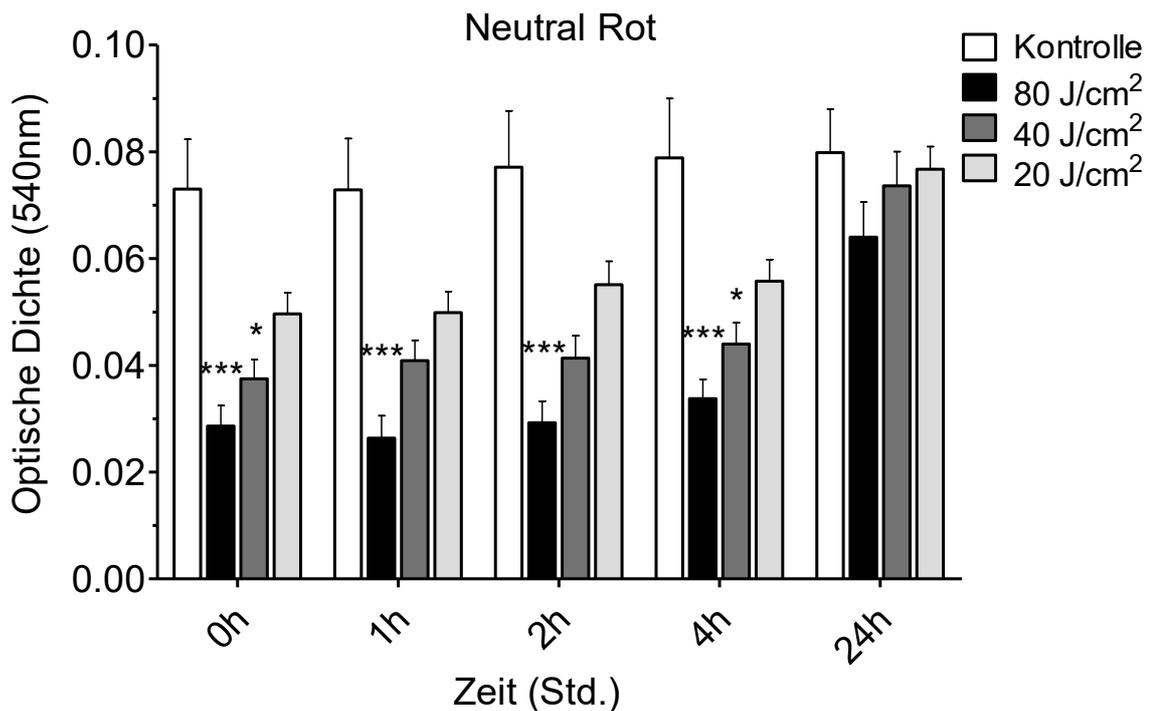


Abb. 20: Darstellung der Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot in die Lysosomen anhand der optischen Dichte bei 540 nm bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm², 40 J/cm² und 20 J/cm² bestrahlt. Die Signifikanz wurde mittels Two-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-Test ermittelt (*=signifikant zu unbestrahlter Kontrolle; n=8).

Bereits eine einmalige Bestrahlung der Fibroblasten führte zu einer signifikanten Reduktion der Aufnahmefähigkeit der Zellen gegenüber dem Farbstoff Neutralrot. Diese signifikante Verringerung der optischen Dichte konnten wir am eindrucklichsten bei einer Bestrahlungsintensität von 80 J/cm² beobachten. Dabei war die Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen bis vier Stunden nach Bestrahlungsende am stärksten reduziert. Die optische Dichte betrug weniger als die Hälfte derer in den unbestrahlten Kontrollzellen.

Dieses Phänomen konnten wir in etwas abgeschwächter Form auch bei einer Bestrahlung mit 40 J/cm² und 20 J/cm² erkennen. Dementsprechend führten auch die geringeren Bestrahlungsdosen bis zu vier Stunden nach Bestrahlungsende zu einer verringerten Farbstoffaufnahme in die Lysosomen und damit zu einer geringeren gemessenen optischen Dichte. Vor allem bei der Bestrahlung mit 20 J/cm² war diese Reduktion allerdings nicht mehr signifikant (Abb. 21).

Zudem konnten wir feststellen, dass es bei allen Bestrahlungsdosen 24 Stunden nach Bestrahlungsende zu einer Erholung der Zellen beziehungsweise der Aufnahmefähigkeit der Lysosomen kommt.

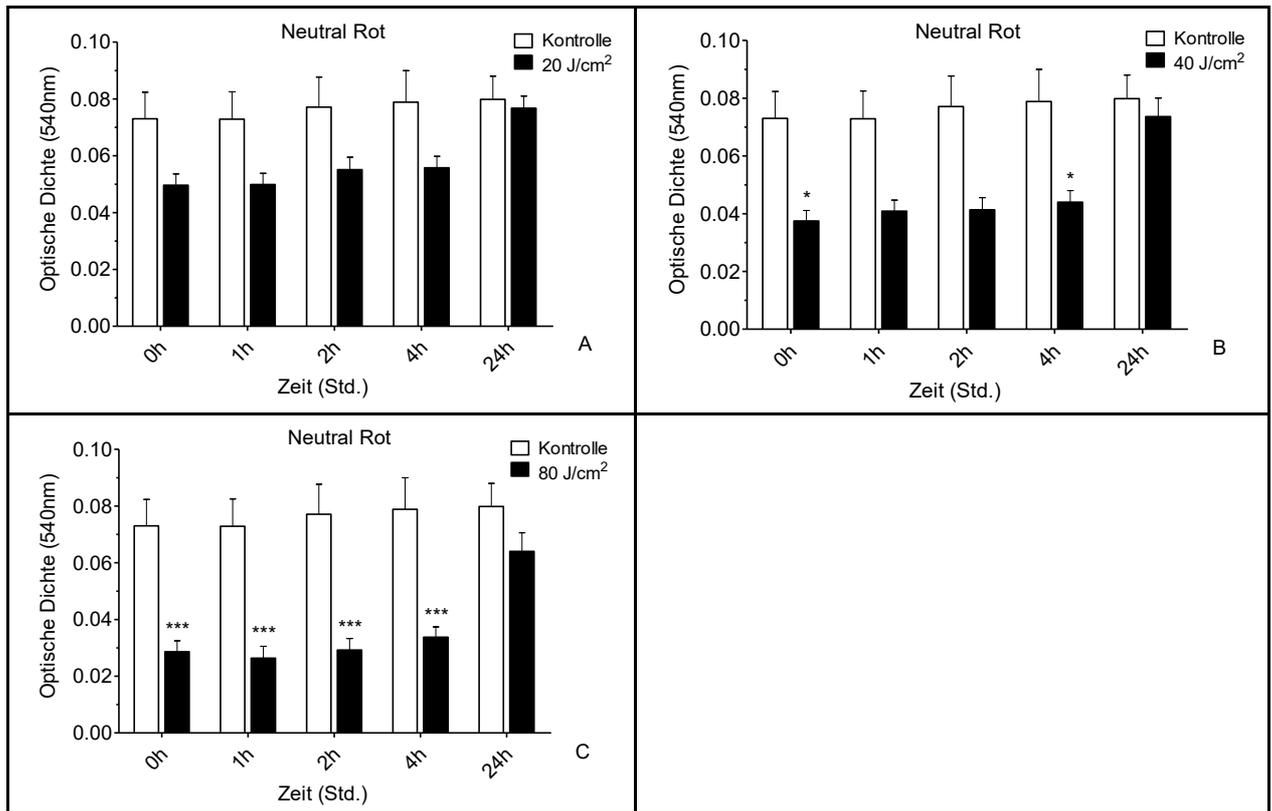


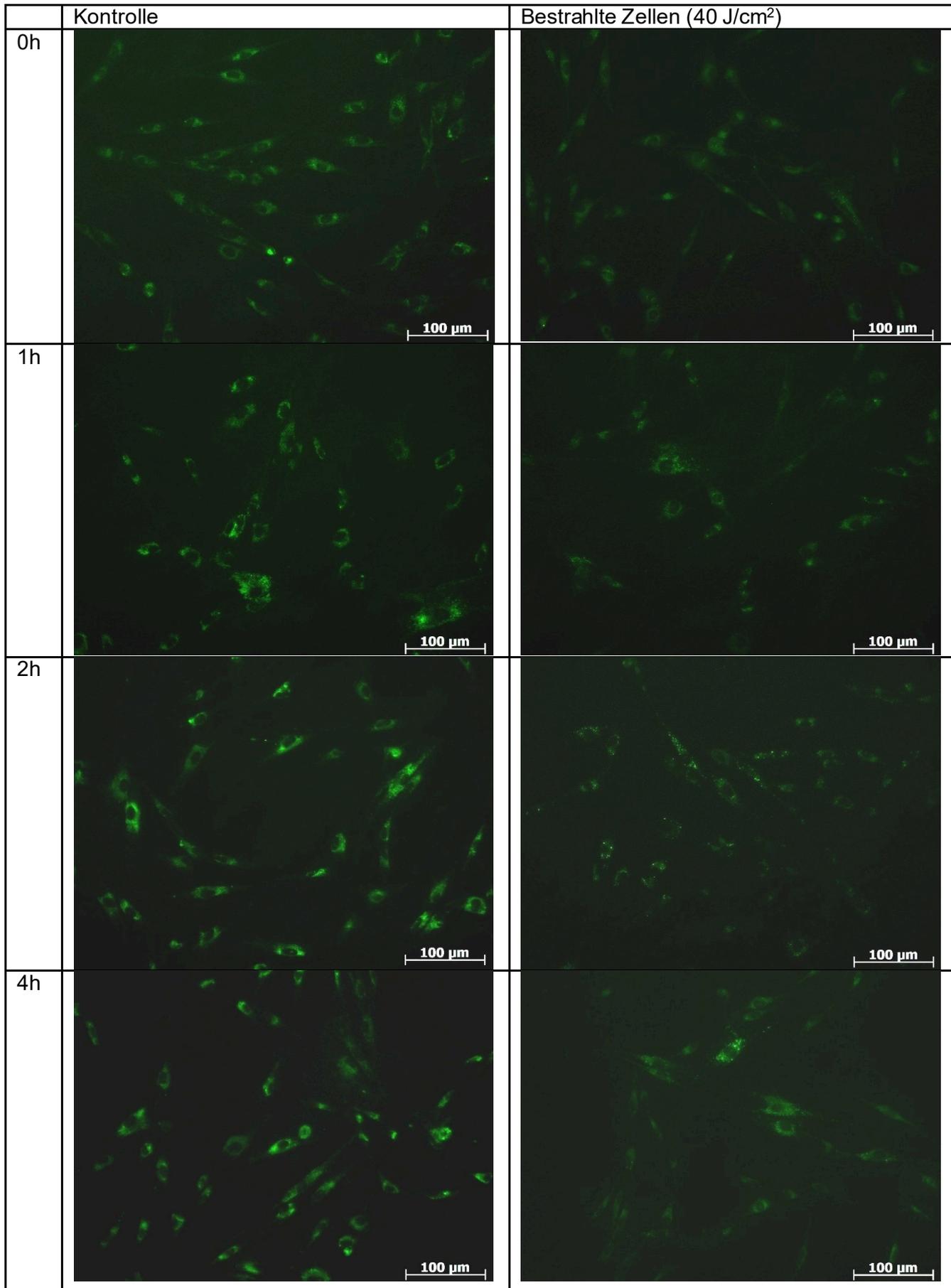
Abb. 21: Darstellung der Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot in die Lysosomen anhand der optischen Dichte bei 540 nm bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 20 J/cm², 40 J/cm² (B), 80 J/cm² (C) bestrahlt. Die Signifikanz wurde mittels Two-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-Test ermittelt (*=signifikant zu unbestrahlter Kontrolle; n=8).

Aufgrund des deutlich signifikanten Ergebnisses, vor allem bei einer Bestrahlung mit 80 J/cm², vermuteten wir, dass den Lysosomen eine zentrale Rolle im Rahmen der Bestrahlung mit blauem Licht und dessen Effekt auf die Zellen zukommt. Daher führten wir im Anschluss den Lyso-Tracker Assay durch, um das Ergebnis des Neutral-Rot Assays bildlich darzustellen und zu bestätigen. Aufbauend auf dieses Ergebnis, könnten in Zukunft weiterführende und detailliertere Untersuchungen an Lysosomen durchgeführt werden, um ihre Rolle im Rahmen der Blaulichtbestrahlung besser verstehen zu können.

5.4.1 Lyso Tracker

Wie oben bereits erwähnt, führten wir im Anschluss an den Neutral-Rot Assay (Abschnitt 5.4) den Lyso-Tracker durch, um das Ergebnis idealerweise durch eine bildliche Darstellung zu bestätigen und einen genaueren Einblick in die Viabilität und das Anreicherungsverhalten der Zellen zu bekommen.

Nach einer einmaligen Bestrahlung mit 40 J/cm² wurden die Zellen mit einem zell-permeablen grünen Farbstoff, welcher sich in den sauren Kompartimenten, den Lysosomen lebender Zellen anreichert, versehen. Es erfolgte keine detaillierte Auswertung, die Bilder dienen rein zur Veranschaulichung und Visualisierung der Ergebnisse (Abb. 22).



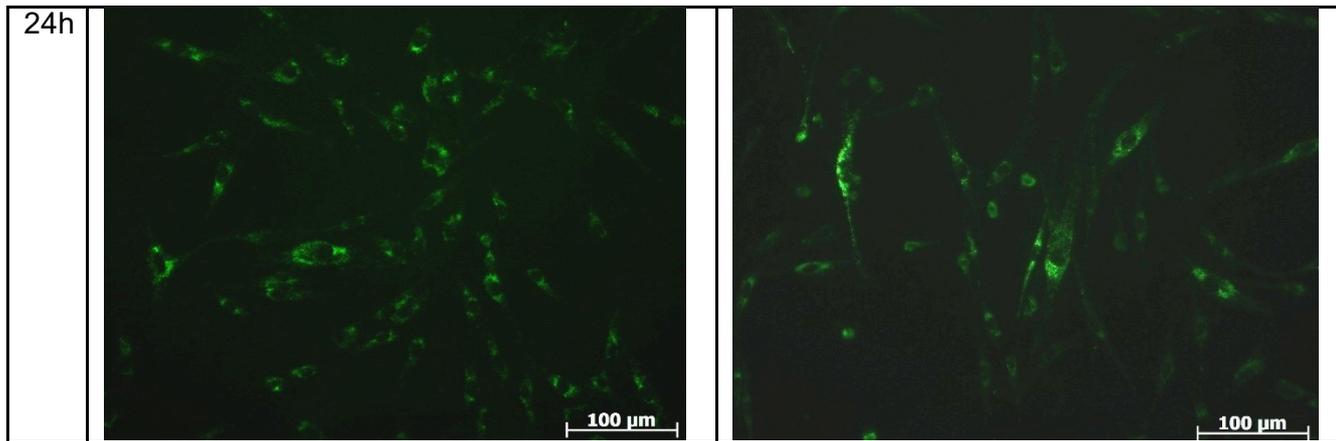


Abb. 22: Mikroskopische Aufnahmen des Anreicherungsverhaltens der Zellen im Rahmen des Lyso-Tracker Assays.

Insgesamt ließ sich durch diese Fotoreihe erkennen, dass die bestrahlten Zellen nach einmaliger Bestrahlung mit 40 J/cm^2 weniger Farbstoff anreichern als die nicht bestrahlten Zellen. Der Farbstoff schien kondensierter zu sein und sich nur punktuell anzureichern. Ebenso war zu beobachten, dass dieser Effekt 24 Stunden nach Bestrahlung nahezu nicht mehr zu erkennen ist. Dies deckte sich mit dem Ergebnis des Neutral-Rot Assays.

5.5 Glucose-Glo-Assay: Stoffwechselaktivität und Glucose-Verbrauch der Zellen

Zur weiteren Untersuchung der Stoffwechselaktivität in Bezug auf die Glykolyse der bestrahlten Zellen führten wir den Glucose-Glo Assay durch.

Dabei wurden Fibroblasten einmalig mit 20 J/cm^2 , 40 J/cm^2 und 80 J/cm^2 in Glucose-reduziertem Medium bestrahlt und anschließend wurde die verbliebende Menge an Glucose via Lumineszenz-Messung mittels Workout-Programm ermittelt (Abschnitt 4.9). Die Menge Glucose in der Lösung war proportional zur detektierten Lumineszenz. Je mehr Glucose also in der Lösung war, desto stärker war das entstehende Lichtsignal, desto weniger Glucose wurde von den Zellen umgesetzt (Abb. 23).

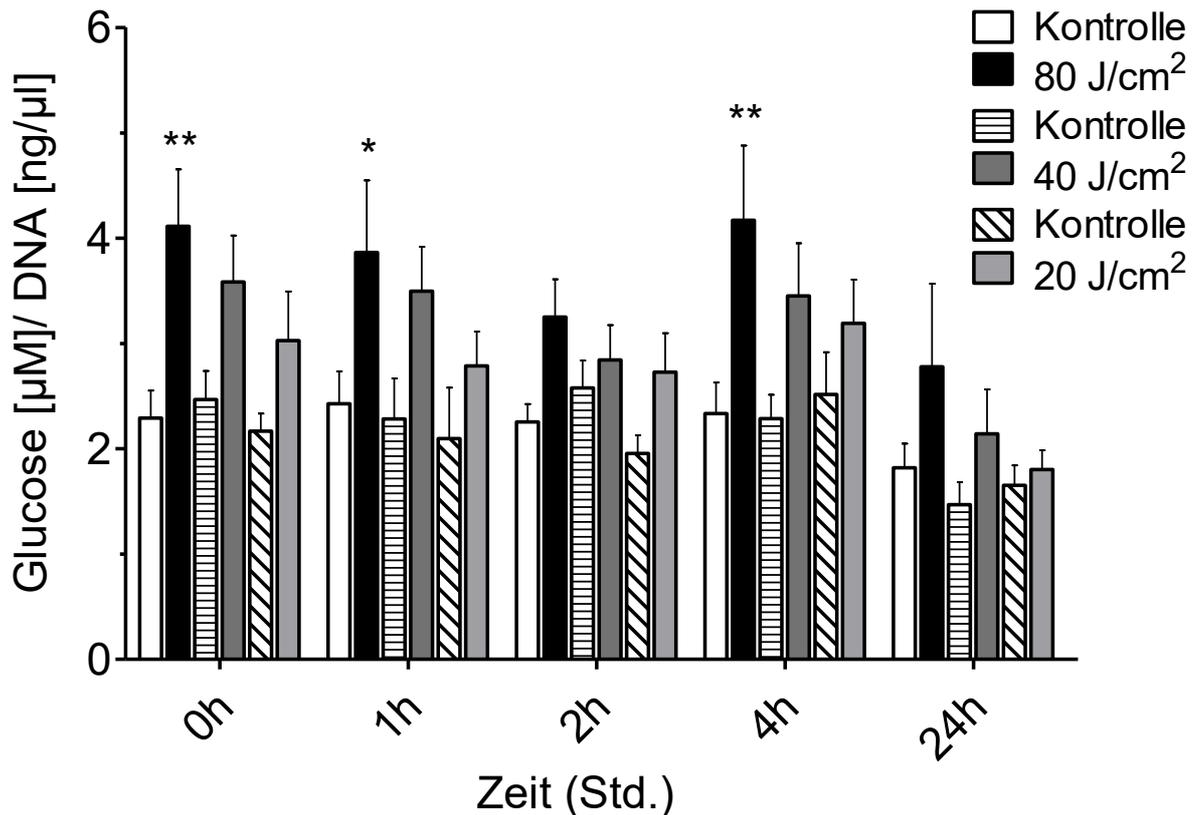


Abb. 23: Die relative Glucosekonzentration bezogen auf die DNA-Menge in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende und Bestrahlungsdosis. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane demale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm², 40 J/cm² und 20 J/cm² bestrahlt. Statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest (*=signifikant zu entsprechender, unbestrahlter Kontrolle; n=6).

Insgesamt konnten wir im Rahmen des Glucose-Assays beobachten, dass die mit blauem Licht bestrahlten Proben eine höhere Glucosekonzentration pro Zelle aufwiesen als die Zellen der unbestrahlten Kontrollgruppe. Bereits eine einmalige Bestrahlung mit 80 J/cm² führte zu einer signifikant erhöhten Menge an Glucose, besonders null, eine und vier Stunden nach Bestrahlungsende. Hier konnten wir einen Anstieg der Glucosekonzentration um nahezu das Doppelte der Ausgangskonzentration der Kontrolle beobachten.

Ebenso führte die Bestrahlung mit 40 J/cm² und 20 J/cm² zu einer erhöhten Glucose-Menge über nahezu den gesamten Messzeitraum. Lediglich nach 24 Stunden kam es zu einer Verringerung der Glucosekonzentration. Dennoch glich sich die Konzentration nicht der, der Kontroll-Fibroblasten an, sodass wir nach 24 Stunden keine Erholung der Zellen beobachten konnten. Ausnahme waren hier die mit 20 J/cm² bestrahlten Zellen. Weiterhin war über alle Bestrahlungsdosen hinweg zum Messzeitpunkt von zwei Stunden eine leichte Reduktion der gemessenen Glucose-Konzentration festzustellen (Abb. 24). Insgesamt ließ dies darauf schließen, dass der Stoffwechsel der mit blauem Licht bestrahlten Fibroblasten deutlich heruntergefahren war und daher weniger Glucose verbraucht wurde.

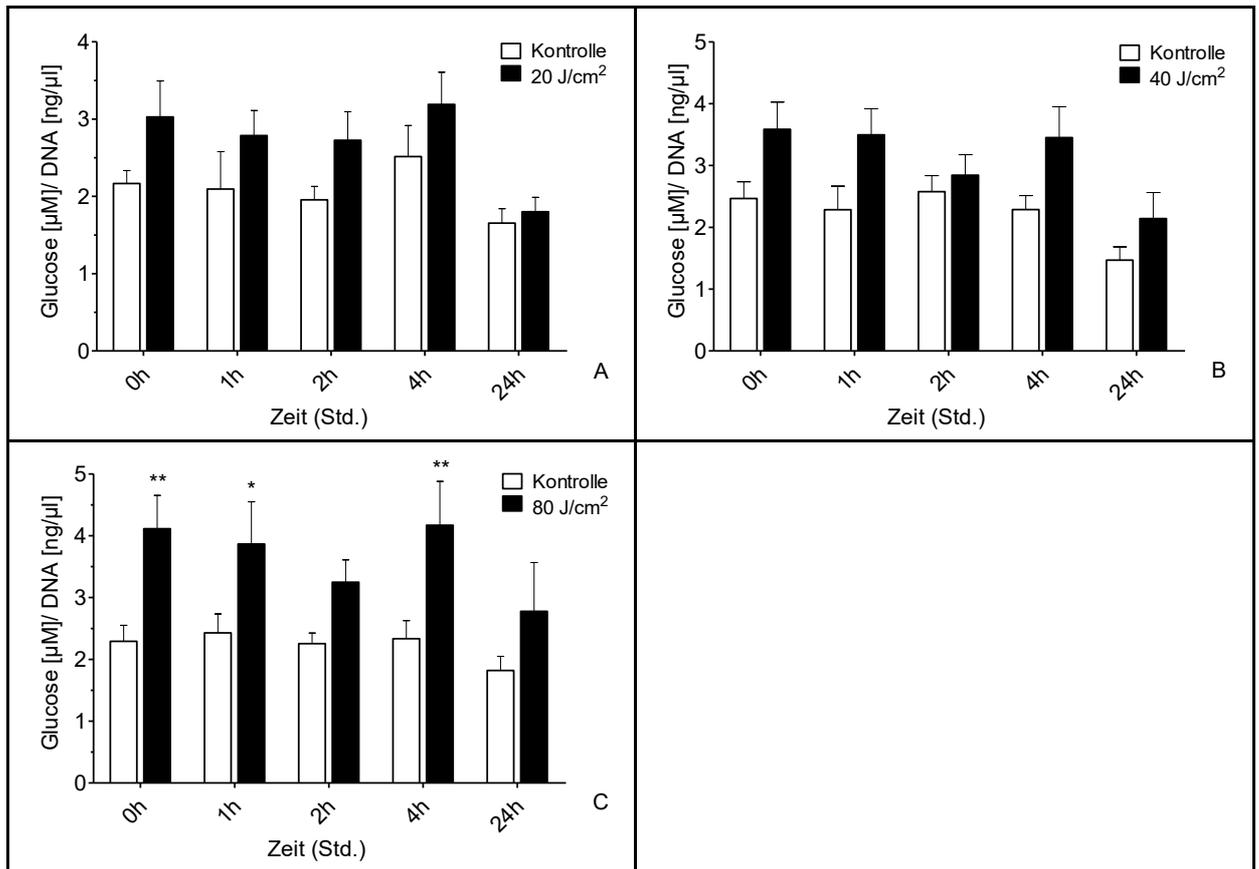


Abb. 24: Die relative Glucosekonzentration bezogen auf die DNA-Menge in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende und Bestrahlungsdosis. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 20 J/cm² (A), 40 J/cm² (B), 80 J/cm² (C) bestrahlt. Statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest (*=signifikant zu entsprechender, unbestrahlter Kontrolle; n=6).

5.6 ATP-Assay: Aktivität der Atmungskette anhand der ATP-Generierung

Die Hauptaufgabe der Atmungskette ist die ATP Synthese und damit die Energiegewinnung durch verschiedene Elektronentransporte. Hierbei spielen Flavinmoleküle als Cofaktoren eine wichtige Rolle. Wie in Voruntersuchungen bereits gezeigt werden konnte, führte die Bestrahlung mit blauem Licht zu einer Proliferationshemmung der Fibroblasten. Um weiter differenzieren zu können, auf Grundlage welcher Stoffwechselprozesse diese Inhibition stattfand, führten wir eine Bestimmung der ATP-Konzentration in den Zellen mit und ohne Bestrahlung durch (Abb. 25).

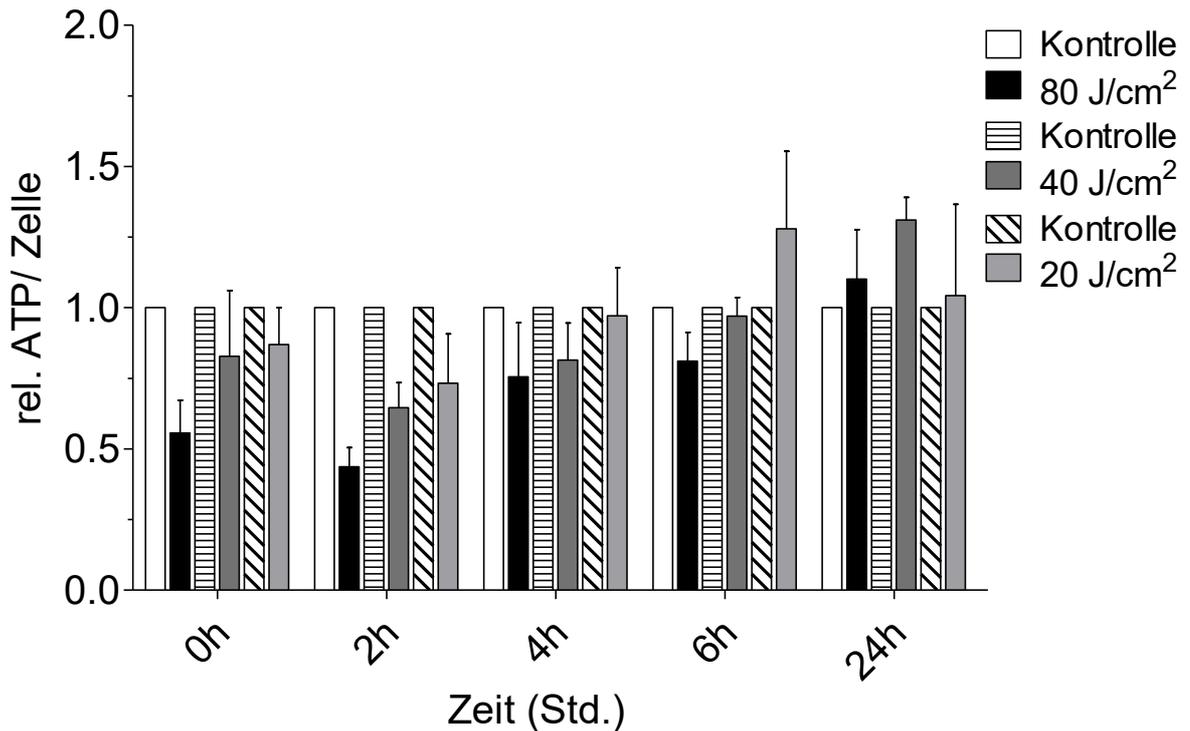


Abb. 25: Relative ATP-Konzentration pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm², 40 J/cm² und 20 J/cm² bestrahlt. Die gemessene ATP-Menge wurde auf die entsprechende DNA-Konzentration bezogen und auf die Molmasse von ATP (507,18 g/mol) berechnet (keine Signifikanz; normiert auf die entsprechende Kontrolle; n=8).

Nach einer einmaligen Bestrahlung der Fibroblasten mit blauem Licht konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten Zellen detektieren.

Dennoch konnten wir vor allem bei der Bestrahlung mit 80 J/cm² eine deutliche Reduktion der relativen ATP-Menge pro Zelle detektieren. Am deutlichsten war dies unmittelbar sowie zwei Stunden nach der Bestrahlung zu erkennen. Auch bei einer Bestrahlung mit 40 J/cm² und 20 J/cm² konnten wir in diesem Zeitraum eine Reduktion der ATP-Menge verzeichnen. Bereits sechs Stunden nach Bestrahlungsende war allerdings ein Angleichen der beiden Gruppe zu beobachten, sodass kein wesentlicher Unterschied in der ATP-Konzentration mehr zu erkennen war. Im Gegenteil, 24 Stunden nach Bestrahlung konnten wir sogar eine gering erhöhte ATP-Menge in den bestrahlten Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle feststellen (Abb. 26).

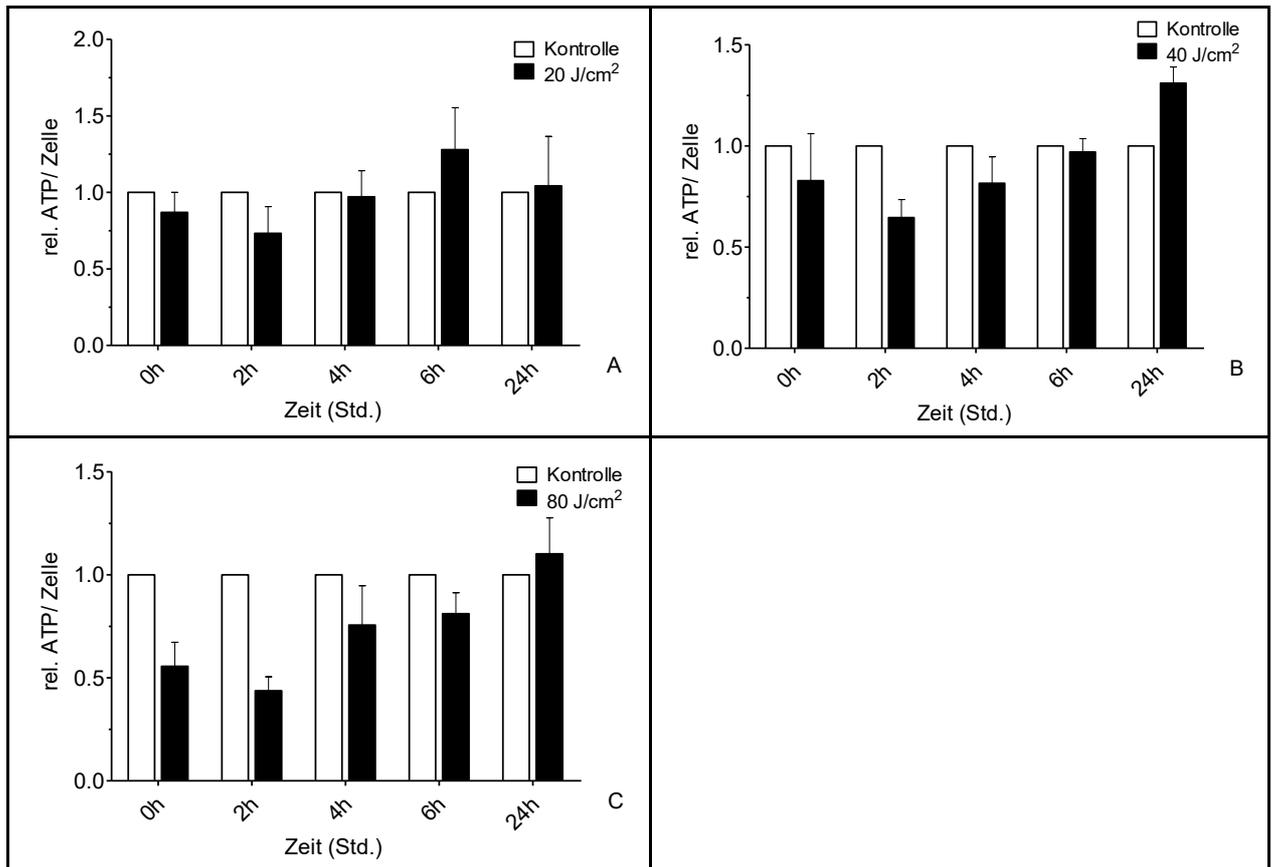


Abb. 26: Relative ATP-Konzentration pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 20 J/cm² (A), 40 J/cm² (B), 80 J/cm² (C) bestrahlt. Die gemessene ATP-Menge wurde auf die entsprechende DNA-Konzentration bezogen und auf die Molmasse von ATP (507,18 g/mol) berechnet (keine Signifikanz; normiert auf die entsprechende Kontrolle; n=8).

Auch in dieser Versuchsreihe ließen sich erneut die Unterschiede zwischen den verschiedenen Bestrahlungsdosen erkennen. Die Bestrahlung mit 80 J/cm² führte zu der deutlichsten Reduktion der relativen ATP-Konzentration pro Zelle und damit zu der stärksten Einschränkung Energie-produzierender Prozesse. Diesen Effekt konnten wir bei einer Bestrahlung mit 40 J/cm² und 20 J/cm² nur in abgeschwächtem Maße beobachten. Zudem konnten wir über die Zeit eine schnellere Erholung der ATP-Produktion beziehungsweise der Atmungskette bei diesen Zellen erkennen.

In Zusammenschau mit den vorherigen Versuchsergebnissen sowie vorangegangenen Arbeiten schien die Bestrahlung zu einer Reduktion von flavin-haltigen Proteinen, möglicherweise auch innerhalb der Atmungskette zu führen, was die verringerte Produktion von ATP erklären könnte.

5.7 Glutathion-Analyse: Beeinflussung des Glutathion-Stoffwechsels durch blaues Licht

Wie bereits in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, spielte die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Rahmen der Bestrahlung mit blauem Licht eine wesentliche Rolle. Die Bestrahlung führte zu einem deutlichen Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies unmittelbar danach, was unterschiedlichste Einflüsse auf die Zellen haben könnte (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017).

Um die Reaktion der Zellen auf den möglichen Anstieg der ROS weitergehend zu untersuchen und den Einfluss der Bestrahlung auf den Stoffwechsel der Fibroblasten noch besser zu verstehen, führten wir verschiedene Glutathionen-Assays.

Die Hauptaufgabe des Glutathionen-Stoffwechsels besteht darin, die Zellen vor oxidativem Stress in Form von freien Radikalen zu schützen, indem es diese im Rahmen der folgenden Reaktion unschädlich macht (Abb. 27).

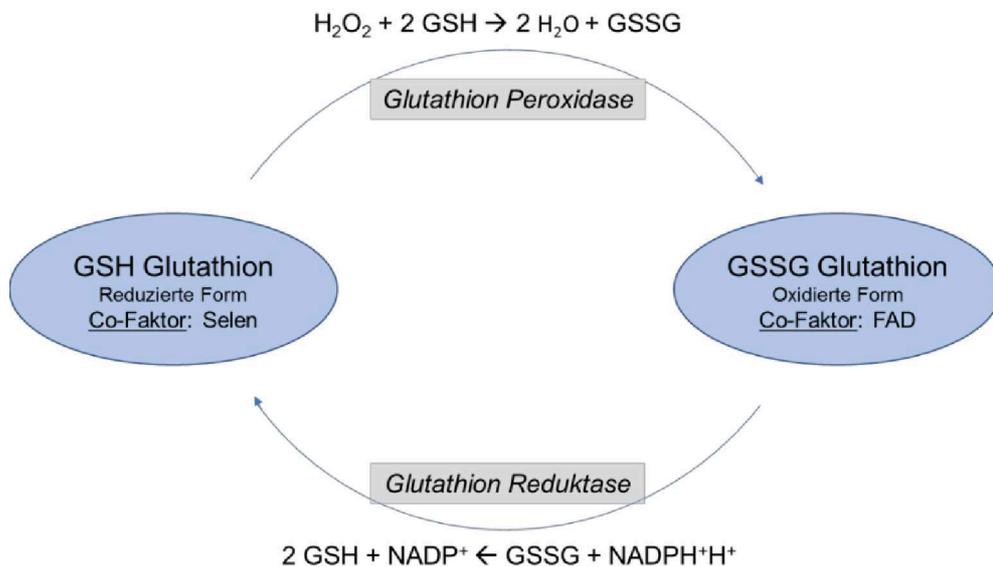


Abb. 27: Darstellung der durch die Glutathion Peroxidase und Glutathion Reduktase katalysierten Reaktionen inklusive derer Co-Faktoren.

5.7.1 Glutathion Colorimetric Detection Kit

Um zunächst die Gesamtmenge des Glutathions zu bestimmen, führten wir das *Glutathion Colorimetric Detection Kit* durch. Hiermit konnte sowohl die Menge des oxidierten Glutathions (*GSSG*) als auch des reduzierten Glutathions (*GSH*) gemessen und in ein Verhältnis gesetzt werden. Wir entschieden uns aufgrund der Praktikabilität dazu, nur die Menge des totalen GSH zu bestimmen. Das GSH ist die reduzierte Form des Glutathions und wird in der durch die Glutathion-Peroxidase katalysierten Reaktion unter Entstehung von zwei H_2O zu *GSSG* oxidiert.

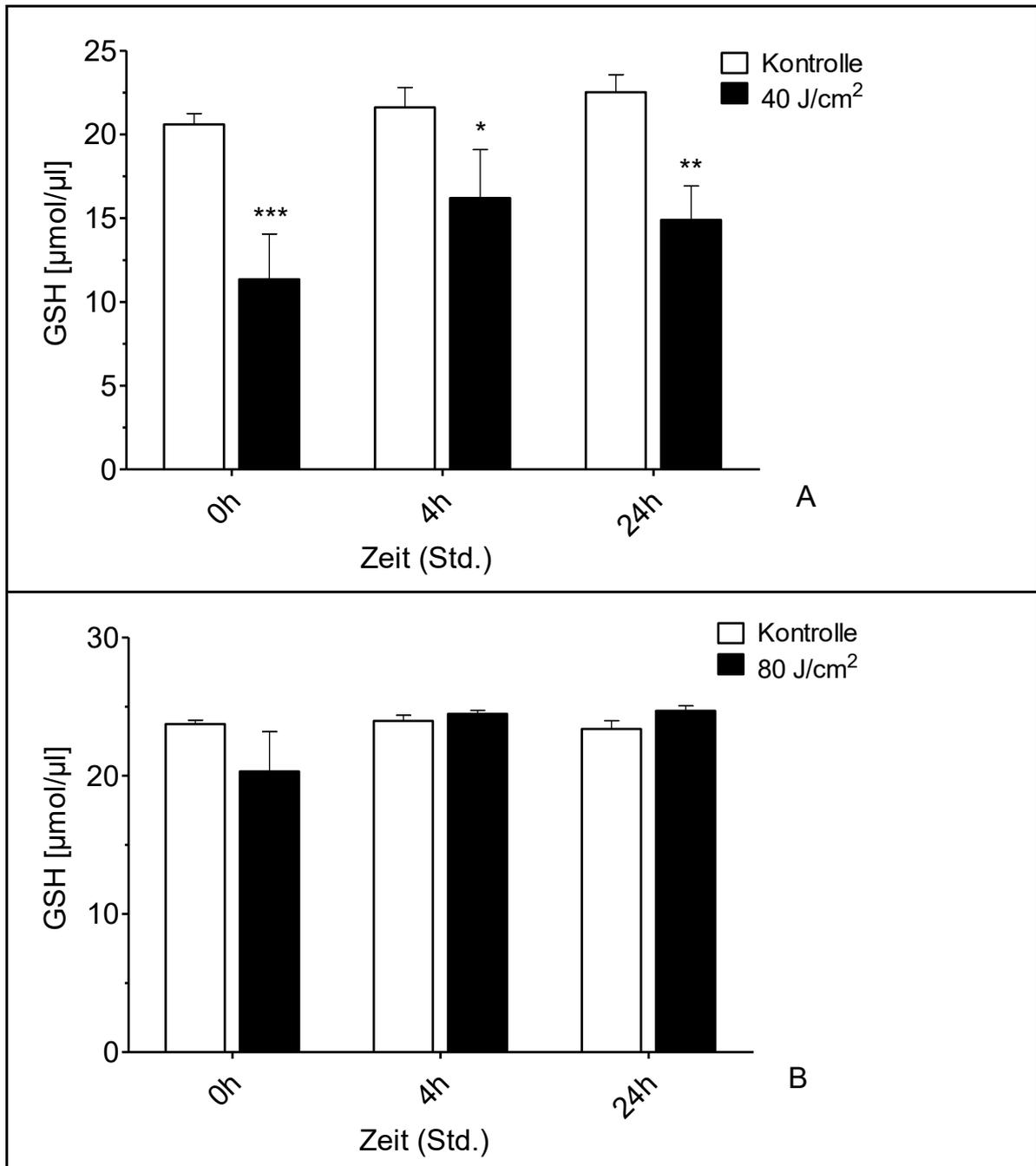


Abb. 28: Die Gesamtkonzentration des totalen GSH bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 40 J/cm² (A) und 80 J/cm² (B) bestrahlt. Statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest (*=signifikant zu entsprechender, bestrahlter Kontrolle; n=6).

Im Rahmen der Messung der totalen GSH-Menge führte vor allem eine Bestrahlung mit 40 J/cm² zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtmenge an GSH. Bereits unmittelbar nach Bestrahlungsende war die Menge des totalen GSH um etwa die Hälfte reduziert im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Diese signifikante Reduktion blieb auch vier und 24 Stunden nach Bestrahlungsende in abgeschwächter Form bestehen und betrug etwa 75 % des Ausgangswertes.

Bei der Bestrahlung mit 80 J/cm² konnten wir diesen Effekt kaum beobachten. Hier konnte lediglich unmittelbar nach der Bestrahlung eine leichte Reduktion der totalen GSH-Menge verzeichnet werden. Bereits vier Stunden nach Bestrahlung war keine verringerte

Konzentration mehr detekierbar und die GSH-Menge in den bestrahlten und unbestrahlten Zellen war nahezu identisch (Abb. 28).

5.7.2 Glutathion Peroxidase Assay Kit

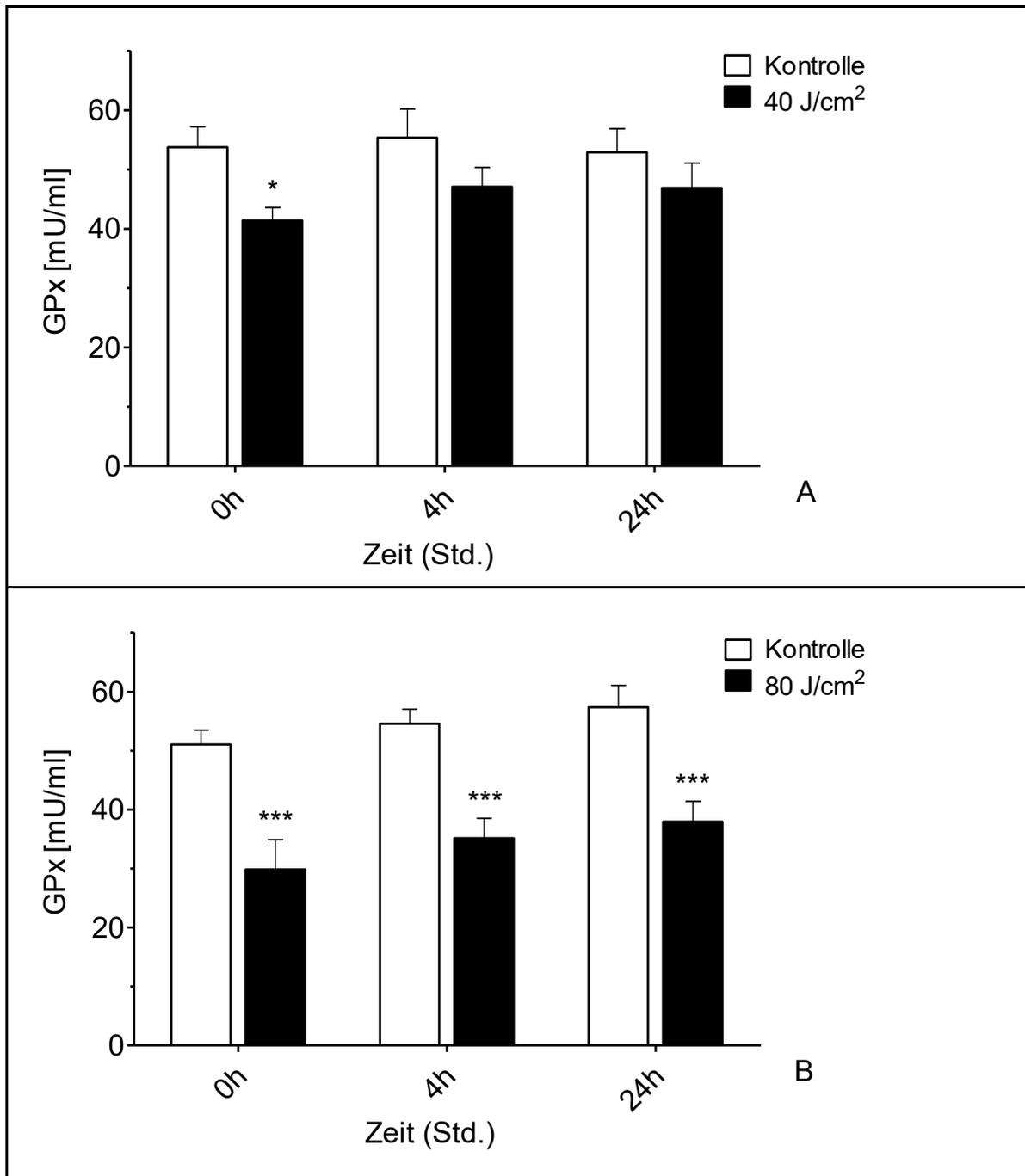


Abb. 29: Glutathion Peroxidase Aktivität bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 40 J/cm² (A) und 80 J/cm² (B) bestrahlt. Statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest (*=signifikant zu entsprechender, unbestrahlter Kontrolle; n=6).

Im Gegensatz zur Messung des Glutathion Colorimetric Assays, bei dem eine Bestrahlung mit 40 J/cm² eine signifikante Reduktion hervorrief, führte bei dem Glutathion Peroxidase Assay vor allem eine Bestrahlung mit 80 J/cm² zu einer signifikanten Reduktion der

Glutathion Peroxidase (GPx) Aktivität. Die Bestrahlung mit 80 J/cm^2 führte unmittelbar nach Bestrahlungsende zu einer signifikanten, etwa um 60 % reduzierten Aktivität der Glutathion Peroxidase. Diese erholte sich über die Zeit nur gering, sodass die Aktivität auch 24 Stunden nach Bestrahlung noch signifikant reduziert war.

Bei den mit 40 J/cm^2 bestrahlten Zellen konnten wir über die Zeit einen ähnlichen Verlauf und damit nur geringen Wiederanstieg der Glutathion Peroxidase Aktivität beobachten, jedoch kam es insgesamt zu einer weniger starken Reduktion der Aktivität. Hier war die Aktivität der Glutathion Peroxidase lediglich null Stunden, also unmittelbar nach der Bestrahlung, signifikant um etwa 25 % verringert. Ebenso war die Aktivität nach 24 Stunden nur noch leicht reduziert als die, der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 29).

5.7.3 Glutathion Reductase Fluorescent Activity Kit

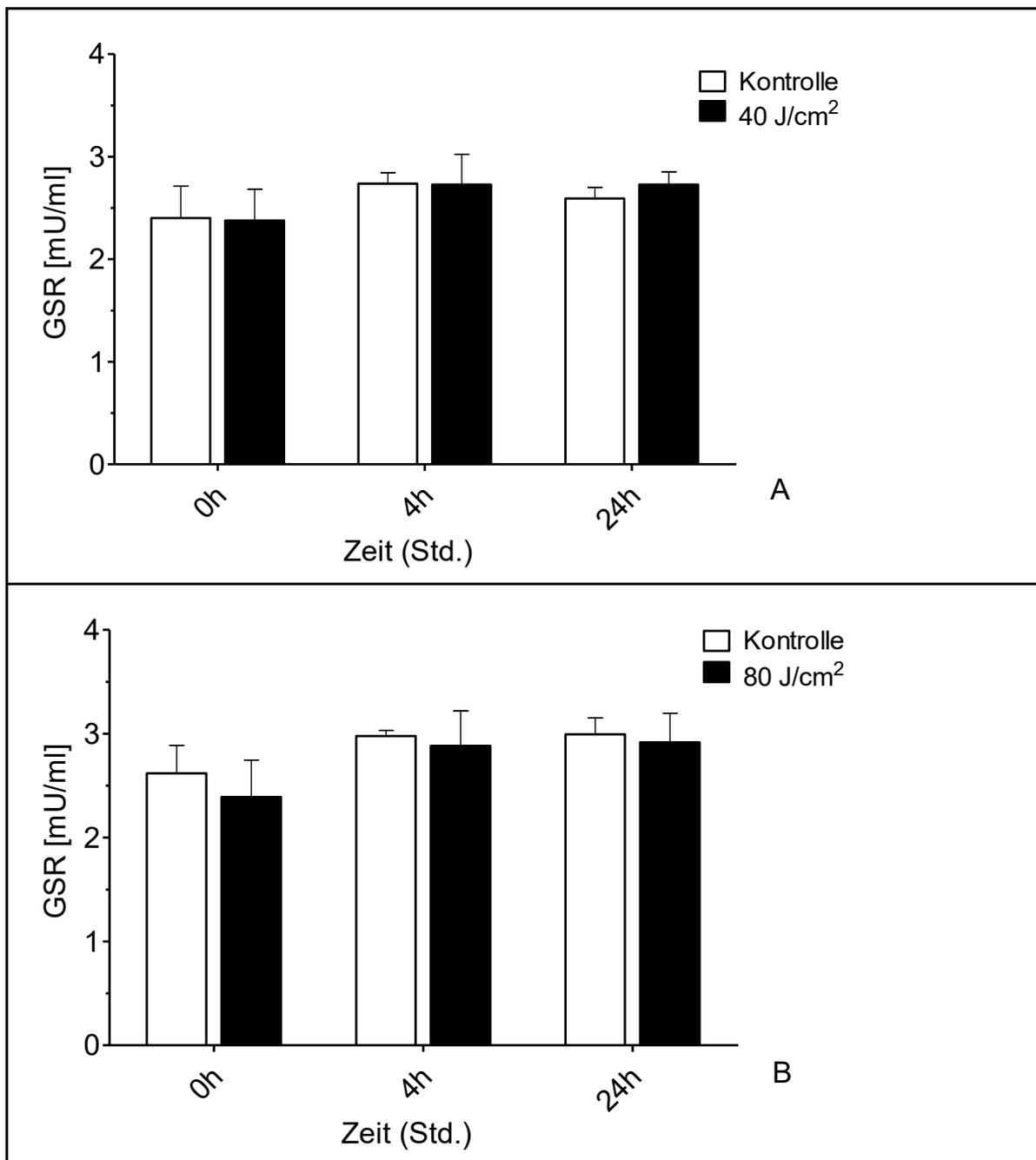


Abb. 30: Glutathion Reduktase Aktivität bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale

Fibroblasten wurden einmalig mit 40 J/cm^2 (A) und 80 J/cm^2 (B) bestrahlt. Statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest (keine Signifikanz; $n=6$).

Zum Abschluss der Messreihe führten wir das *Glutathion Reductase Fluorescent Activity Kit* durch, um ebenfalls die Aktivität der Glutathion Reduktase (GSR) zu untersuchen. Über den gesamten Messzeitraum von 24 Stunden war weder bei der Bestrahlung mit 80 J/cm^2 noch mit 40 J/cm^2 eine signifikante Reduktion der Glutathion Reduktase Aktivität detektierbar.

Einzig die Bestrahlung mit 80 J/cm^2 führte unmittelbar nach Bestrahlungsende zu einer geringgradigen Reduktion der Enzymaktivität. Sowohl vier als auch 24 Stunden nach der Bestrahlung war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Ebenso verhielt es sich bei der Bestrahlung mit 40 J/cm^2 , bei der über den gesamten Messzeitraum keine Aktivitätsunterschiede messbar waren (Abb. 30).

Aufgrund der deutlich signifikanten Ergebnisse bei der Untersuchung der Glutathion Peroxidase Aktivität, könnten auch hier in Zukunft weitere Versuchsreihen stattfinden, um sowohl die Rolle der ROS als auch der Redox-Systeme im Rahmen der Bestrahlung weitgehend zu untersuchen und zu verstehen.

6 Diskussion

Die Wundheilung ist ein komplexer, dynamischer und interaktiver biologischer Prozess, welcher klassischerweise in drei, ineinander übergehenden Phasen abläuft. Nach einer Verletzung werden verschiedenste intra- und interzelluläre Signalwege sowie verschiedene Zelltypen aktiviert und koordiniert, um die Integrität und Homöostase des Gewebes wiederherzustellen (Gurtner et al., 2008). In der letzten, der regenerativen Phase, wird die Kollagenmatrix kontinuierlich umstrukturiert, die Zellzahl reduziert und die Belastbarkeit der Narbe wiederhergestellt (Darby et al., 2014; Mutschler, 2012). Dabei spielt auch die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, durch Induktion von α -SMA über den TGF- β 1 Signalweg, eine entscheidende Rolle, da letztere durch kontraktile Kräfte den Wundverschluss initiieren (Barnes and Gorin, 2011; Darby et al., 1990; Vaughan et al., 2000). Durch Dysregulation einer der drei Phasen können bei dem Heilungsprozess unterschiedlichste Probleme auftreten, welche einerseits zu chronischen Wunden, andererseits zu exzessiver Wundheilung führen können (Wang et al., 2018). Eine exzessive Wundheilung, zum Beispiel durch vermehrte Kollagensynthese oder anhaltenden mechanischen Stress, kann sich in Form von hypertrophen Narben und Keloiden präsentieren (Broughton et al., 2006a; Darby et al., 2014; Gurtner et al., 2008).

Keloide und hypertrophe Narben zählen zu den fibroproliferativen Krankheiten und sind durch einen gestörten Wundheilungsprozess, meist infolge eines Traumas, charakterisiert (Lee and Jang, 2018; Wolfram et al., 2009). Sie zeichnen sich durch eine vermehrte Ablagerung von Kollagen, eine anhaltende Aktivität der Myofibroblasten und eine verminderte Apoptose aus (Reinke and Sorg, 2012; Singer and Clark, 1999; Tomasek et al., 2002). Keloide überschreiten, im Gegensatz zu hypertrophen Narben, die Grenzen der ursprünglichen Wunde. Sie bestehen aus unorganisiertem Kollagen Typ I und III und können sich bis zu einem Jahr nach Verletzung entwickeln (Gauglitz et al., 2011). Des Weiteren wurde eine Überexpression von TGF- β 1 in fibrotischen Geweben gefunden, weshalb diesem Zytokin ein profibrotischer Effekt zugeschrieben wird (Wang et al., 2018; Wolfram et al., 2009). Ebenso sind Myofibroblasten der prädominante Zelltyp in fibrotischen Erkrankungen, beispielweise dem Morbus Dupuytren, der Leberzirrhose und der Lungenfibrose (Barnes and Gorin, 2011; Pakshir et al., 2020). Aufgrund der oben genannten Eigenschaften stellt eine Beeinflussung des TGF- β 1 Signalwegs sowie Inhibition der Myofibroblasten-Differenzierung und -Proliferation eine mögliche, nützliche Strategie zur Prävention oder Reduktion solcher fibrotischer Erkrankungen dar (Taflinski et al., 2014).

Trotz der kosmetischen und funktionalen Probleme (Berman et al., 2017; Ehrlich, 1988), besteht für diese Erkrankungen bisher keine adäquate und heilungsversprechende Therapie (DiPietro, 2016; Gauglitz et al., 2011). Die optimale Behandlung kann meist nur durch Kombination interdisziplinärer Therapieregime erreicht werden (Wolfram et al., 2009). Daher wird die chirurgische Exzision, häufig in Kombination mit adjuvanten Behandlungsoptionen, wie der intraläsionalen Steroidinjektion oder der Kryotherapie, als Therapie der Wahl angewandt (Broughton et al., 2006b; Wolfram et al., 2009). Weitere Therapieansätze sind die Anwendung von topischen Silikongelen oder Kompression, die Modulation von TGF- β 1 oder die Durchführung einer Antikörper-vermittelten Immunotherapie (Wolfram et al., 2009). Auch die Lasertherapie in unterschiedlichsten Formen und Wellenlängen wird seit längerem eingesetzt (Abschnitt 1.4) (Gauglitz et al., 2011; Wolfram et al., 2009).

Aufgrund der Karzinogenität von UV-Strahlung, wird diese jedoch nicht mehr zur Langzeit-Behandlung empfohlen, sodass es einen Wechsel zur Anwendung von Licht mit

Wellenlängen des sichtbaren Spektrums gab (Garza et al., 2018; Lewis et al., 2005). In den letzten Jahren sind verschiedene Formen der Phototherapie, in Form der Photobiomodulation (PBM), aufgekommen, bei welcher mit einem breiten Wellenlängenbereich (380-440 nm (Liebmann et al., 2010); 400-1100 nm (Serrage et al., 2019)) hyperproliferative Hauterkrankungen wie Psoriasis, Akne, Keratosis und Hautkrebs behandelt werden (Liebmann et al., 2010). Um einen Effekt zu erzeugen müssen die Photonen des Lichts von einem Chromophor im Gewebe absorbiert werden. Generell können durch die PBM sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Effekte ausgelöst werden. Der am meisten beobachtete und beabsichtigte Effekt durch PBM ist die Produktion freier Radikale, insbesondere von ROS, welche von unterschiedlichsten Faktoren beeinflusst wird (Hamblin, 2018; Serrage et al., 2019). Außerdem wird die zelluläre Proliferation sowie die mitochondriale Funktion beeinflusst. Ebenso soll die Anwendung von blauem Licht anti-bakterielle und anti-inflammatorische Effekte haben, die Wundheilung fördern und die Zellproliferation vermindern (Serrage et al., 2019; Vandersee et al., 2015). Es ist bekannt, dass Flavine und Flavoproteine blaues Licht absorbieren und dadurch erhöhte Mengen an ROS generiert werden (Campiche et al., 2020; Opländer et al., 2011; Serrage et al., 2019). Daher postulierte Hockberger, dass die Flavine der flavinhaltigen Oxidasen, in Peroxisomen und Mitochondrien, durch blaues Licht photoreduziert werden und dies in der Produktion von H_2O_2 resultiert. Dabei liegen die Absorptionsspitzen bei den Wellenlängen 370 und 450 nm (Hockberger et al., 1999). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte Krassovka dies bei der Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm bestätigen. Sie konnte eine Veränderung des Absorptionsspektrums von Flavinen im Bereich von 445 nm nachweisen. Dies deutete auf eine verringerte Menge an oxidierten Flavinen durch eine Reduktion hin und bestätigte damit ihre Aufgabe als endogene Photosensibilisatoren für blaues Licht. Damit einhergehend zeigte sich ein verminderter Verbrauch von NADPH durch eine verringerte Aktivität NADPH-verbrauchender Enzyme (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017). Diese NADPH-abhängigen Enzyme sind zum Beispiel die zuvor erwähnten flavinhaltigen Oxidoreduktasen, welche für einen Großteil der Superoxid-Generierung verantwortlich sind (Barnes and Gorin, 2011). Dies ließ darauf schließen, dass die flavinhaltigen Enzyme durch blaues Licht entkoppelt werden, wodurch das ursprüngliche Substrat nicht mehr verbraucht wird, aber dennoch eine erhöhte Menge an ROS entsteht (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017). Genau wie Taflinski zuvor bei einer Bestrahlung der Wellenlänge 420 nm, konnte Krassovka zeigen, dass die Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 453 nm ebenso die TGF- β 1 induzierte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten hemmt. Dies wurde durch eine verminderte Expression des Markerproteins α -SMA nachgewiesen. All diese Effekte waren über die Zeit reversibel (Krassovka et al., 2020; Taflinski et al., 2014). Da die dosisabhängige Hemmung der Differenzierung und Proliferation mit einer erhöhten ROS-Generierung einherging, wurde diese als Ursache für den Mechanismus identifiziert (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017; Krassovka et al., 2019). Auch Taflinski machte den oxidativen Stress, durch nicht-toxische Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=420$ nm), und darauf folgende Energie verbrauchende zelluläre Reaktionen für die Hemmung der Proliferation und Störung der Differenzierung, sowie für den erhöhten Zellmetabolismus, verantwortlich (Taflinski et al., 2014).

Aufbauend darauf, untersuchte ich in meiner Arbeit die Auswirkungen von blauem Licht auf die Viabilität und Proliferation von humanen, dermalen Fibroblasten, deren Stoffwechsel- und Energiemetabolismus, sowie deren antioxidative Eigenschaften. Ziel war es, den zugrundeliegenden Mechanismus der Bestrahlung mit blauem Licht und dessen Effekte weiter zu entschlüsseln und zu prüfen, ob dies durch die Photoreduktion von Flavinen und

der damit einhergehenden ROS-Generierung zu erklären ist. Ich verwendete blaues Licht der Wellenlänge 453 nm, welches auch bei hohen Dosen bis 500 J/cm² keine Toxizität vermittelte (Liebmann et al., 2010; Opländer et al., 2013).

6.1 Der inhibierende Effekt von nicht-toxischem blauem Licht auf die Myofibrogenese

Um die bereits in Vorarbeiten beobachtete Inhibition der Differenzierung nochmal zu bestätigen, führten wir erneut eine Proteinbestimmung des Differenzierungsmarkers α -SMA mittels Western Blot durch. Dafür wurden die Zellen vorher mit oder ohne TGF- β 1 behandelt sowie an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils mit 20 J/cm², 40 J/cm² und 80 J/cm² bestrahlt. Ich konnte erneut zeigen, dass durch die tägliche Bestrahlung mit blauem Licht die Expression von α -SMA inhibiert und damit die Ausbildung von Myofibroblasten und ihrer kontraktile Kräfte verhindert wurde. Normalerweise werden diese durch TGF- β 1 vermehrt exprimiert (Pakshir et al., 2020; Tomasek et al., 2002). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse und Annahmen der Arbeitsgruppe von Liebmann et al.. Sie bestrahlten Endothelzellen und Keratinozyten ebenfalls mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm und konnten als Folge dessen eine dosisabhängige, reduzierte Proliferation der Zellen feststellen. Dies führten sie allerdings auf die Initiation der Differenzierung zurück, da sie eine erhöhte Expression der Differenzierungsmarker der Keratinozyten (Involucrin) nachweisen konnten (Liebmann et al., 2010). Dies spiegelt die unterschiedlichen Effekte von blauem Licht auf die verschiedenen Zellarten in Abhängigkeit von der Wellenlänge und Bestrahlungsstärke wider.

Bei Krassovka, welche ebenfalls eine Inhibition der Differenzierung nachweisen konnte, ging diese mit einer reversibel erhöhten Bildung von ROS einher, sodass diese für die Inhibition verantwortlich gemacht wurde (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017; Krassovka et al., 2020). Mehrere Quellen deuteten darauf hin, dass der entscheidende Schritt der Wirkung von UV-Licht oder sichtbarem Licht (280-700 nm) auf die Haut, im Rahmen der PBM, die vermehrte Entstehung freier Radikale, insbesondere reaktiver Sauerstoffspezies, war. Dabei korrelierte die Menge der erzeugten Radikale mit der Bestrahlungsstärke (Afaq and Mukhtar, 2001; Hamblin, 2018; Zastrow et al., 2009). Reaktive Sauerstoffspezies allgemein entstehen bei einer Menge von physiologischen und biologischen Prozessen, häufig als Nebenprodukt bei der oxidativen Phosphorylierung. Sie können zum einen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Signalwegen spielen, zum anderen bei erhöhter Konzentration, zum Beispiel durch vermehrte Produktion oder verminderte Entgiftung, oxidativen Schaden verursachen (Hamblin, 2018; Hornig-Do et al., 2007; Zastrow et al., 2009). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch die Zugabe von freien Sauerstoffradikalen zu kultivierten Fibroblasten der vom Morbus Dupuytren betroffenen Palmarfaszie, Dosis-abhängige Effekte ausgelöst werden. Geringe Konzentrationen freier Sauerstoffradikale führten zu vermehrter Expression von Kollagen Typ III wohingegen hohe Konzentrationen zu einer Inhibition der Proliferation führten (Rödel et al., 2017).

In Bezug auf unsere Arbeit bedeutete dies, dass bei einer höheren Bestrahlungsdosis vermutlich mehr ROS gebildet wurden. Dadurch konnten stärkere Effekte, in diesem Fall eine stärkere Differenzierungshemmung, ausgelöst werden. Die Bestrahlung mit 80 J/cm² führte demnach zu einer signifikanten Inhibition der Differenzierung. Bei der Bestrahlung mit 40 J/cm² und 20 J/cm² war diese nur weniger stark ausgeprägt. Es ist bekannt, dass vor allem blaues Licht den intrazellulären oxidativen Stress durch Bildung von ROS erhöht.

Dabei sind die Mitochondrien eine der wichtigsten Quellen für ROS (Hamblin, 2018). Doch wie kam diese vermehrte Produktion an ROS, die für die Inhibition der Differenzierung verantwortlich gemacht wird, zustande?

6.2 Der Einfluss von blauem Licht auf die Atmungskette und die Rolle von Flavinen als Photoakzeptoren

In dem von uns genutzten Wellenlängenbereich von 453 nm kommen zum einen porphyrin-haltige Enzyme, aber auch Flavoproteine als Photoakzeptoren des blauen Lichts in Frage (Losi and Gärtner, 2011; Opländer et al., 2011).

Flavoproteine sind gelbe Verbindungen, welche sowohl elektrophile als auch nukleophile Eigenschaften aufweisen und als Koenzyme an einer Vielzahl von (Elektronen-Transfer-) Reaktionen beteiligt sind (Iwata and Masuda, 2021; Losi and Gärtner, 2011; Massey, 2000). Säugetierzellen enthalten etwa 50 verschiedene Flavoproteine. Sie sind charakterisiert durch die Fähigkeit Ein- oder Zwei-Elektronentransfers durchzuführen und nehmen eine zentrale Rolle in dem aeroben Metabolismus ein (Losi, 2007; Losi and Gärtner, 2011; Massey, 2000). Aktuell existieren drei verschiedene Klassen von Photorezeptoren der Flavoproteine. Dazu gehören die Cryptochromen (CRYs), die *light-oxygen-voltage* (LOV) Domäne Proteine und die *blue light using FAD* (BLUF) Domäne Proteine, welche in den unterschiedlichsten physiologischen Prozessen involviert sind (Iwata and Masuda, 2021). Ihr Absorptionsbereich liegt in der Region des UVB, UVA und des blauen Lichts. Im blauen Bereich liegt die maximale Absorption des oxidierten Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) bei etwa 450 nm (Abb. 31) (Losi and Gärtner, 2011). Daher könnten Flavoproteine und Flavoenzyme mit FAD als Ko-Faktor, von blauem Licht dieser Wellenlänge beeinflusst werden. Krassovka konnte zeigen, dass die Bestrahlung von FAD mit blauem Licht zu dessen Reduktion führt, einhergehend mit der Auslöschung des maximalen Absorptions-Peaks bei 450 nm sowie eines generell verminderten intrazellulären Gehalts an oxidiertem FAD (Krassovka et al., 2020).

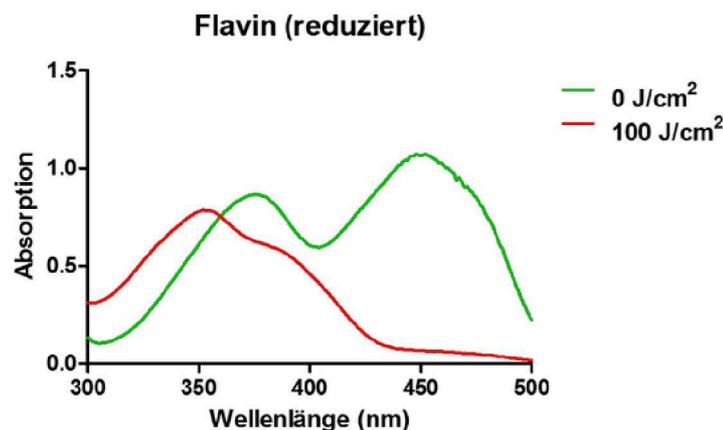


Abb. 31: Absorption von FAD mit und ohne Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm (100 J/cm²). Quelle: Modifiziert nach (Dipl.-Biol. Krassovka, 2017)

Die NADPH-Oxidase 4 (NOX4) gehört zu den flavinhaltigen Oxidoreduktasen und kann damit durch blaues Licht beeinflusst und reduziert werden. Sie ist ein 578 Aminosäuren großes, konstitutiv aktives Enzym und eines von sieben Mitgliedern der NADPH-Oxidase Familie. Exprimiert wird sie in diversen Geweben, vor allem in glatten Muskelzellen,

Endothelzellen und Adventitia-Fibroblasten, und ihre einzige Aufgabe ist die Generierung von ROS (Bernard et al., 2017; Selemidis et al., 2008). Die NOX4 übernimmt eine Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen, zum Beispiel bei der zellulären Differenzierung oder der Entstehung von Gewebe-Fibrose (Bernard et al., 2017). Die NOX4 wird für die ROS-induzierte Fibroblasten-Aktivierung verantwortlich gemacht und übernimmt damit eine essentielle Rolle im TGF- β 1 Signalweg und bei der Differenzierung zum profibrotischem Myofibroblasten-Phänotyp (Barnes and Gorin, 2011; Dipl. -Biol. Krassovka, 2017). Wie oben bereits erwähnt, können ROS allerdings dosis-abhängige Effekte haben und damit unterschiedliche Reaktionen auslösen (Hamblin, 2018; Hornig-Do et al., 2007; Rödel et al., 2017).

Um zu untersuchen, ob die Bestrahlung mit blauem Licht durch die Interaktion mit dem Flavin einen Einfluss auf die NADPH-Oxidase 4 hat, führten wir einen Proteinnachweis der NOX4 mittels Western Blot durch. Zuvor wurden die Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit blauem Licht bestrahlt und entweder mit oder ohne TGF- β 1 behandelt. Wir stellten fest, dass die Bestrahlung mit blauem Licht in jedem Fall zu einer signifikant reduzierten NOX4-Proteinexpression führte. Dies galt für alle Bestrahlungsdosen 20 J/cm², 40 J/cm² und 80 J/cm², sowohl in den mit TGF- β 1 aktivierten, als auch den nicht aktivierten Zellen. Daher führte die Bestrahlung mit blauem Licht zu einer Inhibition des Enzyms, vermutlich aufgrund dessen Entkopplung.

Für ihre eigentliche Funktion verbraucht die NADPH-Oxidase 4 NADPH als Substrat und überträgt Elektronen auf das FAD. In der Vergangenheit konnte allerdings nach der Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453$ nm) ein verminderter NADPH-Verbrauch, anhand eines verminderten NADP/NADPH-Verhältnisses, nachgewiesen werden (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017; Krassovka et al., 2020). Daher schlossen wir darauf, dass die photoinduzierte Reduktion des Flavins (FAD) durch blaues Licht eine vermehrte Produktion von H₂O₂ und einen erhöhten Elektronentransport auslöst, ohne dabei das eigentliche Substrat, das NADPH, zu verbrauchen (Abb. 32). Die reguläre Funktion des Enzyms wird infolge dessen gestört. Außerdem fanden Bernard et al. heraus, dass die NOX4 die Aktivität der Komplexe der Atmungskette modulieren kann. Die NOX4 ist innerhalb der Mitochondrien lokalisiert und interagiert dort mit dem Komplex I der Atmungskette. Ein Mangel an NOX4 beeinflusst diese Interaktion und begünstigt die ROS-Produktion durch den Komplex. Zudem konnte eine erhöhte mitochondriale Atmung bei NOX4-Defizienz nachgewiesen werden (Bernard et al., 2017).

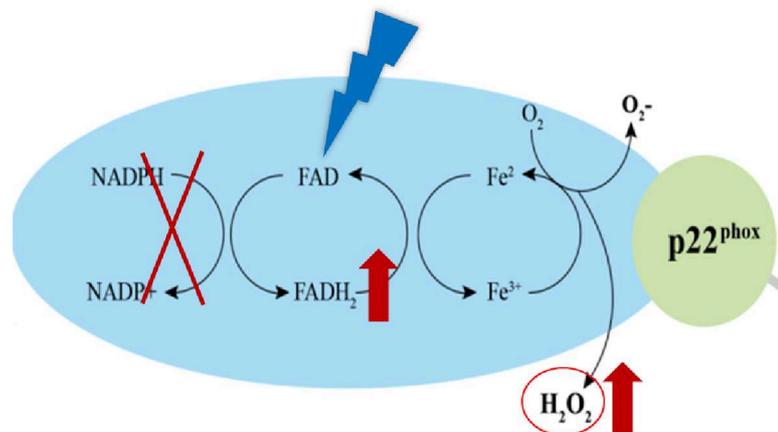


Abb. 32: Möglicher Effekt der Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453$ nm) auf flavinhaltige Oxidoreduktasen am Beispiel der NADPH-Oxidase 4. Durch die Reduktion des Flavins werden

vermehrt ROS gebildet, ohne das Substrat NADPH zu verbrauchen. Quelle: Modifiziert nach (Dipl.-Biol. Krassovka, 2017).

Da die NOX4 eine essentielle Rolle im Rahmen des TGF- β 1 Signalwegs bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten spielt, hat die Bestrahlung auch darauf Auswirkungen. Wie in Abschnitt 6.1 beschrieben, konnten wir nach der Bestrahlung eine verminderte Expression von α -SMA detektieren. Dabei scheint die Entkopplung des Enzyms einhergehend mit der vermehrten Produktion an ROS (H_2O_2) verantwortlich für die Inhibition der Differenzierung zu sein. Außerdem stellte Krassovka in der Vergangenheit fest, dass nach der Blaulicht-Bestrahlung eine reduzierte ERK1/2 Proteinexpression nachzuweisen war. Die Bestrahlung führte also zu einer Entkopplung der NOX4, mit einer vermehrten Produktion an ROS und einer Störung des nachfolgenden Signalwegs (Abb. 33) (Krassovka et al., 2020).

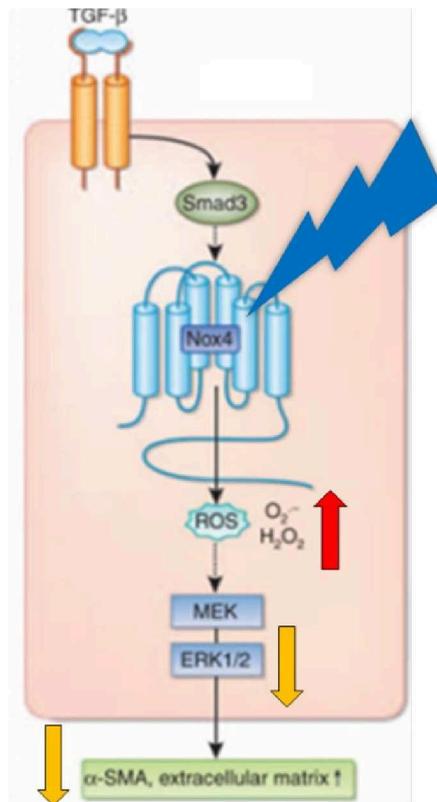


Abb. 33: Einfluss der Bestrahlung mit blauem Licht auf den NOX4 Signalweg im Rahmen der TGF β 1 abhängigen Aktivierung von Fibroblasten. Quelle: Modifiziert nach (Barnes and Gorin, 2011).

Viele flavinhaltige Enzyme sind außerdem in primären metabolischen Signalwegen involviert, zum Beispiel dem Citratsäure-Zyklus, der β -Oxidation oder der Atmungskette (Ahmad et al., 2021; Krassovka et al., 2020). Bereits 1978 stellte Aggarwal et al. fest, dass an der Absorption von sichtbarem Licht mitochondriale Flavine der Zellen beteiligt waren. Als Reaktion auf die Licht-Exposition bemerkte er eine Inaktivierung der mitochondrialen Aktivität und führte diese hauptsächlich auf die Inhibition der NADH-Dehydrogenase und Succinat-Dehydrogenase zurück. Diese Dehydrogenasen (Oxidoreduktasen) sind flavin-haltige, NADPH-verbrauchende Enzyme und damit in der Lage blaues Licht zu absorbieren (Aggarwal et al., 1978). Dabei enthält die NADH-Dehydrogenase (Komplex I der Atmungskette) das FMN als Flavin und die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) das $FADH_2$ als Flavin-haltiges Cytochrom (Serrage et al., 2019). Studien belegen, dass Flavine

in Form des reduzierten FAD (FADH₂) Superoxide und H₂O₂ in einem Prozess, der Dunkel-Reoxidation genannt wird; generieren können (Krassovka et al., 2020; Massey, 2000). Dabei stellen die Mitochondrien eine große endogene Quelle von ROS in den Zellen dar (Lewis et al., 2005). Auch Hockberger et al. (1999) hatten bereits herausgefunden, dass H₂O₂ hauptsächlich in den Peroxisomen und Mitochondrien, in Anwesenheit von flavinhaltigen Oxidasen, entsteht und schlossen daher auf eine Licht-induzierte Produktion von H₂O₂ durch Photoreduktion von Flavoproteinen (Hockberger et al., 1999).

Im Rahmen des CellTiter Blue und des MTT Assays untersuchten wir schließlich die Aktivität der flavinhaltigen Komplexe der Atmungskette und konnten damit Rückschlüsse über den Einfluss der Bestrahlung auf die mitochondriale Aktivität der Zellen ziehen. Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität des Komplex I wurde der CellTiter Blue Assay durchgeführt, bei welchem der Farbstoff Resazurin zu Resorufin reduziert wurde. Die Fluoreszenz gibt an, wie viel Farbstoff in Abhängigkeit von der Zeit durch die Zellen umgesetzt wurde. Dabei konnten wir beobachten, dass die Bestrahlung von humanen dermalen Fibroblasten mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm und einer Dosis von 40 J/cm² und 80 J/cm² zu einer erhöhten Fluoreszenz und damit einem vermehrten Umsatz des Komplex I führte (Abb. 16). Dieser Effekt war unmittelbar, sowie vier Stunden nach der Bestrahlung am deutlichsten ausgeprägt, was bedeutet, dass die Zellen zu diesen Zeitpunkten besonders viel Farbstoff metabolisierten. Für die Reduktion wird in der Regel NADPH, FADH, FMNH oder NADH gebraucht (Rampersad, 2012).

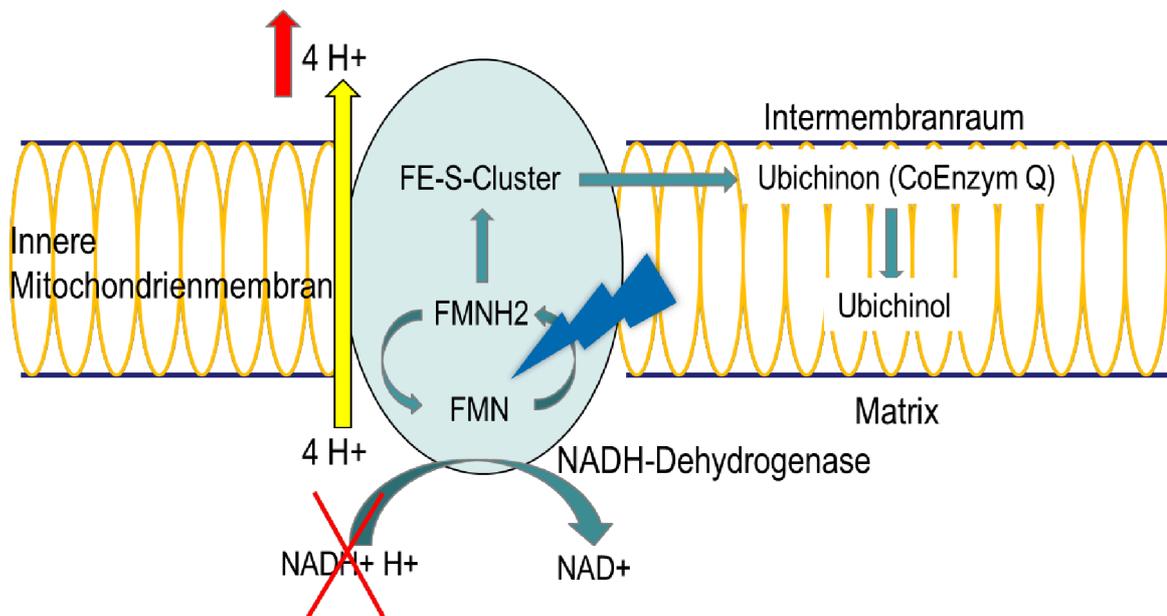


Abb. 34: Schematische Darstellung des Effekts der Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453$ nm) auf die flavinhaltige NADH-Dehydrogenase (Komplex I) der Atmungskette. Durch die Reduktion des Flavins werden vermehrt Protonen transportiert und infolge dessen ROS generiert, ohne dass das Substrat NADH oxidiert wird.

Im Rahmen der Atmungskette nimmt das FMN des Komplex I zwei Elektronen des oxidierten NADH auf und überträgt diese durch Zwischenschritte auf das Coenzym Q. Während dieses Prozesses werden vier Wasserstoff Ionen von der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum transportiert und tragen zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten bei (Ahmad et al., 2021; Lenaz et al., 2006). Allerdings gibt es einige Agenzien, durch welche die Entkopplung der Atmungskette ausgelöst und damit die Bildung von ATP verhindert werden kann. Es entsteht ein Protonenleck, welches den elektrochemischen

Gradienten schwächt, obwohl weiterhin Protonen übertragen werden. Diese können jedoch von der ATP-Synthase nicht zur Produktion von ATP genutzt werden (Ahmad et al., 2021). Einen ähnlichen Effekt vermuteten wir bei der Bestrahlung mit blauem Licht. Wir schlossen darauf, dass durch die Reduktion des FMN, ausgelöst durch das blaue Licht, mehr Elektronen durch den Komplex übertragen wurden. Folglich wurde mehr Farbstoff umgesetzt, ohne das eigentliche Substrat NADH zu verbrauchen. Dies deutete auf eine Inhibition der eigentlichen Funktion des Enzyms und damit auf eine Entkopplung der Atmungskette hin, in dessen Folge kein Protonengradient gebildet werden konnte (Abb. 34). Bereits 1978 schloss Aggarwal darauf, dass die Bestrahlung mit blauem Licht in den Mitochondrien eine Entkopplung der Komplexe der Atmungskette auslöst, einhergehend mit einem Verlust des Membranpotentials (Aggarwal et al., 1978). Einen ähnlichen Ansatz verfolgte Hamblin et al., indem sie feststellten, dass durch die PBM das mitochondriale Membranpotential erhöht wurde und dadurch ein vermehrter Elektronentransport stattfand. Sie vermuteten eine vermehrte ROS Produktion in Folge des erhöhten Membranpotentials. Im Verlauf führte dies zu einem Zusammenbruch des Potentials und resultierte in einer noch höheren ROS-Generierung durch die Atmungskette (Hamblin, 2018). Eine vermehrte Bildung von ROS in Folge der Reduktion von Flavinen konnte auch Krassovka in der Vergangenheit bestätigen (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017).

Allerdings gibt es einige Quellen, nach denen der Umsatz des Farbstoffes nicht spezifisch auf einen Komplex der Atmungskette zurückzuführen war, sondern vielmehr ein Indikator für die Oxidations-Reduktions-Aktivität der verschiedenen Komponenten der Atmungskette darstellte (Petrenko et al., 2005; Rampersad, 2012). Auch Taflinski schloss darauf, dass im Rahmen dieses Assays vorrangig die metabolische Funktion und Aktivität der Zellen abgebildet wurde (Taflinski et al., 2014). Weiterhin konnten wir beobachten, dass die erhöhte Aktivität der bestrahlten Fibroblasten 24 Stunden nach der Bestrahlung nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Dies deutete darauf hin, dass die, durch die Bestrahlung hervorgerufenen, Effekte reversibel waren und eine Erholung der Fibroblasten eintrat. Ebenso waren bei der Bestrahlung mit einer Dosis von 20 J/cm² kaum Unterschiede in der Fluoreszenz zu erkennen, sodass nur höhere Lichtdosen die Flavine in ausreichendem Maße stimulierten, um eine Entkopplung hervorzurufen.

Nachdem bereits der Komplex I durch die Bestrahlung mit blauem Licht vermehrt aktiv war und durch die Entkopplung des Enzyms kein Protonengradient aufgebaut wurde, stellten wir uns die Frage, welche Auswirkungen dies auf weitere Komplexe der Atmungskette hat. Daher bestimmten wir nachfolgend mittels MTT Assay die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase (SDH), dem Komplex II der Atmungskette. Dabei wurde der Farbstoff Tetrazolium durch das Enzym (SDH) zu unlöslichem Formazan reduziert, welches schließlich in Form eines Farbsignals durch Messung der optischen Dichte dargestellt werden konnte. Wir konnten über den gesamten Messzeitraum von 24 Stunden eine verminderte optische Dichte, also einen verminderten Umsatz, aufgrund einer geringeren Aktivität der SDH, beobachten. Bei einer Bestrahlungsdosis von 40 J/cm² und 80 J/cm² zeigte sich, vor allem vier Stunden nach Bestrahlungsende, eine signifikante Reduktion der optischen Dichte. Da die Succinat-Dehydrogenase ebenfalls das FAD als Flavin enthält, scheint auch dieses Enzym durch die Bestrahlung beeinflusst und entkoppelt zu werden. Die verminderte Aktivität der SDH könnte darin begründet sein, dass durch die Entkopplung der NADH-Dehydrogenase kein ausreichender elektrochemischer Gradient aufgebaut wurde und somit die Succinat-Dehydrogenase nur eingeschränkt aktiv sein konnte. Da der Komplex II selbst keine Protonen durch die Membran transportiert, scheinen die Auswirkungen auf den Protonengradienten in diesem Fall geringer zu sein als bei dem

Komplex I. Dennoch wurden durch die Reduktion des FAD zu FADH₂ vermutlich vermehrt ROS gebildet, wie bei der NADH-Dehydrogenase bereits erklärt.

Andere Studien konnten teils kontroverse Beobachtungen machen. Masson-Meyers et al. bestrahlten ebenfalls Fibroblasten mit blauem Licht ($\lambda=470$ nm) und konnten bei Dosen von 110 und 220 J/cm² eine verminderte Viabilität feststellen. Sie schlussfolgerten daraus, dass der Grund dafür, in einem veränderten mitochondrialen Metabolismus, einer lysosomalen Dysfunktion und dem Verlust der Membranintegrität lag (Masson-Meyers et al., 2016). Lewis et al. dagegen bestrahlten sowohl Tumorzellen als auch gesunde Keratinozyten mit blauem Licht (380-500 nm) und konnten jeweils unterschiedliche Effekte beobachten. Die Bestrahlung der Keratinozyten führte zu einer gering erhöhten Aktivität der SDH, wohingegen die Bestrahlung der malignen Zellen zu einer Suppression der SDH-Aktivität führte (Lewis et al., 2005). Gleiches stellten Lockwood et al. fest, bei denen kumulativ höhere Level an ROS in oralen Plattenepithel-Karzinomzellen als in den normalen Zellen gemessen wurden (Lockwood et al., 2005). Dies macht deutlich, dass die Blaulicht-Bestrahlung scheinbar unterschiedliche Effekt auf verschiedene Zelltypen hat. Daher sollte der Einfluss der Bestrahlung mit blauem Licht auf die mitochondriale Aktivität und die Komplexe in Zukunft auch an erkrankten Zellen, zum Beispiel des Morbus Dupuytren oder keloidalen Zellen, durchgeführt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass Fibroblasten des Morbus Dupuytren einen höheren Metabolismus haben und daher auch erhöhte Mengen an ROS erzeugen, weshalb sie möglicherweise noch stärker von der Bestrahlung beeinflusst werden (Krassovka et al., 2019). Im Gegensatz zum CTB Assay konnten wir bei dem MTT Assay nach 24 Stunden weiterhin eine deutlich reduzierte Aktivität beobachten, sodass der Effekt der Bestrahlung in diesem Fall nach 24 Stunden noch nicht reversibel war. Dies könnte daran liegen, dass der Wiederaufbau des Protonengradienten beziehungsweise Membranpotentials, und damit auch die Normalisierung der Aktivität des Komplex II, erst mit etwas Verzögerung eintritt. Um zu untersuchen, ob es sich hier um einen dauerhaft irreversiblen oder möglicherweise auch einen reversiblen Effekt handelt, könnten in Zukunft längere Versuche über 48 oder 72 Stunden stattfinden.

6.3 Der Effekt von blauem Licht auf die ATP-Produktion

Aufgrund des zuvor festgestellten Einflusses der Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453$ nm) auf die mitochondriale Aktivität und die mögliche Inhibition der Komplexe der Atmungskette, führten wir im Anschluss eine Messung der ATP-Konzentration innerhalb der Zellen durch. Dadurch konnten wir außerdem den Effekt des blauen Lichts auf den Energiemetabolismus der Zellen beurteilen.

Die Mitochondrien sind wichtig für das zelluläre Überleben, haben jedoch zwei widersprüchliche Eigenschaften. Klassischerweise synthetisieren sie ATP (*adenosine 5' triphosphate*) im Rahmen der Atmungskette und stellen damit die notwendige Energie für die Zellen bereit. Außerdem generieren sie ROS, welche gegensätzliche Effekte haben und zelluläre Prozesse sowie das Überleben beeinflussen können (Hornig-Do et al., 2007). Die Atmungskette besteht aus vier Komplexen. Diese Komplexe durchlaufen Redox-Reaktionen, wodurch ein Elektronenfluss von der mitochondrialen Membran in den Intermembranraum entsteht. Die ATP-Synthase stellt den fünften Komplex dar. Sie nutzt den aufgebauten Protonengradienten schließlich zur Produktion von ATP. Dieses System wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet (Ahmad et al., 2021; Serrage et al., 2019).

Nach der einmaligen Bestrahlung humaner dermaler Fibroblasten mit Lichtdosen ($\lambda=453$ nm) von 20 J/cm^2 , 40 J/cm^2 und 80 J/cm^2 konnten wir in den ersten vier Stunden nach der Bestrahlung eine Reduktion des relativen ATP-Gehalts der Zellen beobachten. Dieser war vor allem unmittelbar nach sowie zwei Stunden nach der Bestrahlung deutlich reduziert, allerdings zu keiner Zeit signifikant. Außerdem konnten wir eine Lichtdosis-abhängige Reduktion feststellen, sodass eine höhere Bestrahlungsdosis auch zu einer stärkeren Verringerung der ATP-Konzentration führte.

Dies deckte sich mit den zuvor gemachten Beobachtungen. Wie in Abschnitt 6.2 beschrieben, induzierte die Blaulicht-Bestrahlung eine durch die Reduktion der Flavine ausgelöste Entkopplung der Atmungskette. Als Folge dessen wurden zwar vermehrt Elektronen transportiert, allerdings konnte kein Protonengradient aufgebaut und somit kein ATP durch die ATP-Synthase produziert werden (Abb. 35). Je höher die Bestrahlungsdosen waren, desto mehr Energie zum Transport von Elektronen wurde geliefert, die Enzyme stärker entkoppelt und umso mehr ROS gebildet (Krassovka et al., 2020). Bereits sechs Stunden nach Bestrahlungsende konnten wir einen Wiederanstieg der ATP-Konzentration feststellen. Nach 24 Stunden sogar einen leicht erhöhten ATP-Gehalt im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe. Das bedeutet, dass der Effekt des blauen Lichts auf die ATP-Produktion reversibel war und keine permanenten Schäden an der Atmungskette entstehen.

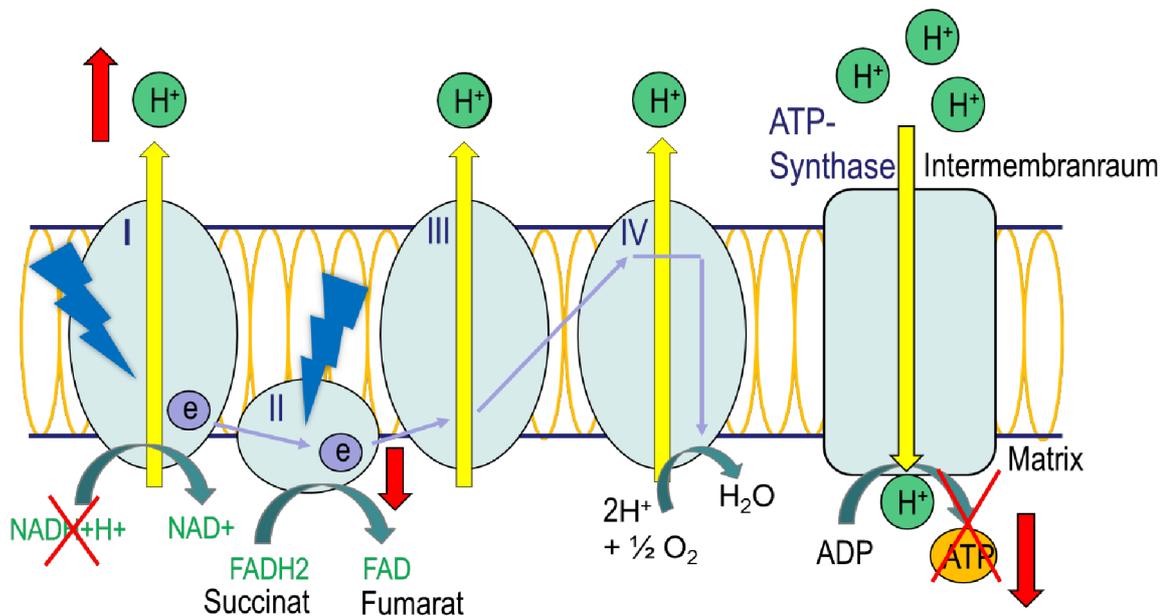


Abb. 35: schematische Darstellung des Einflusses der Bestrahlung mit blauem Licht auf die Komplexe der Atmungskette und nachfolgend auf die ATP-Produktion. Blaues Licht entkoppelt den Komplex I, sodass vermehrt Elektronen über die Membran gepumpt werden, jedoch ohne ein Membranpotential aufzubauen. Auch die Flavine des Komplex II absorbieren blaues Licht und sind daher vermindert aktiv. Insgesamt entsteht kein ausreichender Protonengradient, um schließlich ATP produzieren zu können.

Meine Ergebnisse deckten sich weitestgehend mit denen von Krassovka. Sie bestimmte die relative ATP-Konzentration pro Zelle in mit TGF- β 1 aktivierten, wie auch in nicht aktivierten dermalen Fibroblasten. In beiden Gruppen konnte sie nach der einmaligen Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453$ nm) einen signifikant verringerten ATP-Gehalt pro Zelle detektieren. Dies führte sie auch auf eine Unterbrechung des Elektronentransports innerhalb der Atmungskette zurück (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017). Andere Arbeitsgruppen haben die ATP-Konzentration in Endothelzellen und Keratinozyten nach wiederholter Bestrahlung mit Licht

der Wellenlänge 453 nm in nicht-toxischen Dosen gemessen. Sie konnten eine signifikant erhöhte ATP-Konzentration in diesen Zellen messen. Allerdings konnten sie auch eine Induktion der Differenzierung der Keratinozyten einhergehend mit einer Reduktion der Proliferation insgesamt feststellen. Sie schlossen darauf, dass die Proliferationsinhibition durch eine Erschöpfung des Energiemetabolismus hervorgerufen wurde (Liebmann et al., 2010). Ein ähnlicher Mechanismus wäre bei unseren Versuchen auch denkbar, nämlich dass eine Depletion des Energiemetabolismus die Proliferation hemmt.

Die Atmungskette stellt einen Teil der oxidativen Phosphorylierung dar und diese gehört neben der Glykolyse und dem Citratzyklus zur aeroben zellulären Atmung. Daher vermuteten wir, dass die Bestrahlung möglicherweise den gesamten aeroben zellulären Energiemetabolismus einschränken könnte. Dies konnte bereits in weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe anhand einer Reduktion des Sauerstoffverbrauchs der Zellen beobachtet werden (Dennis Merk, 2020). Außerdem stellen die oxidative Phosphorylierung und die Glykolyse zwei der wichtigsten Produktionswege zur ATP-/Energiegewinnung der Zellen dar. Das ATP ist notwendig für die Aufrechterhaltung der Homeostase und das Überleben der Zellen (Lunt and Vander Heiden, 2011). Kommt es zu einer Einschränkung dieser Signalwege einhergehend mit einer Depletion des Energiemetabolismus, wäre ein Proliferationsinhibition eine mögliche Folge. Dieser Effekt wäre sowohl bei der Behandlung von hypertrophen Narben und Keloiden, als auch bei fibrotischen Erkrankungen durch Bestrahlung mit blauem Licht hilfreich, um das überschießende Wachstum zu verhindern.

6.4 Der Einfluss der Bestrahlung auf den Glucose-Stoffwechsel

Um den Einfluss der Bestrahlung auf die aerobe zelluläre Atmung und den Energiemetabolismus der Zellen weitergehend zu untersuchen, führten wir den Glucose-Glo Assay (Promega) durch. Glucose stellt für die Zellen eine bedeutende Quelle für zelluläre Energie und neue Zellprodukte dar (Lunt and Vander Heiden, 2011). Im Rahmen des Assays haben wir die relative Glucosekonzentration in Abhängigkeit von der DNA-Menge bestimmt. Dabei katalysierte die Glucose-Dehydrogenase die Oxidation von Glucose unter Verbrauch von NAD⁺. Unter Verwendung des entstehenden NADH reduziert anschließend die Reduktase Pro-Luciferin zu Luciferin. Das Luciferin wurde schließlich unter der Reaktion der Luciferase und ATP in Form von Licht detektiert. Dabei war die Menge des produzierten Lichts proportional zu der Menge an Glucose in der Probe (Promega Corporation, 2017) (siehe Abb. 10).

Wie bereits erwähnt, ist die Glykolyse neben der oxidativen Phosphorylierung und dem Citratzyklus einer der wichtigsten aeroben Signalwege für die Energieproduktion (Sokolov et al., 2015). Dabei wird Glucose im Rahmen der Glykolyse zu Pyruvat metabolisiert, um schließlich bei der oxidativen Phosphorylierung ATP zu generieren (Lunt and Vander Heiden, 2011). Im Allgemeinen ist die oxidative Phosphorylierung effizienter bei der reinen Energieproduktion, wohingegen die aerobe Glykolyse Aufgaben über die ATP-Produktion hinaus erfüllt. Die Hauptfunktion der Glykolyse stellt die vermehrte Synthese von Biomasse zur Unterstützung anaboler Reaktionen der Zellen dar, durch Bereitstellung glykolytischer Zwischenprodukte. Aufgrund dessen unterscheidet sich der Energiemetabolismus ruhender Zellen signifikant von dem, schnell-proliferierender Zellen. Aktiv sich teilende Zellen, beispielsweise Krebszellen, nutzen häufig die aerobe Glykolyse, auch unter physiologischen Sauerstoffkonzentrationen (Lunt and Vander Heiden, 2011; Sokolov et al., 2015). Daher

scheint diese eine wichtige Rolle bei der Proliferation und dem Wachstum von Krebszellen zu spielen. Durch die vermehrte Glykolyse können die Zellen eine erhöhte Menge an metabolischen Zwischenprodukten bilden, welche zur Synthese von Nukleotiden, Fetten und Proteinen benötigt werden (Feng et al., 2020). Ähnlich ist es bei der Fibrose, bei welcher die Fibroblasten einerseits schneller proliferieren und andererseits vermehrt extrazelluläre Matrix ablagern. Auch hier bietet die aerobe Glykolyse beides. Zum einen das notwendige ATP und zum anderen das Synthesematerial in Form von Zwischenprodukten. Daher wechseln diese Fibroblasten das metabolische Profil von oxidativer Phosphorylierung zu aerober Glykolyse (Ding et al., 2017). Dieser Wechsel wird auch als „Warburg Effekt“ bezeichnet (Wei et al., 2019).

Auch die Wundheilung ist ein Energie-abhängiger Prozess. In der initialen Phase sind die Zellen auf die anaerobe ATP-Produktion via Glykolyse angewiesen. Später in der Proliferationsphase weisen die Zellen eine erhöhte Proteinsynthese und damit einen gesteigerten Metabolismus auf. Deshalb sind sie auf ein hohes ATP-Angebot im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung und Glykolyse angewiesen und benötigen eine erhöhte Menge an Glucose und Sauerstoff (Broughton et al., 2006b).

Weiterhin trägt eine erhöhte Glykolyse entscheidend zur Manifestation eines fibrogenen Phänotypen in Fibroblasten bei (Chen et al., 2019; Wei et al., 2019). Dies lässt sich damit erklären, dass beispielsweise die proliferativen Eigenschaften von Fibroblasten in hypertrophen Narben deutlich höher sind als in normalen, gesunden Haut-Fibroblasten (Ghazawi et al., 2018). In einer weiteren Studie konnte eine vermehrte Expression von Enzymen der Glykolyse in renalen interstitiellen Fibroblasten, die zuvor mit TGF- β 1 behandelt wurden, als auch in fibrotischem Nierengewebe nachgewiesen werden. Daher wurde der aeroben Glykolyse eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der renalen Fibrose zugemessen. Ebenso wurde durch eine erhöhte aerobe Glykolyse die Aktivierung der Myofibroblasten induziert, während durch Inhibitoren der aeroben Glykolyse die TGF- β 1 stimulierte Differenzierung zu Myofibroblasten vermindert werden konnte (Ding et al., 2017). Zusätzlich dazu, führte die Inhibition der Glykolyse auch zu einer reduzierten Expression von Fibronectin und α -SMA, was ebenfalls auf eine verminderte Differenzierung hindeutete (Wei et al., 2019). Aufgrund dessen wurden die Inhibition der Glykolyse als potentielle neue anti-fibrotische Therapieoption angesehen (Ding et al., 2017).

In einigen Quellen wurden dem blauen Licht anti-proliferative Eigenschaften zugeschrieben (Garza et al., 2018; Magni et al., 2020; Opländer et al., 2011). So stellte Opländer et al. beispielsweise fest, dass die Bestrahlung von humanen, dermalen Fibroblasten mit nicht-toxischen Dosen blauen Lichts mit Wellenlängen zwischen 400-460 nm zu einer Inhibition der Proliferation führte (Opländer et al., 2011). Garza et al. nannten als Grund dafür eine Energiedepletion, ausgelöst durch die Bestrahlung, welche den bei einigen Gruppen festgestellten Proliferations- und Zellteilungsstopp erklären könnte (Garza et al., 2018). Diese Überlegungen lassen sich auch auf unsere Ergebnisse übertragen. Wir konnten anhand des Glucose-Glo Assays feststellen, dass die Fibroblasten nach der Bestrahlung mit blauem Licht deutlich weniger Glucose verbrauchten. Damit war die Glucose-Konzentration im Medium nach der Bestrahlung höher, als die des Mediums der Kontrollzellen. Vor allem nach einer einmaligen Bestrahlung mit 80 J/cm² konnte unmittelbar, eine und vier Stunden nach der Bestrahlung signifikant mehr Glucose pro DNA nachgewiesen werden. Die Glucose-Konzentration war zeitweise doppelt so hoch wie die, der unbestrahlten Kontrollzellen. Diese bestrahlten Fibroblasten verbrauchten also signifikant weniger Glucose, was auf eine starke Inhibition der Glykolyse durch die

Bestrahlung hindeutete. Ebenso führte die Bestrahlung mit 40 J/cm² und 20 J/cm² zu einer entsprechenden, dosis-abhängigen Einschränkung der Glykolyse bis zu vier Stunden nach Bestrahlungsende. Erneut auffällig war, dass die Glucose-Konzentration sich nach 24 Stunden wieder leicht anglich. Besonders bei der Bestrahlung mit 20 J/cm² waren die bestrahlte Gruppe und die Kontrollgruppe nach 24 Stunden auf einem nahezu gleichen Niveau. Daher scheint auch dieser Effekt des blauen Lichts über die Zeit reversibel zu sein und keine permanente Inhibition der Glykolyse zu verursachen. Unsere Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Hemmung der Glykolyse, einhergehend mit einem reduzierten Glucose-Verbrauch, zu einer verminderten ATP-Produktion beiträgt sowie zu einer eingeschränkten Produktion metabolischer Zwischenprodukte führt. Dies könnte die Ursache für eine eingeschränkte Zellproliferation und verminderte Differenzierung sein, wie ich sie bereits in Abschnitt 6.1 anhand der reduzierten Expression des Differenzierungsmarkers α -SMA zeigen konnte. Dadurch könnte zudem der pathologischen Prozess der vermehrten Zellteilung im Rahmen der Fibrose inhibiert werden, da vermutlich vor allem proliferierende Zellen empfänglicher für blaues Licht sind (Opländer et al., 2011). Außerdem ist damit der zweite wichtige Signalweg der ATP-/Energiegewinnung, neben der oxidativen Phosphorylierung der Atmungskette, gestört, was zu der insgesamt verminderten ATP-Konzentration beiträgt (Abschnitt 6.3). Die meisten Zellen wechseln bei einer Störung der Atmungskette auf die Glykolyse, um damit weiterhin Energie in Form von ATP produzieren zu können (Lunt and Vander Heiden, 2011). Dies ist hier allerdings nicht der Fall, da beide Energie-produzierenden Signalwege durch die Bestrahlung beeinträchtigt werden. Der genaue Mechanismus, welcher der Inhibition der Glykolyse zugrunde liegt, ist allerdings unklar. Ein Grund könnte eine Beeinflussung durch die vermehrte ROS-Produktion, ausgelöst durch das blaue Licht, sein. Ein anderer könnte das NAD⁺/NADH Verhältnis sein, welches für die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat benötigt wird. Um eine anhaltende Glykolyse zu gewährleisten, muss die NAD⁺/NADH Redox-Balance aufrechterhalten bleiben. Das NAD⁺ wird benötigt für die Umwandlung von Glycerinaldehyde-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat, welche durch die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase katalysiert wird. Daher muss das NAD⁺ wieder regeneriert werden. Dies geschieht entweder im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette, wobei die Elektronen des NADH+(H⁺) auf den Komplex I der Atmungskette übertragen werden, oder indem das NADH+(H⁺) als Substrat der Lactatdehydrogenase (LDH) verbraucht wird (Lunt and Vander Heiden, 2011). Da das NADH+(H⁺) des Komplex I, als Folge der Entkopplung des Komplexes durch die Bestrahlung, nicht verbraucht wird (Abschnitt 6.2), wird auch das benötigte NAD⁺ vermutlich nicht wieder regeneriert. Dadurch könnte dies zu einer Hemmung der Glykolyse führen, als Folge der erhöhten NADH+(H⁺) Konzentration (Via Medici, 2021). Bereits Krassovka et al. konnte ebenso ein vermindertes NADP⁺/NADPH Verhältnis nach der Bestrahlung mit blauem Licht, ausgelöst durch eine Inhibition NADPH-oxidierender Flavoproteine, nachweisen (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017).

6.4.1 Effekt der Bestrahlung auf die FOXO1-Proteinexpression

Ein weiteres Protein, was wir im Zusammenhang mit dem Glucose-Stoffwechsel und der Glykolyse untersucht haben, ist das FOXO1 Protein. Es gehört zu der Forkhead Familie, welche mehr als 100 Mitgliedern im Menschen hat (FOXA bis FOXS), und ist charakterisiert durch eine erhaltene DNA-Bindungsdomäne, die Forkhead Box. Die FOXO Proteine stellen eine Subfamilie von Transkriptionsfaktoren davon dar, wovon FOXO1, FOXO3, FOXO4 und FOXO6 in Säugetieren vorkommen (Li et al., 2017). Diese Transkriptionsfaktoren sind an

einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, zum Beispiel bei der Regulation der Stressresistenz, der anti-oxidativen Enzyme, des Metabolismus, des Zellzyklus-Arrest und der Apoptose und Autophagie (Arden, 2004; Li et al., 2017; Xing et al., 2018). Das FOXO1 Gen ist auf Chromosom 13 lokalisiert und enthält vier funktionale Domänen (Xing et al., 2018). Es ist ein wichtiger Bestandteil der Insulin-Signalkaskade und übernimmt daher eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellwachstums, der Differenzierung und des Metabolismus. Das hepatische FOXO1 vermittelt außerdem die hepatische Glucose-Produktion durch eine Erhöhung der Expression und Aktivität von Genen, welche für die Gluconeogenese verantwortlich sind (Wu et al., 2018).

Bei unserem Proteinnachweis des FOXO1 Proteins mittels Western Blot (Abschnitt 5.1.4) konnten wir nach einer dreitägigen Bestrahlung mit einer kumulativen Dosis von 60 J/cm² und 120 J/cm² keinen Unterschied zwischen der unbestrahlten Kontrollgruppe und den bestrahlten Zellen feststellen, unabhängig davon, ob die Zellen zuvor mit TGF-β1 behandelt wurden oder nicht. Lediglich eine dreitägige Bestrahlung mit jeweils 80 J/cm² (kumulativ 240 J/cm²) führte zu einer signifikant verringerten FOXO1-Proteinexpression der mit TGF-β1 behandelten Gruppe. Eine Erklärung dafür könnte in der Rolle von FOXO1 bei der Regulation der Gluconeogenese liegen. Da die Inhibition der Glykolyse, ausgelöst durch die Bestrahlung, zu einem verringerten Verbrauch der Glucose führte, war für die Zellen eigentlich dauerhaft ausreichend Glucose vorhanden, welche nur nicht verwendet wurde. Somit bestand keine Notwendigkeit, die Gluconeogenese zu aktivieren und dies hatte folglich keinen Einfluss auf die FOXO1-Expression. Aufgrund der signifikanten Inhibition der Glykolyse durch die Bestrahlung mit 80 J/cm² könnte dies allerdings zu einer kompensatorischen Herunterregulierung des FOXO1 Proteins und damit auch der Gluconeogenese geführt haben.

Ein anderer Einflussfaktor könnte der TGF-β1/SMAD Signalweg sein. Dieser fördert die Expression und Aktivität von FOXO1 (Kurakazu et al., 2019). Deshalb wäre zu erwarten gewesen, dass die Expression von FOXO1 nach der Behandlung mit TGF-β1 erhöht war. Dies ist bei uns innerhalb der unbestrahlten Gruppe in unterschiedlichem Maße so eingetreten. Allerdings ist es überraschend, dass nur die Bestrahlung mit 80 J/cm² in der Folge zu einer reduzierten FOXO1 Expression führte. Es wäre davon auszugehen gewesen, dass alle Bestrahlungsdosen eine gewisse Minderung der FOXO1-Expression und Aktivität auslösten, ähnlich wie dies bei der Expression von α-SMA nachzuweisen war. Möglicherweise liegt die Ursache in den vielfältigen Einflussfaktoren auf den FOXO1-Signalweg. Ein weiterer Faktor, der die FOXO1 Expression beeinflusst, könnte die Veränderung des oxidativen Stress-Levels sein. FOXO1 übernimmt eine Aufgabe als Detektor für oxidativen Stress im antioxidativen Signalweg und beeinflusst damit die Expression der MnSOD und Catalase (Abb. 36) (Ponugoti et al., 2013; Xing et al., 2018). Da durch die Bestrahlung mit blauem Licht erhöhte Mengen an ROS generiert wurden (Abschnitt 1.6), könnte dies auch einen Einfluss sowohl auf die Expression von FOXO1 als auch auf die antioxidative Kapazität der Zellen haben. Aufgrund unserer Beobachtungen, dass die relative Proteinexpression von FOXO1 nach TGF-β1 Behandlung mit oder ohne nachfolgende, dreitägige Bestrahlung mit je 20 und 40 J/cm² auf einem Niveau bleibt, scheint die Menge der gebildeten ROS in diesem Fall noch keinen Einfluss auf die Expression von FOXO1 zu haben. Lediglich die dreitägige Bestrahlung mit jeweils 80 J/cm² reduzierte die FOXO1-Expression signifikant, nach vorheriger TGF-β1 Aktivierung. Dadurch scheinen folglich ausreichend ROS produziert zu werden, um die Expression der antioxidativen Enzyme (MnSOD, Catalase) zu reduzieren. Eine Untersuchung bezüglich des

Einfluss von blauem Licht ($\lambda=453\text{ nm}$) auf die Proteinexpression der Catalase führte Krassovka in der Vergangenheit durch. Sie konnte 24 Stunden nach der Blaulicht-Bestrahlung mit 80 J/cm^2 und vorheriger TGF- β 1 Behandlung eine signifikante Verringerung der Catalase-Expression beobachten (Dipl. -Biol. Krassovka, 2017). Dies würde sich also mit unseren Vermutungen bezüglich des Einflusses von FOXO1 auf die antioxidativen Eigenschaften und die Catalase-Expression decken. Der Effekt der Bestrahlung mit blauem Licht auf den Glutathion-Stoffwechsel und dessen antioxidative Eigenschaften, wird in Abschnitt 6.6 weiter erläutert.

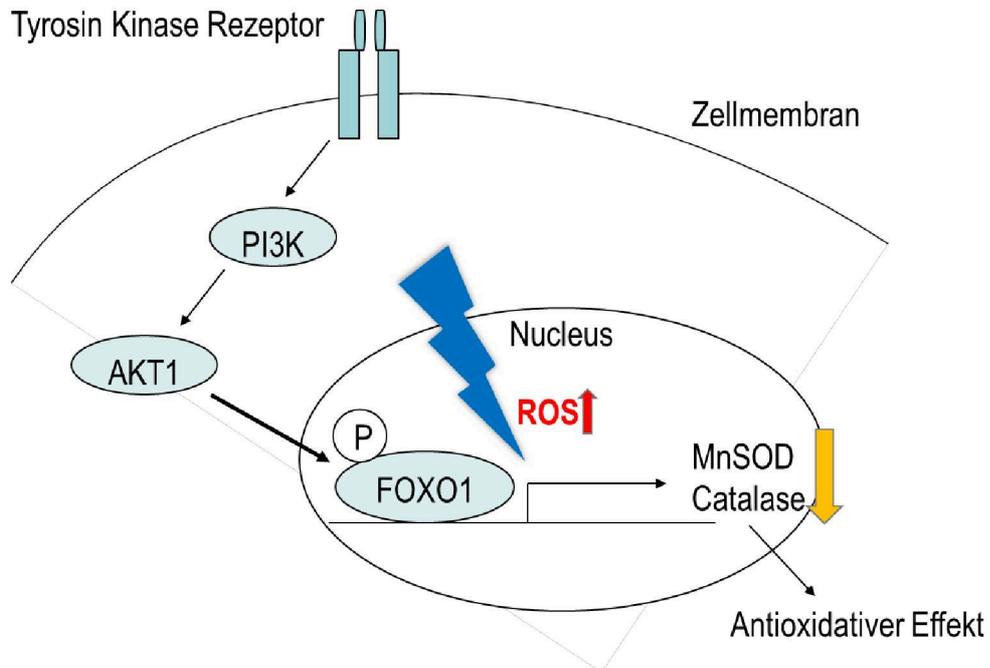


Abb. 36: Darstellung des FOXO1 Signalwegs und dessen Beeinflussung durch die Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453\text{ nm}$). Die Bestrahlung mit 80 J/cm^2 führt zu einer vermehrten ROS-Produktion einhergehend mit einer verminderten FOXO1-Proteinexpression.

6.5 Der Effekt der Blaulicht Bestrahlung auf die Zellviabilität

Im Anschluss an die Bestimmung des Glucose-Gehalts der Fibroblasten nach der Bestrahlung, wodurch die anti-proliferativen Eigenschaften des blauen Lichts diskutiert wurde, führten wir den Neutral-Rot Assay (Firma Sigma Aldrich) durch, um eine weiter reichende Aussage über die Viabilität und das Teilungsverhalten der Zellen, unter Einfluss der Blaulicht-Bestrahlung, treffen zu können.

Anhand des Neutral Rot Assays kann eine quantitative Schätzung der Anzahl viableler Zellen in einer Kultur gemacht werden. Zudem kann er genutzt werden, um die Zell-Replikation, zytostatische/-toxische Effekte oder den Zelltod zu messen. Der Assay basiert auf der Fähigkeit lebender Zellen, den Farbstoff in die Lysosomen aufzunehmen und zu binden. Dabei dringt der schwach kationische Farbstoff durch nicht-ionische, passive Diffusion in die Zellmembran ein und konzentriert sich daraufhin in den Lysosomen. Er bindet durch elektrostatische, hydrophobe Bindungen an anionische oder phosphathaltige Gruppen der lysosomalen Matrix (Repetto et al., 2008). Lysosomen haben in ihrem Inneren einen pH-Wert von etwa fünf, welcher durch ATP-abhängige, membranständige Protonenpumpen

aufrechterhalten wird (Aumüller and Wolff, 2010; Welsch and Deller, 2010). Die Aufnahme des Neutral-Rot Farbstoffes ist abhängig von der Fähigkeit der Zellen eben diesen pH-Gradienten aufrecht zu erhalten. Bei einem physiologischem pH-Wert des Zytoplasmas besitzt der Farbstoff nahezu keine Ladung. Dies ermöglicht ihm, die Zellmembranen zu durchdringen. Innerhalb der Lysosomen besteht allerdings der Protonengradient, welcher den pH-Wert niedrig hält. Der Farbstoff wird somit geladen und innerhalb der Lysosomen gefangen. Stirbt die Zelle oder kann der pH-Wert nicht aufrechterhalten werden, so kann die Farbe nicht im Inneren der Lysosomen gehalten werden. Folglich ist die Absorption des Farbstoffes geringer und die Menge des retinierten Farbstoffes proportional zur Anzahl viabler Zellen. Die Absorption des gelösten Farbstoffs wird schließlich unter Verwendung eines Spektrophotometers quantifiziert (Bumah et al., 2021; Repetto et al., 2008).

Wir konnten bei der Durchführung des Neutral-Rot Assays beobachten, dass die Bestrahlung mit blauem Licht aller Bestrahlungsdosen zu einer deutlich verringerten Aufnahme des Neutral-Rot Farbstoffes in die Zellen führte. Vor allem bei einer Bestrahlungsdosis von 40 J/cm^2 und 80 J/cm^2 war die optische Dichte bis vier Stunden nach Bestrahlung signifikant reduziert, um etwa die Hälfte der unbestrahlten Zellen. Bereits 24 Stunden nach Bestrahlungsende konnten wir diesen Effekt nicht mehr beobachten und die Werte der bestrahlten Zellen glichen sich dem Niveau der unbestrahlten Kontrolle an. Opländer et al. ermittelte ebenfalls mit Hilfe der Neutral Rot Färbung die relative Anzahl an Zellen. Diese Anzahl war bei einer Bestrahlung von Fibroblasten mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm nach 24 Stunden nicht reduziert (Opländer et al., 2011). Dies deckt sich weitgehend mit unseren Beobachtungen. Auch wir konnten 24 Stunden nach Bestrahlungsende ein Angleichen der optischen Dichte des Neutral-Rot Farbstoffs gemessen in den bestrahlten Fibroblasten an die der unbestrahlten Kontrollgruppe beobachten. Dies deutete erneut auf einen reversiblen Effekt der Bestrahlung auf die Fibroblasten hin, wie in Abschnitt 6.4 ebenfalls beschrieben.

Außerdem konnte Opländer eine Dosis- und Wellenlängenabhängige Reduktion der Proliferation und Einschränkung der Zellteilung humaner, dermalen Fibroblasten nach Blaulicht-Bestrahlung feststellen. Diese Reduktion war nicht auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen, was er mittels einer Hoechst-Färbung nachweisen konnte (Opländer et al., 2011). Gleiches stellte Liebmann et al. fest, welcher Keratinozyten und Endothelzellen mit blauem Licht ($\lambda=453 \text{ nm}$) in unterschiedlichen Dosen bestrahlte. Sie konnten nach der Bestrahlung ebenfalls eine Reduktion der Zellzahl beziehungsweise Proliferation feststellen, welche nicht durch einen vermehrten Zelltod erklärt werden konnte, was ebenfalls anhand einer Hoechst-Färbung gezeigt wurde (Liebmann et al., 2010).

Daher können wir davon ausgehen, dass die verminderte Aufnahme des Neutral-Rot Farbstoffs nicht durch einen vorzeitigen Zelltod der Fibroblasten entstand, sondern eine andere Ursache haben musste. Wahrscheinlich spielt hier der eingeschränkte Stoffwechsel einhergehend mit einer verminderten ATP-Produktion, als Folge der Bestrahlung mit blauem Licht, eine entscheidende Rolle. Wie oben bereits erwähnt, werden für die Aufrechterhaltung des sauren pH-Wertes im Inneren der Lysosomen, die ATP-abhängigen membranständigen Protonenpumpen benötigt. Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass die Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453 \text{ nm}$) zu einer signifikant verringerten Produktion von ATP, sowohl im Rahmen der Atmungskette als auch der Glykolyse, führte. Daher scheint es möglich, dass durch den stark eingeschränkten ATP-Metabolismus nicht ausreichend ATP gebildet wird, um den sauren pH-Wert innerhalb der Lysosomen aufrecht zu erhalten. Diese

werden dadurch vorübergehend funktionsunfähig und können den Farbstoff nicht mehr retinieren, was zu der verminderten optischen Dichte führt.

Passend dazu erforschten Bartel et al. in ihrer Studie den Zusammenhang zwischen Lysosomen und Mitochondrien. Sie untersuchten unter anderem die lysosomale V-ATPase, die Protonenpumpe, welche für die lysosomale Ansäuerung verantwortlich ist. In ihren Untersuchungen wurde die Protonenpumpe durch Archazolid (Arch), einen starken Inhibitor der lysosomalen V-ATPase, gehemmt. Dies wiederum verursachte einen deutlichen Anstieg des luminalen pH-Werts und führte zu einer Störung der lysosomalen Funktion. Weiter haben sie herausgefunden, dass eine lysosomale Dysfunktion zu einem veränderten Cholesterin-Metabolismus führte, was nachfolgend die Proliferation von Krebszellen beeinträchtigte (Bartel et al., 2019). Demnach könnte auch die durch Opländer beobachtete Einschränkung der Proliferation und Zellteilung, ausgelöst durch das blaue Licht (Opländer et al., 2011), durch die Funktionsstörung der Lysosomen erklärt werden. Dies würde sich mit den Ergebnissen unserer Studie vereinbaren lassen.

Des Weiteren sind lysosomale Enzyme, wie zum Beispiel Cathepsin B, D und L, an der Regulation der Menge extrazellulärer Matrixproteine und Prokollagene, welche von Fibroblasten sezerniert werden, beteiligt. Etwa 10-90 % der Prokollagen-Moleküle werden vor der Sekretion, in Abhängigkeit von dem Gewebe und dem Alter, intrazellulär degradiert. Die Regulierung dieses Prozesses stellt einen notwendigen Mechanismus für eine schnelle Adaptation der Kollagen-Sekretion nach einer Verletzung dar (McAnulty, 2007). Die aktuelle Forschung bezüglich neuer Therapieoptionen zur Behandlung hypertropher Narben und Keloide, wie auch von Fibrose, zielt zum Teil auf die Inhibition der Fibroblasten-Proliferation und eine verringerte Ablagerung der extrazellulären Matrix ab (Gauglitz et al., 2011). Daher scheint das blaue Licht hier ein vielversprechendes Target zu sein. Wird durch die Bestrahlung die ATP-Produktion reduziert, werden dadurch die Lysosomen vorübergehend funktionsunfähig, da sie den benötigten sauren pH-Wert nicht aufrechterhalten können. Dies führt dazu, dass theoretisch weniger Prokollagen-Moleküle und extrazelluläre Matrixproteine sezerniert werden. Damit könnte die Entstehung hypertropher Narben, Keloide und fibrotischer Erkrankungen verlangsamt oder vollständig verhindert werden.

Um das Ergebnis des Neutral-Rot Assays zusätzlich bildlich darzustellen, führten wir im Anschluss den Lyso-Tracker Assay durch. Dabei handelte es sich um einen zell-permeablen grünen Farbstoff, welcher sich in den Lysosomen lebender Zellen anreichert (Cell Signaling Technology, 2018). Somit konnten wir anhand des Farbstoffes die Lysosomen und den Effekt der Blaulicht-Bestrahlung sichtbar machen. Wir konnten beobachten, dass die bestrahlten Zellen, bis etwa vier Stunden nach dem Bestrahlungsende, deutlich weniger Farbstoff aufnahmen. Außerdem schien dieser weniger stark kondensiert zu sein. Dies ließ sich ebenfalls dadurch erklären, dass die Lysosomen der bestrahlten Zellen nicht in der Lage sind, den pH-Wert aufrecht zu erhalten und damit funktionsunfähig werden. Daher können sie auch den Farbstoff nicht aufnehmen und sind als Folge dessen weniger stark gefärbt als die unbestrahlten Fibroblasten. In diesen funktionieren die Lysosomen wie gewohnt. Sie sind in der Lage den Farbstoff aufzunehmen und zu retinieren, wodurch die unbestrahlten Zellen deutlich stärker gefärbt und der Farbstoff kondensierter erscheint.

6.6 Die Rolle der antioxidativen Abwehr bei der Bestrahlung mit blauem Licht

Zuletzt untersuchten wir den Einfluss der Blaulicht-Bestrahlung auf die antioxidativen Eigenschaften der Fibroblasten. Wie zuvor erwähnt können durch die Bestrahlung mit blauem Licht vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden, welche einen Einfluss auf den Redox-Status der Zellen nehmen können. Wir bestimmten sowohl die Gesamtkonzentration des reduzierten Glutathions (GSH), als auch die Aktivität der Glutathion Peroxidase und Glutathion Reduktase (Abb. 37). Außerdem haben wir eine Proteinbestimmung des Proteins Nrf2 mittels Western Blot durchgeführt.

Obwohl das Glutathion erstmal 1888 von J. de Rey-Pailhade entdeckt wurde, ist der Aufbau erst 1929 durch Gowland Hopkins sowie Hunter und Eagles entschlüsselt worden (Bachhawat and Yadav, 2018). Glutathion (*γ -glutamylcysteinyl-glycin*) ist ein endogenes, nukleophiles, thiol-haltiges Tripeptid und besteht aus γ -glutaminsäure, Cystein und Glycin. Es befindet sich in hohen Konzentrationen (1-10 mM) in allen Eukaryoten und vielen prokaryotischen Spezies. Das GSH übernimmt eine Vielzahl von wichtigen Aufgaben innerhalb der Mitochondrien, weshalb eine stabile Glutathion-Homeostase äußerst wichtig ist (Afaq and Mukhtar, 2001; Calabrese et al., 2017). Mitochondriales Glutathion wird im Cytosol synthetisiert, da die Mitochondrien selbst keine Enzyme für die Synthese enthalten. Die Synthese des Glutathions (GSH) besteht aus zwei separaten, ATP-konsumierenden Schritten. Initial reagieren Glutamat und Cystein zu γ -glutamylcystein. Dieser erste Schritt ist Raten-limitierend und wird durch die γ -glutamylcystein Synthetase katalysiert. In dem zweiten Schritt bildet das γ -glutamylcystein eine Peptid-Bindung mit Glycin, wodurch das Tripeptid GSH entsteht. Dies wiederum wird durch die Glutathion-Synthetase katalysiert und durch die Konzentration des vorhandenen L-Cysteins reguliert (Bachhawat and Yadav, 2018; Calabrese et al., 2017). Der Abbau von GSH ist ebenfalls ein zweiteiliger Prozess, dessen Aufführung an dieser Stelle zu weit führen würde. Aufgrund der negativen Ladung des Glutathions, werden Transporter und Kanäle benötigt, um das GSH über die Membran zu transportieren (Calabrese et al., 2017).

Glutathion kann in einem thiol-reduzierten Status, dem GSH, und dem oxidierten Status (GSSG) vorliegen, welches aus zwei, über eine Disulfid-Brücke verbundenen, GSH-Molekülen besteht (Calabrese et al., 2017). Im Rahmen der Reaktion wird Glutathion (GSH) zu Glutathion-Disulfid (GSSG) oxidiert und übernimmt dadurch die Aufgabe eines Radikal-Fängers (Afaq and Mukhtar, 2001; Calabrese et al., 2017). Das GSSG wird nachfolgend durch die Glutathion Reduktase (Glr), mit FAD als Ko-Faktor und unter Gebrauch von Elektronen des NADPH, wieder zu GSH reduziert. Dabei kann durch NADPH ein Molekül GSSG zu zwei Molekülen GSH recycelt werden (Calabrese et al., 2017; Panday et al., 2020). Sowohl die Matrix als auch der Intermembranraum können nach oxidativer Belastung, zum Beispiel mit H_2O_2 , das GSSG effektiv reduzieren und entfernen und somit das GSH schnell wiederherstellen (Calabrese et al., 2017).

Das GSH übernimmt viele entscheidende Aufgaben innerhalb der Zelle. Dazu gehört die Eisen-Sulfur Cluster Biosynthese, die Beseitigung von bestimmten ROS, Elektrophilen und Schwermetallen im Rahmen der antioxidativen Abwehr und Entgiftung, der Reduktion von Protein-Disulfid Bindungen, sowie der Signaltransduktion (Bachhawat and Yadav, 2018; Calabrese et al., 2017; Panday et al., 2020). Reduziertes Glutathion (GSH) selbst kann direkt als Antioxidant wirken, indem es Superoxid Anionen und Hydroxyl Radikale abfängt, oder wird von der Glutathion Peroxidase als Substrat benutzt (Hornig-Do et al., 2007).

Bereits Tyrrell stellte fest, dass durch UVB-, UVA-Strahlung oder nahes-sichtbares Licht verursachte Schäden an humanen, dermalen Fibroblasten durch normale zelluläre Level von Glutathion verhindert werden können (Tyrrell and Pidoux, 1986). Daher kommt diesem System eine wichtige Rolle bei der antioxidativen Abwehr zu (Calabrese et al., 2017).

Wie oben bereits erwähnt ist das Glutathion (GSH) und GSH/Glutathion Peroxidase (GPX) Enzym System außerdem essentiell für die normale intrazelluläre Homeostase und kann unter pathophysiologischen Bedingungen gestört werden. Eine dieser pathologischen Bedingungen ist beispielsweise die endotheliale Dysfunktion. Sie ist charakterisiert durch eine Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) inklusive Superoxide (O_2^-) und den Verlust der Stickoxid-Bioverfügbarkeit (NO), was zu einem erhöhten oxidativen und nitrosativen Stress führt und in der Folge mitochondriales Versagen verursachen kann. Daher spielt das GSH/GPX-System eine wichtige Rolle bei der Entfernung von ROS und RNS (Panday et al., 2020).

In einem ersten Schritt bestimmten wir die Gesamtkonzentration des totalen GSH in humanen dermalen Fibroblasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten (unmittelbar, vier und 24 Stunden) nach der Bestrahlung mit blauem Licht. Wir konnten beobachten, dass die Bestrahlung mit 40 J/cm^2 zu einer signifikanten Verringerung der GSH-Konzentration zu jedem Messzeitpunkt nach Bestrahlung führte. Dies bedeutete, dass wir auch 24 Stunden nach Bestrahlungsende keine Erholung der GSH-Konzentration der Fibroblasten erkennen konnten. Bei der Bestrahlung mit 80 J/cm^2 hingegen ergab sich ein etwas anderes Bild. Dort konnten wir zu keinem Zeitpunkt nach der Bestrahlung eine verminderte GSH-Konzentration feststellen. Unmittelbar nach der Bestrahlung ließ sich ein geringes Absinken der GSH-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Zu den Zeitpunkten vier und 24 Stunden war die GSH-Konzentration jederzeit auf dem gleichen Niveau wie die der Kontrollzellen.

Wie bereits zuvor erwähnt, ist eine der Hauptaufgaben des Glutathions (GSH) die antioxidative Abwehr und Entgiftung von ROS, besonders in Form von H_2O_2 (Calabrese et al., 2017; Panday et al., 2020). Es ist bereits bekannt, dass die Bestrahlung von Fibroblasten mit blauem Licht nachweislich zu einer vermehrten Produktion von ROS und damit von oxidativem Stress führt (Abschnitt 1.6). Dies konnte Krassovka in der Vergangenheit zeigen (Krassovka et al., 2020). Der Hauptgrund für die verminderte GSH-Konzentration könnte daher der vermehrte oxidative Stress, ausgelöst durch die Bestrahlung, sein. Das Glutathion ist einer der wichtigsten Radikalfänger der ROS, weshalb es bei steigenden ROS-Leveln vermehrt zu GSSG oxidiert. Dadurch sinkt der Gehalt des GSH und indiziert eine reduzierte antioxidative Kapazität der Zellen. Jedoch besitzt die Konzentration des GSH alleine oft keine ausreichende Aussagekraft. Vielmehr wird das Verhältnis von GSH/GSSG als repräsentativer Marker für den zellulären Redox-Status genutzt (Zhao et al., 2019). Deshalb sollte in Zukunft zusätzlich der Gehalt des GSSG in den Fibroblasten nach Blaulicht-Bestrahlung bestimmt werden und anschließend eine erneute Beurteilung stattfinden.

Allerdings bestimmte Krassovka in ihrer Arbeit in bestrahlten Fibroblasten die Aktivität eines weiteren antioxidativen Enzyms, die Catalase. Die Catalase wirkt ebenfalls antioxidativ und katalysiert die Umwandlung Hydrogen Peroxid (H_2O_2) zu Wasser und Sauerstoff. Am effektivsten arbeitet die Catalase bei der Metabolisierung von hohen Konzentrationen H_2O_2 . Die Glutathion Peroxidase hingegen ist effektiver bei niedrigeren Konzentrationen von Hydrogen Peroxid (Afaq and Mukhtar, 2001; Siraki et al., 2018; Zhao et al., 2019). Krassovka konnte 24 Stunden nach der Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453 \text{ nm}$) eine signifikant verringerte Catalase-Proteinexpression in, mit TGF- β 1 aktivierten, Fibroblasten

beobachten. Dort folgte auf einen schnellen Anstieg der intrazellulären ROS eine erhebliche Herunterregulierung der Catalase-Expression nach 24 Stunden. Diese Herunterregulierung mag einerseits durch den vermehrten oxidativen Stress begründet sein, trägt aber andererseits auch indirekt zum intrazellulären oxidativen Stress bei. Weiterhin vermutete Krassovka, dass der oxidative Stress und die ROS entscheidend an der Inhibition der Differenzierung und Proliferation der Fibroblasten beteiligt sind (Krassovka et al., 2020). Ähnliches postulierte zuvor Taflinski et al. im Rahmen der Bestrahlung von Fibroblasten mit blauem Licht. Sie vermutete, dass eine wiederholte, nicht-toxische Bestrahlung mit blauem Licht möglicherweise eine Energie-aufwendige, zelluläre Reaktion gegen den entstehenden oxidativen Stress auslöste. Dies könnte zu dem Proliferationsstopp, der Störung der Differenzierung und einem erhöhten Zellmetabolismus führen (Taflinski et al., 2014).

Dennoch scheint es bei dem Umgang der Zellen mit oxidativem Stress zelltyp-spezifische Unterschiede zu geben, welche ebenso bei der Exposition mit blauem Licht auftreten (Lewis et al., 2005). Beispielsweise bestrahlte Garza et al. Endothelzellen, Keratinozyten und T-Zellen mit blauem Licht und konnte folgendes beobachten. Sowohl die Endothelzellen, als auch die Keratinozyten zeigten auch bei hohen Bestrahlungsdosen von 250 – 500 J/cm² keine Apoptose. Im Gegensatz dazu konnten sie bei T-Zellen bereits bei geringen Bestrahlungsdosen Zeichen von Apoptose erkennen (Garza et al., 2018). Auch Hornig et al. konnte zeigen, dass Keratinozyten signifikant mehr reduziertes und oxidiertes Glutathion enthalten und zudem ein zweifach niedrigeres GSH/GSSG-Verhältnis aufweisen im Vergleich zu Fibroblasten. Dies ließ darauf schließen, dass die Keratinozyten höhere Level an oxidativem Stress tolerieren können (Hornig-Do et al., 2007). Daher sollten in Zukunft die Untersuchungen zusätzlich an erkrankten Zellen durchgeführt werden, um zu prüfen, ob diese möglicherweise andere Fähigkeiten haben mit oxidativem Stress umzugehen.

Insgesamt ist die Interaktion zwischen Glutathion (GSH) und oxidativem Stress komplex. Ein reduzierter GSH-Gehalt kann eine erhöhte ROS- und RNS-Bildung begünstigen, sowie zu einer erhöhten Aktivität des mitochondrialen Komplex I und NADPH-Oxidation, einer verminderten Zell-Viabilität und einer beeinträchtigten ATP-Synthese führen. Andererseits kann eine Erhöhung des oxidativen Stresses zu einem Verbrauch der GSH Level führen (Panday et al., 2020). All dies sind Effekte, die wir als Folge der Bestrahlung mit blauem Licht beobachten konnten. Daher scheinen die ROS und ihr Einfluss auf die antioxidativen Eigenschaften entscheidend für den Effekt des blauen Lichts auf humane, dermale Fibroblasten verantwortlich zu sein. Dies bestätigt die Beobachtungen und Hypothesen von Taflinski und Krassovka (Krassovka et al., 2020; Taflinski et al., 2014).

Zusätzlich zum Verbrauch des GSH durch oxidativen Stress, kann die GSH-Konzentration durch die Regulation der GSH-Synthese beeinflusst werden. Die Synthese des Glutathion (GSH) ist ein ATP-abhängiger, zwei-teiliger Prozess (Calabrese et al., 2017). Wie in Abschnitt 6.3 beschrieben, führt die Bestrahlung mit blauem Licht allerdings zu einer ATP-Depletion der Zellen. Deshalb könnte auch die Neu-Synthese des GSH in gewissem Maße beeinträchtigt sein, aufgrund einer nicht ausreichenden Verfügbarkeit von ATP, um diese aufrecht zu erhalten. Außerdem besteht noch eine weitere Möglichkeit, wodurch die Bestrahlung mit blauem Licht den Glutathion-Haushalt und damit den Redox-Status der Zellen beeinflussen kann. Die Bestrahlung von Pflanzen mit sichtbarem Licht führt ebenfalls zu einer Veränderung der antioxidativen Eigenschaften. Dabei beeinflusst die Bestrahlung vermutlich die Transkription der zugehörigen Gene (Toldi et al., 2019). Ob dies auch bei humanen, dermalen Fibroblasten stattfindet, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Im Anschluss an die totale GSH-Konzentration bestimmten wir die Aktivität der Glutathion Peroxidase. Insgesamt sind fünf Selen-abhängige Peroxidasen bekannt, deren Hauptfunktion die Reduktion von Hydrogen-Peroxid (H_2O_2) ist. Die Glutathion Peroxidase ist ein tetrameres Selenoprotein und enthält ein Selenocystein an jeder der vier aktiven Seiten (Siraki et al., 2018). Es existieren allerdings zwei verschiedene Formen der Glutathion Peroxidase. Die Selen-abhängige Glutathion-Peroxidase, welche eine hohe Reaktivität gegenüber Hydrogen Peroxid und organischen Hydroperoxiden zeigt und als wichtigstes antioxidatives Abwehrsystem der Haut angesehen wird, und die Selen-unabhängige Glutathion-Peroxidase (Afaq and Mukhtar, 2001). Dieses ubiquitäre, intrazelluläre Enzym katalysiert die Reaktion von GSH und H_2O_2 zu Wasser und GSSG (Afaq and Mukhtar, 2001; Siraki et al., 2018). Generell ist die Glutathion Peroxidase, im Gegensatz zur Catalase, besonders effektiv bei niedrigen Konzentrationen von Hydrogen-Peroxid (Afaq and Mukhtar, 2001; Siraki et al., 2018). Wir konnten, nach der Bestrahlung mit $40 J/cm^2$ blauen Lichts, eine zum Teil signifikant verminderte Aktivität der Glutathion Peroxidase über den gesamten Messzeitraum von 24 Stunden feststellen. Bei der Bestrahlung mit $80 J/cm^2$ konnten wir ähnliche Ergebnisse feststellen. Hier konnten wir zu jedem Messzeitpunkt nach Bestrahlung eine signifikante, etwa um die Hälfte der Kontrolle verringerte Aktivität der Glutathion Peroxidase detektieren.

Die Glutathion Peroxidase (GPX) ist ein antioxidatives Schlüssel-Enzym. Sie katalysiert die Reduktion von oxidativen Spezies wie Hydrogen Peroxid (H_2O_2) und Peroxynitrit (ONOO-) durch Oxidation des Substrats Glutathions (GSH) zu Wasser (H_2O) (Fu et al., 2001; Panday et al., 2020; Zhao et al., 2019). Die Glutathion Peroxidase gehört neben der Catalase und der Superoxid Dismutase (SOD) zu den „direkten“, klassischen Antioxidantien (Walters et al., 2008). Die Kapazität der Glutathion Peroxidase (GPX) ist abhängig von der Verfügbarkeit des GSH und dem Level des oxidativen oder nitrosativen Stresses. Kommt es zu einem Mangel an GPX, verstärkt dies den oxidativen Stress und begünstigt das Auftreten einer endothelialen Dysfunktion oder der Apoptose (Panday et al., 2020). Ersteres konnten wir im Rahmen unserer Versuche nachweisen. Es ist bekannt, dass die Bestrahlung mit blauem Licht unterschiedliche Mengen an oxidativem Stress generiert (Krassovka et al., 2020; Opländer et al., 2011). Dies wurde bereits in Abschnitt 6.2 detailliert beleuchtet. Übersteigt allerdings die Menge der ROS die antioxidative Kapazität, kann dies das Reduktions-Oxidations-Gleichgewichts stören (Walters et al., 2008).

So beobachtete Afaq et al., dass eine chronische UV-Exposition die Bildung freier Radikale induziert und dies zu einer Erschöpfung des Gehalts freier Antioxidantien, wie der Superoxid Dismutase, Ascorbat und des Glutathions in der Haut, führte (Afaq and Mukhtar, 2001). Auch Opländer et al. hatte berichtet, dass geringe Dosen blauen Lichts unterschiedlicher Wellenlängen (410, 420 und 453 nm) die antioxidative Kapazität von humanen Fibroblasten reduziert (Opländer et al., 2011). Beispielsweise führt die Bestrahlung mit $50 J/cm^2$ und $100 J/cm^2$ zu einer signifikanten Verringerung der Karotenoid-Konzentration mit einer dosis-abhängigen Kinetik. Durch höhere Bestrahlungsdosen wurden größere Mengen an ROS generiert, was dementsprechend zu einer vermehrten Erschöpfung des Karotenoid-Gehalts führte (Vandersee et al., 2015). Daher ist es naheliegend, dass bei unserem Versuch die Kapazität der Glutathion Peroxidase durch den oxidativen Stress vermindert wurde. Gleichzeitig trägt die deutliche Reduktion der GPX zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses bei. Da die Kapazität der GPX außerdem von der Menge des vorhandenen GSH abhängig ist, kann der zuvor nachgewiesene Mangel an GSH ebenfalls eine Ursache für die verminderte GPX-Aktivität sein (Panday et al., 2020). Jedoch gibt es einige Diskrepanzen. Die Bestrahlung mit $80 J/cm^2$ beeinflusst den totalen GSH-Gehalt kaum, wohingegen die

Aktivität der Glutathion Peroxidase signifikant reduziert ist. Die genaue Ursache für diese Unterschiede sollten weitergehend untersucht werden, indem in Zukunft zusätzlich der totale GSSG-Gehalt der Zellen bestimmt wird. Dieser könnte dann in ein Verhältnis mit dem totalen GSH-Gehalt gesetzt werden und daraus eine genauere Aussage über den Redox-Status der Zellen getroffen werden.

Neben der Aktivität der Glutathion Peroxidase bestimmten wir auch die Aktivität der Glutathion Reduktase. Die Glutathion Reduktase katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von oxidiertem GSH (GSSG), wodurch das Glutathion (GSH) wiederhergestellt wird. Vermutlich kann die Glutathion Reduktase das gesamte kutane GSH in weniger als einer Minute recyceln. Daher ist ihre Funktion essentiell für aerobes Leben (Afaq and Mukhtar, 2001; Siraki et al., 2018). Wir konnten beobachten, dass weder die Bestrahlung mit 40 J/cm² noch mit 80 J/cm² blauen Lichts zu einer Reduktion der Aktivität der Glutathion Reduktase führte. Zu jedem Messzeitpunkt nach der Bestrahlung war die Aktivität der Glutathion Reduktase der bestrahlten Zellen auf dem gleichen Niveau wie die, der unbestrahlten Zellen.

Zum einen wird für die Reaktion der Glutathion Reduktase FAD als Ko-Faktor benötigt. Wie in Abschnitt 1.6 beschrieben, sind Flavine Photoakzeptoren von blauem Licht. Daher ist es naheliegend, dass auch hier das FAD als Photoakzeptor durch das blaue Licht reduziert wird. Durch diese Photoreduktion könnte das Enzym, die Glutathion Reduktase, entkoppelt werden und eine gleichbleibende, erhöhte Aktivität aufweisen, wie dies bei der Atmungskette der Fall war. Allerdings ist die Aktivität der Glutathion Reduktase bei den bestrahlten und unbestrahlten Zellen auf dem gleichen Niveau. Daher bleibt zu überlegen, ob möglicherweise bereits die maximale Funktionskapazität des Enzyms erreicht wurde und diese auch durch die Photoreduktion nicht gesteigert werden kann. Eine andere Überlegung wäre, dass die Bestrahlung zwar zu einer konstanten Aktivität führt, jedoch die Funktion der Glutathion Reduktase möglicherweise eingeschränkt wurde und kein GSSG mehr zu GSH reduziert werden kann, also die Zelle selbst kein GSH wiederherstellen kann. Dies wiederum würde auch die signifikant erniedrigten GSH Werte nach Blaulicht-Bestrahlung und damit einhergehend auch die verminderte Aktivität der Glutathion Peroxidase erklären (Panday et al., 2020).

Des Weiteren benötigt die Glutathion Reduktase NADPH als Substrat für die Reduktion. Adäquate NADPH-Level werden durch die Reaktion der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) durch die Oxidation von Glucose-6-Phosphat bereitgestellt (Afaq and Mukhtar, 2001; Calabrese et al., 2017). Ein Mangel wiederum der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase könnte beispielsweise eine Verminderung des NADPH-Gehalts verursachen und damit die Aktivität der Glutathion-Reduktase möglicherweise einschränken. Aber auch die Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH 1) und die 6-Phosphogluconate-Dehydrogenase (PGD) sind NADPH-generierende Enzyme, deren Transkription zum Teil durch Nrf2 reguliert wird (Dinkova-Kostova and Abramov, 2015). Die Aufgabe des Nrf2 wird in Abschnitt 6.6.1 detaillierter erläutert. Panday et al. fanden jedoch heraus, dass die Reduktions-Kapazität des GSH/GPX-Systems unabhängig von den physiologischen NADPH-Leveln ist (Panday et al., 2020). Eine ähnliche Vermutung ließ sich durch unsere Ergebnisse aufstellen. Im Rahmen der Atmungskette konnten wir beobachten, dass durch die Photoreduktion von Flavinen das eigentliche Substrat NADPH nicht verbraucht wurde (Abschnitt 6.2). Dies zeigte Krassovka bereits in der Vergangenheit durch ein reduziertes NADP⁺/NADPH-Verhältnis (Krassovka et al., 2020). Daher ist dauerhaft

ausreichend NADPH vorhanden und die NADPH-Level beeinflussen die Aktivität der Glutathion-Reduktase nicht maßgeblich.

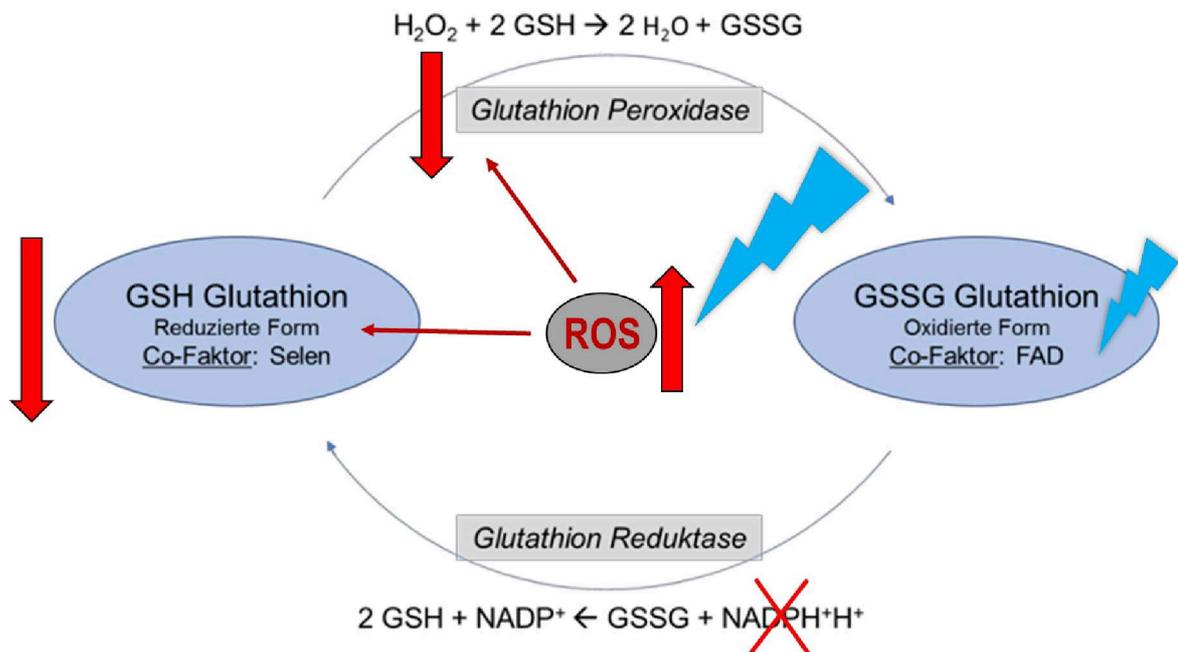


Abb. 37: Schematische Darstellung des Glutathion-Stoffwechsels, beeinflusst durch die Bestrahlung mit blauem Licht ($\lambda=453$ nm).

6.6.1 Einfluss/Effekt der Bestrahlung auf die Proteinexpression von Nrf2

Wie oben bereits erwähnt (Abschnitt 1.5.1; 1.6), induziert Licht sichtbaren Spektrums ($\lambda = 400-500$ nm) eine dosis-abhängige Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in kultivierten, humanen Fibroblasten. Die Entgiftung dieser ROS in der Haut wird durch Antioxidantien erreicht, wie zum Beispiel Vitamin C und E oder Carotenoide wie das β -Carotene. Zusätzlich kommen antioxidative Enzyme oder Proteine zum Einsatz, von denen viele unter der Kontrolle von Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) stehen, ein Regulator von zellulären Redox-Signalen und der antioxidativen Abwehr (Hecker et al., 2014; Mann et al., 2020). Daher bestimmten wir, zusätzlich zum Glutathion-Gehalt und der Aktivität der Glutathion Peroxidase und Reduktase, die Proteinexpression des Nrf2.

Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher Zellen und Gewebe vor oxidativem Stress schützt, indem es protektive, antioxidative und entgiftende Enzyme aktiviert (Cho et al., 2004) und zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homeostase und strukturellen Integrität beiträgt (Dinkova-Kostova and Abramov, 2015). Das Nrf2 gehört zur *Cap'n'Collar (CNC)-basic leucine zipper (bZIP)* Transkriptionsfaktor-Familie und wird in nahezu allen Zell- und Gewebetypen exprimiert, vor allem in Geweben, in denen häufig Entgiftungsreaktionen ablaufen, wie im Interstitium, der Lunge oder der Niere (Walters et al., 2008). Zusammen mit seinem Repressor Keap 1 reguliert Nrf2 nicht nur antioxidative, Medikamenten-metabolisierende und anti-inflammatorische Gene als Reaktion auf Stress, sondern beeinflusst auch den primären Metabolismus und die Bioenergetik (Bernard et al., 2017; Dinkova-Kostova and Abramov, 2015; Ghazawi et al., 2018; Holmström et al., 2013). Der Keap1-Nrf2-Signalweg dient der Aufrechterhaltung der zellulären Redox-Homeostase, indem dieser die Expression von Genen der Enzyme kontrolliert, welche an der Synthese,

Verwendung und Regeneration von Glutathion, Thioredoxin und NADPH beteiligt sind (Dinkova-Kostova and Abramov, 2015; Holmström et al., 2013). Normalerweise führt eine erhöhte ROS-Produktion zu einer Dissoziation des Nrf2 von seinem Inhibitor Keap 1, wird in den Nukleus verlagert und bindet an antioxidative Reaktions-Elemente (AREs), wodurch die Transkription von antioxidativen Genen induziert wird (Serrage et al., 2019; Walters et al., 2008). Außerdem übernimmt Nrf2 eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der mitochondrialen Funktionen, zum Beispiel durch Regulation des mitochondrialen Membranpotentials, der mitochondrialen Atmung und der ATP-Produktion, sowie der Regulation der Balance zwischen oxidativer Phosphorylierung und dem Redox-Status der Zellen (Bernard et al., 2017; Holmström et al., 2013). Daher ist insgesamt die Fähigkeit zur Regulation von Nrf2-abhängigen Genen entscheidend für die Adaptation, das Überleben und den Schutz gegen Fibrose, vor allem unter Bedingungen von oxidativem Stress (Bernard et al., 2017; Dinkova-Kostova and Abramov, 2015; Holmström et al., 2013).

Bei diesem Versuchsansatz bestrahlten wir humane dermale Fibroblasten mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen, mit und ohne vorherige Aktivierung durch TGF- β 1. Dabei konnten wir beobachten, dass die Bestrahlung mit 20 J/cm² zu keinem wesentlichen Unterschied in der Proteinexpression von Nrf2 führte. Die Bestrahlung mit 40 J/cm² und 80 J/cm² hingegen führte zu einer signifikant verminderten Nrf2-Proteinexpression im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe. Dies war sowohl in den mit TGF- β 1 aktivierten, als auch in den nicht aktivierten Fibroblasten nachweisbar.

Bezüglich des Nrf2 stellten Walters et al. in ihrer Studie fest, dass ein Mangel an Nrf2 in einer Überexpression von fibrotischen Markern wie TGF- β 1 und verschiedenen Kollagenen resultierte. Andersherum ist es bekannt, dass TGF- β 1 an der Bildung von ROS beteiligt ist und die Transkription von antioxidativen Genen (für Enzyme wie GST, SOD und GCL), durch eine Interaktion von SMAD3-ATF3 mit Nrf2, supprimiert wird (Walters et al., 2008). Wie bereits in Abschnitt 6.1 erläutert, gehen wir davon aus, dass die Bestrahlung den TGF- β 1 Signalweg beeinflusst. Daher führt die, durch die Bestrahlung hervorgerufene, Nrf2-Defizienz in unserem Fall nicht zu einer Überexpression von TGF- β 1.

In einer weiteren Studie untersuchen Hecker et al. eine persistente Fibrose in Mäuse-Lungen. Diese ist charakterisiert durch eine Anhäufung von seneszenten und Apoptose-resistenten Myofibroblasten. Bei der Untersuchung fanden sie heraus, dass dieser Phänotyp gekennzeichnet ist durch die beeinträchtigte Fähigkeit, eine Nrf2-abhängige, antioxidative Reaktion zu induzieren. Sie verfolgten das Konzept, dass ein Verlust der zellulären Redox-Homeostase den pro-fibrotischen Myofibroblasten-Phänotyp fördert (Hecker et al., 2014). Da wir bei den bestrahlten Fibroblasten ebenfalls eine beeinträchtigte Nrf2-Expression nachweisen konnten, stellte sich die Frage, ob die Störung der Redox-Homeostase durch die Bestrahlung mögliche Folgen im Sinn pro-fibrotischer Eigenschaften hat. Weitergehend stellte die Arbeitsgruppe fest, dass ein Mangel an Nrf2 einhergehend mit einer Hochregulation ROS-generierender Enzyme, der NOX4, zu einer andauernden Redox-Imbalance führte und dies eine persistierende Myofibroblasten-Seneszenz und Apoptose-Resistenz förderte (Bernard et al., 2017; Hecker et al., 2014). Andersherum untersuchte Bernard et al. den Effekt einer NOX4-Stummschaltung. Sie konnten in NOX4-defizienten Lungen-Fibroblasten eine zweifache Erhöhung des nuklearen Nrf2 im Vergleich mit der Kontrollgruppe feststellen. Daher vermuteten sie, dass durch einen NOX4-Mangel die Transkription eines Nrf2-abhängigen Mechanismus gefördert und damit die mitochondriale Biogenese in menschlichen Lungen-Fibroblasten stimuliert wird (Bernard et al., 2017). Beides war bei uns allerdings nicht der Fall. Wir konnten sowohl eine verminderte

Proteinexpression des Nrf2 als auch der NOX4 beobachten. Außerdem konnten wir nachweisen, dass die Bestrahlung mit blauem Licht zu einer verminderten Expression des Myofibroblasten-Markers α -SMA führte (Abschnitt 6.1). Daher scheint die Blaulicht-Bestrahlung zwar einen Einfluss auf die Regulation des Redox-Status der Zellen zu nehmen, jedoch nicht einhergehend mit einer Persistenz des Myofibroblasten-Phänotyps. Welchen Einfluss die Bestrahlung jedoch auf Fibroblasten mit fibrotischem Phänotyp hat, bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären.

Andere Arbeitsgruppen stellten in der Vergangenheit fest, dass Nrf2 die mitochondriale Redox-Homeostase beeinflusst. Nrf2-mangelhafte Zellen wiesen insgesamt eine erhöhte Menge an ROS auf, einhergehend mit erniedrigten Leveln von reduziertem Glutathion (GSH) (Holmström et al., 2013). Gleiches konnten wir bei unseren Untersuchungen nachweisen. Wir konnten nach der Bestrahlung sowohl eine verminderte Proteinexpression des Nrf2 als auch einen verminderten Gehalt reduzierten Glutathions (GSH) nachweisen. Das Nrf2 übernimmt, neben der Regulation der GSH Biosynthese, eine wichtige Aufgabe bei der Aufrechterhaltung des Glutathions in seiner reduzierten Form. Das Nrf2 reguliert die Transkription der Glutathion Reduktase 1, welche das oxidierte Glutathion wieder zu GSH reduziert unter Gebrauch von reduzierenden Äquivalenten des NADPH (Abschnitt 6.6). Bei einem Nrf2-Mangel ist der NADPH-Gehalt verringert aufgrund einer verminderten Expression der IDH1, G6PD und PGD. Dies wäre auch eine Begründung für die verminderten GSH-Level in Zellen mit Nrf2-Defizienz (Dinkova-Kostova and Abramov, 2015). Folglich scheint die Bestrahlung mit blauem Licht durch die vermehrte Generierung von ROS die Redox-Homeostase der Zellen auf unterschiedliche Weise zu beeinflussen. Zum einen durch einen verringerten GSH-Gehalt, zum anderen durch eine Reduktion der Nrf2-Proteinexpression.

Außerdem kann ein Mangel an Nrf2 weitere Folgen haben. So fanden Holmström et al. heraus, dass ein Verlust von Nrf2, wie bei uns durch die Bestrahlung hervorgerufen, zu einer mitochondrialen Depolarisation, verminderten ATP-Leveln und einer beeinträchtigten Atmung führte. Sie vermuteten, dass Nrf2 zum einen direkt den zellulären Energie-Metabolismus und das Membranpotential beeinflusst, indem es die Verfügbarkeit der Substrate für die mitochondriale Atmungskette reguliert. Dabei handelt es am ehesten um eine veränderte Bereitstellung der Substrate des Komplex I (NADH) und II (FADH₂) (Dinkova-Kostova and Abramov, 2015; Holmström et al., 2013). Andererseits führten sie als Ursache einer verminderten ATP-Produktion bei Nrf2-Mangel an, dass der Mangel an Nrf2 direkt die Expression der Gene der Atmungskette beeinflusst (Holmström et al., 2013). Dies sind weitestgehend Effekte, welche wir bei den Zellen nach der Bestrahlung mit blauem Licht ebenfalls beobachten konnten. Wir konnten eine verminderte Nrf2-Proteinexpression ebenso wie eine Beeinträchtigung der Atmung und des Energiemetabolismus bei den bestrahlten Fibroblasten nachweisen. Im Zusammenhang mit dem blauen Licht wird dies aber vermutlich nicht durch einen Verbrauch der Substrate NADH oder FADH₂ ausgelöst. Durch den Einfluss der Bestrahlung auf die flavinhaltigen Komplexe I und II der Atmungskette und der darauffolgenden Entkopplung, werden diese Substrate nicht verbraucht (Abschnitt 6.2). Damit ist es fraglich, ob die Effekte des Nrf2 auf den Energie-Metabolismus und die mitochondriale Atmungskette im Rahmen der Blaulicht-Bestrahlung durch eine Veränderung der Substrate ausgelöst werden können. Um dies genauer zu untersuchen, sollten in Zukunft der Gehalt der Substrate (NADH und FADH₂) in den Fibroblasten nach der Bestrahlung mit blauem Licht bestimmt werden.

In Bezug auf die ATP-Produktion konnten Dinkova et al. feststellen, dass ein Nrf2-Mangel die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung reduziert und damit die ATP-Synthese verringert (Dinkova-Kostova and Abramov, 2015). Im Gegensatz dazu beobachtete Holmström, dass Nrf2-defiziente Zellen dafür eine erhöhte Produktion von ATP im Rahmen der Glykolyse aufwiesen. Die Glykolyse wurde im Zusammenhang mit der F1F0-ATPase zur Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials genutzt in dem Fall einer beeinträchtigten ATP-Produktion durch die oxidative Phosphorylierung. Dies konnten sie durch erhöhte Level an glykolytischen Zwischenprodukten nachweisen (Holmström et al., 2013). Unsere Untersuchungsergebnisse bezüglich des ATP-Haushalts widersprechen dem. Zwar konnten wir bei den Fibroblasten nach der Blaulicht-Bestrahlung ebenfalls eine verminderte ATP-Produktion feststellen, jedoch war auch die Glykolyse bei den bestrahlten Zellen eingeschränkt (Abschnitt 5.5, 6.4).

Insgesamt bestätigten die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, dass die Bestrahlung mit blauem Licht einen deutlichen Einfluss auf den Redox-Status und das Regulatorprotein Nrf2 hat. Sowohl die vermehrte ROS-Produktion als auch die dadurch verursachten Veränderungen der antioxidativen Eigenschaften können für eine Vielzahl der beobachteten Effekte verantwortlich sein. Die genaue Ursache für die Depletion von Nrf2 bleibt weiterhin unklar. Ob dies allein auf die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zurückzuführen ist oder dem noch ein anderer Mechanismus zugrunde liegt, bleibt im Rahmen von weiteren Untersuchungen zu klären.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aarabi, S., Bhatt, K.A., Shi, Y., Paterno, J., Chang, E.I., Loh, S.A., Holmes, J.W., Longaker, M.T., Yee, H., Gurtner, G.C., 2007. Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *FASEB J* 21, 3250–3261. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8218com>
- Afaq, F., Mukhtar, H., 2001. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *J Photochem Photobiol B* 63, 61–69. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00217-2](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00217-2)
- Aggarwal, B.B., Quintanilha, A.T., Cammack, R., Packer, L., 1978. Damage to mitochondrial electron transport and energy coupling by visible light. *Biochim Biophys Acta* 502, 367–382. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(78\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(78)90057-9)
- Ahmad, M., Wolberg, A., Kahwaji, C.I., 2021. Biochemistry, Electron Transport Chain, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Alcibiades, 2006. Schematic draft of a Neubauer improved counting chamber for cells.
- Arden, K.C., 2004. FoxO: linking new signaling pathways. *Mol Cell* 14, 416–418. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(04\)00213-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00213-8)
- Attisano, L., Wrana, J.L., 2002. Signal transduction by the TGF- β superfamily. *Science* 296, 1646–1647. <https://doi.org/10.1126/science.1071809>
- Aumüller, G., Wolff, W. (Eds.), 2010. *Anatomie: 208 Tabellen ; [mit DVD zum Präp.-Kurs]*, 2., überarb. Aufl. ed, Duale Reihe. Thieme, Stuttgart.
- Bachhawat, A.K., Yadav, S., 2018. The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ -glutamyl cycle. *IUBMB Life* 70, 585–592. <https://doi.org/10.1002/iub.1756>
- Barnes, J.L., Gorin, Y., 2011. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney International* 79, 944–956. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.516>
- Barolet, D., 2008. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg* 27, 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.sder.2008.08.003>
- Bartel, K., Pein, H., Popper, B., Schmitt, S., Janaki-Raman, S., Schulze, A., Lengauer, F., Koeberle, A., Werz, O., Zischka, H., Müller, R., Vollmar, A.M., von Schwarzenberg, K., 2019. Connecting lysosomes and mitochondria – a novel role for lipid metabolism in cancer cell death. *Cell Commun Signal* 17. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0399-2>
- Benninghoff, A., Drenckhahn, D., Waschke, J., Asan, E., Benninghoff-Drenckhahn (Eds.), 2011. *Taschenbuch Anatomie, Nachdr. ed*. Elsevier, Urban & Fischer, München.
- Berman, B., Maderal, A., Raphael, B., 2017. Keloids and Hypertrophic Scars: Pathophysiology, Classification, and Treatment. *Dermatologic Surgery* 43. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000819>
- Bernard, K., Logsdon, N.J., Miguel, V., Benavides, G.A., Zhang, J., Carter, A.B., Darley-Usmar, V.M., Thannickal, V.J., 2017. NADPH Oxidase 4 (Nox4) Suppresses Mitochondrial Biogenesis and Bioenergetics in Lung Fibroblasts via a Nuclear Factor Erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2)-dependent Pathway. *J Biol Chem* 292, 3029–3038. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.752261>

- Blobe, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F., 2000. Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease. *New England Journal of Medicine* 342, 1350–1358. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005043421807>
- Border, W.A., Ruoslahti, E., 1992. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 90, 1–7.
- Branski, L.K., Rennekampff, H.O., Vogt, P.M., 2012. Therapie von hypertrophen Narben und Keloiden. *Chirurg* 83, 831–846. <https://doi.org/10.1007/s00104-011-2243-0>
- Broughton, G., Janis, J.E., Attinger, C.E., 2006a. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 117, 12S–34S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>
- Broughton, G., Janis, J.E., Attinger, C.E., 2006b. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg* 117, 1e–S–32e–S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9>
- Bumah, V.V., Masson-Meyers, D.S., Awosika, O., Zacharias, S., Enwemeka, C.S., 2021. The viability of human cells irradiated with 470-nm light at various radiant energies in vitro. *Lasers Med Sci*. <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03250-z>
- Calabrese, G., Morgan, B., Riemer, J., 2017. Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions. *Antioxid Redox Signal* 27, 1162–1177. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7121>
- Campiche, R., Curpen, S.J., Lutchmanen-Kolanthan, V., Gougeon, S., Cherel, M., Laurent, G., Gempeler, M., Schuetz, R., 2020. Pigmentation effects of blue light irradiation on skin and how to protect against them. *Int J Cosmet Sci* 42, 399–406. <https://doi.org/10.1111/ics.12637>
- Carthy, J.M., 2018. TGF β signaling and the control of myofibroblast differentiation: Implications for chronic inflammatory disorders. *J Cell Physiol* 233, 98–106. <https://doi.org/10.1002/jcp.25879>
- Cell Signaling Technology, 2018. LysoTracker® Green DND-26 [WWW Document]. Cell Signaling Technology. URL <https://www.cellsignal.com/products/buffers-dyes/lysotracker-green-dnd-26/8783> (accessed 5.31.21).
- Chambers, R.C., Leoni, P., Kaminski, N., Laurent, G.J., Heller, R.A., 2003. Global Expression Profiling of Fibroblast Responses to Transforming Growth Factor- β 1 Reveals the Induction of Inhibitor of Differentiation-1 and Provides Evidence of Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching. *The American Journal of Pathology* 162, 533–546. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63847-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63847-3)
- Chen, Z., Wang, Z., Jin, T., Shen, G., Wang, Y., Tan, X., Gan, Y., Yang, F., Liu, Y., Huang, C., Zhang, Y., Fu, X., Shi, C., 2019. Fibrogenic fibroblast-selective near-infrared phototherapy to control scarring. *Theranostics* 9, 6797–6808. <https://doi.org/10.7150/thno.36375>
- Cho, H.-Y., Reddy, S.P.M., Yamamoto, M., Kleeberger, S.R., 2004. The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis. *FASEB J* 18, 1258–1260. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1127fje>
- Cohen, L., Brodsky, M.A., Zubair, R., Kohli, I., Hamzavi, I.H., Sadeghpour, M., 2020. Cutaneous Interaction with Visible Light: What Do We Know. *J Am Acad Dermatol*. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2020.03.115>

- Darby, I., Skalli, O., Gabbiani, G., 1990. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63, 21–29.
- Darby, I.A., Laverdet, B., Bonté, F., Desmoulière, A., 2014. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 7, 301–311. <https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>
- David, C.J., Massagué, J., 2018. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 419–435. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0007-0>
- Ding, H., Jiang, L., Xu, J., Bai, F., Zhou, Y., Yuan, Q., Luo, J., Zen, K., Yang, J., 2017. Inhibiting aerobic glycolysis suppresses renal interstitial fibroblast activation and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 313, F561–F575. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00036.2017>
- Dinkova-Kostova, A.T., Abramov, A.Y., 2015. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med* 88, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036>
- DiPietro, L.A., 2016. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J Leukoc Biol* 100, 979–984. <https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0316-102R>
- Dipl. -Biol. Krassovka, J., 2017. Molekulare Grundlagen der durch blaues Licht induzierten Differenzierungshemmung humaner Fibroblasten zu Myofibroblasten [WWW Document]. URL <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=42628> (accessed 7.21.21).
- Ehrlich, H.P., 1988. Wound closure: evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye (Lond)* 2 (Pt 2), 149–157. <https://doi.org/10.1038/eye.1988.28>
- Feldman, G., Rozen, N., Rubin, G., 2017. Dupuytren's Contracture: Current Treatment Methods 3.
- Feng, J., Li, J., Wu, L., Yu, Q., Ji, J., Wu, J., Dai, W., Guo, C., 2020. Emerging roles and the regulation of aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 39, 126. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01629-4>
- Fu, Y., Porres, J.M., Lei, X.G., 2001. Comparative impacts of glutathione peroxidase-1 gene knockout on oxidative stress induced by reactive oxygen and nitrogen species in mouse hepatocytes. *Biochem J* 359, 687–695. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3590687>
- Gabbiani, G., Hirschel, B.J., Ryan, G.B., Statkov, P.R., Majno, G., 1972. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med* 135, 719–734. <https://doi.org/10.1084/jem.135.4.719>
- Garza, Z.C.F., Born, M., Hilbers, P. a. J., van Riel, N. a. W., Liebmann, J., 2018. Visible Blue Light Therapy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Curr Med Chem* 25, 5564–5577. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170727112206>
- Gauglitz, G.G., Korting, H.C., Pavicic, T., Ruzicka, T., Jeschke, M.G., 2011. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol Med* 17, 113–125. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00153>
- Ghazawi, F.M., Zargham, R., Gilardino, M.S., Sasseville, D., Jafarian, F., 2018. Insights into the Pathophysiology of Hypertrophic Scars and Keloids: How Do They Differ?

- GmbH, A.-M.D.A., Avoxa-Mediengruppe Deutscher Apotheker, n.d. Zur Biochemie des Glutathionsystems: ein Überblick [WWW Document]. Pharmazeutische Zeitung online. URL <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/inhalt-45-1996/titel-45-1996/> (accessed 8.16.20).
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T., 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314–321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>
- Hamblin, M.R., 2018. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem Photobiol* 94, 199–212. <https://doi.org/10.1111/php.12864>
- Hecker, L., Logsdon, N.J., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Bernard, K., Hock, T., Meldrum, E., Sanders, Y.Y., Thannickal, V.J., 2014. Reversal of Persistent Fibrosis in Aging by Targeting Nox4-Nrf2 Redox Imbalance. *Sci Transl Med* 6, 231ra47. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008182>
- Hockberger, P.E., Skimina, T.A., Centonze, V.E., Lavin, C., Chu, S., Dadras, S., Reddy, J.K., White, J.G., 1999. Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6255–6260. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6255>
- Holmström, K.M., Baird, L., Zhang, Y., Hargreaves, I., Chalasani, A., Land, J.M., Stanyer, L., Yamamoto, M., Dinkova-Kostova, A.T., Abramov, A.Y., 2013. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. *Biol Open* 2, 761–770. <https://doi.org/10.1242/bio.20134853>
- Hornig-Do, H.-T., von Kleist-Retzow, J.-C., Lanz, K., Wickenhauser, C., Kudin, A.P., Kunz, W.S., Wiesner, R.J., Schauen, M., 2007. Human Epidermal Keratinocytes Accumulate Superoxide Due to Low Activity of Mn-SOD, Leading to Mitochondrial Functional Impairment. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 1084–1093. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700666>
- Iwata, T., Masuda, S., 2021. Photoreaction Mechanisms of Flavoprotein Photoreceptors and Their Applications. *Adv Exp Med Biol* 1293, 189–206. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8763-4_11
- Khashan, M., Smitham, P.J., Khan, W.S., Goddard, N.J., 2011. Dupuytren's Disease: Review of the Current Literature. *Open Orthop J* 5, 283–288. <https://doi.org/10.2174/1874325001105010283>
- Krassovka, J., Borgschulze, A., Sahlender, B., Lögters, T., Windolf, J., Grotheer, V., 2019. Blue light irradiation and its beneficial effect on Dupuytren's fibroblasts. *PLOS ONE* 14, e0209833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209833>
- Krassovka, J.M., Suschek, C.V., Prost, M., Grotheer, V., Schiefer, J.L., Demir, E., Fuchs, P.C., Windolf, J., Stürmer, E.K., Opländer, C., 2020. The impact of non-toxic blue light (453 nm) on cellular antioxidative capacity, TGF- β 1 signaling, and myofibrogenesis of human skin fibroblasts. *J Photochem Photobiol B* 209, 111952. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111952>
- Kurakazu, I., Akasaki, Y., Hayashida, M., Tsushima, H., Goto, N., Sueishi, T., Toya, M., Kuwahara, M., Okazaki, K., Duffy, T., Lotz, M.K., Nakashima, Y., 2019. FOXO1 transcription factor regulates chondrogenic differentiation through transforming

- growth factor $\beta 1$ signaling. *J Biol Chem* 294, 17555–17569. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009409>
- Leask, A., Abraham, D.J., 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 18, 816–827. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1273rev>
- Ledon, J.A., Savas, J., Franca, K., Chacon, A., Nouri, K., 2013. Intralesional treatment for keloids and hypertrophic scars: a review. *Dermatol Surg* 39, 1745–1757. <https://doi.org/10.1111/dsu.12346>
- Lee, H.J., Jang, Y.J., 2018. Recent Understandings of Biology, Prophylaxis and Treatment Strategies for Hypertrophic Scars and Keloids. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19030711>
- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M.L., Bergamini, C., Bianchi, C., Biondi, A., 2006. Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta* 1757, 1406–1420. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.05.007>
- Lewis, J.B., Wataha, J.C., Messer, R.L.W., Caughman, G.B., Yamamoto, T., Hsu, S.D., 2005. Blue light differentially alters cellular redox properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 72, 223–229. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30126>
- Li, B., Wang, J.H.-C., 2011. Fibroblasts and Myofibroblasts in Wound Healing: Force Generation and Measurement. *J Tissue Viability* 20, 108–120. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2009.11.004>
- Li, Y., Ma, Z., Jiang, S., Hu, W., Li, T., Di, S., Wang, D., Yang, Y., 2017. A global perspective on FOXO1 in lipid metabolism and lipid-related diseases. *Prog Lipid Res* 66, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.04.002>
- Liebel, F., Kaur, S., Ruvolo, E., Kollias, N., Southall, M.D., 2012. Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 1901–1907. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.476>
- Liebmann, J., Born, M., Kolb-Bachofen, V., 2010. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *J Invest Dermatol* 130, 259–269. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.194>
- Lockwood, D.B., Wataha, J.C., Lewis, J.B., Tseng, W.Y., Messer, R.L.W., Hsu, S.D., 2005. Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. *Dent Mater* 21, 683–688. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2004.07.022>
- Losi, A., 2007. Flavin-based Blue-Light photosensors: a photobiophysics update. *Photochem Photobiol* 83, 1283–1300. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00196.x>
- Losi, A., Gärtner, W., 2011. Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochem Photobiol* 87, 491–510. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00913.x>
- Lunt, S.Y., Vander Heiden, M.G., 2011. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>

- Magni, G., Banchelli, M., Cherchi, F., Coppi, E., Fraccalvieri, M., Rossi, M., Tatini, F., Pugliese, A.M., Rossi Degl'Innocenti, D., Alfieri, D., Matteini, P., Pini, R., Pavone, F.S., Rossi, F., 2020. Experimental Study on Blue Light Interaction with Human Keloid-Derived Fibroblasts. *Biomedicines* 8. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8120573>
- Mahmoud, B.H., Hexsel, C.L., Hamzavi, I.H., Lim, H.W., 2008. Effects of visible light on the skin. *Photochem Photobiol* 84, 450–462. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00286.x>
- Mann, T., Eggers, K., Rippke, F., Tesch, M., Buerger, A., Darvin, M.E., Schanzer, S., Meinke, M.C., Lademann, J., Kolbe, L., 2020. High-energy visible light at ambient doses and intensities induces oxidative stress of skin-Protective effects of the antioxidant and Nrf2 inducer Licochalcone A in vitro and in vivo. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 36, 135–144. <https://doi.org/10.1111/phpp.12523>
- Massey, V., 2000. The Chemical and Biological Versatility of Riboflavin. *Biochemical Society Transactions* 28, 283–296. <https://doi.org/10.1042/bst0280283>
- Masson-Meyers, D.S., Bumah, V.V., Enwemeka, C.S., 2016. A comparison of four methods for determining viability in human dermal fibroblasts irradiated with blue light. *J Pharmacol Toxicol Methods* 79, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.01.001>
- McAnulty, R.J., 2007. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 666–671. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.11.005>
- Merk, D., 2020. Auswirkungen von blauem Licht ($\lambda = 453 \text{ nm}$) auf den Energiemetabolismus von humanen dermalen Fibroblasten; Masterarbeit (M. Sc.); Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Moll, I., Jung, E.G., Augustin, M. (Eds.), 2010. *Dermatologie: 104 Tabellen; [mit Blickdiagnosen und Quizfragen auf CD-ROM], 7., komplett überarb. und erw. Aufl. ed, Duale Reihe.* Thieme, Stuttgart.
- Mutschler, W., 2012. Physiologie und Pathophysiologie der Heilung von Defektwunden. *Unfallchirurg* 115, 767–773. <https://doi.org/10.1007/s00113-012-2208-x>
- Opländer, C., Deck, A., Volkmar, C.M., Kirsch, M., Liebmann, J., Born, M., van Abeelen, F., van Faassen, E.E., Kröncke, K.-D., Windolf, J., Suschek, C.V., 2013. 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 Radic Biol Med* 65, 1363–1377. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.022>
- Opländer, C., Hidding, S., Werners, F.B., Born, M., Pallua, N., Suschek, C.V., 2011. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 103, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.02.018>
- Pakshir, P., Noskovicova, N., Lodyga, M., Son, D.O., Schuster, R., Goodwin, A., Karvonen, H., Hinz, B., 2020. The myofibroblast at a glance. *J Cell Sci* 133. <https://doi.org/10.1242/jcs.227900>
- Panday, S., Talreja, R., Kavdia, M., 2020. The role of glutathione and glutathione peroxidase in regulating cellular level of reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res* 131, 104010. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104010>

- Petrenko, Y.A., Gorokhova, N.A., Tkachova, E.N., Petrenko, A.Y., 2005. The reduction of Alamar Blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria. *Ukr Biokhim Zh* (1999) 77, 100–105.
- Ponugoti, B., Xu, F., Zhang, C., Tian, C., Pacios, S., Graves, D.T., 2013. FOXO1 promotes wound healing through the up-regulation of TGF- β 1 and prevention of oxidative stress. *J Cell Biol* 203, 327–343. <https://doi.org/10.1083/jcb.201305074>
- Promega Corporation, 2017. Glucose-Glo-Assay [WWW Document]. URL <https://www.promega.de/products/energy-metabolism/metabolite-detection-assays/glucose-glo-assay/> (accessed 4.8.21).
- Rampersad, S.N., 2012. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)* 12, 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- Reinke, J.M., Sorg, H., 2012. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 49, 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3, 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Rödel, F., Fournier, C., Wiedemann, J., Merz, F., Gaipf, U.S., Frey, B., Keilholz, L., Seegenschmiedt, M.H., Rödel, C., Hehlhans, S., 2017. Basics of Radiation Biology When Treating Hyperproliferative Benign Diseases. *Front Immunol* 8, 519. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00519>
- Rossi, F., Magni, G., Tatini, F., Banchelli, M., Cherchi, F., Rossi, M., Coppi, E., Pugliese, A.M., Rossi degl'Innocenti, D., Alfieri, D., Pavone, F.S., Pini, R., Matteini, P., 2021. Photobiomodulation of Human Fibroblasts and Keratinocytes with Blue Light: Implications in Wound Healing. *Biomedicines* 9. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010041>
- Sarrazy, V., Billet, F., Micallef, L., Coulomb, B., Desmoulière, A., 2011. Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments. *Wound Repair and Regeneration* 19, s10–s15. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00708.x>
- Selemidis, S., Sobey, C.G., Wingler, K., Schmidt, H.H.H.W., Drummond, G.R., 2008. NADPH oxidases in the vasculature: Molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacology & Therapeutics* 120, 254–291. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.08.005>
- Serini, G., Gabbiani, G., 1999. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 250, 273–283. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4543>
- Serrage, H., Heiskanen, V., Palin, W.M., Cooper, P.R., Milward, M.R., Hadis, M., Hamblin, M.R., 2019. Under the spotlight: mechanisms of photobiomodulation concentrating on blue and green light. *Photochem Photobiol Sci* 18, 1877–1909. <https://doi.org/10.1039/c9pp00089e>
- Singer, A.J., Clark, R.A., 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341, 738–746. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411006>
- Singer, S., Berneburg, M., 2018. Phototherapy. *J Dtsch Dermatol Ges* 16, 1120–1129. <https://doi.org/10.1111/ddg.13646>

- Siraki, A.G., Klotz, L.-O., Kehrer, J.P., 2018. Free Radicals and Reactive Oxygen Species, in: *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, pp. 262–294. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.01895-X>
- Sklar, L.R., Almutawa, F., Lim, H.W., Hamzavi, I., 2013. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochem Photobiol Sci* 12, 54–64. <https://doi.org/10.1039/c2pp25152c>
- Slemp, A.E., Kirschner, R.E., 2006. Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management. *Current Opinion in Pediatrics* 18, 396–402. <https://doi.org/10.1097/01.mop.0000236389.41462.ef>
- Sokolov, S.S., Balakireva, A.V., Markova, O.V., Severin, F.F., 2015. Negative Feedback of Glycolysis and Oxidative Phosphorylation: Mechanisms of and Reasons for It. *Biochemistry (Mosc)* 80, 559–564. <https://doi.org/10.1134/S0006297915050065>
- Svobodova, A., Walterova, D., Vostalova, J., 2006. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150, 25–38. <https://doi.org/10.5507/bp.2006.003>
- Taflinski, L., Demir, E., Kauczok, J., Fuchs, P.C., Born, M., Suschek, C.V., Opländer, C., 2014. Blue light inhibits transforming growth factor- β 1-induced myofibroblast differentiation of human dermal fibroblasts. *Experimental Dermatology* 23, 240–246. <https://doi.org/10.1111/exd.12353>
- Toldi, D., Gyugos, M., Darkó, É., Szalai, G., Gulyás, Z., Gierczik, K., Székely, A., Boldizsár, Á., Galiba, G., Müller, M., Simon-Sarkadi, L., Kocsy, G., 2019. Light intensity and spectrum affect metabolism of glutathione and amino acids at transcriptional level. *PLoS One* 14, e0227271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227271>
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R.A., 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 349–363. <https://doi.org/10.1038/nrm809>
- Tyrrell, R.M., Pidoux, M., 1986. Endogenous glutathione protects human skin fibroblasts against the cytotoxic action of UVB, UVA and near-visible radiations. *Photochem Photobiol* 44, 561–564. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1986.tb04709.x>
- van Meerloo, J., Kaspers, G.J.L., Cloos, J., 2011. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, in: Cree, I.A. (Ed.), *Cancer Cell Culture, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- Vandersee, S., Beyer, M., Lademann, J., Darvin, M.E., 2015. Blue-violet light irradiation dose dependently decreases carotenoids in human skin, which indicates the generation of free radicals. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 579675. <https://doi.org/10.1155/2015/579675>
- Vaughan, M.B., Howard, E.W., Tomasek, J.J., 2000. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 257, 180–189. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4869>
- Via Medici, 2021. Glykolyse: Übersicht, Reaktionen und Energiebilanz [WWW Document]. via medici: leichter lernen - mehr verstehen. URL <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/547091/subject/biochemie/kohlenhydrate/stoffwechsel/glykolyse+übersicht+reaktionen+und+energiebilanz> (accessed 5.23.21). Zugriffsdatum 23.05.2021

- Walters, D.M., Cho, H.-Y., Kleeberger, S.R., 2008. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 10, 321–332. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1901>
- Wang, P.-H., Huang, B.-S., Horng, H.-C., Yeh, C.-C., Chen, Y.-J., 2018. Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association* 81, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>
- Wei, Q., Su, J., Dong, G., Zhang, M., Huo, Y., Dong, Z., 2019. Glycolysis inhibitors suppress renal interstitial fibrosis via divergent effects on fibroblasts and tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 316, F1162–F1172. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00422.2018>
- Welsch, U., Deller, T., 2010. *Lehrbuch Histologie: mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch*, 3. Aufl. ed. Elsevier, Urban & Fischer, München.
- Wolfram, D., Tzankov, A., Pülzl, P., Piza-Katzer, H., 2009. Hypertrophic Scars and Keloids—A Review of Their Pathophysiology, Risk Factors, and Therapeutic Management. *Dermatologic Surgery* 35, 171–181. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2008.34406.x>
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., Massagué, J., 1994. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370, 341–347. <https://doi.org/10.1038/370341a0>
- Wu, Y., Pan, Q., Yan, H., Zhang, K., Guo, X., Xu, Z., Yang, W., Qi, Y., Guo, C.A., Hornsby, C., Zhang, L., Zhou, A., Li, L., Chen, Y., Zhang, W., Sun, Y., Zheng, H., Wondisford, F., He, L., Guo, S., 2018. Novel Mechanism of Foxo1 Phosphorylation in Glucagon Signaling in Control of Glucose Homeostasis. *Diabetes* 67, 2167–2182. <https://doi.org/10.2337/db18-0674>
- Xing, Y.-Q., Li, A., Yang, Y., Li, X.-X., Zhang, L.-N., Guo, H.-C., 2018. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression. *Life Sci* 193, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.030>
- Zastrow, L., Groth, N., Klein, F., Kockott, D., Lademann, J., Ferrero, L., 2009. [UV, visible and infrared light. Which wavelengths produce oxidative stress in human skin?]. *Hautarzt* 60, 310–317. <https://doi.org/10.1007/s00105-008-1628-6>
- Zhao, M.-X., Wen, J.-L., Wang, L., Wang, X.-P., Chen, T.-S., 2019. Intracellular catalase activity instead of glutathione level dominates the resistance of cells to reactive oxygen species. *Cell Stress Chaperones* 24, 609–619. <https://doi.org/10.1007/s12192-019-00993-1>

8 Anhang

8.1 Der ATP-Gehalt der Zellen mit und ohne Einfluss der Bestrahlung mit 453 nm

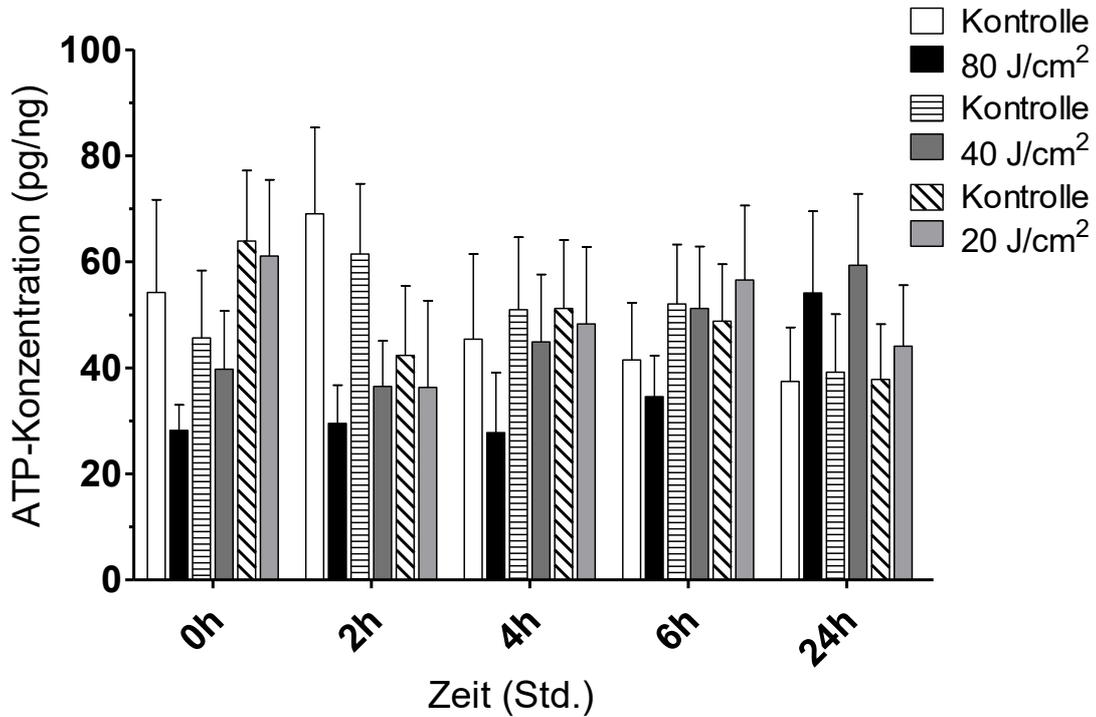


Abb. 38: Die reine ATP-Konzentration pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Die hellen Balken stehen für die Proben der unbestrahlten Kontrollen, die dunklen zeigen die Werte der bestrahlten Proben. Humane dermale Fibroblasten wurden einmalig mit 80 J/cm², 40 J/cm² und 20 J/cm² bestrahlt. Die gemessene ATP-Menge wurde auf die entsprechende DNA-Konzentration bezogen und auf die Molmasse von ATP (507,18 g/mol) berechnet (keine Signifikanz; normiert auf die entsprechende Kontrolle; n=8).

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Christoph V. Suschek für die Möglichkeit bedanken, meine Arbeit in dem Forschungslabor der Unfall- und Handchirurgie, in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Joachim Windolf, durchführen zu dürfen. Christoph war ein super Doktorvater und die Betreuung hätte ich mir besser nicht vorstellen können! Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Wehling danken, dass er die Zweitbetreuung meiner Arbeit übernommen hat.

Ein großes Dankeschön gilt außerdem dem gesamten Team des Forschungslabor, vor allem aber Samira Seghrouchni, Jutta Schneider und Mona Schmitz. Sie standen mir jederzeit bei Fragen und Problemen zur Seite. Ohne euch wäre die Arbeit so nicht möglich gewesen! Auch denke ich gerne an unser gemeinsames Frühstück, die Geburtstage und Weihnachtsfeiern zurück. Danke für die schöne und unvergessliche Zeit!

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, Stefanie und Karsten, dass sie mich die ganze Zeit unterstützt und mir überhaupt erst die Möglichkeit gegeben haben, diese Arbeit zu schreiben und fertigzustellen. Das ist nicht selbstverständlich und ich bin euch wirklich dankbar!