

Aus dem Lehrstuhl
für Dermatologie und Venerologie
Prof. Dr. Mark Berneburg
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Biologische Wirkung von UVA₁ (Neue LED-Technologie 360-400 nm versus
herkömmliche Metallhalogenid Hochdruckstrahler 340-400 nm)
auf die dermale Fibrose *in vitro* und *in vivo*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Clara Lissner

2022

Aus dem Lehrstuhl
für Dermatologie und Venerologie
Prof. Dr. Mark Berneburg
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Biologische Wirkung von UVA₁ (Neue LED-Technologie 360-400 nm versus
herkömmliche Metallhalogenid Hochdruckstrahler 340-400 nm)
auf die dermale Fibrose *in vitro* und *in vivo*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Clara Lissner

2022

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Sigrid Karrer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Boris Ehrenstein

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Januar 2023

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Sklerodermie	7
1.1.1	Zirkumskripte Sklerodermie	8
1.1.1.1	Übersicht	8
1.1.1.2	Klinik	10
1.1.1.3	Klassifikation	11
1.1.1.4	Histopathologie	12
1.1.1.5	Therapien	12
1.2	UVA₁ – Strahlung	14
1.2.1	Physikalische Grundlagen	14
1.2.2	Anwendung in der Medizin	15
1.2.3	Nebenwirkungen und Risiken	18
1.3	UVA₁ – Therapie bei dermalen Fibrose/Sklerodermie	20
1.3.1	Molekulare Wirkmechanismen von UVA ₁ in der Dermis bei normalen und Sklerodermie – Fibroblasten	21
1.3.1.1	Kollagenmetabolismus (MMP-1 und Coll-1)	23
1.3.1.2	Zytokine (IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF- α)	24
1.3.1.3	Wachstumsfaktoren (TGF β -1 und TGF β -2)	25
1.3.2	Molekulare Wirkmechanismen von UVA ₁ bei epidermalen Keratinozyten	26
1.4	Zielsetzung der Studie	28
2.	MATERIAL UND METHODEN	30
2.1	Materialien	30
2.1.1	Geräte	30
2.1.2.	Verbrauchsmaterial	32
2.1.3	Zelllinien	35
2.1.4	Mäusestamm	35
2.1.5	Primer	35

2.2	Methoden	37
2.2.1	UVA ₁ -Bestrahlung	37
2.2.2	Zellkulturmethoden	38
2.2.2.1	Auftauen von Zellen	38
2.2.2.2	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	38
2.2.2.3	Bestrahlung von Zellen mit UVA ₁	39
2.2.2.4	Mikroskopische Untersuchung von Zellen und Dokumentation	40
2.2.2.5	MTT-Assay	40
2.2.2.6	Zellzahlbestimmung mittels LUNA-FL	41
2.2.2.7	Einfrieren von Zellen	41
2.2.3	Tierversuchsmethoden	42
2.2.3.1	Mausstamm und Herkunft	42
2.2.3.2	Versuchsgruppen	43
2.2.3.3	Bleomycin-induziertes Fibrose Mausmodell	43
2.2.3.4	Bestrahlung von Mäusen	44
2.2.3.5	Asservierung des murinen Hautgewebes	45
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	45
2.2.4.1	mRNA Isolierung aus Zellen	45
2.2.4.2	mRNA Isolierung aus murinem dermale Hautgewebe	46
2.2.4.3	Reverse Transkription von mRNA in cDNA	46
2.2.4.4	Quantitative real time PCR	47
2.2.5	Histologische und Immunhistologische Methoden	48
2.2.5.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung	48
2.2.5.2	Sirius Red Färbung	48
2.2.5.3	αSMA Färbung	49
2.2.5.4	Vermessung der Dermis-Dicke	49
2.2.6	Statistische Auswertungen	49
2.2.6.1	Auswertungen der mRNA Genexpressionsanalysen	50
2.2.6.2	Auswertungen der Dermis-Vermessung	50

3.	ERGEBNISSE	51
3.1.	<i>In vitro</i> Untersuchungen: Molekulare und zelluläre Effekte von UVA₁ auf Fibroblasten und Keratinozyten	51
3.1.1	Bestimmung der Bestrahlungsparameter für Zellkulturexperimente	51
3.1.1.1	Bestrahlungsbedingungen	51
3.1.1.2	UVA ₁ -Dosisfindung für Zellkulturexperimente	52
3.1.1.3	Untersuchung der Zellviabilität im Zeitverlauf nach UVA ₁ -Bestrahlung	55
3.1.2	Einfluss von UVA ₁ -Bestrahlung auf die Genexpression in Fibroblasten und Keratinozyten	57
3.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen: Molekulare und zelluläre Effekte von UVA₁ auf die lokale Sklerodermie am Bleomycin-induzierten Fibrose Mausmodell	66
3.2.1	UVA ₁ -Bestrahlung der Versuchsmäuse	66
3.2.2	Immunhistochemische Untersuchungen des fibrotischen Hautareals nach UVA ₁ -Bestrahlung	68
3.2.3	Vermessung der Dermisdicke	73
3.2.4	Genexpressionsanalysen des fibrotischen Hautareals der Dermis nach UVA ₁ -Bestrahlung	74

4.	DISKUSSION	78
4.1	Etablierung der Bestrahlungsparameter	78
4.1.1	<i>In vitro</i> : Zellkultur	78
4.1.2	<i>In vivo</i> : Mausversuch	80
4.2	Bestrahlungsstudie mit molekularbiologischer Auswertung	81
4.2.1	Einfluss von UVA ₁ auf Fibroblasten und Keratinozyten	81
4.2.1.1	Fibroblasten	83
4.2.1.2	Keratinozyten	88
4.2.2	Einfluss von UVA ₁ auf die zirkumskripte Sklerodermie am Bleomycin-induzierten Fibrose-Mausmodell	91
4.2.2.1	Histologische und immunhistologische Auswertungen	92
4.2.2.2	Genexpressionsanalysen	93
5.	ZUSAMMENFASSUNG	96
6.	ANHANG.	98
6.1	Tabellen	98
6.2	Abbildungen	98
6.3	Abkürzungsverzeichnis	100
7.	LITERATURVERZEICHNIS	102
8.	DANKSAGUNG	

1. Einleitung

1.1 Sklerodermie

Der Begriff Sklerodermie umfasst im Allgemeinen chronisch-inflammatorische Erkrankungen, bei denen es nach einer entzündlichen Phase zur bindegewebsartigen Verhärtung (Sklerose) umschriebener Hautareale oder auch zu einer generalisierten Sklerose der Haut unter Beteiligung innerer Organe wie z.B. Herz, Lunge, Niere oder Gastrointestinal-Trakt kommen kann. Trotz Gemeinsamkeiten in histologischen sowie molekularbiologischen Befunden ergibt sich aufgrund unterschiedlicher Ausprägung, Verläufen und Prognose die Notwendigkeit, zwei eigenständige Krankheitsentitäten zu differenzieren:

- zirkumskripte Sklerodermie (ZS) (Synonym Morphea) und
- systemische Sklerodermie (SS) (Synonym Systemische Sklerose) (1, 3, 4).

Während die Prognose der ZS in der Regel für die betroffenen Patienten günstig ist, handelt es sich bei der SS um eine ernstzunehmende Erkrankung mit eingeschränkter bzw. verkürzter Lebenserwartung aufgrund der Beteiligung innerer Organe (3, 4). Dabei unterscheidet man bei der SS zwischen einer limitierten Form mit besserer Prognose und einer diffusen Form, die schneller und schwerer verläuft.

Betroffene SS-Patienten können jedoch die gleichen äußerlichen Symptome aufweisen, welche auch bei ZS-Patienten an der Haut auftreten. Ein Übergang von einer ZS-Erkrankung in eine SS tritt, außer in sehr selten beschriebenen Fällen in der Literatur (5-8), ebenso wenig auf wie der Befall innerer Organe (1).

Aufgrund der großen klinischen Unterschiede und Abgrenzungen beider Sklerodermie-Erkrankungen befasst sich diese Studie ausschließlich mit der Sklerose der Haut, im näheren Sinn also mit der zur zirkumskripten Form der Sklerodermie gehörenden Morphea.

1.1.1 Zirkumskripte Sklerodermie

1.1.1.1 Übersicht

Die zirkumskripte Sklerodermie wird in der Fachliteratur, sowie im Englischen, oft auch als „Morphea“, „Morphaea“ oder „localized scleroderma“ bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine Reihe seltener sklerotischer Hauterkrankungen, d.h. chronische, fibrotische Störungen der Hautschichten vor allem des Bindegewebes, die je nach Subtyp und Lokalisation, auch eine mögliche Beteiligung umliegender, hautnaher Strukturen wie Adnexgebilde (z.B. Haarfollikel), Fettgewebe, Muskulatur, Gelenke und Knochen mit sich bringen kann (1, 4).

Die Krankheit wird mit einer Inzidenz von 0,4-2,7 pro 100.000 Einwohner angegeben und tritt mit 2,6-6 : 1 häufiger bei Frauen als bei Männern auf (9, 10). Am häufigsten erkranken jüngere Erwachsene (20-40 Jahre), etwa 15% der Patienten sind Kinder bis zu 10 Jahren. Menschen mit stärkerer Pigmentierung erkranken nur sehr selten (11).

Die Ätiopathogenese der Morphea ist derzeit noch unvollständig aufgeklärt. Um die Entstehung dieser Krankheit nachvollziehen zu können, werden unterschiedlichste Faktoren in Betracht gezogen und sind Gegenstand aktueller Forschung. Pathogenetisch ist zumindest klar, dass die Entstehung der Krankheit durch ein Ungleichgewicht im Kollagenmetabolismus zustande kommt. Die überschießende Kollagensynthese, welche in der tiefen retikulären Dermis beginnt, weitet sich im fortlaufenden Prozess auf das gesamte Bindegewebe aus und verursacht die mit der Krankheit einhergehende Hautverhärtung (12). Trotzdem bleibt die Ätiologie der Morphea schwer definierbar und es ist anzunehmen, dass ihre Entstehung und der individuelle Krankheitsverlauf multifaktoriellen Prozessen unterliegen. Unter anderem werden folgende Faktoren als mögliche Ursachen assoziiert: Traumata oder Strahlung, Medikamente, Infektionen, Autoimmunität und Mikrochimärismus (4).

Eine durch Traumata ausgelöste Morphea kann bei bestimmten Impfungen (13) oder auch durch intramuskuläre Injektionen einzelner Vitamine (B₁₂, K) (14-17) entstehen. Diese lokalen Traumata gehen in etwa 20% der Fälle einer Morphea-Erkrankung voraus (12). Auch UV-Strahlung kann Morphea induzieren. Besonders relevant auch für die vorliegende Forschungsarbeit im Hinblick auf das verwendete Tiermodell ist die medikamentös verursachte ZS. So sind zahlreiche Pharmaka bekannt, welche

nachweislich eine Sklerose der Haut verursachen (18). Darunter ist auch das in dieser Studie beschriebene Bleomycin, welches für das Fibrose-Mausmodell nach *Yamamoto et al.*, 1999 verwendet wurde. Kontrovers werden Infektionen wie z.B. die kutane Borreliose als Ursache (19) diskutiert und teilweise in verschiedenen Studien bestätigt, aber jedoch auch widerlegt (4, 20). Dass die Autoimmunität eine entscheidende Rolle spielt, wird in einigen Veröffentlichungen und Studien durch den Nachweis positiver Autoantikörper bei Patienten mit Morphea begründet (4, 21). Ein Indiz dafür können mit zirkumskripten Sklerodermie-Erkrankungen vermehrt einhergehende Autoimmunkrankheiten sein (22, 23). Eine pathophysiologische Ursache verfolgt man mit der Erforschung von chimären Zellen, welche Gemeinsamkeiten in der SS, ZS und der Graft-versus-Host-Krankheit (GVHD) aufweisen (4).

Zusammenfassend werden also genetische, autoimmunologische, virale, hormonelle, infektiöse, traumatische, vaskuläre, neurogene, toxische sowie medikamentöse Ursachen als auslösende Faktoren einer ZS in Betracht gezogen (11). Offensichtlich ist lediglich, dass die Erkrankung letztendlich in einer Störung oder in einem Ungleichgewicht des Kollagenmetabolismus resultiert, mit der Folge exzessiver Fibrose, die für das typische Hautbild verantwortlich ist (4).

1.1.1.2 Klinik

In der Klinik äußert sich die Krankheit als initial entzündliches, sich fleckenförmig und zentrifugal ausdehnendes Erythem, welches sich unter Schwund der Rötung in eine langsam wachsende, atrophisch-glänzende Skleroseplatte verwandelt. Zurück bleibt ein ringförmiges, fliederfarbiges Resterythem, der sogenannte „lilac ring“. Die gelblich-weiße verhärtete Platte (Abbildung 1) ist mit der unteren Hautschicht verbacken und bleibt oft irreversibel bestehen. Im weiteren Verlauf des Fortschreitens der Sklerosierung können innerhalb der Plaques auch Adnexstrukturen betroffen sein, mit Verlust von Haar- und Talgdrüsen, welche eine trockene, derbe atrophe Fläche entstehen lassen. In mechanisch belasteten Zonen kann es auch zur Kontinuitätstrennung im Bereich des dermoepidermalen Übergangs mit der Folge bullöser Veränderungen oder auch gelegentlich Einblutungen kommen. Pigmentveränderungen (teils Hyper-, teils Depigmentierungen) werden ebenfalls häufig beobachtet (3, 11, 24). Im Gegensatz zur systemischen Sklerodermie zeigen sich bei der zirkumskripten Sklerodermie keine Auffälligkeiten in den Laborwerten (3).



Abbildung 1: Zirkumskripte Sklerodermie: typisches klinisches Hautbild mit verhärteten weißen Sklerose-Plaques und schon hyperpigmentiertem Randsaum als Zeichen eines längeren Verlaufs der Erkrankung. aus *Altmeyers Enzyklopädie* (2)

1.1.1.3 Klassifikation

Das breite Spektrum der klinischen Manifestationen der ZS führte zu unterschiedlichen Klassifizierungen und Subtypisierungen der Krankheit. Neben einer vor allem im deutschsprachigen Raum verwendeten Einteilung in 3 unterschiedliche Typen (Typ I – Lokalisierte plaqueartige Sklerodermie, Typ II – Lineare Sklerodermie und Typ III – Subkutane, profunde Sklerodermie), wird in der internationalen Literatur eine Einteilung nach Peterson *et al.* im Jahre 1995 in die verschiedenen Untertypen der Morphea (plaque, tiefe, generalisierte, bullöse und lineare Morphea) vorgenommen. Zudem schlägt die Deutsche Gesellschaft für Dermatologie in ihrer „Leitlinie von 2016 zur zirkumskripten Sklerodermie“ folgende Klassifikation der Krankheit nach *Kreuter et al., 2016* (Tabelle 1), vor (1, 7, 25).

Tabelle 1: Klassifikation der ZS nach *Kreuter et al., 2016*

Limitierte Form	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Morphea (Plaque-Typ) ➤ Morphea guttata (Sonderform der Morphea) ➤ Atrophodermia Pasini-Pierini (Sonderform der Morphea)
Generalisierte Form	<ul style="list-style-type: none"> ➤ generalisierte zirkumskripte Sklerodermie (Befall mindestens dreier anatomischer Areale) ➤ disabling pansclerotic morphea (schwer verlaufende Sonderform) ➤ eosinophile Fasziitis (Sonderform mit führendem Befall der Faszie)
Lineare Form	<ul style="list-style-type: none"> ➤ lineare zirkumskripte Sklerodermie (meist Befall der Extremitäten) ➤ lineare zirkumskripte Sklerodermie vom Typ en coup de sabre ➤ progressive faziale Hemiatrophie (Synonym: Parry-Romberg Syndrom)
Tiefe Form	
Gemischte Form	

1.1.1.4 Histopathologie

In der ZS kann man histologisch eine Früh- und Spätphase beobachten. Im entzündlichen, frühen Stadium können vor allem lymphozytäre Infiltrate nachgewiesen werden, aber auch Plasmazellen, Histozyten und eosinophile Granulozyten sind im Bereich der retikulären Dermis zu finden. Auch die darin gelegenen Kollagenfaserbündel zeigen oftmals eine ödematöse Verquellung. Anschließend entwickelt sich die sklerotische Phase, welche sich durch die Ausbreitung des dermalen Bindegewebes auf Kosten des subkutanen Fettgewebes auszeichnet. Im sklerotischen Spätstadium zeigen sich innerhalb der Dermis nur noch wenige Entzündungszellen, Fibroblasten sind nur spärlich zwischen den homogenisierten und verbreiterten Kollagenfaserbündeln nachweisbar. Durch die neu entstandenen dick gepackten, kräftig eosinophilen Kollagenfasern werden Hautadnexe wie ekkrine Schweißdrüsen eingeschlossen und rarefiziert, Haarfollikel und Talgdrüsen verschwinden fast völlig. Die Gefäßwände werden verdickt und zu Schlitzfenstern verengt, elastische Fasern bleiben aber weitgehend erhalten (3, 26). Histologisch ist anhand einer Hautbiopsie eine Unterscheidung zwischen einer zirkumskripten und einer systemischen Sklerodermie nicht möglich, da die feingeweblichen Veränderungen weitgehend identisch sind.

1.1.1.5 Therapien

Grundsätzlich gibt es für die zirkumskripte Sklerodermie keine kausale Therapie, jedoch haben sich über die Jahre viele Behandlungsansätze entwickelt. Auch die unterschiedlichen Krankheitsausprägungen und Schweregrade haben zu den vielen verschiedenen Therapieansätzen geführt. Hierbei können Patienten topisch mittels Cremes und Salben, systemisch medikamentös (vor allem Glukokortikoide, Methotrexat, Mycophenolatmofetil), oder physikalisch mithilfe von beispielsweise UV-Phototherapie, behandelt werden. Aufgrund der spontanen Abheilungstendenzen der zirkumskripten Sklerodermie sind allerdings eingreifende Maßnahmen nicht in jedem Fall notwendig (3). Generell verspricht eine frühe Behandlung im aktiven Stadium der Erkrankung eine höhere Erfolgsaussicht als in den späten Phasen der Krankheit (27).

Um für jeden Sklerodermie-Patienten die geeignete Therapiemöglichkeit herauszufinden, haben sich Experten zusammengeschlossen und im Rahmen einer deutschen bzw. europäischen Leitlinie einen Behandlungsalgorithmus entwickelt (*Kreuter et al., 2016* und *Knobler et al., 2017*). Dieser erfasst, in Abhängigkeit der vorbestehenden Ausdehnung, der Schwere der Erkrankung und des Subtyps der ZS, die entsprechenden Behandlungsoptionen.

Solche Therapiealgorithmen wurden von Autoren im JEADV – Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology (*Knobler et al., 2017*) und im JDDG – Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (*Kreuter et al., 2016*) veröffentlicht.

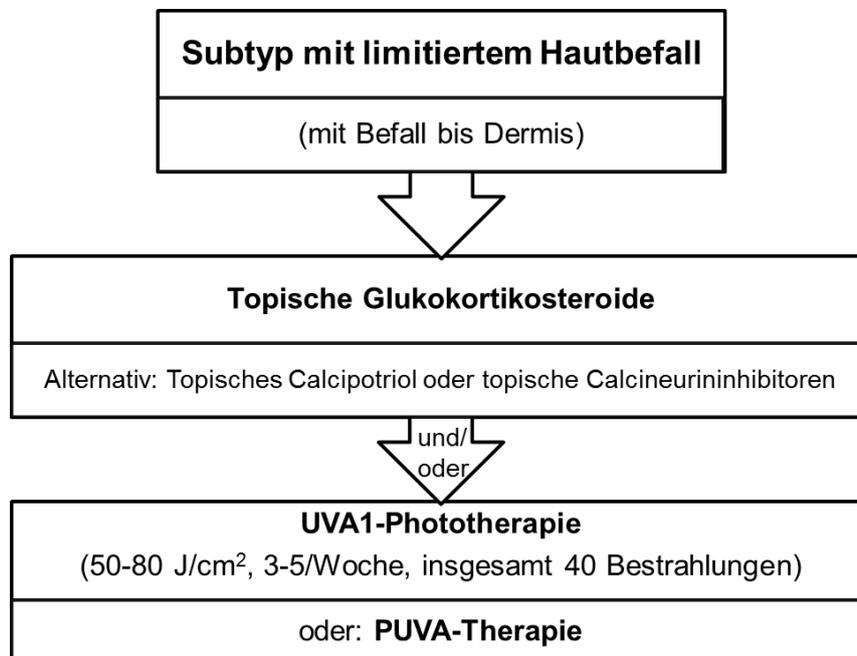


Abbildung 2: Auszug des Therapie-Algorithmus für den limitierten Subtyp der ZS nach *Kreuter et al., 2016* (1)

Demnach wird bei einer limitierten Form der zirkumskripten Sklerodermie eine topische Glukokortikosteroid-Behandlung empfohlen, die zusammen mit einer Phototherapie erfolgen kann. Auch eine alleinige Phototherapie ist möglich (1, 28). Besonders die hier empfohlene UVA₁-Phototherapie soll in dieser Dissertation genauer betrachtet und studiert werden.

1.2 UVA₁-Strahlung

1.2.1 Physikalische Grundlagen

Solares ultraviolettes Licht ist eine elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge von 100-400 nm. Nicht jede ultraviolette Strahlung durchbricht die Ozonschicht. Zwischen 100 nm und 200 nm absorbieren Stickstoff und Sauerstoff die UV-Strahlung, dieser Bereich wird auch als Vakuum-UV bezeichnet (29). Nur UV-Licht mit einer Wellenlänge von 290-400 nm kann in die Erdatmosphäre eindringen. Dazu gehören die beiden langwelligen Bestandteile der ultravioletten Strahlung: UVB (280-320 nm) und UVA (320-400 nm) (30). UVA kann in zwei weitere Subklassen untergliedert werden: UVA₁ (340-400 nm) und UVA₂ (320-340 nm). UVA₁ ist eine langwellige Strahlung und fester Bestandteil aller natürlicher und künstlichen, ungefilterten Licht- und UV-Quellen und stellt die energieschwächste Komponente der Ultraviolettstrahlen dar. Betrachtet man die photobiologischen und chemischen Effekte der UVA₁ Strahlung, so kann man sie eher mit der kurzwelligen, sichtbaren Strahlung (<440 nm) vergleichen (29) wohingegen sich UVA₂ (320-340 nm) eher wie UVB verhält (31).

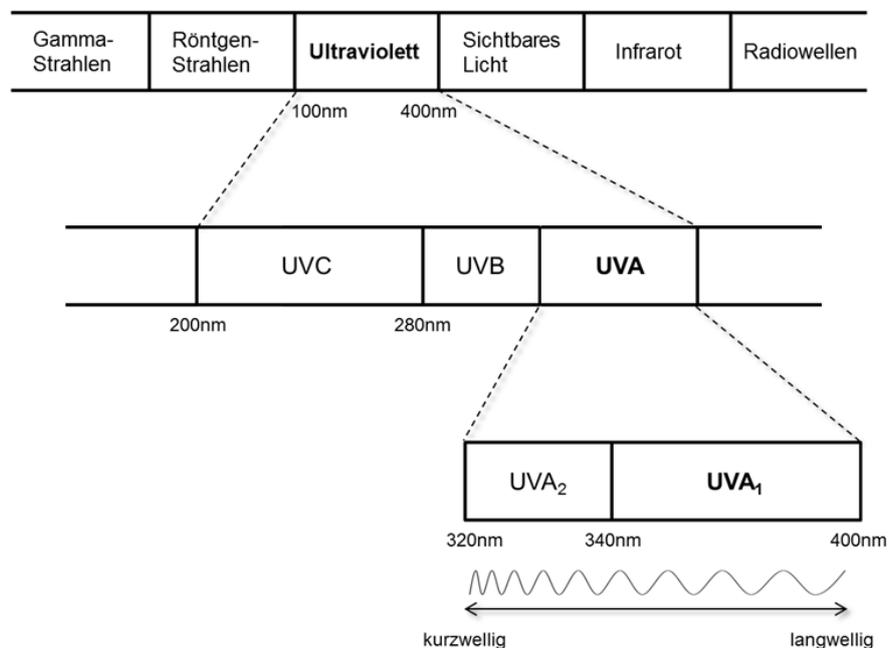


Abbildung 3: Elektromagnetische Strahlung und die Einordnung des ultravioletten Lichts im Spektrum mit Aufteilung in UVC, UVB und UVA und Angaben der jeweiligen Wellenlängen.

Schon 1978 haben *Plewig et al.* einen UVA+UVB Bestrahlungsapparat vorgestellt, der anhand eines einsetzbaren Filters fähig war, den UVB-Anteil zu blockieren. Bereits 1981 konnten *Mutzhass et al.* eine Hochleistungsstrahlenquelle mit festem UVA₁-Emissionsspektrum von 320-460 nm präsentieren, welche vorerst in der Photodiagnostik insbesondere zur Provokation von Photodermatosen eingesetzt wurde (32). Basierend auf diesen Anfängen erfolgten viele Studien, welche sich dem möglichen therapeutischen Potenzial von UVA₁-Strahlung und der kontinuierlichen Weiterentwicklung von Bestrahlungsgeräten widmeten. Dies geschah vor allem vor dem Hintergrund eine möglichst verträgliche Phototherapie mit wenig Nebenwirkungen anbieten zu können, da UVA₁ den energieärmsten Anteil des UV-Spektrums nutzt, um direkte DNA-Schäden zu vermeiden.

1.2.2 Anwendung in der Medizin

Sowohl UVB- als auch UVA-Strahlung wird in der Medizin zur Behandlung von Krankheiten, vor allem Hauterkrankungen, angewendet. Während UVB-Strahlung hauptsächlich die epidermalen Keratinozyten und Langerhans-Zellen erreicht, kann UVA-Strahlung über die Epidermis hinaus tiefer in die Dermis und sogar bis in die Subkutis eindringen, wo sie dermale Fibroblasten, dermale dendritische Zellen, endotheliale Zellen sowie hautinfiltrierende inflammatorische Zellen wie beispielsweise T-Lymphozyten, Mastzellen und Granulozyten penetrieren und beeinflussen kann (33). Die Phototherapie mit UVB und hier insbesondere das Schmalband UVB mit 311 nm wird vor allem erfolgreich zur Behandlung der Psoriasis vulgaris, der Vitiligo und zur Prophylaxe der polymorphen Lichtdermatose eingesetzt. Breitband UVA wird in Form der sogenannten PUVA-Photochemotherapie (PUVA: Psoralen plus UVA) eingesetzt, bei der die Haut des Patienten vor der UVA-Bestrahlung mit einem oralen oder topisch applizierten Photosensibilisator (Psoralen) lichtempfindlicher gemacht wird. Hauptindikationen für die PUVA Therapie sind wiederum die Psoriasis vulgaris, das atopische Ekzem, die Mycosis fungoides, der Lichen ruber planus und auch die zirkumskripte Sklerodermie. Die Therapie mit UVA₁ stellt ein vergleichsweise neueres phototherapeutisches Prinzip dar. So wurden erste Studien mit UVA₁ erst 1991 publiziert, während die UVB-Therapie seit 1925 etabliert ist und die PUVA Therapie bereits 1974 eingeführt wurde. Da UVA₁ mit seinem Spektrum noch tiefere dermale Hautschichten erreicht, verglichen zu UVB und UVA₂, wird in der Dermatologie

vorzugsweise UVA₁-Strahlung zur phototherapeutischen Behandlung tiefreichender, insbesondere sklerosierender Dermatosen angewendet (Abbildung 4) (31). In der vorliegenden Studie nehmen vor allem die in Abbildung 4 dargestellten dermalen Fibroblasten sowie epidermalen Keratinozyten eine besondere Rolle ein. Ihre jeweilige Reaktion auf UVA₁-Strahlung ist von wesentlicher Bedeutung für die therapeutische Wirkung der Lichttherapie und soll im weiteren Verlauf genauer betrachtet werden.

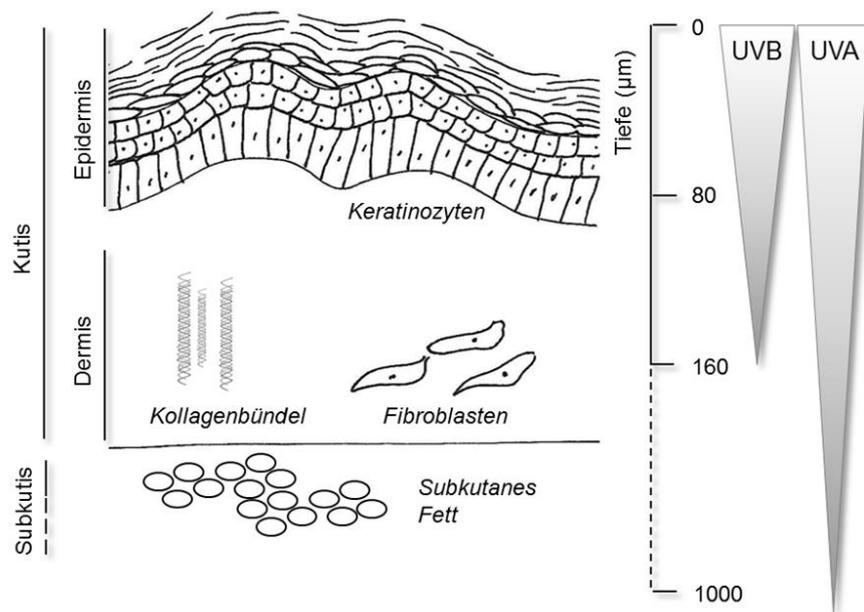


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Hautmodells und die Eindringtiefe der UVA- und UVB-Strahlung (Angaben in µm)

Die UVA₁-Dosis, mit welcher das zu behandelnde Hautareal bestrahlt wird, setzt sich aus der Bestrahlungsstärke und der Bestrahlungszeit zusammen. In der medizinischen Anwendung werden laut S1-Leitlinie der AWMF zur UV-Phototherapie folgende Einheiten unterschieden: die niedrig dosierte („low-dose“; 10-20 J/cm²), die mittelhoch dosierte („medium-dose“; >20-70 J/cm²) und die hoch dosierte („high-dose“; >70-130 J/cm²) UVA₁-Therapie. Bei den genannten Dosen handelt es sich um die in einer (Tages)Sitzung applizierten Einzeldosen und nicht um die kumulative Dosis eines kompletten Therapieverlaufs (31, 34).

Erstmals wurde 1991 über eine hochdosierte UVA₁-Therapie zur Behandlung der atopischen Dermatitis durch Krutmann und Schöpf berichtet (35). In den darauffolgenden Jahren führten weitere Studien mit unterschiedlichen Indikationen

dazu, dass sich die UVA₁-Phototherapie gut als Behandlungsoption etablieren konnte. Erkrankungen wie beispielsweise die Urticaria pigmentosa oder auch die zirkumskripte Sklerodermie konnten mit der UVA₁-Phototherapie erfolgreich behandelt werden (36). Vor allem sklerosierende Hauterkrankungen und Hauterkrankungen, bei denen es nach erfolglosen Behandlungen an Alternativtherapien mangelt, profitierten von der weiteren Entwicklung der medizinischen Phototherapie. Zu den möglichen, durch Studien oder Pilotstudien bestätigten Indikationen für eine UVA₁-Phototherapie gehören u.a. inzwischen neben den oben genannten Erkrankungen auch die kutane Graft-versus-Host-Erkrankung, der extragenitale Lichen sclerosus et atrophicus, die Akrosklerose bei systemischer Sklerodermie, die Mycosis fungoides, die lymphomatoide Papulose, die Mucinosis follicularis, die Pityriasis rubra pilaris, die Pityriasis lichenoides, die kutane Sarkoidose, die Necrobiosis lipoidica, das Granuloma anulare, der Lichen ruber planus, das dyshydrosiforme Handekzem, der Morbus Grover und das Scleroedema adultorum (34, 37).

Während die Aufklärung der photoimmunologischen Wirkmechanismen der UV-Therapie in den letzten Jahren zu einem deutlich vergrößerten Indikationsspektrum geführt hat, entwickelten sich zeitgleich auch die in der medizinischen Praxis verwendeten UVA₁-Bestrahlungsgeräte (35). Von großer Bedeutung sind hierbei technische Fortschritte, die eine UV-Therapie im Praxis- sowie im Klinikalltag ermöglichen, indem die Anschaffung sowie die Wartung von UV-Geräten optimiert und finanziell realisierbar wird. Eine Herausforderung der UVA₁-Therapie ist insbesondere die technische Umsetzung eines Bestrahlungsgerätes, das in der Lage ist, die benötigte Strahlungsdosis in einem akzeptablen Zeitraum abzugeben. Bislang wurden für die Erzeugung von hohen Dosen von UVA₁-Strahlen Hochdruckstrahler, welche mit Metallhalogenidzusätzen dotiert sind, eingesetzt. Diese erlauben die Applikation von höheren Lichtdosen in relativ kurzen Zeiträumen, sind aber technisch und auch in der Handhabbarkeit sehr aufwendig. So benötigen diese Geräte viel Platz und ein aufwendiges Entlüftungssystem, da bei der Bestrahlung noch viel Wärme entsteht. Diese Nachteile schränken die Verfügbarkeit dieser wirksamen Therapie in der Praxis oder Klinik stark ein. Einen Beitrag zur Weiterentwicklung dieser Lampensysteme leistet nun die neue LED-Technologie (engl. „light-emitting diodes“), welche bereits im roten Spektralbereich in der photodynamischen Therapie

epithelialer Tumoren seit Jahren routinemäßig eingesetzt wird (38). Durch die Entwicklung neuer LEDs auch im kürzerwelligen Emissionsbereich sind diese nun auch Bestandteil aktueller photomedizinischer Forschung (39, 40). Ein großer Vorteil der LED-Technologie wäre neben einem geringeren Energieverbrauch die deutliche Reduktion der Wärmebelastung und damit ein Wegfall der technisch sehr aufwendigen Belüftungssysteme sowie durch die hohe Leistungsdichte eine weitere Verkürzung der Bestrahlungsdauer. Die Vorteile der neuen Technologie sowie ihr therapeutischer Nutzen im Vergleich zur den herkömmlichen Hochdruckstrahlern soll nun auch durch experimentelle Studien wie in dieser Arbeit herausgestellt werden.

1.2.3 Nebenwirkungen und Risiken

Neben den positiven und erfolgreichen Therapieeffekten, die eine UVA₁-Behandlung mittlerweile bei vielen Hauterkrankungen mit sich bringt, können allerdings auch unerwünschte Nebenwirkungen nach einer Bestrahlung auftreten. Prinzipiell lassen sich akute und chronische Nebenwirkungen des UV-Lichts voneinander abgrenzen. Hauptsächlich kann es dosisabhängig akut nach einer UVA₁-Bestrahlung zur Erythem-Bildung, Hyperpigmentierung (also Bräunungseffekt wie nach einem Sonnenbad), zu einer polymorphen Lichtdermatose (PLD), Pruritus und zu einer Reaktivierung von viralen Infektionen wie einem Herpes simplex kommen. In der Literatur werden die akut auftretenden Nebenwirkungen von UVA₁ zwar generell als seltener im Vergleich zu Breitband-UVA-, UVB- und PUVA-Therapien beschrieben, sind aber auch nicht ausgeschlossen. Um eine Überdosierung mit Erythembildung zu vermeiden, kann optional vor der UVA₁-Bestrahlung die minimale Erythemdosis, kurz MED-UVA, ermittelt werden (35). Dabei wird individuell herausgefunden, bei welcher gewählter UV-Dosis ein minimales Erythem des bestrahlten Hautareals entsteht, um bei anschließender großflächigerer Behandlung diese Dosis nicht zu überschreiten und um möglichen Nebenwirkungen vorzubeugen (41). Studien haben gezeigt, dass die MED von UVA₁ bis zu 130 J/cm² betragen kann (42) und bei der Mehrheit der Patienten durchaus eine hohe UVA₁-Dosis ohne anschließende Erythembildung appliziert werden kann. Allerdings werden initial niedrig verabreichte UVA₁-Dosen (auch in Abhängigkeit des Hauttyps des Patienten und des Bräunungszustandes der Haut) empfohlen, welche im Verlauf schrittweise und orientierend am Hautbefund weiter auf mittelhohe UVA₁-Dosen gesteigert werden sollten (43). Die Behandlung mit hohen Einzeldosen wird mittlerweile nicht mehr generell empfohlen und wird

zunehmend verlassen. Weitere akute Risiken können durch die aufkommende Wärmebelastung der gegenwärtigen UVA₁-Therapiegeräte entstehen. Das ist vor allem bei älteren Apparaten, welche keine Infrarotfilter oder Kühlsysteme besitzen, der Fall. Gefahren durch thermische Einwirkung im Sinne einer Kreislaufbelastung könnten hier für Patienten mit kardiovaskulären Vorerkrankungen aufkommen (35). Bei neueren Geräten, sowie bei dem in dieser Studie verwendeten Prototyp mit LED-Leuchtmitteln, kommt es zu keinerlei klinisch relevanten exothermen Wärmeentwicklungen.

Zu den potenziellen chronischen Nebenwirkungen werden Langzeitrisiken wie die durch UVA₁ verursachte Lichtalterung der Haut (Photoaging) und das erhöhte UV-induzierte Hautkrebsrisiko gezählt (35). Photoaging entsteht hierbei aufgrund der durch die UVA-Strahlung induzierten Singulett-Sauerstoff-Moleküle, welche durch ihre hohe Reaktivität mitochondriale DNA-Mutationen generieren und in Folge Gewebe- bzw. Hautalterung hervorrufen können (44). Während die Lichtalterung lediglich ein kosmetisches Problem darstellt, ist die mögliche kanzerogene Wirkung der UVA₁-Strahlung wesentlich ernster zu bewerten. Studien an Mäusen haben den Wirkungseffekt von UVA auch als potentiellen Auslöser von malignen Melanomen in Betracht gezogen und bestätigt, dass UVA epitheliale Tumore verursachen kann. Unklar ist allerdings bis dato, ob sich die Risiken langwelliger UVA₁-Strahlung von denen einer Breitband-UVA-Strahlung unterscheiden (45).

In einer amerikanischen Studie mit 92 UVA₁-Therapiepatienten konnten bei nur 15% der Patienten Nebenwirkungen beobachtet werden, wobei ein Patient aufgrund einer PLD-Entwicklung während der Studie ausgeschlossen wurde. Eine Bräunung der Haut wurde bei jedem Patienten festgestellt, 7,5% der Patienten entwickelten ein Erythem, 3,2% Pruritus, ebenfalls 3,2% beschrieben eine gesteigerte Sensibilität des bestrahlten Hautareals und 2,1% gaben ein brennendes Gefühl während der Behandlung an. Schlussfolgernd ging aus der Studie jedoch hervor, dass die UVA₁-Therapie eine gut verträgliche und nützliche Behandlungsmethode vieler Krankheiten ist (46). An weiteren Langzeitbeobachtungen nach erfolgter UVA₁-Therapie mangelt es allerdings im Schrifttum. Zukünftige Studien zur Erforschung der Photokarzinogenese und längerfristigen Auswirkungen der UVA₁-Phototherapie sind daher wünschenswert und erforderlich. Generell ist zu sagen, dass vor Einleitung einer Phototherapie, wie z.B. einer UVA₁-Therapie, aufgrund der möglichen Risiken

immer eine strenge Indikationsstellung und Aufklärung der Patienten erfolgen sollten. Trotzdem stellt die UVA₁-Therapie bei zahlreichen Hauterkrankungen, vor allem der der zirkumskripten Sklerodermie mit schwerem Verlauf, momentan die wirksamste und erfolgversprechendste Behandlungsmethode dar.

1.3 UVA₁-Therapie bei dermalen Fibrose/Sklerodermie

Obwohl sich viele verschiedene Studien bereits mit UVA₁-Strahlung und den damit verbundenen Prozessen in der Haut auseinandergesetzt haben, ist der komplette Wirkmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings konnten bereits entscheidende Schritte in der Wirkweise aufgezeigt und bewiesen werden. Untersuchungen der phototherapeutischen Wirkmechanismen, die einer UVA₁-Therapie zugrunde liegen, deuten im Wesentlichen auf immunmodulatorische Effekte hin, welche hauptsächlich in einer Immunsuppression, Apoptose-Induktion und in einer Beeinflussung des Kollagenmetabolismus resultieren (47). So konnte die apoptotische Wirkung von UVA₁ auf T-Zellen, der stimulierende Effekt auf die Angiogenese und der, für diese Studie besonders relevante, induzierende Einfluss von UVA₁ auf die Expression von Matrix-Metallo-Proteinase-1 (MMP-1) nachgewiesen werden (48-52). Diese schwerpunktmäßig bei einer UVA₁-Bestrahlung stattfindenden Prozesse in der Haut konnten im Laufe der letzten Dekaden durch zahlreiche Studien zum Verständnis und zur Pathogenese vieler Hauterkrankungen, die ebenfalls mit der UV-Phototherapie erfolgreich behandelbar sind, beitragen. So konnte beispielsweise der Schlüsselmechanismus einer hochdosierten UVA₁-Therapie bei T-Zell-vermittelten Hautkrankheiten wie z.B. dem atopischen Ekzem, der Mycosis fungoides oder auch der Psoriasis aufgezeigt und erklärt werden, indem auch hier jeweils eine Apoptose-Induktion bei infiltrierenden T-Helferzellen nach Bestrahlung nachgewiesen wurde (35, 47). Im Folgenden soll jedoch vorwiegend, die in den Kollagenstoffwechsel eingreifende photoimmunologische Funktion der therapeutischen UVA₁-Strahlung betrachtet und detailliert aufgezeigt werden, da dieser Effekt bei fibrosierenden Hautkrankheiten wie der dermalen Fibrose, auf die in dieser Arbeit Fokus gelegt wird, eine fundamentale Rolle spielt.

1.3.1 Molekulare Wirkmechanismen von UVA₁ in der Dermis bei normalen und Sklerodermie - Fibroblasten

Wie bereits oben angesprochen, spielt der Kollagenhaushalt und damit einhergehend, die in der Dermis enthaltenden Fibroblasten, eine wichtige Rolle beim Verständnis von Bindegewebserkrankungen wie der dermalen Fibrose. Das Zusammenspiel der kollagenproduzierenden Fibroblasten mit der extrazellulären Matrix (EZM) der Haut folgt einer ständigen Neugestaltung und intendierten Homöostase, um eine Balance zwischen dem Kollagengehalt innerhalb des Bindegewebes der Haut herzustellen. Sklerodermie-Fibroblasten, das sind vor allem aktivierte Fibroblasten oder auch Myofibroblasten, zeigen ein Ungleichgewicht im Kollagenstoffwechsel und produzieren übermäßig viel Kollagen, hauptsächlich in Form von Kollagen Typ 1 (Coll-1). Um die therapeutisch angewandte UVA₁-Behandlung und ihren Effekt auf Fibroblasten aufzuzeigen, stellen die folgenden Abbildungen die Wirkung der UVA₁-Strahlung auf normale Fibroblasten und auf Sklerodermie-Fibroblasten dar.

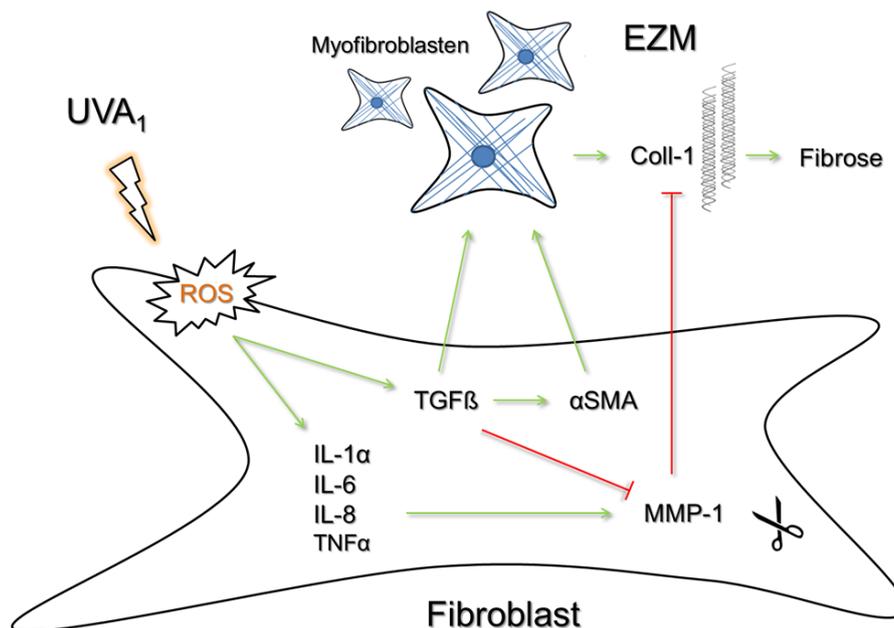


Abbildung 5: Molekulare Wirkmechanismen bei normalen dermalen Fibroblasten nach UVA₁-Strahlung

Abbildung 5 zeigt vereinfacht und schematisch, welche Wirkung UVA₁-Strahlung auf eine normale humane Fibroblastenzelle ausübt. Die erste Reaktion, ausgelöst durch den UVA₁-induzierten oxidativen Stress in Zellen und Geweben, ist die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (53) an der Zellmembran (äußere und mitochondriale). Unter den verschiedenen ROS gilt UVA₁-generierter Singulett-Sauerstoff als wichtigstes Molekül und Reaktant der darauf folgenden zellulären Signalwege und anschließende Genexpressions-Modulationen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (54). Die durch UVA₁ induzierten ROS stimulieren wiederum reaktive Zytokine und leiten Reaktionskaskaden ein, welche vor allem die MMP-1-Induktion und daher den Kollagen-Abbau begünstigen. Das Schema zeigt auf, dass eine UVA₁-induzierte Fibrose in normalen Fibroblasten möglich ist, da ROS auch stimulierend auf eine TGFβ-Produktion wirken kann und damit einhergehend, alpha smooth muscle actin (αSMA) sowie die Myofibroblasten-Induktion hervorruft, welche wiederum in einer vermehrten Coll-1 Synthese resultiert.

Da in dieser Arbeit jedoch vor allem die therapeutische und antifibrotische Wirkung von UVA₁-Strahlung im Fokus stehen soll, wird in Abbildung 6 gezeigt, welchen Effekt UVA₁ auf Sklerodermie-Fibroblasten bzw. aktivierte Myofibroblasten ausübt. In Fibroblasten, die bereits eine krankhafte Kollagenproduktion aufweisen, wurden erhöhte TGFβ- und Coll-1-Werte (55, 56) sowie ein niedriger Gehalt an MMP-1 (57) festgestellt. UVA₁ kann MMP-1 in Fibroblasten teilweise direkt stimulieren, zum anderen Teil aber auch über autokrine Mechanismen durch Zytokinfreisetzung von Immunzellen in Fibroblasten die MMP-1 Synthese deutlich steigern (30, 58-61). Zudem wirkt UVA₁ direkt hemmend auf die TGFβ-Produktion (62), und damit einhergehend auch auf αSMA, was wiederum die Aktivierung von Myofibroblasten mit darauf folgender Kollagenproduktion stoppt und einer Fibrose entgegenwirkt.

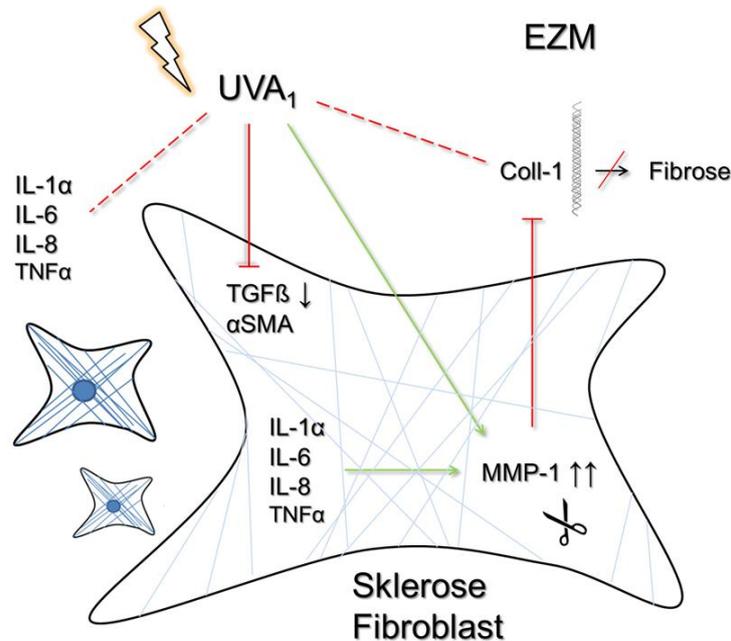


Abbildung 6: Molekulare Wirkmechanismen bei Sklerodermie-Fibroblasten
unter Einwirkung von UVA₁-Strahlung

1.3.1.1 Kollagenmetabolismus (MMP-1 und Coll-1)

Matrix Metalloproteinasen (MMP's) bilden eine Enzym-Familie von Endopeptidasen, bestehend aus 3 Subklassen, welche fähig sind, EZM-Komponenten zu degradieren und somit maßgeblich den Kollagenstoffwechsel zu beeinflussen. Die Subgruppe der Kollagenasen, darunter im Besonderen die für diese Studie relevante interstitielle Kollagenase, welche auch Fibroblasten-Kollagenase oder kurz MMP-1 genannt wird, ist speziell für den Abbau von Kollagen zuständig. Hierbei spielt hauptsächlich der zu 90% in der Haut vorkommende Kollagen Typ I, kurz Coll-1, eine zentrale Rolle, dessen übermäßige Produktion zum typischen Phänotyp der dermalen Fibrose mit einhergehender Hautverhärtung durch krankhaften Kollagenüberschuss in der Dermis führt. Die beiden Biomarker, MMP-1 und Coll-1, stehen im gegenseitigen Wechselspiel miteinander und halten in gesunden Fibroblasten das Gleichgewicht des Kollagenmetabolismus. Während Coll-1 in Sklerodermie-Fibroblasten verstärkt synthetisiert wird, herrscht ein Mangel an MMP-1 und somit ein Ungleichgewicht im Kollagenstoffwechsel. MMP's werden in vielen verschiedenen Zellen der Haut, wie beispielsweise in Fibroblasten, kontinuierlich oder auch bedingt durch äußere Einflüsse, temporär verstärkt exprimiert und zusätzlich von Zytokinen und

Wachstumsfaktoren moduliert (57, 63, 64). Durch UVA₁-Strahlung (Abbildung 5 und 6) werden Matrix-Metalloproteinasen, darunter MMP-1, in humanen dermalen Fibroblasten der Haut aktiviert (51, 54, 65). Schon sehr geringe Dosen UVA₁ reichen dabei aus, um Singulett-Sauerstoff zu generieren und nachfolgende Reaktionskaskaden, einschließlich der Aktivierung von MMP-1, zu stimulieren (54). Dies kann nach UVA₁-Bestrahlung entweder über eine direkte MMP-1-Freisetzung geschehen oder auch durch eine autokrine Zytokin-Mediation in Fibroblasten (33, 66). Hierbei vermitteln die durch UVA₁ induzierten Zytokine die MMP-1-Sezernierung.

1.3.1.2 Zytokine (IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF α)

Zytokine sind multifunktionelle Regulatorproteine, die als Schutzmechanismus agierend im Rahmen einer durch exogene Einflüsse ausgelösten Infektion, Immunantwort, Entzündung oder Trauma im Körper von verschiedenen Zellen gebildet werden und Zellproliferation sowie Differenzierung vermitteln. Zu unterscheiden sind entzündungshemmende (anti-inflammatorische) und entzündungsfördernde (pro-inflammatorische) Zytokine. IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF α sind Beispiele typischer profibrotischer Zytokine und werden daher zur Gruppe der pro-inflammatorischen Zytokine gezählt. Sie besitzen eine Vielfalt biologischer Funktionen und werden in vielen verschiedenen Zellarten synthetisiert, darunter Fibroblasten und Keratinozyten. Wie der Name schon sagt, fördern pro-inflammatorische Zytokine vor allem Entzündungen, Fieber und Bindegewebsdestruktion. Aufgrund der vermittelnden Funktion der Zytokine bei entzündlichen Bindegewebskrankheiten, welche in einer Störung der Homöostase durch ein Ungleichgewicht im Auf- und Abbau der EZM resultieren, spielen sie bei fibrosierenden Hauterkrankungen eine besonders wichtige Rolle (67-69). Stimuli der Zytokinproduktion in den Zellen sind verschieden einwirkende Stressfaktoren. Darunter fallen Auslöser wie beispielsweise Einwirkung von UV-Licht oder Einfluss körperfremder viraler sowie bakterieller Mikroorganismen. Einige Signaltransduktionswege der Zytokinsynthese liegen zum Teil noch unaufgeklärten Prozessen zugrunde. Es konnten jedoch bereits viele Induktionsmechanismen zahlreicher Zytokine mit verschiedensten biologischen Funktionen nachvollzogen werden. So zeigte sich, dass die Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine ein sich gegenseitig stimulierendes Netzwerk bildet. Eine besondere Rolle spielt hierbei

IL-1 α . Interleukin-1 α kann den Kollagenstoffwechsel beeinflussen und ist maßgeblicher Stimulus der Synthese anderer profibrotischer Regulatorproteine wie IL-6, IL-8 und TNF α (69, 70). Umgekehrt wiederum stimuliert auch TNF α die IL-1 α -Synthese (67). Generell streben Zytokine in ihrer Bioaktivität stets nach einer Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Immunantworten. Ein gutes Beispiel hierfür ist erneut IL-1. Neben dem fördernden Effekt der Proliferation von Fibroblasten sowie Keratinozyten und der stimulierenden Wirkung auf die Kollagensynthese, beeinflusst IL-1 in seiner pro-inflammatorischen Funktion auch den entgegengesetzten Mechanismus und steigert die Kollagenasen- also MMP-1-Produktion (67-69, 71). Bezogen auf die dermale Fibrose konnte hier eine gesteigerte autokrine Aktivierung von Interleukin-1 nachgewiesen werden (71). In Fibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerodermie wurden erhöhte Werte von IL-1 α festgestellt, was die zusätzliche Synthese weiterer profibrotischer Zytokine wie IL-6 und die damit einhergehende exzessive Produktion von Kollagen bzw. der Vorstufe Prokollagen erklären konnte. Zusätzlich konnte bei einer Überproduktion von IL-1 α in normalen Fibroblasten die Entwicklung eines systemischen Sklerodermie-Fibroblastenphänotyps beobachtet werden (71, 72). Bei der UVA₁-Phototherapie, die bei sklerosierenden Hauterkrankungen angewendet wird, können, induziert durch Zytokine, neben der gewollt autokrin stimulierenden MMP-1-Synthese auch ungewünschte pro-inflammatorische Nebeneffekte entstehen (33).

1.3.1.3 Wachstumsfaktoren (TGF β -1 und TGF β -2)

Die Wachstumsfaktoren der TGF β -Familie sind multifunktionelle Zytokine, die eine zentrale Rolle im Auf- und Umbau der extrazellulären Matrix spielen (siehe Abbildung 5). TGF β übt somit einen großen Einfluss auf den Kollagenmetabolismus aus und wird als ein entscheidender Faktor entstehender Fibrosen angesehen (73). Im Allgemeinen stimuliert die Ausschüttung des zuvor latenten und durch Reaktionskaskaden aktivierten TGF β die Produktion von verschiedenen EZM-Komponenten wie z.B. Coll-1 (74, 75). Dies geschieht vor allem durch den induzierenden Effekt von TGF β in Kombination mit mechanischem Stress auf die Differenzierung von Fibroblasten zu kontraktile Myofibroblasten (76). Myofibroblasten schütten wiederum, in Antwort auf Zellschäden, innerhalb der inflammatorischen Phase eine erhöhte Anzahl an Signalmolekülen aus, darunter der

Wachstumsfaktor TGF β und das Matrixmolekül α SMA (77-79). Neben der pro-fibrotischen Eigenschaft von TGF β und der damit verbundenen vermehrten Kollagensynthese wirkt sich die Ausschüttung der Wachstumsfaktoren auch gleichzeitig hemmend auf die Produktion der Proteasen, darunter MMP-1, aus. Dadurch wird ein enzymatischer Abbau der EZM verhindert und der pro-fibrotische Prozess der exzessiven Kollagenproduktion verstärkt. Eine gesteigerte TGF β -Produktion führt daher unweigerlich zu einer Kollagenüberproduktion und schließlich zur Entwicklung einer Fibrose. Hauptakteur innerhalb der Wachstumsfaktoren-Familie ist TGF β -1. In den meisten Studien wurden die Wachstumsfaktoren einschließlich TGF β -1 untersucht, welcher unter den drei Isoformen am häufigsten vorkommt (80). TGF β -2 wurde in unseren Experimenten mit normalen humanen Fibroblasten miteinbezogen, konnte allerdings in anderen Studien nur in SS-Fibroblasten korrelierend mit Coll-1-mRNA-Expression in Verbindung gebracht und nachgewiesen werden (81). *Kawakami et al.*, 1997 konnten in ihrer Studie einen Zusammenhang der Expression der TGF β -Rezeptoren und der autokrinen Regulation der Coll-1-Transkription durch TGF β herstellen (55). Demnach konnte ein zweifach erhöhtes Expressionslevel der TGF β -Rezeptoren bei Sklerodermie-Fibroblasten festgestellt werden im Vergleich zu normalen Fibroblasten. Demzufolge wiesen Sklerodermie-Fibroblasten eine höhere TGF β -Rezeptorbindung auf und zeigten korrelierend dazu erhöhte Coll-1-Produktionen. Resultierend aus diesen Erkenntnissen führt nicht nur eine gesteigerte TGF β -1-Synthese zur Entstehung einer Fibrose, sondern auch die Aktivierung des autokrinen TGF β -Signalwegs infolge einer Überproduktion der TGF β -Rezeptoren (55).

1.3.2 Molekulare Wirkmechanismen von UVA₁ bei epidermalen Keratinozyten

Obwohl sich die wesentlichen Wirkmechanismen der UVA₁-Therapie bezüglich der Behandlung von Bindegewebserkrankungen vor allem in der dermalen Hautschicht, insbesondere bei den sich dort befindlichen Fibroblasten abspielen, nehmen die Keratinozyten der Epidermis eine nicht weniger wichtige Rolle ein. Die die obere Zellschicht bildenden Keratinozyten stellen die erste Kontaktstelle der Haut mit dem eintreffenden UVA₁-Licht dar und zeigen somit die ersten biologischen Effekte in Reaktion auf UV-Strahlung. Wie auch bei den Fibroblasten werden die UV-induzierten photoimmunmodulatorischen Mechanismen vor allem durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) gesteuert. Hierbei spielen die Zytokine

eine besonders wichtige Rolle. UVA₁-Strahlung löst bei epidermalen Keratinozyten anti-inflammatorische und proinflammatorische Zytokinmodulationen aus. Zu den immunsuppressiven Wirkungen zählen beispielsweise die Induktion von IL-10 und die daraus folgende Supprimierung des an Entzündungsprozessen beteiligten IFN γ , sowie die Hormonstimulation des Neuropeptids α MSH und des Prostaglandins PGE₂ (33). Im Fokus dieser Arbeit stehen jedoch die pro-inflammatorischen Zytokin-Effekte des UVA₁-Lichts. Nicht nur bei den Fibroblasten sondern auch bei den Keratinozyten in der Epidermis interagieren die entzündungsfördernden Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF α und bilden ein Netzwerk, welches sich vor allem durch immunologische und inflammatorischen Folgereaktionen auszeichnet (82). Lacroix *et al.* beschrieben 1995 die zusätzliche Interaktion zwischen den epidermalen Keratinozyten und den dermalen Fibroblasten. Demnach stimulieren sezernierte Zytokine der Epidermis nicht nur durch autokrine Mechanismen bioaktive Moleküle ihrer Hautschicht, sondern modulieren durch parakrine Signalwege zudem dermale Zellen wie vor allem die Fibroblasten (83). Dadurch können durch UV-induzierte epidermale Zytokine (z.B. IL-6, IL-1, TNF α) einen Einfluss auf dermale Fibroblasten ausüben, der unter anderem zur Stimulation der MMP-1 Produktion in der Dermis führen kann (82, 84, 85). Vergleichbare Prozesse liegen auch der antifibrotischen Wirkung der photodynamischen Therapie zugrunde, dessen Wirkweise von Mitgliedern der Regensburger Arbeitsgruppe untersucht wurde (85, 86).

1.4 Zielsetzung der Studie

Ziel dieser Studie ist es den biologischen Wirkmechanismus der therapeutisch angewandten UVA₁-Phototherapie bei dermalen Fibrosen, wie beispielsweise die der Hautkrankheit Sklerodermie, zu untersuchen und ablaufende Prozesse in der Haut nachzuvollziehen. Mit Hilfe von *in vivo* und *in vitro* Experimenten soll ein neuer Prototyp eines UVA₁-Bestrahlungsgeräts im Hinblick auf die molekularbiologische Wirkung getestet und mit dem herkömmlichen älteren Bestrahlungsgerät verglichen werden. Beide Geräte unterscheiden sich in ihren Bestrahlungsquellen und in ihrem jeweiligen Spektrum voneinander. Während das ältere UVA₁-Gerät mit eingebauter Metallhalogenid-Hochdrucklampe (MHL) ein breiteres Emissionsspektrum von 340-400 nm besitzt, kann das LED-UVA₁-Gerät ein schmaleres Spektrum im Bereich von 360-400 nm emittieren. Das mittels LED-Technologie eingegrenzte UVA₁-Spektrum kann durch eine Reduzierung kurzwelliger und somit potenziell schädlicherer (kanzerogener wirkender) Wellenlängen einen wesentlichen Vorteil für die UVA₁-Therapie mit sich bringen. Langzeitnebenwirkungen können somit möglicherweise verringert werden. Zudem resultiert durch die Verwendung der lichtstärkeren LED-Lampen eine deutlich höhere Leistungsabgabe, so dass die Beleuchtungszeiten verkürzt werden können. Demnach kann die für die Therapie benötigte Dosis schon nach geringerer Bestrahlungszeit erreicht werden. Die kürzere Therapiesitzung kommt Patienten sowie Behandler zugute und ermöglicht es auch älteren oder geschwächten Patienten, die nicht so lange in einer Position verharren können bzw. körperlich nicht im Stande sind lange zu Liegen oder zu Stehen, mit einer UVA₁ Therapie behandelt zu werden. Ein weiterer positiver Gesichtspunkt ist die deutlich reduzierte Hitzeentwicklung. Dieser Aspekt ist vor allem für den klinischen Gebrauch der UVA₁-Bestrahlungsgeräte ein wichtiger Faktor. Zum einen bedeutet die Wärmeentwicklung einen hohen Energieverbrauch, da die über die elektrische Spannung vermittelte Energie bei den konventionellen Systemen nur zu einem geringen Teil in Lichtstrahlung umgewandelt wird und der Hauptanteil in Wärme abgegeben wird. Diese Wärme muss nun, um das System und die Umgebung selbst nicht zu beeinträchtigen, durch entsprechende aufwändige Kühl- und Abluftvorrichtungen direkt am Gerät oder durch ganze Raumklimatisierungen abgeleitet werden, was neben dem gesteigerten Platzbedarf auch eine deutliche finanzielle Belastung darstellt und die Mobilität und Einsetzbarkeit der Systeme stark

einschränkt. Fehlende räumliche Kapazitäten mit unzureichenden Möglichkeiten für den benötigten Luftaustausch – gerade beim Austausch mit Frischluft- erschwert den Lichtabteilungen somit häufig die Anschaffung und Haltung der medizinisch relevanten Bestrahlungsgeräte. Im Gegensatz dazu können die neuen LED-Beleuchtungssysteme kompakt gebaut werden, benötigen keine derart aufwendigen Abluftsysteme und sind daher wesentlich platzsparender, mobiler und verbrauchen deutlich weniger Strom.

Vergleichend soll nun bei den parallel unter gleichen Bedingungen stattfindenden Experimenten aufgezeigt werden, ob und wenn ja, wie sich beide UVA₁-Geräte in ihrer Wirkung voneinander unterscheiden. Im Rahmen dieser vorklinischen Studie soll die Frage beantwortet werden, ob die neue LED-Technologie, aufgrund ihrer wesentlichen Vorteile, eine Alternative zur bisherigen UVA₁-Behandlung mit breiterem Emissionsspektrum darstellt und daher möglicherweise auch für eine klinische Phototherapie bei fibrosierenden Hautkrankheiten favorisiert werden sollte. Eine Beurteilung dieser Fragestellung soll aus der Bewertung der Ergebnisse photoimmunologischer Untersuchungen von Zellkulturen und Mäuse-Gewebeproben hervorgehen und durch zusätzliche immunhistochemische Untersuchungen am Gewebe gestützt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Akku-Haarschneidemaschine Typ 1556, Moser, WAHL GmbH, Unterkirnach, Deutschland

Allgemeine Geräte:

Dako Medimachine System, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Elisareader, MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland

Lightcycler 96 Real-Time PCR System, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Luna-FL Dual Fluorescence Cell Counter, Logos Biosystems, Südkorea

NanoDrop 2000c Spektrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

Peltier Thermal Cycler PTC-200, DNA Engine, MJ Research Inc., Massachusetts, USA

Power PAC 3000, BIO RAD, München, Deutschland

Rotationsmikrotom Microm HM350S, Microm GmbH, Neuss, Deutschland

Sakura Tissue-Tek® VIP® 6, Gewebeentwässerungsautomat, Sakura Seiki Co, Nagano, Japan

Stickstofftank, AIR liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland

Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Vortex-Schüttler, VWR International, Pennsylvania, USA

Wasserbad VWB12, VWR, Darmstadt, Deutschland

Xenox Motorhandstück, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Zellkultur:

Brutschrank HERAccl CO₂-Inkubator, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

Sterilbänke Heraeus Herasafe KS, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

Zentrifugen:

Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Heraeus Multifuge 3SR, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

Mini Spin, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Mikroskope:

Leitz Mikroskop Labovert FS mit Leica Kameraaufsatz MC 170HD, Leica microsystems, Wetzlar, Deutschland

PreciPoint M8, Mikroskop und Scanner, precipoint, Freising, Deutschland

Zeiss Lichtmikroskop axiostar plus mit AxioCam ICc 1 Kameraaufsatz, Carl Zeiss, Micro Imaging GmbH, Göttingen, Deutschland

Bestrahlungsgeräte:

Sellamed 1200, 340-400 nm, System Dr. Sellmeier, Sellas med. Geräte GmbH, Ennepetal, Deutschland

Sellamed LED-Prototyp, 360-400 nm, System Dr. Sellmeier, Sellas med. Geräte GmbH, Ennepetal, Deutschland

Pipetten:

div. Pipetten, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Handy Step Electronic, Brand, Wertheim, Deutschland

S1 Pipettierhilfe 9501, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Allgemeine Verbrauchsmaterialien:

2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

50 µm sterile Medicon, BD, Heidelberg, Deutschland

6-well-Zellkulturplatten, Costar 3516, Corning Inc., Tewksbury, Massachusetts, USA

70% Ethanol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

96-well-Platten, flach, Costar 3598, Corning Inc., Tewksbury, Massachusetts, USA

99,8% Ethanol Rotipuran, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Agarose Tablets (DNase/RNase free), Bioline, Delaware, USA

Bleomycin, 15.00 I.E., Charge: EZ 8184, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland

Cell Counting Slides für Luna, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Collagenase Typ I, Gibco, Carlsbad, USA

Combitips Advanced (10ml/ 2,5ml/ 1,0ml/ 0,5ml/ 0,2ml/ 0,1ml) Biopur quality, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Deckgläser, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

DEPC Wasser K028, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

dNTP'S, New England Biolab, Massachusetts, USA

Einweg Pasteurpipetten, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Eppendorfgefäße (1,5 ml/ 2 ml), Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Falcon Zellkulturflaschen (75 cm² und 150 cm²), Corning Inc., Tewksbury, Massachusetts, USA

FastStart Essential DNA Green Master, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Formaldehydlösung 4%, Merck, Darmstadt, Deutschland

FS Essential DNA Green Master, 10x5 ml, Roche, Basel, Schweiz

Kanülen, 0,4x19 mm, BD Microlance 3, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Kryoröhrchen, gefrierfest, 2 ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Lightcycler 480 - Multiwell Plate 96, Roche, Basel, Schweiz

Lightcycler 8 - Tube Strips (white), Roche, Basel, Schweiz

MTT Formazan M2003, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Objektträger- Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland

Pasteurpipetten 230 mm, VWR, Darmstadt, Deutschland

Pipettenspitzen, gesteckt (10, 20 und 1000 µl), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Random Primer, Roche, Basel, Schweiz

Serologische Pipetten (10 ml/ 20 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Spritzen Omnifix 1 ml/ Luer Solo 100, B. Braun, Melsungen, Deutschland

Zellkultur:

Dermal Cell Basal Medium inklusive Keratinocyte Growth Kit, ATCC, Virginia, USA

DMEM, PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) 500 ml, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Fötale Kälberserum (FKS), PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

L-Glutamine Solution Bioextra, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Penicillin-Streptomycin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Trypsin 0,05 %/ EDTA 0,02 % in PBS, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

Trypsin Inhibitor 1 mg/ml, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

Trypsin-EDTA Solution 10x, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Histologie:

AEC+ Substrate-Chromogen, Dako, Hamburg, Deutschland

Anti-alpha smooth muscle Actin antibody, Abcam, Cambridge, UK

Aquatex, Merck, Darmstadt, Deutschland

Direct Red 80, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Fast Green FCF, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Histofine Simple Stain MAX PO (R), Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan

Picrinsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

p-Xylol, Merck, Darmstadt, Deutschland

Roti-Histokitt, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Roti-Liquid Barrier Marker rot, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tween 20, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Farbstoffe (Indikatoren):

Acridine Orange / Propidium Iodide Stain, 872045, Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Trypanblau, L6323, Biochrom, Berlin, Deutschland

Kits:

AMV Reverse Transkriptase Kit, Promega, Mannheim, Deutschland

NucleoSpin® RNA-Kit, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Super Script II, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, USA

2.1.3 Zelllinien

Humane Fibroblasten, dermal, neonatal: CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH,
St. Katharinen, Deutschland

Batch #: 231340, 7F3943, 7F3950, 2F0621, 9F0889, 9F0438

Strain: NHDF-NEO

Primäre epidermale Keratinozyten: ATCC-PCS-200-010 Lot Number: 60245430,
ATCC, Manassas, Virginia, USA

2.1.4 Mäusestamm

129 / SvEv Wildtyp, unter SPF-Bedingungen, Eigenzucht seit 2007 (Zentrales
Tierlabor D3, Klinikum Regensburg), Herkunft von Carol Paterson, Robertson Lab,
Dunn School of Pathology, University of Oxford, Großbritannien

Antragsnummer des Tierversuchsvorhabens: 55.2 DMS-2532-2-461

2.1.5 Primer

Alle Primer stammen von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland und
wurden im Verhältnis 1:5 verdünnt.

Primer zur Amplifikation von **humanen** Genen:

Name	Sequenz (5'→3')	Größe (bp)
β-aktin cyt. for	5' CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC 3'	
β-aktin cyt. rev	5' GATGGAGCCGCCGATCCACACGG 3'	385 bp
MMP-1 for	5' TCACCAAGGTCTCTGAGGGTCAAGC 3'	
MMP-1 rev	5' GGATGCCATCAATGTCATCCTGAGC 3'	324 bp
IL-8 for	5' CTGCAGCTCTGTGTGAAGGTG 3'	
IL-8 rev	5' ACAGAGCTCTCTTCCATCAG 3'	185 bp
IL-6 for 242-263	5' ACACAGACAGCCACTCACCTCT 3'	
IL-6 rev 371-392	5' AAGGTTTCAGGTTGTTTTCTGCC 3'	150 bp
TNF-alpha for	5' ATCCTGGGGGACCCAATCTA 3'	
TNF-alpha rev	5' AAAAGAAGGCACAGAGGCCA 3'	112 bp
IL-1 alpha for	5' GACGCACTTGTAGCCACGTA 3'	
IL-1 alpha rev	5' TGGCAGCTTAAGCCTGAGTC 3'	81 bp
Collagen Iα1 for 148	5' CGGCTCCTGCTCCTCTT 3'	
Collagen Iα1 rev 372	5' GGGGCAGTTCTTGGTCTC 3'	224 bp
TGFβ-1 for 2	5' GCAGAGCTGCGTCTGCTGAGGC 3'	
TGFβ-1 rev 2	5' CCCGTTGATGTCCACTTGCAGTG 3'	257 bp
TGFβ-2 for 1707	5' CTCCGAAAATGCCATCCCGC 3'	
TGFβ-2 rev 1870	5' GCTCAATCCGTTGTTTCAGGC 3'	164 bp

Primer zur Amplifikation von **murinen** Genen:

Name	Sequenz (5'→3')	Größe (bp)
β-aktin for	5' TGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC 3'	
β-aktin rev	5' TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG 3'	320 bp
MMP-1 for 17	5' CTGTTGCTTCTCTGGGCTGC 3'	
MMP-1 rev 192	5' CTGCATTTGCCTCAGCTTTTC 3'	176 bp
Collagen-1 for	5' CAACGAGATCGAGCTCAGA 3'	
Collagen-1 rev	5' CTAGTCCGAATTCCTGGTCT 3'	168 bp
αSMA for 130	5' GGAGTAATGGTTGGAATGGGC 3'	
αSMA rev 342	5' AGGGTTCCAGTGGTGCCTCTG 3'	212 bp
TGFβ-1 for	5' GGATACCAACTATTGCTTCAGCTCC 3'	
TGFβ-1 rev	5' AGGCTCCAAATATAGGGGCAGGGTC 3'	156 bp
TGFβ-2 for 50	5' TGGCGCTCAGTCTGTCTACCT 3'	
TGFβ-2 rev 302	5' TTGGCGTAGTACTCCTCGTCCG 3'	252 bp

2.2 Methoden

2.2.1 UVA₁-Bestrahlung

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Bestrahlungsquellen von UVA₁-Licht verwendet und Experimente *in vitro* sowie auch *in vivo* mit beiden Geräten durchgeführt.

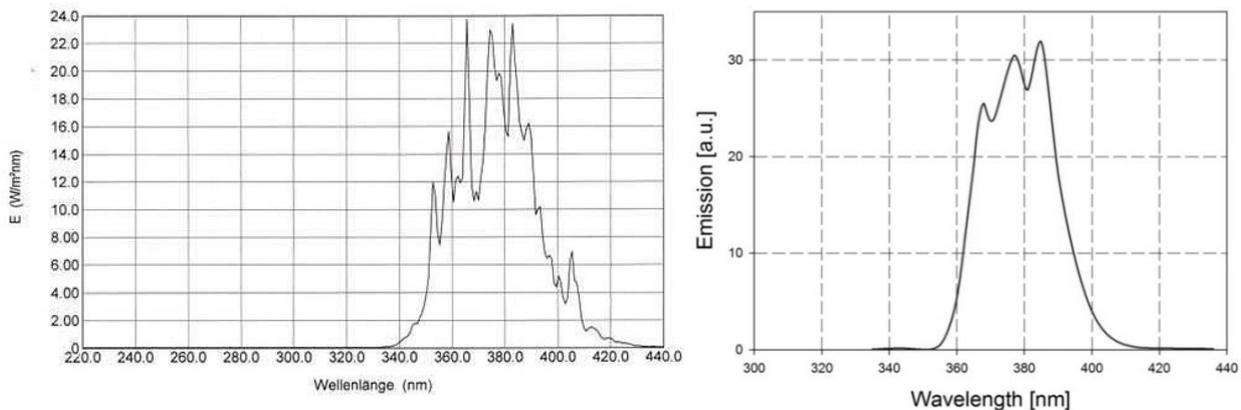


Abbildung 7: Emissionsspektren der UVA₁-Geräte, links: Emissionsspektrum des MHL UVA₁-Geräts (340-400 nm); rechts: Emissionsspektrum des neuen LED UVA₁-Geräts (360-400 nm); beide Geräte bereitgestellt von dem Hersteller Sellamed®

Die Abbildung 7 zeigt gegenüberstellend die Emissionsspektren beider UVA₁-Geräte, die in dieser Studie verwendet wurden und von der Firma Sellamed® (SELLAS, Ennepetal, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden. Links wird die spektrale Bestrahlungsstärke des UVA₁ Teilkörperbestrahlungsgeräts Sellamed 1200 dargestellt, welches in dieser Arbeit als Quelle der Breitband UVA₁-Strahlung diente. Ein Metallhalogenid Hochdruckstrahler Typ: Sellas® 1200/200 und zwei zusätzlich eingebaute Filtersysteme (Blaufilter und UVA₁-Kantenfilter) ermöglichen die ausschließliche Emission des gewünschten UVA₁-Strahlenspektrums (340-400 nm). Im Folgenden abgekürzt als MHL (Metallhalogenid Hochdruckstrahler). Auf der rechten Seite kann man die spektrale Emissionsstärke eines neuen Prototyp-Schmalbandgerätes mit neuer LED-Leuchtmitteltechnologie im Verhältnis zu seiner Wellenlänge sehen, dessen Spektrum auf 360-400 nm reduziert ist und in dieser Studie mit der Abkürzung LED benannt wird.

2.2.2 Zellkulturmethoden

2.2.2.1 Auftauen von Zellen

Für die Versuche wurden die zuvor in einem Stickstofftank bei -196 °C (77 K) unter Normaldruck eingefrorenen Keratinozyten und Fibroblasten aufgetaut. Hierbei wurden die eingefrorenen Kryoröhrchen im Wasserbad erwärmt und deren Inhalt im Rahmen der anschließenden Kultivierung in T75 Zellkulturflaschen zusammen mit 10 ml des jeweiligen Nährmediums überführt.

2.2.2.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Nach dem Auftauen wurden die Zellen in T75 Zellkulturflaschen herangezüchtet. Fibroblasten wurden mit einer Zellzahl von 50.000 Zellen pro 75 cm^2 Fläche ausgesät und Keratinozyten wurden mit einer Zellanzahl von 30.000 Zellen pro 75 cm^2 angesetzt. Bei den Keratinozyten handelte es sich um primäre epidermale Zellen aus humaner Normalhaut und wurden aus neonataler Vorhaut männlicher Neugeborenen mit kaukasischer Herkunft gewonnen, entsprechen also hellhäutigen Hauttypen. Die von 6 verschiedenen Spendern stammenden Fibroblasten Chargen wurden aus humaner dermaler Normalhaut von Neugeborenen entnommen. Pro Zellkulturflasche wurden die Zellen mit 10 ml des jeweiligen Nährmediums versorgt und anschließend bei 37 °C und 5% CO_2 im Brutschrank aufbewahrt.

Zusammensetzung des Fibroblasten-Mediums:

500 ml DMEM
+ 50 ml fötales Kälberserum (FKS)
+ 5 ml Penicillin-Streptomycin (PS)
+ 5 ml L-Glutamin

Zusammensetzung des Keratinozyten-Mediums:

500 ml Dermal Cell Basal Medium
+ Keratinocyte Growth Kit (Apo-Transferrin, rh TGF- α , rh Insulin, Epinephrine, L-Glutamine, Hydrocortisone, Extract-P)

Das Medium wurde unter Sterilbänken der Zellkultur dreimal pro Woche gewechselt und das Heranwachsen der Zellen unter einem Lichtmikroskop beobachtet. Sobald eine Zelllinie den kompletten Flaschenboden bedeckte, wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde eine vollbewachsene T75 Falcon Flasche auf drei neue Zellkulturflaschen gesplittet. Dazu wurde vorerst das Medium der mit Zellen gefüllten Flasche mithilfe einer Pasteur Pipette abgesaugt und mit 10 ml PBS gewaschen. Nach erneutem Absaugen des PBS wurden 2 ml verdünntes Trypsin/EDTA-Gemisch, welches vorher in PBS verdünnt wurde, zugegeben. Nach etwa 5 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ lösten sich die Zellen vom Boden ab. Die Reaktion wurde mit 8 ml Medium, durch das darin enthaltene FKS, gestoppt. Danach wurde die Flüssigkeit, einschließlich der darin enthaltenen Zellen, in ein 50 ml Falcon überführt und bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert. Dabei bildete sich am Boden ein Zellpellet und ein flüssiger Überstand, der erneut mithilfe einer Pasteur-Pipette abgesaugt wurde. Das Pellet wurde mit 10 ml Medium resuspendiert. Bei den Keratinozyten unterscheidet sich der Vorgang des Trypsinierens nur geringfügig von der oben beschriebenen Prozedur für Fibroblasten. Das Trypsin/EDTA-Gemisch zum Ablösen der Zellen und der spezielle Trypsin-Inhibitor zum Abstoppen der Reaktion sind hierbei bereits fertiggestellt gelieferte Reagenzien. Die Inkubationszeit der Keratinozyten im Brutschrank während der Einwirkung des Trypsin/EDTA-Gemischs beträgt 5-10 min. Anschließend wurden die Zellen mithilfe des LUNA-FL Zellzählgerät gezählt und durch entsprechende Verdünnung die jeweils gewünschte Zellzahl in neuen Zellkulturflaschen weiterkultiviert. Eine höhere Passagenzahl als 10 wurde bei den verwendeten Zellen vermieden.

2.2.2.3 Bestrahlung von Zellen mit UVA₁

Für die Bestrahlungsversuche wurden Fibroblasten sowie Keratinozyten auf mehrere 6-Well Platten ausgesät. Die einzelnen Platten wurden unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten zugeordnet (0, 20, 40, 60, 80 oder 100 J/cm²) und anschließend entweder mit dem LED - UVA₁ Gerät (Spektrum: 360-400 nm) oder dem MHL - UVA₁ Gerät, (Spektrum: 340-400 nm) bestrahlt. Hierfür wurde unmittelbar vor der Bestrahlung das Medium aller Zellen abgesaugt und mit 100 µl PBS ersetzt. Alle Platten wurden ohne Deckel bestrahlt. Beide UVA₁-Geräte arbeiten mit einer Leistung von 50 mW/cm², womit die jeweils genauen Bestrahlungszeiten anhand der

erwünschten Joule/cm² errechnet werden konnten (1 J = 1 Ws). Die Zellen wurden mit folgenden Parametern behandelt:

Tabelle 2: Bestrahlungsparameter der Zellkulturversuche mit UVA₁

Nummer	UVA ₁ Dosis (J/cm ²)	Zeit (min' s)
1	0	0
2	20	6' 40
3	40	13' 20
4	60	20' 00
5	80	26' 40
6	100	33' 20

Während der Bestrahlung wurden die Zellen in PBS gehalten, danach sofort wieder mit ihrem jeweiligen Medium genährt und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Kontrolle (0 J/cm²) wurde nicht bestrahlt, jedoch wurde auch hier der gleiche Wechsel zwischen Medium und PBS vorgenommen, um gleiche Bedingungen für die Zellen zu schaffen.

2.2.2.4 Mikroskopische Untersuchung von Zellen und Dokumentation

In zeitlichen Abständen von 6, 24, 48 und 72 h wurden die zuvor bestrahlten Platten aus dem Brutschrank genommen und unter einem Lichtmikroskop beobachtet. Zusätzlich wurden Aufnahmen durch das kamerafähige Mikroskop angefertigt, um den einer Zeit zugeordneten Zustand der Zellen, fotografisch zu dokumentieren.

2.2.2.5 MTT-Assay

Mithilfe eines MTT-Tests wurde die Vitalität der Zellen ermittelt, um herauszufinden wie viele Zellen durch die Belastung der Bestrahlung zugrunde gegangen sind. Dafür wurde MTT zuvor mit 5 mg/ml in PBS gelöst und davon je 10 µl in jedes Well zugegeben. Die Platte wurde für 4 h im Brutschrank inkubiert. Proportional zur Dehydrogenasen-Aktivität entsteht ein unlösliches Formazan in den Zellen. Der Test beruht auf der mitochondrialen Reduktion von Tetrazoliumsalz zu gefärbtem Formazan, welches als Indikator für die Vitalität dient, da diese Farbstoffbildung für Zelltypen konstant ist und daher eine Abschätzung der Zellanzahl möglich ist. (87) SDS wurde zu 20% in H₂O gelöst und pro Well wurden 100 µl zugegeben und über Nacht inkubiert. Die photometrische Auswertung erfolgte über einen ELISA-Reader bei 540 nm.

2.2.2.6 Zellzahlbestimmung mittels LUNA-FL

Eine genaue Zellzahlbestimmung für die Zellkulturversuche und zur Ermittlung der nach einer Bestrahlung überlebenden Zellen wurden mithilfe des LUNA-FL™ Zellzählgeräts unternommen. Dazu wurden 18 µl der zu untersuchenden Zellsuspension und 2 µl Acridinorange/Propidiumiodid gemischt. Davon wurden 10 µl in eine Kammer des Cell counting Slides™ aufgeladen und in das Gerät eingeschoben. Das Zellzählgerät misst die durch das Acridinorange abgegebene Fluoreszenz und gibt die Anzahl der toten sowie der lebenden Zellen innerhalb dieser Kammer an. Auch konnte dadurch die Mortalität der Zellen nach Bestrahlung verglichen werden.

2.2.2.7 Einfrieren von Zellen

Für weitere molekularbiologische Untersuchungen wurden die bestrahlten Zellen aus den Wells trypsiniert und eingefroren. Dazu wurden die Wells mit PBS gespült und anschließend wurden die Zellen mit 500 µl Trypsin 5 min im Brutschrank inkubiert. Darauf wurden 500 µl Medium (oder Trypsin-Inhibitor bei den Keratinozyten) hinzugegeben und die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt, welches bei 3.000 U/min für 5 min zentrifugiert wurde. Zuletzt wurde der Überstand abgesaugt und das nach dem Zentrifugieren entstandene Zellpellet bei -20 °C eingefroren.

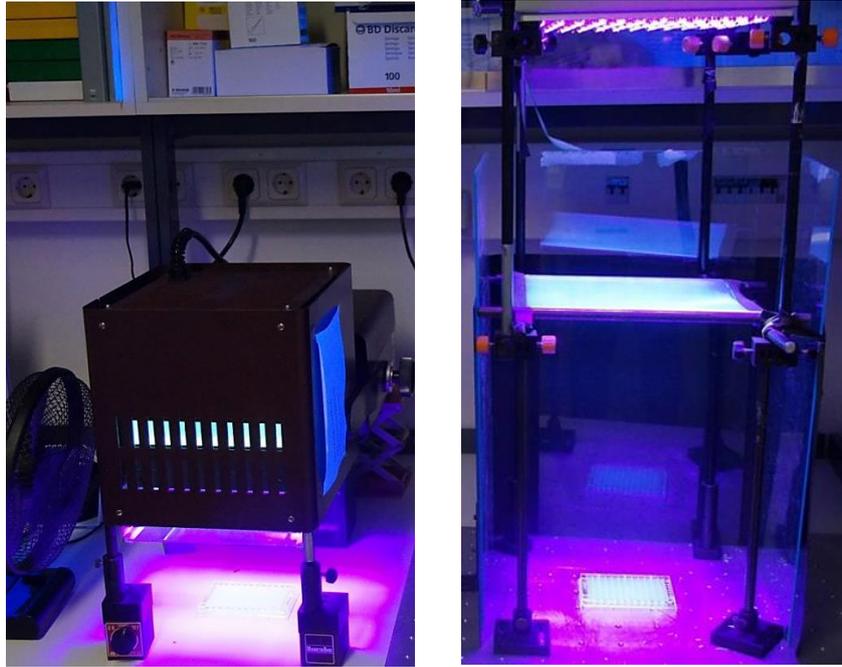


Abbildung 8: Bestrahlungsaufbau der UVA₁-Geräte, **links:** konventionelles MHL-UVA₁-Gerät mit breitem Emissionsspektrum (340-400 nm), **rechts:** neues LED-UVA₁-Gerät mit schmalere Emissionsspektrum (360-400 nm). Darunter befinden sich jeweils 96-well Platten, die bei den Zellkulturversuchen verwendet wurden und jeweils mit gleicher Lichtintensität (50 mW/cm²) mittels entsprechend berechnetem Abstand zur Lichtquelle bestrahlt wurden.

2.2.3 Tierversuchsmethoden

2.2.3.1 Mausstamm und Herkunft

Für die *in vivo* Experimente wurden Mäuse des Stamms 129/SvEv Wildtyp verwendet. Die insgesamt 47 Mäuse stammen alle aus der seit 2007 bestehenden Eigenzucht des hausinternen Zentralen Tierlabors D3 am Klinikum Regensburg mit SPF-Status (spezifiziert-pathogenfrei). Ursprünglich wurde der Mäusestamm aus dem Robertson Lab der Dunn School of Pathology der Universität Oxford in Großbritannien bezogen. Die Versuchsmäuse waren bis auf die Kontrollgruppe 1 männlichen Geschlechts, wogen zwischen 36-49 g und waren 2-4 Monate alt bei Versuchsbeginn. Während der Laufzeit des Experiments wurden die Mäuse in einem konventionellen, offenen Tierlabor gehalten. Nach einer Akklimatisationszeit von 3 Tagen wurden die 6-8 Mäuse eines Käfigs willkürlich den 7 Versuchsgruppen zugeordnet.

2.2.3.2 Versuchsgruppen

Tabelle 3: Einteilung der Versuchsmäuse in unterschiedliche Versuchsgruppen

Gruppe	Gruppengröße (n)	Geschlecht	Behandlung
1	8	w	Kontrolle unbehandelt
2	8	m	Kontrolle BLM 28 Tage unbestrahlt
3	6	m	BLM MHL-UVA ₁ Hochdosis
4	6	m	BLM LED-UVA ₁ Hochdosis
5	7	m	BLM MHL-UVA ₁ Mitteldosis
6	6	m	BLM LED-UVA ₁ Mitteldosis
7	6	m	Kontrolle BLM 28 Tage unbestrahlt + Erhaltungsinjektionen Bleomycin

Die Behandlung der Mäuse richtete sich jeweils nach ihrer Versuchsgruppe, wobei Gruppe 1, 2 und 7 keine UVA₁-Behandlung erhielten. Mäusen der Gruppe 1 wurde als einzige Kontrollgruppe nicht der Fibrose induzierenden Wirkstoff Bleomycin injiziert. Die Kontrollgruppe 2 diente mit BLM-Injektionen über 28 Tage zur Bestätigung des Fibrose-Mausmodells. Den Gruppen 3-7 wurde nach BLM induzierter Fibrosebildung weiterhin über den Versuchszeitraum (30 Bestrahlungssitzungen) BLM lokal injiziert (3x pro Woche), um die Fibrose aufrechtzuerhalten und Ergebnisse nicht zusätzlich durch natürliche Heilungsprozesse zu beeinflussen. Die Kontrollgruppe 7 wurde nicht bestrahlt und diente somit als unbestrahlte aber mit BLM behandelte Kontrollgruppe.

2.2.3.3 Bleomycin-induziertes Fibrose-Mausmodell

Um eine, für die Studie essentielle dermale Fibrose bei den Versuchsmäusen zu induzieren, wurde das bereits gut etablierte Sklerodermie-Mausmodell verwendet (88). Hierbei wurde zunächst pulverförmiges Bleomycin in PBS gelöst (500 µg/ml). Die Rücken aller Mäuse wurden rasiert, sodass eine circa 2x2 cm² große Fläche für die lokalen Injektionen entstand. Da dieses freigelegte Hautareal für die nachfolgenden Untersuchungen diente, erfolgten die Injektionen ausschließlich innerhalb der rasierten Stelle. Eine Betäubung wurde in dieser Studie nicht

vorgenommen, da die lokalen Injektionen als geringe Belastung, Schweregrad 1, einzustufen sind und zusätzliche Betäubungsmaßnahmen als unnötig Stress-induzierend anzusehen sind. (89) Bleomycin wurde 5x pro Woche innerhalb 6 Wochen (je 100 µl) subkutan mit einer 0,4x19 mm großen Injektionsnadel in den rasierten Rückenbereich der Mäuse der Gruppen 2-7 appliziert. Um die lokale Fibrose aufrechtzuerhalten, wurden die Injektionen 1-2x die Woche über den folgenden 6-wöchigen Bestrahlungszeitraum fortgeführt. Mäusen der Kontrollgruppe 1 wurde anstatt Bleomycin 100 µl PBS (Phosphat-buffered Saline) injiziert.

2.2.3.4 Bestrahlung von Mäusen

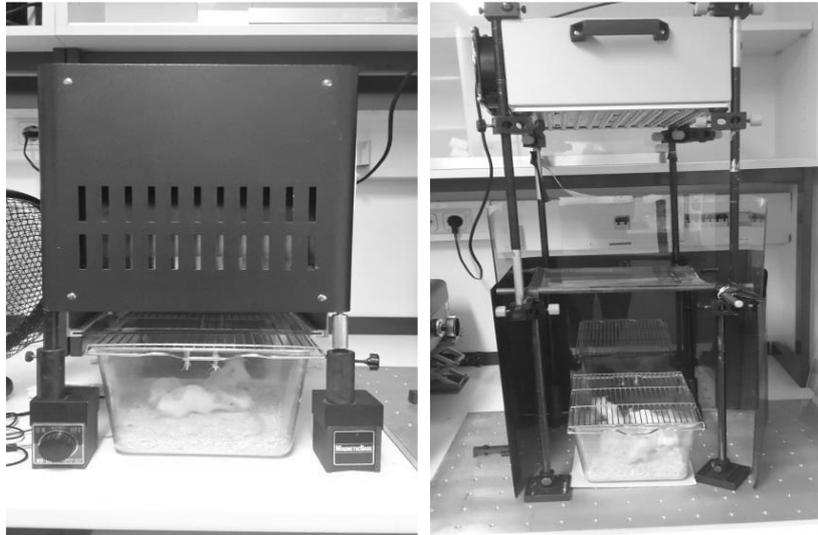
Nach Fibrose-Entwicklung wurden die Versuchsgruppen 3-6 (siehe Tabelle 3) mit UVA₁ entsprechend den angegebenen Behandlungsparametern bestrahlt. Je nach Gruppe wurde eine „medium dose“ (60 J/cm²) oder eine „high dose“ (100 J/cm²) verwendet, entweder mithilfe des konventionellen MHL-UVA₁-Geräts mit breitem Spektrum oder des LED-UVA₁-Geräts mit schmalen Spektrum.

Eine zuvor durchgeführte Lichttestung mit unterschiedlichen UVA₁-Dosen (20, 40, 60, 80 und 100 J/cm²) wurde an fünf studien-unabhängigen Mäusen durchgeführt, um die minimale phototoxische Dosis für den verwendeten Mausstamm zu bestimmen.

Tabelle 4: Bestrahlungsparameter der Versuchsmäuse

Nummer	UVA ₁ Dosis (J/cm ²)	Zeit (min' s)	Kumulative UVA ₁ -Dosis (J/cm ²)
1	60	20'00	1.800
2	100	33'30	3.000

Um der entstehenden Hitzeentwicklung während der Bestrahlungszeit mit dem konventionellen MHL-UVA₁-Gerät mit breitem Spektrum entgegenzuwirken und die Mäuse zu schützen, wurde ein Ventilator verwendet. Dadurch konnte ein Kühlungseffekt erzeugt und die Temperatur konstant gehalten werden. Da das neue UVA₁-Gerät mit schmalen Spektrum durch eine neue LED-Technologie keine Wärme erzeugt, wurden hier keine weiteren Optimierungen durchgeführt.



MHL-UVA₁
(340-400 nm)

LED-UVA₁
(360-400 nm)

Abbildung 9: UVA₁-Geräteaufbau bei dem *in vivo* Mausversuch

2.2.3.5 Asservierung des murinen Hautgewebes

Nach 28 Bleomycin-Applikationen und 30 UVA₁-Bestrahlungssitzungen (5x pro Woche) wurde der Tierversuch durch tierschutzgerecht angewandte zervikale Dislokationen beendet. Das ca. 2x2 cm² große bestrahlte fibrotische Hautareal jeder Maus wurde mit einem Skalpell herausgeschnitten. Das Hautstück wurde anschließend halbiert und entsprechend den weiteren vorgesehenen Untersuchungsmethoden aufbereitet und asserviert.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 mRNA-Isolierung aus Zellen

Die nach den Zellkulturversuchen eingefrorenen Zellpellets wurden aufgetaut und anschließend mithilfe des NucleoSpin® RNA Kits ihre mRNA isoliert. Im Laufe mehrerer aufeinanderfolgenden Schritte unter Zugabe unterschiedlicher Puffer (RA1, RAW2, RAW3, MDB) und Reagenzien wurde, entsprechend des Nucleo Spin® Protokolls nach Herstellerangaben, die daraus gewonnene isolierte mRNA in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt.

2.2.4.2 mRNA-Isolierung aus murinem dermalen Hautgewebe

Das Gewebestück des murinen sklerotischen Hautareals wurde halbiert, wobei ein Teil für anschließende histologische Färbungen verwendet wurde und der andere Teil nach erneutem Zerkleinern direkt nach Entnahme für die molekularbiologischen Untersuchungen weiterverarbeitet wurde. Dazu erfolgte die RNA-Isolation des Hautstücks gemäß des Nucleo Spin®-Herstellerprotokolls. Abweichungen vom Herstellerprotokoll erfolgten lediglich im letzten Schritt des Protokolls, wobei zur Elution der RNA anstelle der angegebenen 60 µl H₂O nur 40 µl H₂O verwendet wurde und dieses vor dem Zentrifugieren für 2 min auf der Säule inkubiert wurde. Zudem wurde die Gewebeprobe vor Beginn der RNA-Isolation im Lyse-Puffer mithilfe eines Gewebehexlers homogenisiert.

2.2.4.3 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Mithilfe des SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kits wurde die zuvor isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben. Zuvor wurde mithilfe des NanoDrop Spektrophotometer die RNA Konzentration bestimmt, um die benötigte Menge an mRNA für die Umschreibung zu ermitteln. Hierbei wurde folgende Zusammensetzung verwendet:

- 5 µl mRNA
- + 1 µl Random-Primer (1 µg/µl)
- + 4 µl 5x Puffer
- + 1 µl dNTP's
- + 1 µl DTT (Reduktionsmittel)
- + 7 µl DEPC-Wasser

Die Mixtur wurde bei 70°C für 10 min inkubiert. Hierbei entfaltet sich die RNA und löst die Sekundärstruktur auf. Danach wurde das Gemisch auf Raumtemperatur heruntergekühlt und 1 µl Enzym (Superscript II von Gibco) hinzu pipettiert. Im nächsten Schritt wurde der Vorgang in der PCR- Maschine fortgesetzt. Dabei erhitzt sich das Gerät für 45 min auf 42°C, anschließend für 10 min auf 72°C und beendet das Programm bei konstant bleibenden 4°C, welches auch der Temperatur entspricht, bei der die gewonnene cDNA fortwährend gelagert wurde.

Für die cDNA-Generierung der murinen mRNA wurde das AMV Reverse Transcription System Kit von Promega verwendet. Das herstellereigene „Quick Protocol“ wurde als Protokollvorlage verwendet. Hierbei wurden 10,1 µl Mastermix und 9,9 µl RNA, dessen Konzentration ebenfalls durch NanoDrop zuvor untersucht wurde, verarbeitet. Der Mastermix wurde aus H₂O, MgCl₂, RT-Puffer, dNTP's, RNasin®, AMV-RT und Random Primer hergestellt. Abschließend wurden die Proben, wie bei der oben beschriebenen zellulären RNA Generierung, in die PCR-Maschine gegeben.

2.2.4.4 Quantitative real time PCR

Zur Quantifizierung der Expressionsstärke von mRNA wurde eine Light Cycler unterstützte real time quantitative PCR verwendet. Folgende spezifische Oligonukleotid Primer wurden hierfür eingesetzt:

Tabelle 5: Primer Bedingungen für humane und murine Oligonukleotide

Primer	Annealing (°C)	Messpunkt (°C)	Schmelztemperatur (°C)	Zyklen
hβ-actin	60	85	88,5	45
hMMP1	65	80	83	50
hColl-1	60	86	89	45
hIL-1α	60	78	81	45
hIL-6	60	80	83	45
hIL-8	60	78	81,5	45
hTNF-α	60	81	85,5	45
hTGFB-1	65	84	87,5	45
hTGFB-2	60	79	82,5	45
mβ-actin	60	83	86,5	45
mMMP-1	60	81	80	45
mColl-1	60	84	88,5	45
mα-SMA	60	82	85,5	45
mTGFB-1	60	85	89	45
mTGFB-2	60	86	89	45

Amplifizierung sowie Quantifizierung der im oberen Teil beschriebenen murinen sowie auch die zellulären cDNA-Proben fanden im LightCycler 96 unter vorheriger Zugabe des jeweiligen Primers und des Farbstoffes SYBR green I statt. Dabei wurden pro Well 10 µl SYBR green I, 8 µl H₂O, 0,5 µl Primer forward, 0,5 µl Primer reverse und 1 µl cDNA (jeweils in Doppelbestimmungen) zusammen pipettiert. Jedes Oligonukleotid wurde in einem gesonderten Well als Negativkontrolle ohne cDNA mitgeführt. β-Actin diente auf allen Platten als interner Standard.

Mithilfe hoch-intensiver LED's und 96 paariger robuster Faserkabel, detektiert der LightCycler das in den Wells enthaltende SYBR green I, welches sich unspezifisch in die doppelsträngige DNA einbaut und bei vollständiger Replikation fluoresziert. Expressionsstärken spezifischer Primer konnten nach maximal 50 Zyklen ermittelt werden.

2.2.5 Histologische und immunhistochemische Methoden

Eine Hälfte des bei der Asservierung exzidierten fibrotischen Hautareals der Versuchsmäuse wurde auf eine Membran aufgezogen, über Nacht in Formaldehyd (4%) gehalten und anschließend zur Fixierung in ein vollautomatisches Hypercenter eingelegt. Die eingebetteten Gewebeproben wurden in Paraffin gegossen, nach dem Abkühlen geschnitten, auf Objektträgern fixiert und entsprechend den durchgeführten, unten beschriebenen Färbungen mit H&E, Sirius Red und αSMA gefärbt (90). Die fertigen Schnitte wurden mithilfe des PreciPoint® Mikroskopie-Scanners mit einer Vergrößerung von 40x graphisch dargestellt.

2.2.5.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Eine Routinefärbung mit H&E wurde vorgenommen, um einen ersten Eindruck über die entstandene Fibrosebildung der Versuchsmäuse zu gewinnen und anhand der Schnitte die späteren Dermisdicken-Bestimmungen (von unterhalb der Epidermis bis zum Fettgewebe) mit dem PreciPoint® Histo Scanner vorzunehmen.

2.2.5.2 Sirius Red Färbung

Sirius Red ist ein Azo-Farbstoff, der speziell Kollagenfasern intensiv rot anfärbt. Die Sirius Red Lösung (0,1%) wurde mit 500 mg Sirius Red Reagent, 500 mg Fast Green und 500 ml Picrinsäure angesetzt.

2.2.5.3 α SMA Färbung

Die immunhistologische Färbung mit gegen α -SMA gerichteten Antikörpern soll die Aktivität von Myofibroblasten in den Hautschnitten darstellen. Der Antikörper wurde hierbei in einem Verhältnis 1:1000 mit PBS verdünnt. Es wurden 4 μ l α -SMA-Antikörper und 4 ml Puffer-PBS verwendet.

2.2.5.4 Vermessung der Dermis-Dicke

Anhand der histologischen Schnitte wurde morphologisch die Dermisdicke vermessen und der Durchmesser der Dermis unter den Gruppen verglichen, um die Fibroseinduktion und die damit verbundene Steigerung der Kollagenfaserdicke zu bestimmen und zu vergleichen. Dabei wurden in jedem Schnittpräparat 5 Messpunkte gleichmäßig und parallel zur Verlaufsrichtung der Follikel verteilt, entlang der Dermis unter Aussparung der Haarfollikelzonen bestimmt, die Dermisdicke hier gemessen und später statistisch ausgewertet (Abbildung 10).



Abbildung 10: Vermessung der Dermisdicke an fünf verschiedenen Messpunkten im jeweiligen Schnittpräparat (im vorliegenden Fall Kontrollgruppe 1), parallel der Verlaufsrichtung der Follikel. H&E-Färbung, Vergrößerung 40fach

2.2.6 Statistische Auswertungen

Sowohl die molekularbiologischen Ergebnisse der Expressionsanalysen als auch die Vermessungen der Dermisdicke wurden mithilfe des GraphPad Prism® Programms statistisch ausgewertet.

2.2.6.1 Auswertungen der mRNA Genexpressionsanalysen

Bei den Genexpressionsanalysen wurden mithilfe der LightCycler-Software die Zielgene analysiert und graphisch in Form von Schmelzkurven, Balkendiagrammen und Amplifikationskurven dargestellt. Eine Ergebnistabelle über die Konzentration des untersuchten Gens innerhalb einer bestimmten cDNA Probe wurde zusätzlich erstellt. Alle Proben wurden in Doppelbestimmungen analysiert und basierend auf β -Actin als interner Standard ausgewertet. Die ermittelten Genexpressionswerte der einzelnen biologischen Marker wurden im Tabellenprogramm Excel (Microsoft Corporation, 2010, USA) eingefügt und in Relation zur Kontrollgruppe 1, welche den Wert 1 erhielt, ausgewertet. Die anschließend berechneten Mittelwerte wurden einschließlich ihrer jeweiligen Standardabweichungen in das Programm Graph Pad Prism® übertragen und durch Balkendiagramme mit eingezeichneten Standardabweichungen dargestellt. Zusätzlich wurden ebenfalls mit GraphPad Prism® ungepaarte t-Tests mit einem Konfidenzintervall von 95 % ($p < 0,5$) für Signifikanzberechnungen durchgeführt und in Abhängigkeit auf die jeweilig mitgeführte Kontrolle bezogen. Signifikante Werte wurden mit einem Asterix gekennzeichnet, nicht signifikante Werte erhielten keine gesonderte Auszeichnung. Die Daten der Genexpressionsanalysen wurden von sechs Fibroblastenzelllinien ($n = 6$) und einer Keratinozytencharge ($n = 1$) mit unterschiedlichen Passagen bezogen, wobei jeweils drei Versuche unternommen wurden. Die gewonnenen Ergebnisse wurden gemittelt und zusammengefasst.

2.2.6.2 Auswertungen der Dermis-Vermessung

Auch die jeweilige Dermisdicke der histologischen Schnittpräparate des murinen Hautgewebes wurde mithilfe einer Mittelwert-Bildung aus den 5 festgelegten Messpunkten der einzelnen Schnitte (Abbildung 10) mittels einer Excel-Tabellenfunktion errechnet. Die Werte wurden anschließend in das Programm Graph Pad Prism® übertragen und graphisch in einem Balkendiagramm festgehalten. Dargestellt wurden demnach alle Mittelwerte der einzelnen Versuchsmäuse innerhalb einer Gruppe, deren erneut gebildeter Mittelwert die jeweilige Gruppe mit entsprechendem Balken widerspiegelt.

3. Ergebnisse

3.1 *In vitro* Untersuchungen: Molekulare und zelluläre Effekte von UVA₁ auf Fibroblasten und Keratinozyten

3.1.1 Bestimmung der Bestrahlungsparameter für Zellkulturexperimente

3.1.1.1 Bestrahlungsbedingungen

Die Bestrahlungsbedingungen der Zellkulturexperimente wurden im Rahmen einer Etablierungsstudie mithilfe einiger Vorversuche festgelegt. Dazu wurden jeweils 30.000 Keratinozyten und 50.000 Fibroblasten auf Zellkulturplatten ausgesät und mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen beleuchtet. Ebenso wurden die Bestrahlungsbedingungen variiert. Insgesamt wurden 4 Vorversuche unternommen. Hierbei wurde festgestellt, dass die Bestrahlungen der 96-well-Platten am besten ohne Deckel und ohne zusätzlichen Ventilator durchzuführen sind. Der Grund für diese Vorgehensweise lag an folgender Beobachtung: Eine Bestrahlung ohne Deckel mit Ventilator führte zu einer Verunreinigung der Proben durch umherwirbelnde Mikropartikel und Bestrahlungen bei geschlossenem Deckel führten zur Bildung von Kondenswasser an der Deckelinnenseite mit dem Effekt der Lichtstreuung, wodurch eine konstante einheitliche Strahlendosis nicht gewährleistet werden konnte. Beide UVA₁-Geräte wurden so modifiziert, dass beide eine konstante Leistungsabgabe von 50 mW/cm² auf Höhe des zu bestrahlenden Ziels erbringen konnten und somit ein direkter Vergleich möglich war. Der Abstand zwischen Lichtquelle und zu bestrahlendem Objekt wurde deshalb bei beiden Geräten individuell angepasst und für die Dauer der Versuchsreihen immer konstant gehalten. Da das neue UVA₁-Gerät mit LED-Technologie wesentlich mehr Leistung abgibt, war hier der Lampen-Welloberflächenabstand deutlich höher, verglichen zu dem konventionellen UVA₁-Gerät mit breitem Emissionsspektrum.

3.1.1.2 UVA₁-Dosisfindung für Zellkulturexperimente

Zur Bestimmung der optimalen UVA₁-Dosis wurden die Zellen unmittelbar nach Bestrahlung durch ein Zellmikroskop begutachtet und das morphologische Aussehen dokumentiert (Abbildungen 11 und 12). Im Anschluss daran wurde für eine genauere Analyse der Zellvitalität ein MTT-Test durchgeführt.

Die Zellmikroskopie zeigte bereits deutlich, dass hohe UVA₁-Dosen (80 und 100 J/cm²) starke morphologische Veränderungen verursachten und bei Fibroblasten (exemplarisch dargestellt für 9F0438) sowie auch den Keratinozyten (HEKn) in einer hohen Dichte zum Absterben der Zellen führten. Erkennbar ist dies in Abbildung 11 und in Abbildung 12 vor allem durch das starke Abrunden der Zellen und die dadurch größer werdenden Abstände untereinander.

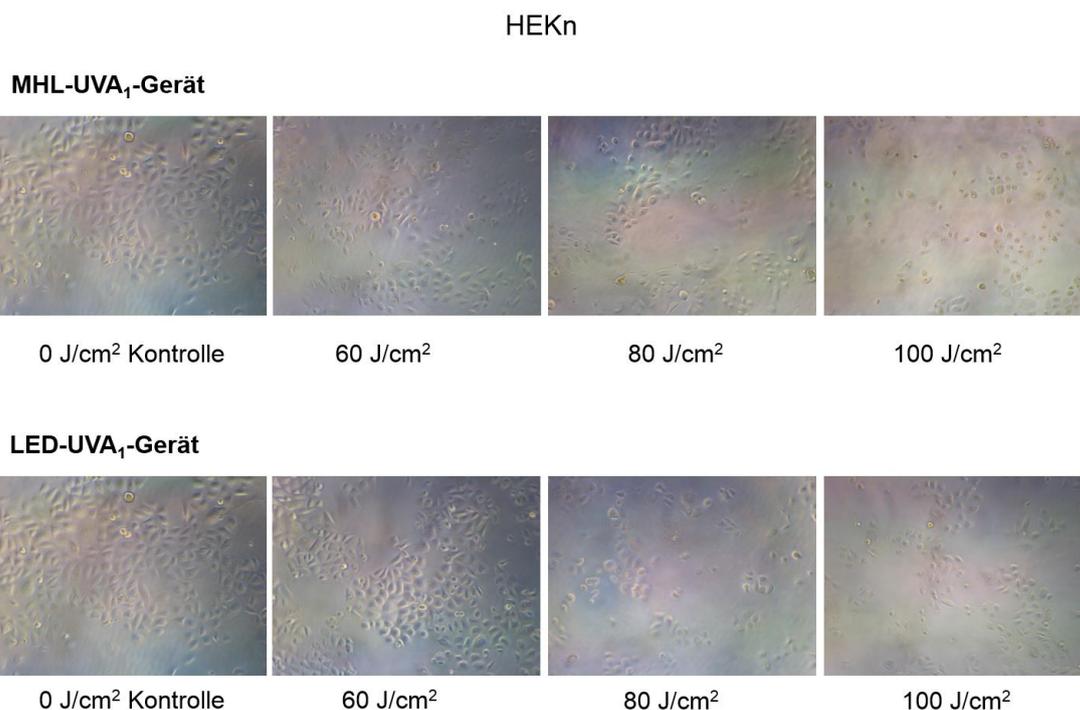
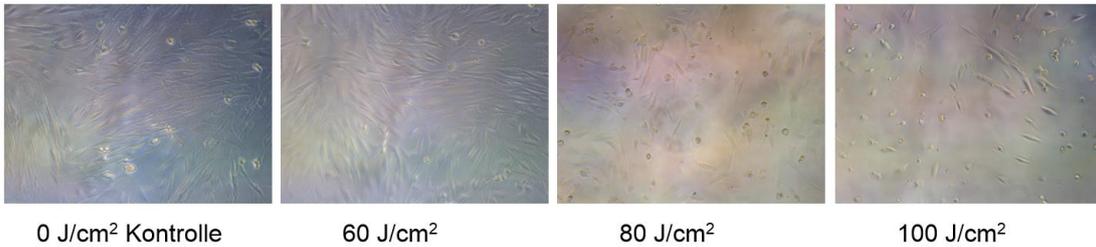


Abbildung 11: Durchlichtmikroskopie von Keratinozyten (HEKn) in 10-facher Vergrößerung, starke Vereinzelung und Verkleinerung der Zellen durch hohe UVA₁-Dosen sind hier zu beobachten.

Fibroblasten 9F0438

MHL-UVA₁-Gerät



LED-UVA₁-Gerät

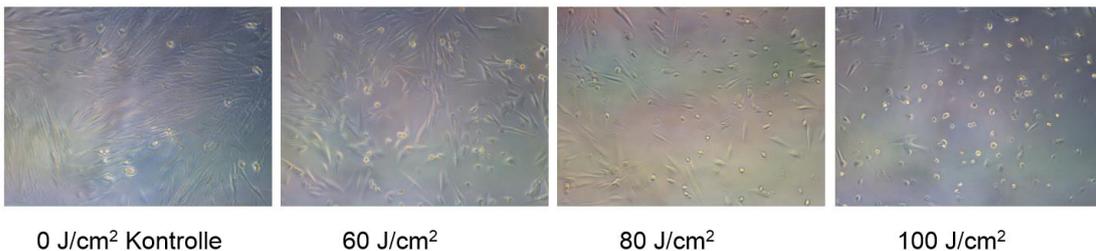


Abbildung 12: Durchlichtmikroskopie von Fibroblasten (exemplarisch der Fibroblasten Charge 9F0438) in 10-facher Vergrößerung, starkes Abrunden der Zellen ist hierbei bei hohen Dosen von UVA₁ festzustellen.

Hierbei wurde festgestellt, dass der Großteil beider Zellpopulationen (ca. 50%) bei Bestrahlung mit einer UVA₁-Dosis von 80 J/cm² und 100 J/cm² abgetötet wurden (Abbildungen 11 und 12). Aus diesem Grund wurden für alle weiteren Zellkulturexperimente geringere UVA₁-Dosen von 20, 40 bzw. 60 J/cm² verwendet. Neben der qualitativen Beurteilung im Lichtmikroskop konnten die Ergebnisse auch mittels MTT-Tests bestätigt werden. Der lichtdosisabhängige Vitalitätsverlust verschiedener Zellpopulationen ist in der folgenden Abbildung 13 graphisch dargestellt.

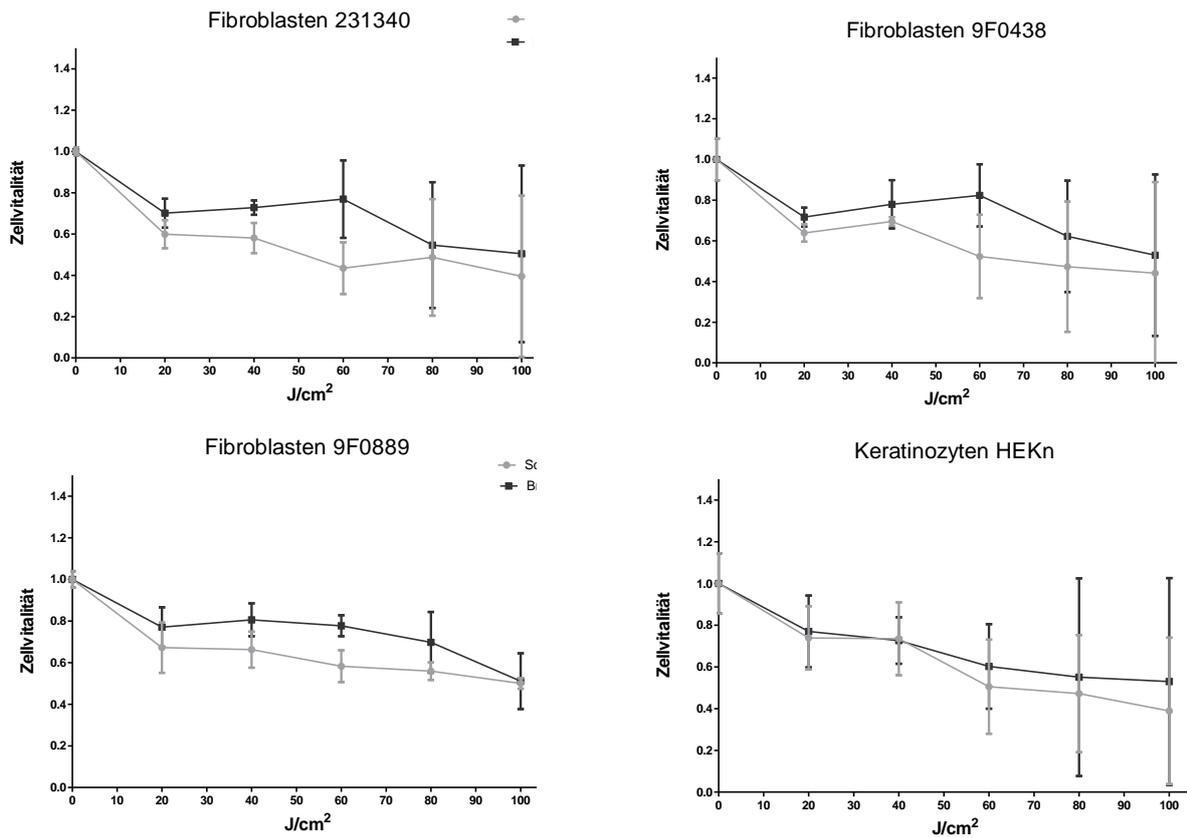


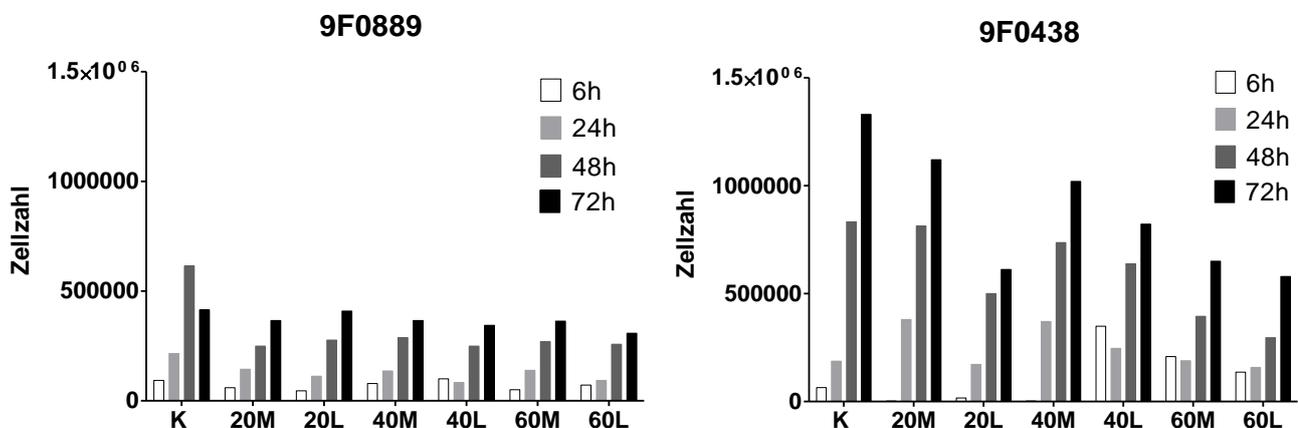
Abbildung 13: MTT-Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität als Maß der Zellvitalität von Keratinozyten und Fibroblasten (9F0889, 9F0438, 231340) nach UVA₁-Bestrahlung. Angegeben wird die Zellvitalität (y-Achse) bei verschiedenen UVA₁-Dosen (x-Achse), 1.0 entspricht hierbei 100%.

Der MTT-Test (Abbildung 13) zeigt eine deutliche Abnahme des Anteils der lebenden Zellen nach einer Bestrahlung mit UVA₁-Dosen über 60 J/cm². Es konnte somit auch der optisch dokumentierte Eindruck bestätigt werden, dass aufgrund zunehmender Bestrahlungsdosen die Anzahl der adhärennten Keratinozyten und Fibroblasten sowohl mit LED-UVA₁ als auch mit MHL-UVA₁ deutlich abnehmen. In den nachfolgenden Versuchen wurden deshalb nur noch die Bestrahlungsdosen 20, 40 und 60 J/cm² verwendet.

3.1.1.3 Untersuchung der Zellviabilität im Zeitverlauf nach UVA₁-Bestrahlung

Nach finaler Festsetzung der Bestrahlungsparameter und abgeschlossener UVA₁-Dosisfindung wurden nun Untersuchungen zur Viabilität von Fibroblasten und Keratinozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach UVA₁-Bestrahlung durchgeführt. Versuchsaufbau und Durchführung folgten dem im Methodenteil beschriebenen Vorgehen. Sechs, 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung wurde die Zellzahl mit dem LUNA-FL® bestimmt und die Ergebnisse mithilfe der Graph Pad Prism® Software ausgewertet. Hierbei sollten erste Erkenntnisse über Viabilität und das Proliferationsverhalten der Zellen nach Bestrahlung im Zeitverlauf gewonnen werden. Neben den mikroskopischen und metabolischen Untersuchungen der Zellen nach UVA₁-Bestrahlung bot die Zellzahlbestimmung eine weitere Methode zur Etablierung und Bestimmung der Bestrahlungsparameter für den weiteren Versuchsverlauf.

Wie in Abbildung 14 dargestellt, erfolgten Zellzahlbestimmungen von Keratinozyten und drei verschiedenen Fibroblasten-Linien. Die Graphen wurden auf der x-Achse in die jeweiligen Versuchsgruppen eingeteilt, d. h. Kontrolle, 20 J/cm², 40 J/cm² und 60 J/cm², jeweils mit MHL-UVA₁ (340-400 nm) oder LED-UVA₁ (360-400 nm) bestrahlt. Vier Zeitpunkte der Zellzählung wurden dargestellt (6h, 24h, 48h und 72h nach Bestrahlung). Auf der y-Achse wurde die Zellzahl angegeben. Hierbei wurde die Skala der Ordinatenachse der Keratinozyten, auf die im Versuch verwendete geringere Zellzahl (30.000 statt 50.000 pro well), angepasst.



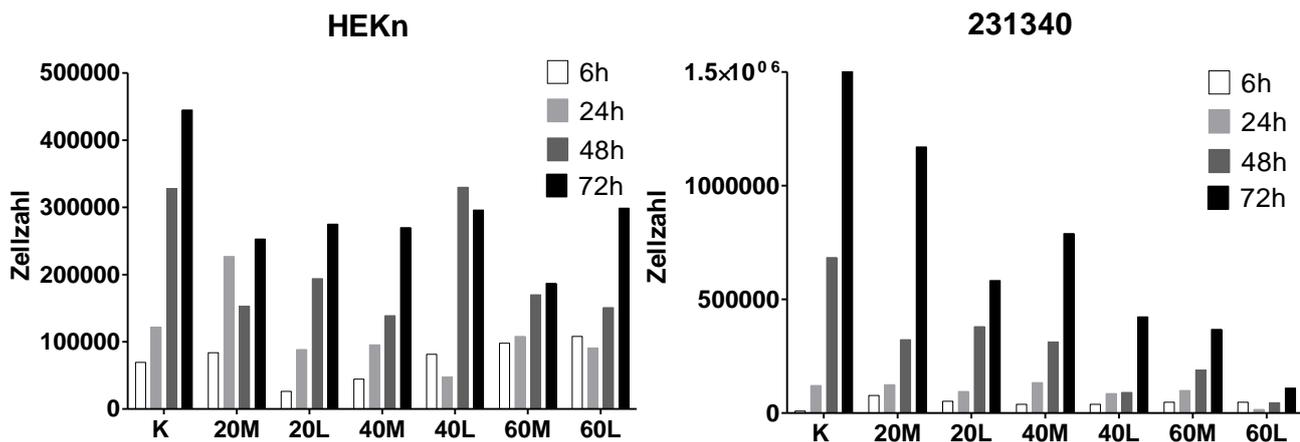


Abbildung 14: Zellzahlbestimmung von Fibroblasten (9F0889, 9F0438, 231340) und Keratinozyten (HEKn) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (6h, 24h, 48h, 72h) nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVA₁-Dosen (K:Kontrolle, 20, 40, 60 J/cm²) mit beiden Systemen (M: MHL; L: LED).

Tabelle 6: Legende LUNA-FL Zellzahlen-Auswertung

Abkürzung x-Achse	Bestrahlungsintensität
K	Kontrolle
20B	20 J/cm ² MHL-UVA ₁
20S	20 J/cm ² LED-UVA ₁
40B	40 J/cm ² MHL-UVA ₁
40S	40 J/cm ² LED-UVA ₁
60B	60 J/cm ² MHL-UVA ₁
60S	60 J/cm ² LED-UVA ₁

Jede Zellzahlbestimmung in Abbildung 14 stellt in den ersten vier Balken links die nicht bestrahlten Kontrollzellen und ihr normales Proliferationsverhalten dar. Die Kontrollen zeigten stets in allen Zellen ein exponentiell ansteigendes Wachstum. Nur die 9F0889 Fibroblasten ließen nach 72h einen Einbruch um 200.000 Zellen im Vergleich zum Zustand nach 48h erkennen.

Außerdem ist zu erkennen, dass sich bei allen Zellen meist erst ab 24h nach Bestrahlung mit UVA₁ ein sichtbarer Proliferationsanstieg zeigte. Sowohl bei den Fibroblasten als auch bei den Keratinozyten wurde eine deutliche Erhöhung der Zellzahlen nach 48h und 72h festgestellt, die jedoch stets unter den Werten der

Kontrolle lagen. Hierbei zeigten sich mit niedrigen UVA₁-Dosen bestrahlte Zellen weniger im Wachstum beeinträchtigt als Zellen, die mit einer hohen Dosis bestrahlt wurden. Dies zeigte sich vor allem sehr deutlich bei den 231340 Fibroblasten, die 72h nach Bestrahlung mit 60 J/cm² einen Verlust von 93,125% mit dem LED-UVA₁ und 77% mit dem MHL-UVA₁, verglichen zur Kontrolle, verzeichneten. Als äußerst robust stellte sich hier die 9F0889 Fibroblasten-Linie dar. Eine Bestrahlungsdosis von 20-60 J/cm² konnte das Zellwachstum, verglichen zur Kontrolle, nicht negativ beeinflussen.

3.1.2 Einfluss der UVA₁-Bestrahlung auf die Genexpression in Fibroblasten und Keratinozyten

Um den molekularen Einfluss der UVA₁-Bestrahlung auf Fibroblasten und Keratinozyten zu beobachten, wurden Genexpressionsanalysen mittels LightCycler-Technologie durchgeführt. Hierbei wurden Gene, vor allem die von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, untersucht, welche eine bedeutende Rolle im Hinblick auf Entstehung und Progression einer dermalen Fibrose spielen und durch eine UVA₁-Behandlung in ihrem Expressionsstatus bekanntlich beeinflusst werden.

Für die Analysen der Fibroblasten wurden die Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Versuchen mit sechs Fibroblastenzelllinien (9F0889, 231340, 7F3943, 7F3950, 2F0621 und 9F0438) zusammengefasst und als n=6 dargestellt. Auf der Abszissen-Achse wurden die Bestrahlungsparameter angegeben, die Ordinaten-Achse stellte die x-fache Aktivierung des Gens, normiert auf das Haushaltsgen β -actin, zum Zeitpunkt der mRNA-Isolation nach Bestrahlung dar. Die Kontrollen wurden auf 1 festgelegt.

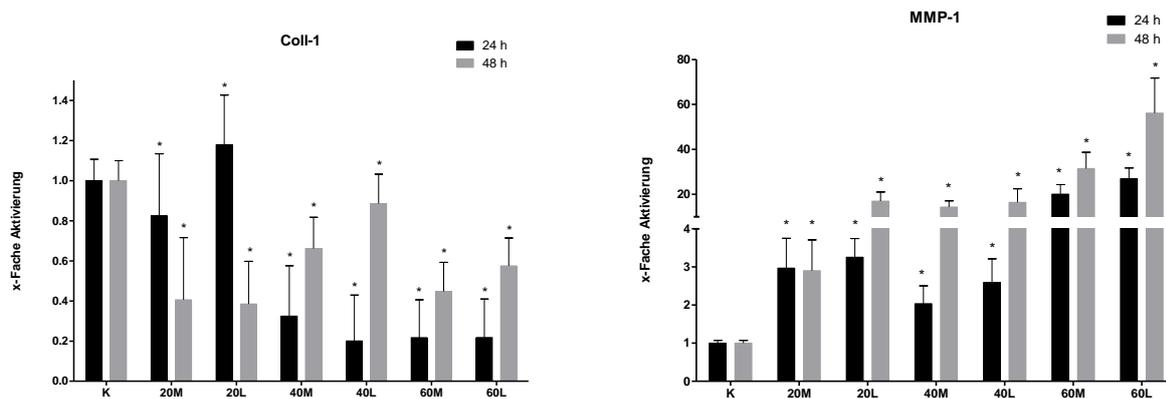


Abbildung 15: Genexpressionsanalyse der im Kollagenstoffwechsel beteiligten Metabolite **MMP-1** und **Coll-1** aus den Fibroblasten (9F0889, 9F0438, 231340, 7F3943, 7F3950, 2F0621) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24, 48h) nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVA₁-Dosen (Kontrolle, 20, 40, 60 J/cm²) mit beiden Systemen (M: MHL und L: LED).

Die Abbildung 15 zeigt die Genexpressionsanalysen der beiden, am Kollagenstoffwechsel wesentlich beteiligten Biomarker MMP-1 und Kollagen-Typ I. Im Vergleich zur Kontrolle weist die Genexpression von MMP-1 signifikante Veränderungen nach UVA₁-Bestrahlung bei Fibroblasten auf, welche sowohl mit LED-UVA₁ (360-400 nm) als auch mit MHL-UVA₁ (340-400 nm) behandelt wurden. Ausgenommen der Zellen, die mit einer Dosis von 40 J/cm² 24h nach Bestrahlung untersucht wurden, konnten deutlich höhere Aktivierungsraten mit steigenden UVA₁-Bestrahlungsintensitäten beobachtet werden. Dies wurde vor allem nach 48h deutlich. Hier zeigten die mit LED-UVA₁ bestrahlten Zellen eine durchgehend höhere Aktivierung des MMP-1-Gens als die mit MHL-UVA₁ bestrahlten Fibroblasten. Verglichen mit der auf 1 gesetzten Kontrolle, konnte bei der Dosis von 60 J/cm² nach 48h bei den mit MHL-UVA₁ bestrahlten Zellen eine um 31,5% erhöhte Expression des Gens erreicht werden und eine um 56,6% gesteigerte Aktivierung bei den mit LED-UVA₁ bestrahlten Zellen.

Bei der Genexpression von Kollagen-Typ I zeigte sich der therapeutisch gewünschte gegenteilige Effekt und die Coll-1 Synthese nach UVA₁-Bestrahlung reduzierte sich. Die einzigen Ausnahmen stellen hier die 24h nach Bestrahlung untersuchten Fibroblasten dar, welche mit 20 J/cm² mit LED-UVA₁ bestrahlt wurden (20L). Nach 48h jedoch fällt der Wert deutlich unterhalb des Wertes der Kontrolle ab. Ähnlich verhält es sich bei der mit der gleichen Dosis aber mit MHL-UVA₁ bestrahlten Gruppe

(20M). Auch hier reduziert sich der Wert nach 48h deutlich, verglichen zur Kontrolle. Kontrovers verhält es sich bei den beiden anderen Bestrahlungsdosen 40 J/cm² und 60 J/cm². Hier kommt es unabhängig vom Gerätetyp in beiden Gruppen nach signifikanter Reduktion der Expression nach 24h, zu leicht ansteigenden Aktivierungsraten nach 48h, wobei kein Wert das Kontrollniveau erreicht. Eine höhere Dosis von UVA₁ verursachte aber im Allgemeinen eine tendenziell geringere Aktivierung von Kollagen-Typ I.

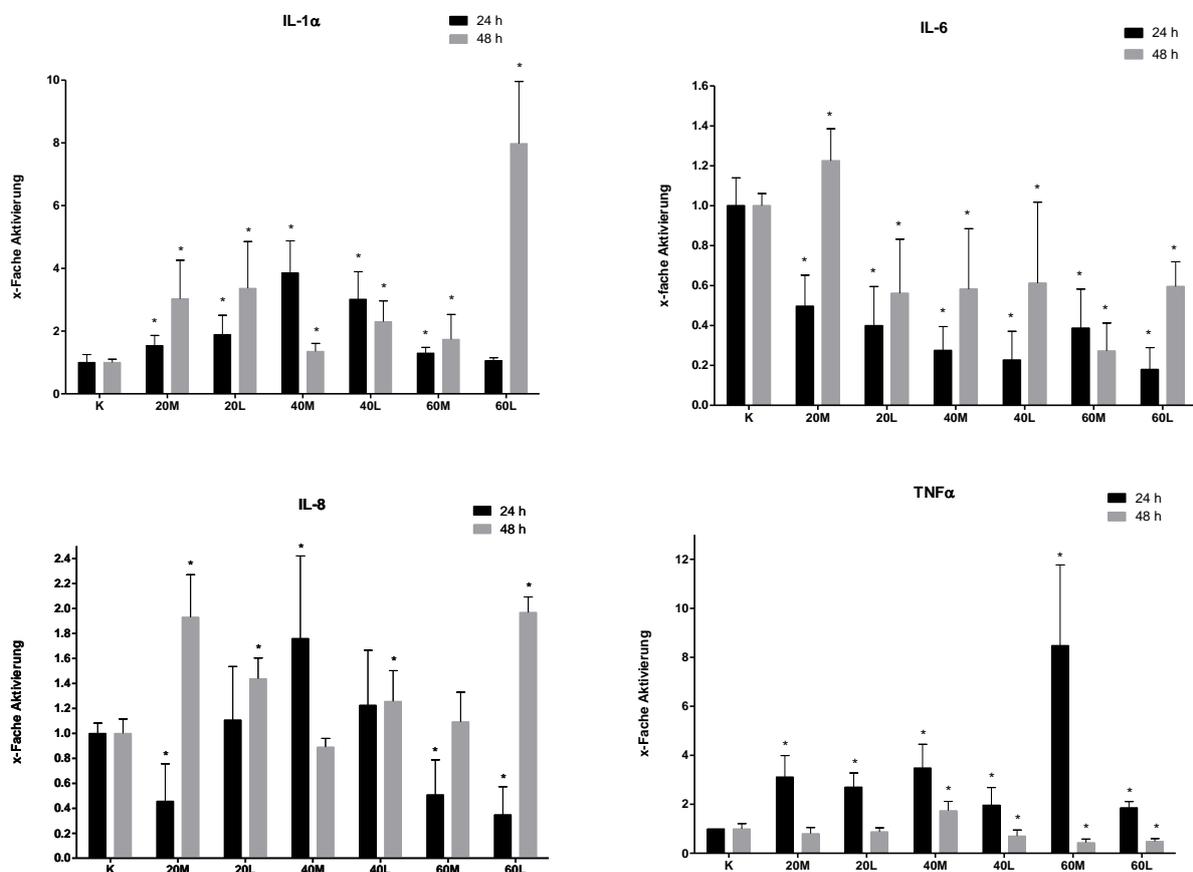


Abbildung 16: Genexpressionsanalysen der Zytokine IL-1α, IL6, IL-8 und TNFα aus den Fibroblasten (9F0889, 9F0438, 231340, 7F3943, 7F3950, 2F0621) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24, 48h) nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVA₁-Dosen (Kontrolle, 20, 40, 60 J/cm²) mit beiden Systemen (M: MHL und L: LED).

Auf den ersten Blick verursachte die UVA₁-Bestrahlung der humanen Fibroblasten hinsichtlich der zytokinregulierten immunmodulatorischen Effekte (Abbildung 16) eine deutliche Erhöhung der IL-1 α - und TNF α -Konzentration, gering erhöhte bis reduzierende Expression von IL-8 und durchgehend hemmende Wirkung auf die IL-6 Synthese. Auch bei dieser Auswertung wurde die unbestrahlte Kontrolle auf 1 gesetzt, um Vergleiche mit den anderen Werten ziehen zu können.

IL-1 α und TNF α zeigten die deutlichsten Steigerungen der Zytokinproduktion nach UVA₁-Einwirkung. Bekanntlich verhalten sich beide als Stimulus des jeweils anderen. Während IL-1 α jedoch nach 24h sowie nach 48h eine erhöhte Synthese aufweist, ist dies bei TNF α nur nach 24h der Fall. Im Zeitraum zwischen 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung sinkt die Zytokinproduktion anschließend deutlich ab unter anderem teilweise signifikant bis unterhalb des Kontrollniveaus. Im Hinblick auf die Dosisabhängigkeit und auf das Spektrum konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Werten wie auch zwischen den beiden Bestrahlungsgeräten beobachtet werden.

Deutlich unklarer zeigte sich das Ergebnis der Genexpressionsanalyse der IL-8-Expression unter UVA₁-Einwirkung. Betrachtet man die Aktivierung 24 Stunden nach Bestrahlung, so liegt der höchste Wert mit 1,76-fach erhöhter Zytokinproduktion bei 40 J/cm² unter MHL-UVA₁ Bestrahlung, dahinter die mit 40 J/cm² (1,22-fach) und 20 J/cm² (1,1-fach) LED-UVA₁ bestrahlten Fibroblasten. Die restlichen Werte liegen bei ungefähr 0,5-facher Aktivierung deutlich unterhalb des Kontrolllevels. Anders verhielt es sich bei den Ergebnissen 48 Stunden nach UVA₁. Außer bei den Proben, die mit 40J/cm² mit MHL-UVA₁ behandelt wurden, konnte bei allen anderen Werten ein leichter bis deutlicher Anstieg der Aktivierungsrate beobachtet werden.

Interleukin 6 wurde als einziger Marker unter den proinflammatorischen Zytokinen in den hier ausgewerteten Experimenten nach UVA₁-Bestrahlung in seiner Bioaktivität gehemmt. Neben der nach 48h entnommenen Probe, die mit 20 J/cm² mit breitem Spektrum bestrahlt wurde, liegen alle anderen Werte deutlich und signifikant unterhalb des Kontrollniveaus und verzeichnen eine reduzierte Aktivierungsrate 24 Stunden als auch 48 Stunden nach UVA₁-Exposition. Tendenziell konnten keine großen Unterschiede zwischen den beiden Geräten festgestellt werden. Allerdings fällt auf, dass bei den Proben, die mit MHL-UVA₁ (340-400 nm) bestrahlt wurden

nach 24h keine großen Unterschiede untereinander festzustellen sind. Nach 48h ergibt sich im Verlauf jedoch ein deutlicher Abstand, im Anbetracht dessen die höhere UVA₁-Dosis auf eine Reduzierung der Zytokinproduktion schließen lässt. Vergleicht man die Werte, welche mit LED-UVA₁ (360-400 nm) bestrahlt wurden, so kann man nach 24h eine reduzierende Wirkung auf die Aktivierungsrate mit steigender UVA₁-Dosis beobachten. Wiederum ist nach 48h eine fast identische Aktivierung von Interleukin 6 dosisunabhängig festzustellen.

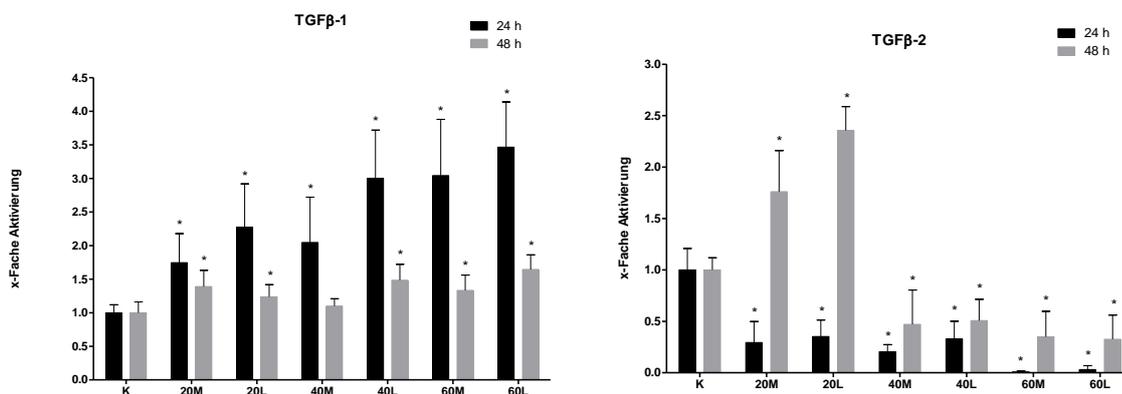


Abbildung 17: Genexpressionsanalysen der Wachstumsfaktoren TGFβ-1 und TGFβ-2 aus den Fibroblasten (9F0889, 9F0438, 231340, 7F3943, 7F3950, 2F0621) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24h, 48h) nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVA₁-Dosen (Kontrolle, 20, 40, 60 J/cm²) mit beiden Systemen (M: MHL und L: LED).

Die Auswertung der Genexpressionsanalysen der beiden Wachstumsfaktoren TGFβ-1 und TGFβ-2 (Abbildung 17) zeigte eine deutliche Aktivierungssteigerung von TGFβ-1 im zeitlichen Verlauf innerhalb der 24 Stunden nach UVA₁-Bestrahlung. Hierbei konnte sowohl eine Dosis- als auch eine gerätespezifische Abhängigkeit festgestellt werden. Fibroblasten, die mit dem LED-UVA₁-Gerät bestrahlt wurden, exprimierten dabei stets höhere TGFβ-1-Werte als Fibroblasten, welche bei gleicher Bestrahlungsintensität mit dem MHL-UVA₁-Gerät behandelt wurden. So zeigte sich verglichen zur Kontrolle bei den mit hoher Dosis (60 J/cm²) bestrahlten Fibroblasten eine 3-fache Aktivierung bei den mit MHL-UVA₁ bestrahlten Zellen (340-400 nm) und eine 3,5-fache Erhöhung bei den Fibroblasten, die mit LED-UVA₁ (360-400 nm) behandelt wurden. Nach 48

Stunden konnte dieser Effekt jedoch nicht mehr beobachtet werden und alle Werte lagen auf einem ähnlichen Niveau, welches sich durchschnittlich bei allen Bestrahlungsdosen und -spektren gering über dem Kontrollniveau bewegte. Hierbei konnten keine eindeutigen dosis- und spektrenabhängigen Unterschiede festgestellt werden.

Während durch UV-Strahlung die TGF β -1-Synthese erhöht wird, führt sie unterdessen bei der TGF β -2 Produktion zur rapiden Reduktion. Dieser Effekt zeigte sich deutlich 24 Stunden nach Bestrahlung mit UVA₁. Signifikant erniedrigte Werte wurden mit der hohen Dosis 60 J/cm² bei beiden Geräten erreicht. Sie sanken auf eine bemerkenswert reduzierte Aktivierung von 0,01 bei dem MHL-UVA₁-Gerät und 0,03 bei dem LED-UVA₁-Gerät im Vergleich zu einer Aktivierung von 1 bei der Kontrolle ab. 48 Stunden nach UVA₁-Bestrahlung zeigten alle Werte der mit 40 J/cm² Mitteldosis und 60 J/cm² Hochdosis bestrahlten Fibroblasten noch immer reduzierte Aktivierungsraten, wobei keine Unterschiede zwischen den Bestrahlungsspektren vorhanden waren. Die mit 20 J/cm² niedrig dosierter UVA₁-Strahlung behandelten Fibroblasten jedoch zeigten nach 48h eine signifikant gesteigerte Aktivierung von TGF β -2. Dies ist bei beiden Spektren (360-400 nm und 340-400 nm) zu beobachten.

Für die Genexpressionsanalysen der Keratinozyten (HEKn) wurden, mit Ausnahme der am Kollagenstoffwechsel beteiligten Proteine MMP-1 und Kollagen-Typ 1, die gleichen Marker verwendet. Beide Moleküle werden ausschließlich in der Dermis exprimiert und spielen somit bei den Keratinozyten in der Epidermis keine Rolle. In die Auswertung der Keratinozyten flossen die Expressionsergebnisse von HEK's aus 5 unabhängigen Experimenten ein.

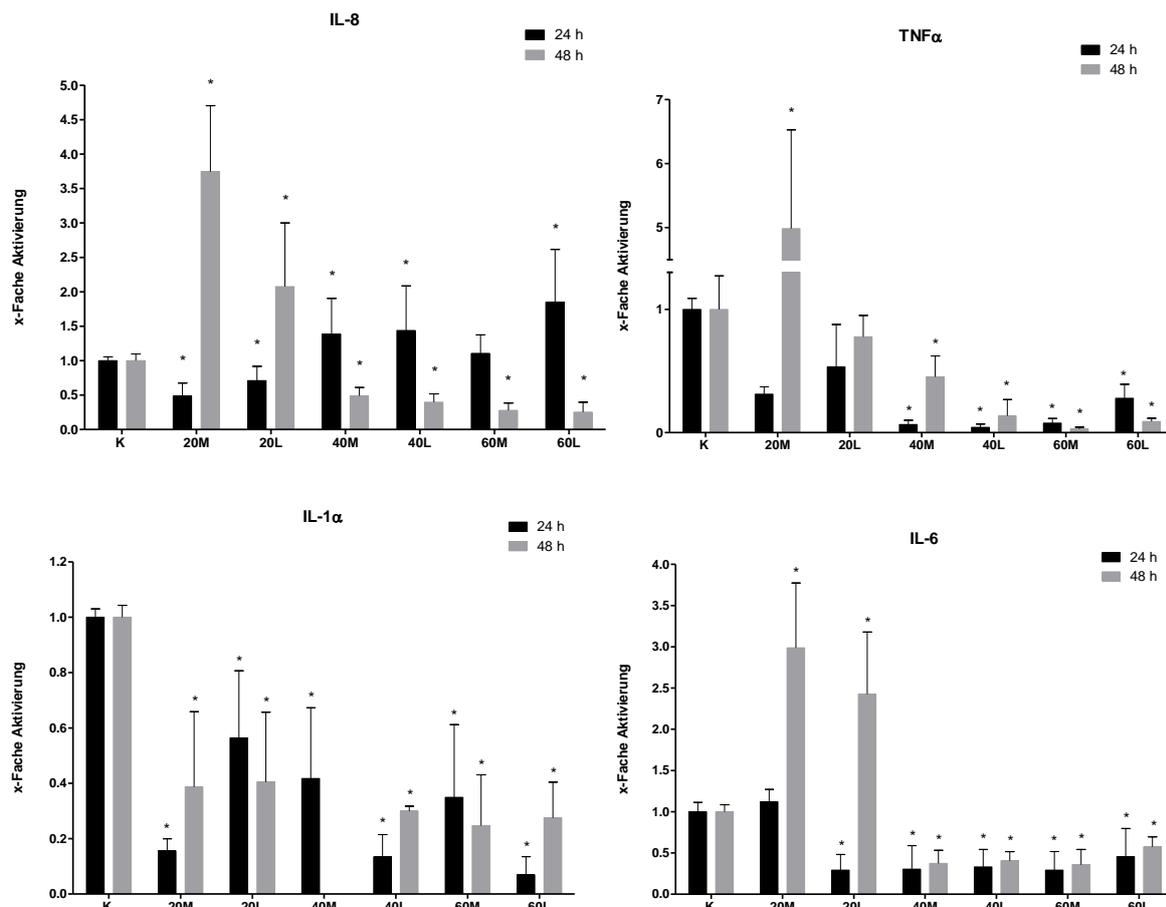


Abbildung 18: Genexpressionsanalysen der Zytokine IL-1 α , IL6, IL-8 und TNF α aus den Keratinozyten (HEKns) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24h, 48h) nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVA₁-Dosen (Kontrolle, 20, 40, 60 J/cm²) mit beiden Systemen (M: MHL und L: LED).

Mit UVA₁ bestrahlte Keratinozyten ergaben bei den Genexpressionsanalysen entzündungsfördernder Zytokine signifikant erniedrigte IL-1 α Aktivierungsraten (Abbildung 18). Eine Abhängigkeit zwischen Aktivierungsraten und Bestrahlungsspektren sowie Bestrahlungsdosis wurden weder nach 24 Stunden noch 48 Stunden nach UVA₁-Einwirkung beobachtet. Auch 48 Stunden in Folge der UVA₁-Bestrahlung zeigten die Keratinozyten deutlich reduzierte IL-1 α Syntheseraten, die durchschnittlich unterhalb des Wertes 0,4 verglichen zur Kontrolle von 1 lagen. Dies verdeutlicht die starke Abnahme der IL-1 α -Produktion bei Keratinozyten in Folge der UVA₁-Bestrahlung.

Ähnlich wurde dieser Effekt auch bei der IL-6-Aktivierungsrate beobachtet. Mit Ausnahme der niedrig-dosiert (20 J/cm^2) bestrahlten Keratinozyten beider Spektren, die sowohl bei der IL-6 Synthese als auch bei den beiden weiteren Zytokinen IL-8 und TNF α ein sich vom Durchschnitt deutlich abweichendes Resultat erbrachten, zeigten alle anderen Werte eine signifikante Reduzierung der IL-6-Produktion an. Deutlich über den Kontrollwerten lagen die Aktivierungsraten der IL-6-Produktion mit 3-facher Erhöhung bei den mit MHL-UVA $_1$ bestrahlten Keratinozyten und mit 2,4-facher Steigerung bei mit LED-UVA $_1$ behandelten Keratinozyten nach 48 Stunden. Insgesamt jedoch zeigte sich eine tendenziell deutlich reduzierende Wirkung von UVA $_1$ -Strahlung auf die IL-6-Produktion bei den Keratinozyten.

Interleukin 8 zeigte ein ähnliches Bild, mitsamt der niedrig-dosiert bestrahlten Keratinozyten-Werte, welche auch hier eine starke Abweichung verglichen mit den anderen Bestrahlungsdosen ergaben. Hervorzuheben ist hier jedoch der Wandel in der IL-8-Produktion nach UVA $_1$ -Bestrahlung epidermaler Keratinozyten. Nach anfänglicher Stimulation der IL-8-Synthese 24 Stunden nach UVA $_1$ -Einwirkung folgten nach 48 Stunden signifikant erniedrigte Aktivierungsraten in der Zytokinsynthese.

Hierbei führten die höherdosierten (60 J/cm^2) UVA $_1$ -Bestrahlungen zu leicht niedrigeren Werten im Vergleich zu den niedriger dosierten (40 J/cm^2) UVA $_1$ -Bestrahlungen bezogen auf die Kontrolle.

Auch für TNF α ergaben sich, außer bei den mit nur 20 J/cm^2 bestrahlten Keratinozyten, signifikant niedrigere Aktivierungsraten im Vergleich zur aufgeführten Kontrolle sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden nach UVA $_1$ -Bestrahlung.

Abbildung 19 zeigt die Genexpressionsanalysen der beiden Wachstumsfaktoren TGF β -1 und TGF β -2 nach UVA $_1$ -Einwirkung auf epidermale Keratinozyten. Hierbei zeigte sich vor allem bei TGF β -1 ein gegenteiliges Bild, verglichen zu den Genexpressionsanalysen der Fibroblasten (Abbildung 17).

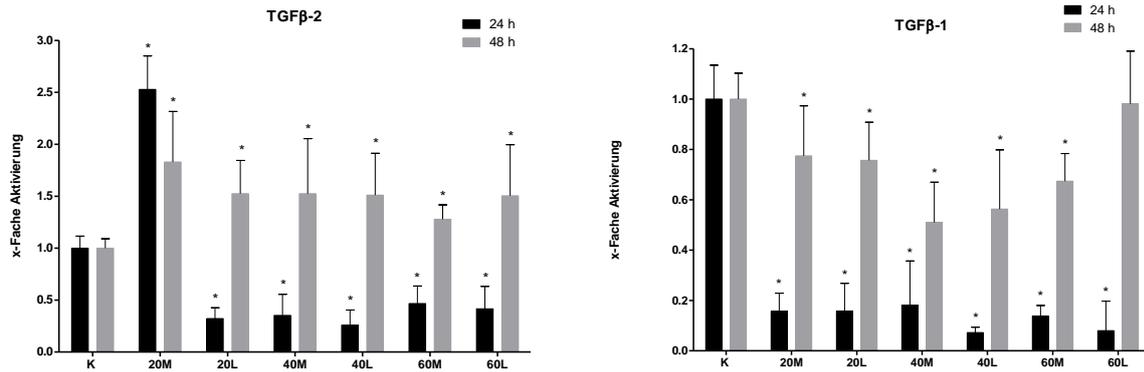


Abbildung 19: Genexpressionsanalyse der Wachstumsfaktoren TGFβ-1 und TGFβ-2 aus den Keratinozyten (HEKn) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24h, 48h) nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVA₁-Dosen (Kontrolle, 20, 40, 60 J/cm²) mit beiden Systemen (B: breites Spektrum; S: schmales Spektrum).

Der für Fibrosen besonders wichtige Biomarker TGFβ-1 zeigte nach der UVA₁-Bestrahlung von Keratinozyten eine signifikante Reduzierung der Zytokin-Aktivierung. Diese Wirkung infolge von UVA₁-Licht konnte besonders nach 24 Stunden beobachtet werden. Hier exprimierten die Keratinozyten bis zu 93% weniger TGFβ-1 (siehe 40S - 40 J/cm² LED-UVA₁). Nach 48 Stunden wurde wiederum eine deutliche Zunahme der Aktivierungsraten beobachtet, die Werte erreichten allerdings das mit 1 festgelegte Kontrollniveau nicht. Lediglich die höher dosiert, mit LED-UVA₁ bestrahlten Keratinozyten zeigten nach 48 Stunden eine 0,98-fache Aktivierung von TGFβ-1.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der TGFβ-2-Expression bei UVA₁-bestrahlten Keratinozyten zeigten allesamt ähnliche Tendenzen bis auf eine Ausnahme bei den niedrig dosiert mit MHL-UVA₁ behandelten Zellen. Im Allgemeinen wurden sinkende Aktivierungsraten 24 Stunden nach Bestrahlung beobachtet. Nach 48 Stunden jedoch stiegen sie deutlich an und lagen signifikant oberhalb des Kontrollniveaus. Mit Ausnahme der mit 20 J/cm² MHL-UVA₁ bestrahlten Keratinozyten zeigten sich sowohl nach 24h als auch nach 48h signifikant erhöhte Produktionsraten von TGFβ-2.

3.2 *In vivo* Untersuchungen: Molekulare und zelluläre Effekte von UVA₁ auf die Sklerodermie am Bleomycin-induzierten Fibrose Mausmodell

3.2.1 UVA₁-Bestrahlung der Versuchsmäuse

Um Wirkmechanismen der UVA₁-Bestrahlungen auch in lebendigen Organismen zu erforschen, wurden zusätzlich zu den Studien *in vitro* an Fibroblasten und Keratinozyten, Mäuse für Untersuchungen *in vivo* herangezogen. Dem Tierversuch liegt ein behördlich genehmigter Tierantrag mit der Nummer 55.2 DMS-2532-2-461 zugrunde.

Vor Beginn der UVA₁-Bestrahlung wurde das neue LED-UVA₁-Gerät im Rahmen einer Vorstudie bezüglich dosisabhängiger Erythem-Bildung getestet (Abbildung 20). Wie bei den Photoprovokations-Testungen, die bei Patienten vor einer UV-Behandlung absolviert werden, wurden fünf zuvor am Rücken rasierte Mäuse mit unterschiedlichen UVA₁-Dosen (20, 40, 60, 80, 100 J/cm²) bestrahlt. Alle Mäuse zeigten unmittelbar nach zweimaliger Bestrahlung keinerlei Erythem-Bildung und auch 24 Stunden nach Bestrahlung wurde keine Erythem-Bildung sichtbar. Diese Testung erfolgte ebenfalls für das in dieser Studie verwendete, bereits etablierte MHL-UVA₁ Gerät. Hautrötungen und Entzündungen nach Bestrahlung traten auch hier nicht auf. Somit konnten die *in vivo* Untersuchungen mit den beiden UVA₁-Geräten durchgeführt werden.

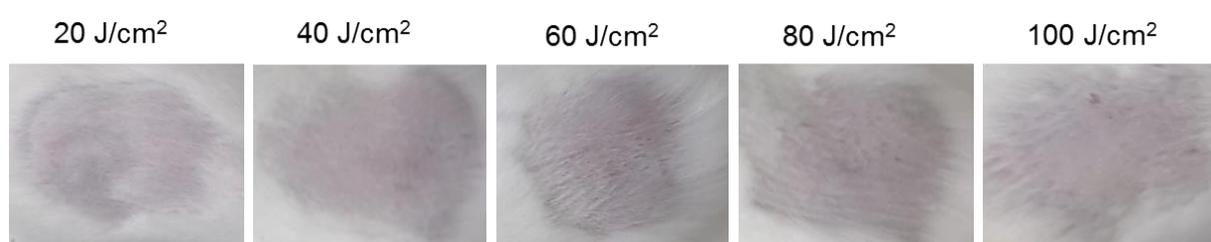


Abbildung 20: Erythem-Test mit dem LED-UVA₁-Gerät am Mäuserücken mit unterschiedlichen UVA₁-Lichtdosen. Dokumentation nach 24 Stunden.

Gemäß des durch Yamamoto beschriebenen Fibrose-Mausmodells wurden den Versuchsmäusen in dieser Studie subkutane, am Rücken lokalisierte, Bleomycin-Injektionen verabreicht, welche dort nach 28 Tagen eine dermale Fibrose verursachten (88). Im Vergleich zur Normalhaut wiesen die Mäuse

unterschiedliche Ausprägungen der Fibrose auf. Während sich bei manchen Mäusen lediglich die Entwicklung der für Sklerodermie typischen weißen indurierten Plaques beobachten ließ, zeigte sich bei anderen Mäusen eine bis hin zur Ulzeration der Haut führende Bindegewebsvermehrung (Abbildung 21). Eine Ulzeration entstand, wenn der Kollagengehalt der Dermis so stark zunahm, sodass die darüberliegende Epidermis dem Druck nicht standhielt und „aufplatzte“.

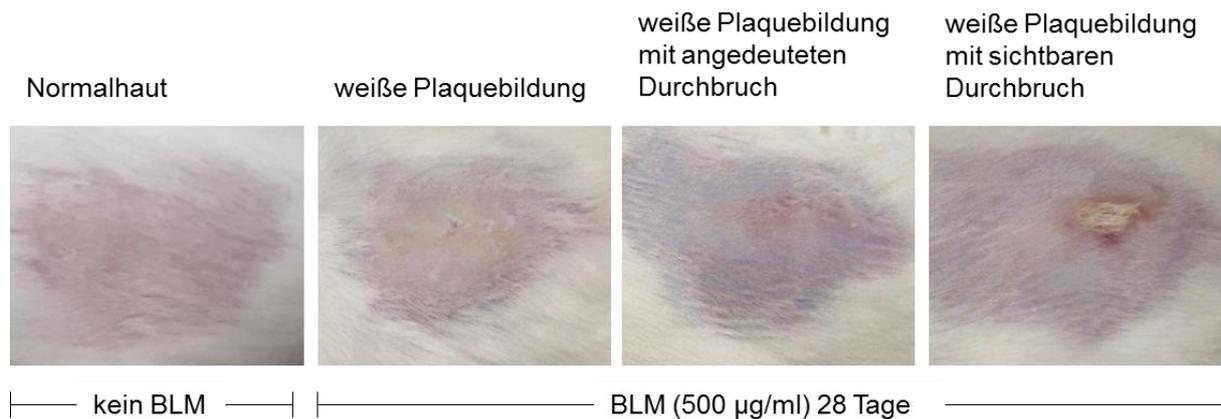


Abbildung 21: Vergleich Normalhaut mit BLM injizierten Fibrose-Mausmodell Hautarealen, welche nach 28 Tagen alle die typische weiße Plauebildung aufweisen, jedoch mit unterschiedlicher Ausprägung, z.T. mit Ulzeration (Durchbruch) der Haut durch den stark erhöhten Kollagengehalt in der Dermis.

Nach Entwicklung der Fibrose wurden entsprechende Versuchsgruppen mit verschiedenen Bestrahlungsintensitäten („medium-dose“ und „high-dose“) und jeweils mit unterschiedlichen Bestrahlungsgeräten (LED-UVA₁ oder MHL-UVA₁) behandelt. Insgesamt wurden 30 Sitzungen mit 5 Bestrahlungen pro Woche in einem Zeitraum von 6 Wochen durchgeführt, was der üblichen Bestrahlungshäufigkeit bei Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie entspricht. Dabei erhielten die mittel-dosierten Gruppen (60 J/cm²) eine kumulative Dosis von 1.800 J/cm² und die hoch-dosierten Gruppen (100 J/cm²) eine kumulative UVA₁-Dosis von 3.000 J/cm². Anschließend erfolgten die Gewebe-Asservierung und die Auswertung des Mausexperiments.

3.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen des fibrotischen Hautareals nach UVA₁-Bestrahlung

Neben den molekularen Analysen der mRNA des Mausgewebes, wurden auch histopathologische Verfahren eingesetzt. Somit konnte die Effektivität des Bleomycin-induzierten Fibrose-Mausmodells überprüft und die erfolgreiche Ausbildung der Sklerodermieareale bestätigt werden. Es wurden 3 Färbungen durchgeführt. Die Routinefärbung Hämatoxylin-Eosin, kurz H&E, sollte als Standardfärbung einen ersten Überblick über den Querschnitt der einzelnen Hautschichten des umschriebenen Hautareals vermitteln. Daneben wurden eine Sirius Red- und eine α SMA-Färbung angefertigt. Sirius Red färbt fibrilläres Kollagen-Typ I rot an und soll die in den Versuchsgruppen unterschiedliche Ausprägung der Fibrose anhand des Kollagengehalts im histologischen Querschnitt der Haut veranschaulichen. Zudem wurde eine spezielle Antikörperfärbung als Proteinnachweis gegen α SMA durchgeführt. Sie färbt aktivierte Myofibroblasten rot und stellt ihre gesteigerte Aktivität im Vergleich zu Normalfibroblasten, die kein α SMA exprimieren, dar. Hiermit kann der unterschiedliche Status des Umwandlungsprozesses von Fibroblasten in aktivierte Myofibroblasten und der damit verbundene pro-fibrotische Effekt in den einzelnen Versuchsgruppen beobachtet werden, der bei dem durch Bleomycin-induzierten Sklerodermie-Modell bei Mäusen zustande kommt (91). Ebenfalls rot gefärbt wird dabei jedoch auch das in den Muskeln enthaltene Aktin, welches in diesem Fall die unterhalb des Fettgewebes liegende Muskulatur sowie die Mm. arrectores pilorum der dermalen Haarfollikel und die vaskuläre Gefäßmuskulatur anfärbt. Um den Unterschied herauszustellen, wurden Myofibroblasten (Abbildungen 22-28) mit einem durchgängig linierten Pfeil markiert und Muskel enthaltende Gebilde wie beispielsweise Gefäße und Muskelanschnitte wurden mit gestrichelten Pfeilen gekennzeichnet.

Im Folgenden wurde für jede Versuchsgruppe (Tabelle 3) jeweils ein repräsentatives Histologiepräparat ausgewählt, welches den Gewebestatus der Haut innerhalb der Gruppe darstellt. Anschließend wurden die Schnitte mittels des Histologie-Scanners von PreciPoint® eingelesen und mithilfe der dazugehörigen Software View Point® Programm graphisch visualisiert.

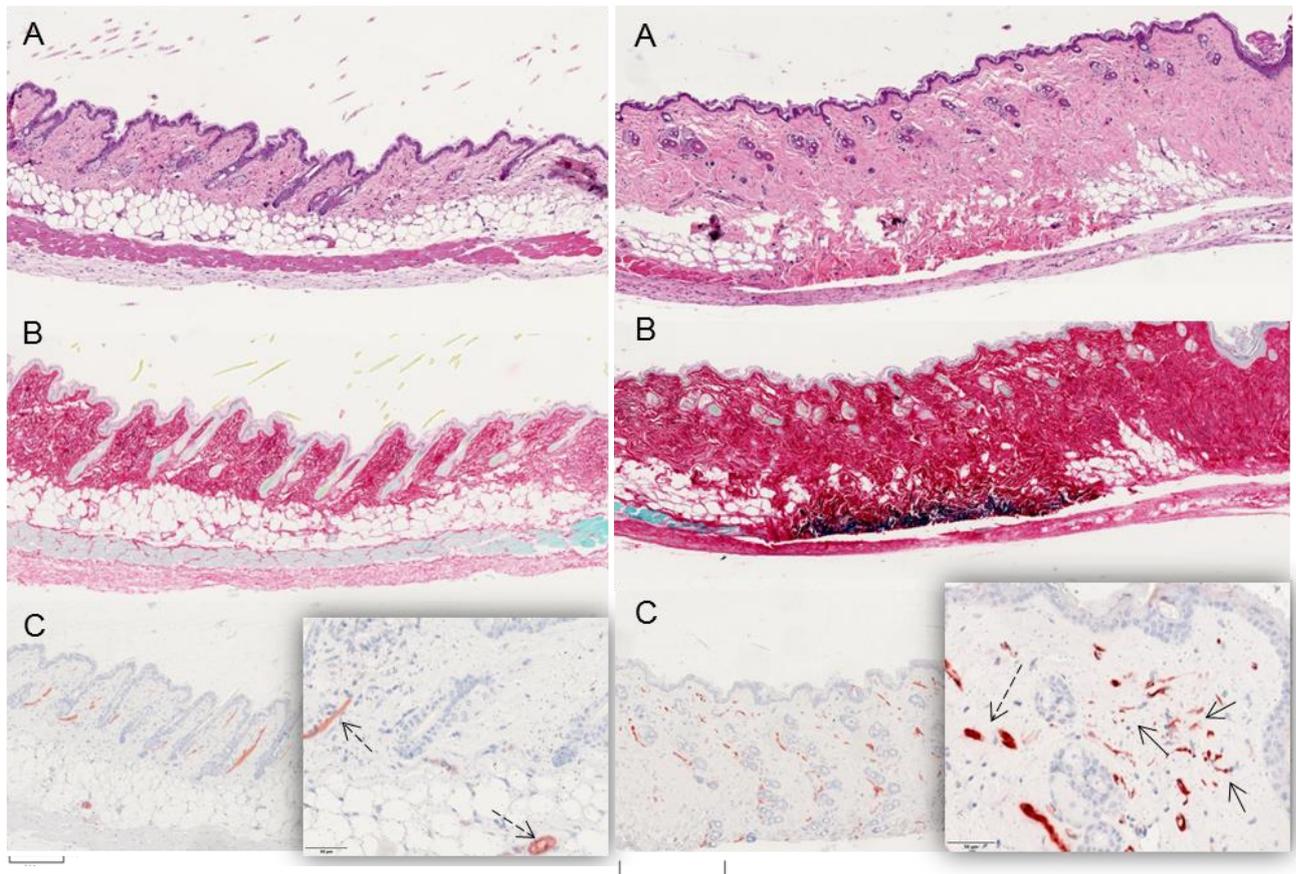


Abbildung 22 und 23: Histologische Färbungen und Immunhistochemische Analyse der Kontrollgruppen 1 (links; unbehandelt) und 2 (rechts; 28 Tage BLM). **A.** Hämatoxylin-Eosin- **B.** Sirius Red- und **C.** α SMA-Färbung. Maßstabsleiste zeigt links 200 μ m und rechts 500 μ m. Erkennbar ist ferner die typische Schräglage der Haarfollikel im murinen Modell.

Abbildung 22 stellt die unbehandelte Kontrollgruppe dar, die als Normalhaut und somit als Vergleichswert diente. Daneben in Abbildung 23 zeigt sich die ausgeprägte dermale Fibrose in der Kontrollgruppe 2 als Folge der 28-tägigen BLM-Injektion. Deutlich sichtbar ist im direkten Vergleich, bereits im H&E- aber vor allem am Sirius Red-Schnittpräparat (A und B), die verdickte Dermis erkennbar als Folge der gesteigerten Kollagensynthese im rechten Bild und damit einhergehend auch das Verdrängen der Fettzellen in der Dermis zur Tiefe hin. Während Myofibroblasten in der α SMA-Färbung bei Gruppe 1 nicht zu beobachten sind, sondern lediglich Aktin-Anfärbungen von Muskelgebilden, zeigt Gruppe 2 im vergrößerten Ausschnitt einen Herd an aktivierten Myofibroblasten. Deutlich sichtbar in Abbildung 23 ist zudem die Rarefizierung der Haarfollikel.

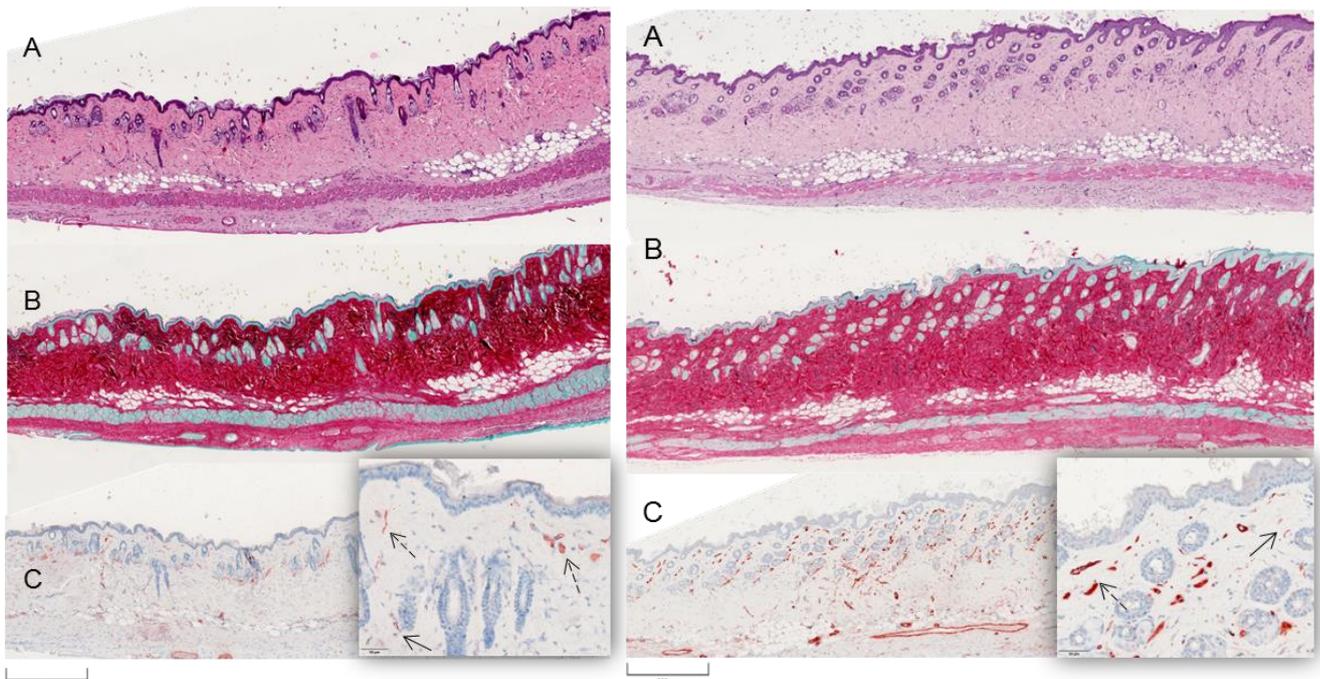


Abbildung 24 und 25: Histologische Färbungen und Immunhistochemische Analyse der mit Hochdosis (100 J/cm^2) bestrahlten Versuchsgruppen 3 (links; MHL-UVA₁) und 4 (rechts; LED-UVA₁).

A. Hämatoxylin-Eosin Färbung **B.** Sirius Red Färbung und **C.** α SMA Färbung. Maßstabsleiste zeigt bei beiden $500 \mu\text{m}$.

Beide histologischen Schnittpräparate wurden aus den Gruppen der mit hoher UVA₁-Dosis (100 J/cm^2) bestrahlten Mäuse ausgewählt. Vergleichend zur Abbildung 23 konnte hier bereits ein deutlicher Rückgang der dermalen Fibrose festgestellt werden. Erkennbar ist dieser Vorgang anhand des sichtbar werdenden Heranwachsens der Fettzellen in den unteren Hautschichten knapp unterhalb der Dermis und der Abnahme der Dermisdicke. Auch bemerkenswert ist der deutliche Zuwachs an Adnexstrukturen wie Haarfollikel und Schweißdrüsen, welche im Rahmen der dermalen Fibroseinduktion stark zurückgegangen waren (Vergleich Abbildung 23 und Abbildung 28). In der α SMA-Färbung zeigten sich vereinzelt noch Myofibroblasten, wobei neu gebildete Gefäße und die dadurch gefärbten Gefäßstrukturen deutlich überwogen.

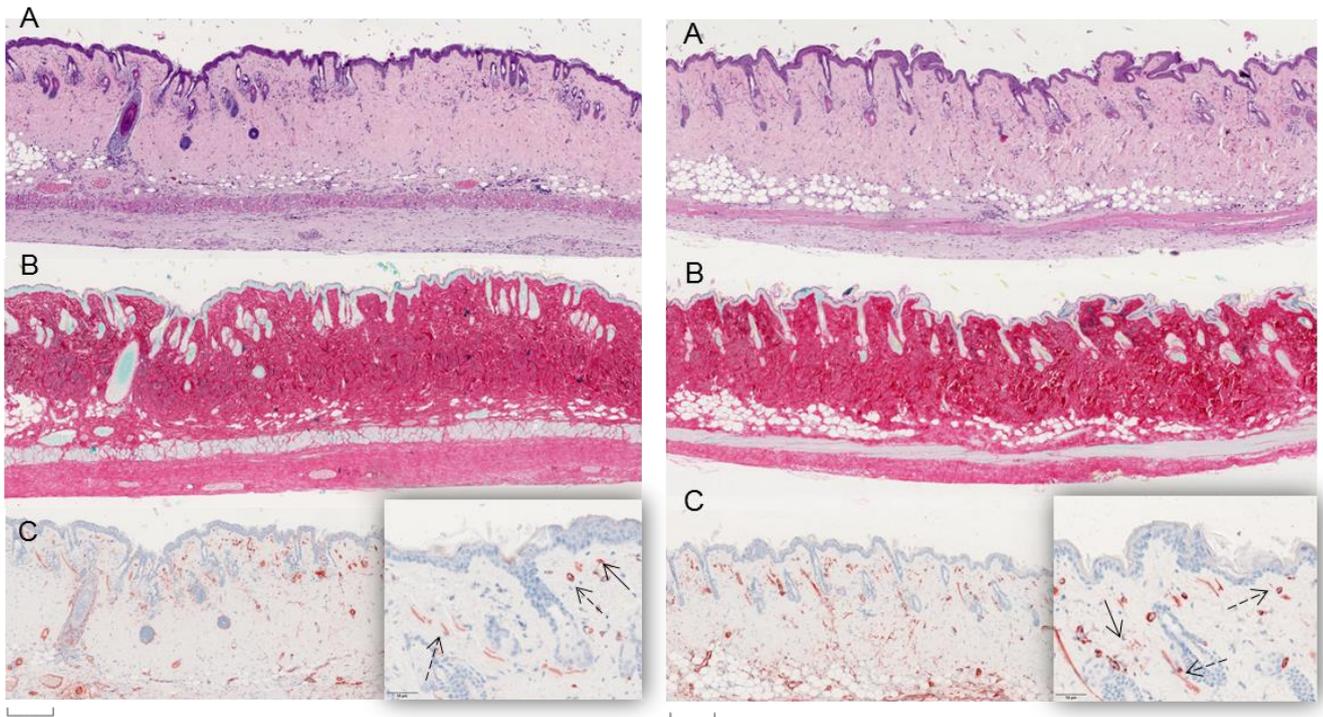


Abbildung 26 und 27: Histologische Färbungen und Immunhistochemische Analyse der mit Mitteldosis (60 J/cm^2) bestrahlten Versuchsgruppen 5 (links; MHL-UVA₁) und 6 (rechts; LED-UVA₁).

A. Hämatoxylin-Eosin Färbung **B.** Sirius Red Färbung und **C.** alphaSMA Färbung. Maßstabsleiste bei beiden Abbildungen $200 \mu\text{m}$.

Die mit Mitteldosis bestrahlten Mäusegruppen zeigten, im Gegensatz zu den bereits stark veränderten Mäusegruppen mit hoher Dosis, immer noch einen deutlich stärkeren Kollagengehalt in der Dermis. Die zwar im Vergleich zu den Fibrose Kontrollgruppen 2 und 7 (Abbildung 23 und Abbildung 28) reduzierte, aber immer noch gesteigerte Aktivität der Myofibroblasten spiegelte sich auch in der αSMA -Färbung sichtbar wider. Die Hautareale der Mäuse aus Gruppe 6, welche mit LED-UVA₁ bestrahlt wurden, lassen jedoch bereits einige Auflockerungen im Gewebe erkennen, welche auch durch die beginnende Repopulation mit Fettzellen ersichtlich wird (Abbildung 27). Geringer ausgeprägt ist dies auch bei Gruppe 5 ersichtlich (Abbildung 26).

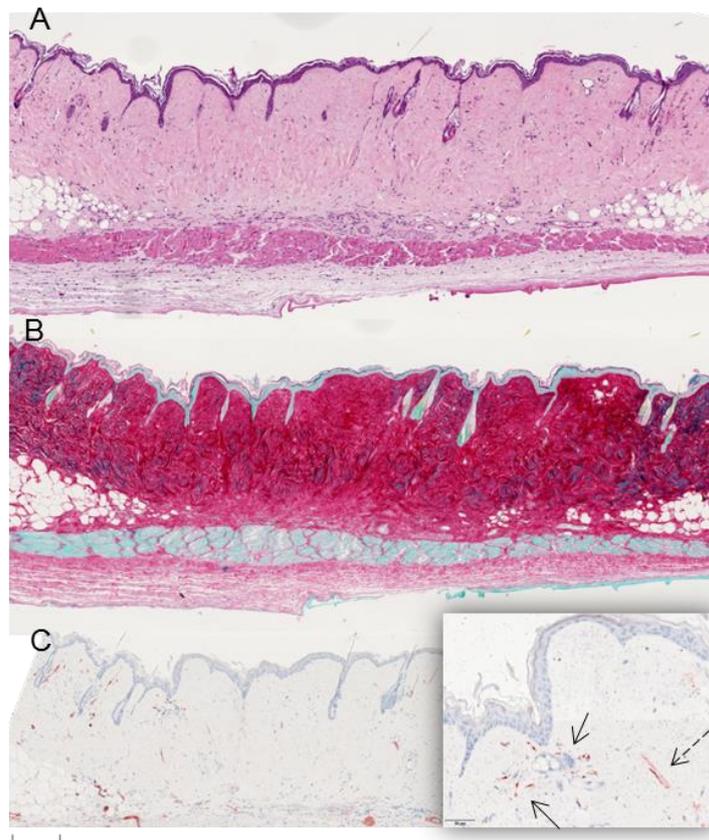
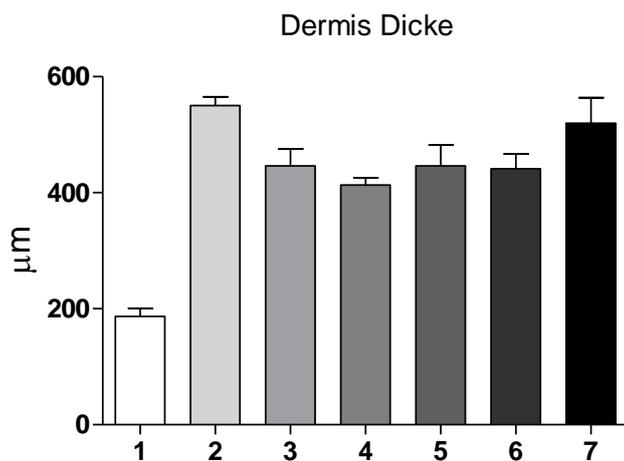


Abbildung 28: Histologische Färbungen und Immunhistochemische Analyse der Kontrollgruppe 7 (BLM über gesamte Versuchsdauer). **A.** Hämatoxylin-Eosin Färbung **B.** Sirius Red Färbung und **C.** alphaSMA Färbung. Maßstabsleiste bei beiden Abbildungen 200 μm .

Die Gruppe 7 wurde nicht bestrahlt, während des gesamten Versuchszeitraumes aber kontinuierlich mit Bleomycin behandelt, im Gegensatz zu der begrenzten Zeit von 28 Tagen bei Kontrollgruppe 2. Dies war nötig, um mögliche regenerierende Prozesse durch das Absetzen des Fibrose-Induktors ausschließen zu können. Somit diente vor allem diese Gruppe als wichtigster Vergleichs- und Bezugswert für alle anderen mit UVA₁ behandelten Gruppen (3-6). Deutlich sichtbar in den Bildern A und B ist die ausgeprägte Fibrose und das Fehlen des Fettgewebes sowie die Abnahme der sonst zahlreichen Hautadnexe. In der αSMA -Färbung sind aktivierte Myofibroblastenansammlungen zu beobachten, die in der dickgepackten kollagenhaltigen Dermis zahlreich, aber klein erscheinen.

3.2.3 Vermessung der Dermisdicke



Gruppe	Behandlung
1	Kontrolle unbestrahlt
2	BLM 28 Tage unbestrahlt
3	BLM MHL-UVA ₁ 100 J/cm ²
4	BLM LED-UVA ₁ 100 J/cm ²
5	BLM MHL-UVA ₁ 60 J/cm ²
6	BLM LED-UVA ₁ 60 J/cm ²
7	Kontrolle BLM unbestrahlt (über gesamten Versuchszeitraum)

Abbildung 29: links: Ergebnis der Dermisvermessung; rechts: Übersicht der Versuchsgruppen einschließlich ihrer jeweiligen Behandlung.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, wurde pro Schnittpräparat der Versuchsgruppen 5 Messungen (n=5) der Dermis vorgenommen, welche durch eine Mittelwertbildung innerhalb der jeweiligen Gruppe zusammengefasst wurden.

Die Dermisvermessung zeigt neben den histologischen Bildern den Status der dermalen Fibrose bei den Versuchsmäusen nach Bleomycin-Injektion und anschließend erfolgter UVA₁-Behandlung auf. Die Dermis der Kontrollgruppe 1 weist eine normale Dicke von ungefähr 200 µm im Mittel auf. Deutlich sichtbar wurden hier die Unterschiede zu den anderen Versuchsgruppen, welche mit Bleomycin behandelt wurden und dadurch eine ausgeprägte Fibrose entwickelten. Die Kontrollgruppen 2 und 7, welche keiner UVA₁-Behandlung unterzogen wurden, zeigten die höchste Dermisdicke und erreichten Maxima knapp unter 600 µm. Die Gruppen 3 und 4, welche mit 100 J/cm² bestrahlt wurden, zeigten im Vergleich zu den beiden Gruppen 5 und 6, welche mit 60 J/cm² behandelt wurden, eine leicht verringerte Dicke der Dermis. Die mit LED-UVA₁ bestrahlten Mäuse wiesen im Trend eine leicht schmalere Dermisdicke auf im Gegensatz zu den mit MHL-UVA₁ bestrahlten Mäusen.

3.2.4 Genexpressionsanalysen des fibrotischen Hautareals nach UVA₁-Bestrahlung

Im Anschluss an die UVA₁-Bestrahlung der fibrotischen Hautareale am Rücken wurden die Hautgewebeproben der Versuchsmäuse, welche Epidermis und Dermis beinhalteten, für molekularbiologische Untersuchungen weiter aufgearbeitet. Nach RNA-Isolation und Reverse Transkription erfolgten Expressionsanalysen von den Genen MMP-1, Coll-1, TGF β -1, TGF β -2 und α SMA mittels LC-Technologie. Es erfolgte eine Auswertung der einzelnen Versuchsgruppen (Tabelle 3) mithilfe der Software Graph Pad Prism®. Durch das bereits anhand der histomorphologischen Untersuchungen an den Schnittpräparaten sowie in den Dermisvermessungen bestätigte Fibrose-Mausmodell der einzelnen Versuchsgruppen bzw. Kontrollgruppen konnten in den folgenden Genexpressionsanalysen der biologischen Marker die Kontrollgruppen 1,2 und 7 vernachlässigt werden. Somit sollten die *in vivo* Genexpressionsanalysen primär die Auswirkung der UVA₁-Strahlung der beiden unterschiedlichen Spektren auf die Versuchsgruppen 3,4,5 und 6 aufzeigen, welche die UVA₁-Behandlung nach Fibroseinduktion durch Bleomycin-Injektionen erhielten. Aufgrund dessen wurde vordergründig der in dieser Arbeit thematisierte Unterschied zwischen den beiden UVA₁-Spektren LED-UVA₁ (360-400 nm) und MHL-UVA₁ (340-400 nm) hervorgehoben und untersucht. Hierzu wurden die beiden bei der UVA₁-Bestrahlung verwendeten unterschiedlichen Dosen (60 J/cm² und 100 J/cm²) gegenübergestellt und jeweils in Bezug auf ihr Spektrum miteinander verglichen. Dazu wurden Signifikanz- bzw. ungepaarte t-Tests ($p < 0.05$) beider jeweiligen UVA₁-Dosen berechnet und signifikante Unterschiede mit einem * gekennzeichnet.

Die in der Einleitung bereits erwähnten und in den *in vitro* Studien ebenfalls analysierten biologischen Marker, welche besonders relevant in der Pathogenese der dermalen Fibrose sind, wurden erneut in der *in vivo* Studie dieser Arbeit berücksichtigt und untersucht. Von zentraler Bedeutung sind hierbei Coll-1 und der Kollagen abbauende Marker MMP-1. Beide stellen wesentliche Komponenten des Kollagenhaushalts dar und weisen in der Fibrose eine Störung im Gleichgewicht ihrer Aktivierung und Synthese auf.

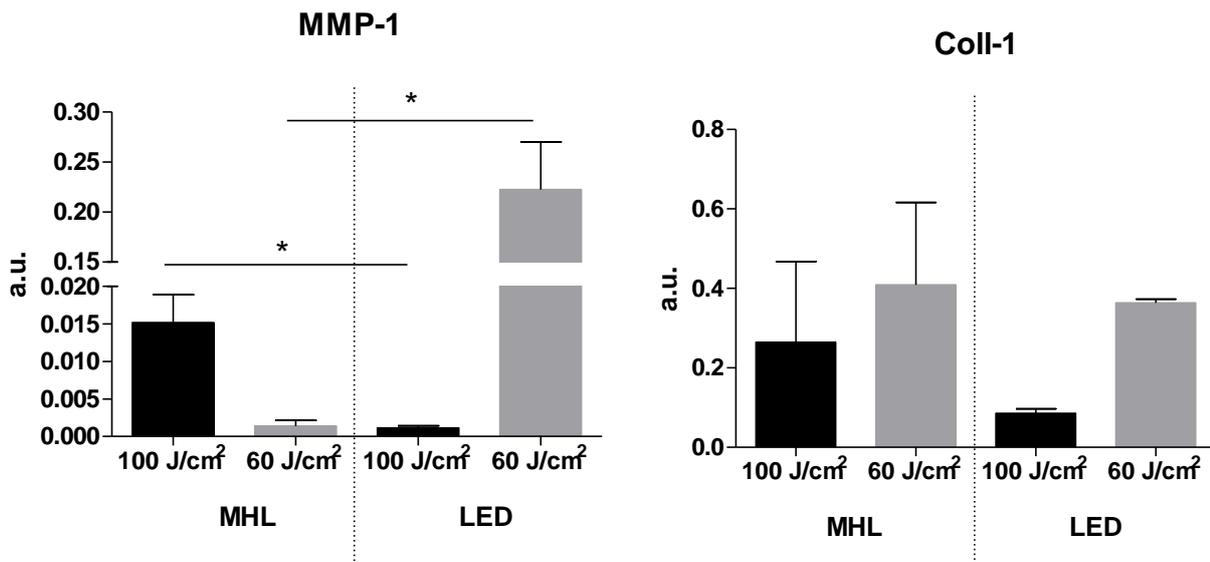


Abbildung 30: Analysen der mRNA-Genexpression von MMP-1 und Coll-1 nach UVA₁-Therapie im *in vivo* Experiment. Signifikanzen wurden jeweils von den Bestrahlungsdosen 100 J/cm² und 60 J/cm² im Vergleich der beiden Spektren berechnet. * p<0.05.

Abbildung 30 zeigt den direkten Vergleich der MMP-1- und Coll-1-Aktivierungsraten in Bezug auf unterschiedliche UVA₁-Bestrahlungsdosen (60 J/cm²; 100 J/cm²) mit den jeweils in Vergleich gesetzten Spektren. Die MMP-1-Synthesen zeigten hierbei sowohl mit 60 J/cm² als auch mit 100 J/cm² UVA₁-Bestrahlung signifikante Unterschiede zwischen beiden Spektren auf. Während die höchste Aktivierungsrate von MMP-1 beim MHL-Gerät erst bei einer Bestrahlungsdosis von 100 J/cm² vorliegt, konnte eine im Vergleich zum MHL-Gerät, deutlich gesteigerte und maximale Aktivierungssteigerung von MMP-1 beim LED-Gerät bereits bei einer Dosis von 60 J/cm² beobachtet werden. Umgekehrt verhält es sich bei den jeweils anderen Bestrahlungsdosen bei beiden Geräten. Eine mit breitem Bestrahlungsspektrum ausgelöste MMP-1-Induktion zeigte bei einer Bestrahlungsdosis von 60 J/cm² nur eine sehr geringe Steigerung auf, wohingegen eine deutlich kleinere Aktivierungsrate von MMP-1 mit schmalen Spektrum bei einer Dosis von 100 J/cm² vorliegt.

Die Coll-1 Expression zeigte keinen signifikanten Unterschied beider Geräte. Bei beiden Spektren konnte mit steigender Dosis auch eine erhöhte Coll-1 Reduktion detektiert werden.

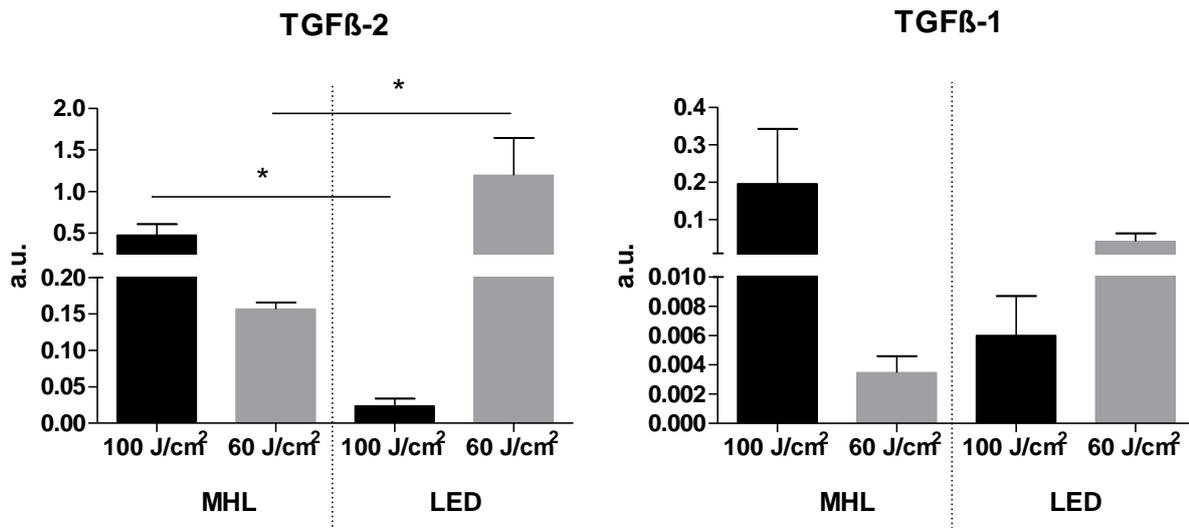


Abbildung 31: Analysen der mRNA-Genexpression von TGFβ-1 und TGFβ-2 nach UVA₁-Therapie im *in vivo* Experiment. Signifikanzen wurden jeweils von den Bestrahlungsdosen 100 J/cm² und 60 J/cm² im Vergleich zu beiden Spektren berechnet. * p<0.05.

Ebenfalls in die *in vivo* Studie eingeschlossene Marker sind die Wachstumsfaktoren TGFβ-1 und TGFβ-2. Sie nehmen eine besondere Rolle in der Pathogenese der Fibrose ein und können durch vermehrte Synthese aktivierungsfördernd auf die Entwicklung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wirken. Beide Marker, sowohl TGFβ-1 als auch TGFβ-2, zeigten dosisabhängige Unterschiede in ihrer Aktivierungsrate nach erfolgter UVA₁-Bestrahlung. Während die mit MHL-UVA₁ (340-400 nm) bestrahlte Haut unter zunehmender Bestrahlungsdosis einen Anstieg der TGFβ-1- und TGFβ-2-Synthesen verzeichnete, wies eine UVA₁-Exposition mit LED-UVA₁ (360-400 nm) den gegenteiligen Effekt auf: Die Genexpression der beiden Wachstumsfaktoren nahm hier mit steigender Dosis deutlich ab. Während innerhalb der TGFβ-1-Genexpression keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten, stellten sich unter Verwendung beider Dosen (60, 100 J/cm²) signifikante Unterschiede bei den TGFβ-2-Aktivierungsraten unter Verwendung beider Spektren heraus. Hervorzuheben ist hierbei der große Unterschied innerhalb der mit dem LED-UVA₁ verwendeten Bestrahlungsdosen (60 und 100 J/cm²).

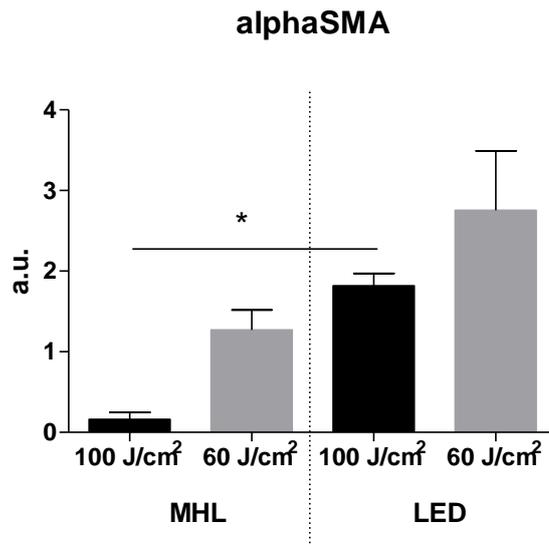


Abbildung 32: Analyse der mRNA-Genexpression von α SMA nach UVA₁-Therapie im *in vivo* Experiment. Signifikanzen wurden jeweils von den Bestrahlungsdosen 100 J/cm² und 60 J/cm² im Vergleich zu beiden Spektren berechnet. * p<0.05.

Stimuliert durch eine erhöhte TGF β -Ausschüttung, steht α SMA in direkter Verbindung mit der TGF β -assoziierten Funktion als wichtiger Fibrose Indikator. Eine hohe α SMA-Aktivierungsrate wird mit einem stimulierenden Effekt auf die Myofibroblasten-Aktivität und der damit einhergehenden verstärkten Kollagensynthese verbunden. Die Genexpressionsanalyse ergab einen signifikanten Unterschied bei der Bestrahlungsdosis 100 J/cm² zwischen den beiden Spektren. Sowohl das LED- als auch das MHL-UVA₁-Gerät zeigten bei 60 J/cm² die höchste Aktivierungsrate von α SMA und niedrigere Werte mit höherer Dosis. Die mit LED-UVA₁ bestrahlte Haut verzeichnete im Allgemeinen eine höhere Expressionsrate mit beiden Dosen (60 J/cm² und 100 J/cm²) als die mit MHL-UVA₁ behandelten Hautareale.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die antifibrotische Wirkung einer neuen UVA₁ Lichtquelle (LED-UVA₁) in präklinischen Studien *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Dabei sollte eine technologisch vorteilhafte LED-Technologie mit einem schmalen Emissionsspektrum (360-400 nm) mit einem bereits in der Klinik etablierten UVA₁-Gerät (Hochdruckstrahler) mit einem breiteren Emissionsspektrum (340-400 nm) direkt verglichen werden. Dieses neue LED-UVA₁-Bestrahlungssystem könnte durch den geringeren Stromverbrauch, die reduzierte Hitzeentwicklung, die höhere Leistung und die damit verbundene verkürzte Anwendungszeit im Laufe einer Therapiesitzung einige Vorteile bei der UVA₁-Behandlung von Sklerodermie-Patienten mit sich bringen. Molekularbiologische Experimente an Fibroblasten und Keratinozyten sollten Aufschluss über die biologischen Wirkmechanismen beider UVA₁-Geräte aufzeigen und einen direkten Vergleich ermöglichen. Dabei sollte herausgestellt werden ob, und wenn ja, wie sich beide Geräte aufgrund ihrer verschiedenen Strahlungsspektren voneinander unterscheiden.

Zusätzlich sollte neben den auf Zellkultur-basierten *in vitro* Experimenten auch das Bleomycin-induzierte Fibrose-Mausmodell die Effekte von Schmalspektrum-UVA₁ im lebenden Organismus darstellen und gegebenenfalls Unterschiede aufzeigen.

4.1 Etablierung der Bestrahlungsparameter

4.1.1 *In vitro*: Zellkultur

Für die Zellkulturexperimente wurden dermale Fibroblasten und epidermale Keratinozyten verwendet. Beide in unterschiedlichen Hautschichten gelegenen Zelltypen spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese und damit auch der Therapie dermalen Fibrosen. So konnte eine Studie von *McCoy et al.* eine gegenseitige Beeinflussung von Keratinozyten und Fibroblasten bei der Sklerodermie zeigen, sowie einen stimulierenden Effekt von Sklerodermie-Keratinozyten auf Fibroblasten, welcher wiederum einen rückkoppelnden pro-

fibrotischen Effekt hervorruft (92). Im Rahmen einer Etablierungsstudie wurden zunächst die für die *in vitro* Untersuchungen optimalen Bestrahlungsparameter ermittelt. Fibroblasten sowie Keratinozyten wurden hierzu mit unterschiedlichen Bestrahlungsbedingungen und UVA₁-Dosen (20, 40, 60, 80, 100 J/cm²) bestrahlt, um herauszufinden, unter welchen Bedingungen die optimalen finalen *in vitro* Experimente ablaufen sollten.

Hierfür wurden nach UVA₁-Bestrahlung mit o.g. Parametern die Zellzahlen bestimmt und die Zellviabilität mittels des MTT-Tests (Abbildung 13) und Zellmikroskopie überprüft, um zu untersuchen, welche UVA₁-Dosis bei direkter Bestrahlung der Zellen toleriert wird und nicht zum Zelltod führt. Das Zellzählgerät Luna-FL® detektierte dabei lebende sowie tote Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (6, 24, 48 und 72 h) nach einer UVA₁-Bestrahlung. So wurde eine hohe Anzahl an toten Zellen bei einer Dosis ab >60 J/cm² (Abbildung 13) beobachtet. Dieses Ergebnis konnte in der Zellmikroskopie (Abbildung 11 und 12) bestätigt werden. Die in Abbildung 14 gezeigten Zellzahlbestimmungen nach UVA₁-Bestrahlung dreier unterschiedlicher Fibroblasten-Zelllinien (231340, 9F0438 und 9F0889) ergaben deutliche Unterschiede in der UVA₁-Sensitivität der Fibroblasten. Während die Fibroblastenlinien 231340 und 9F0438 eine deutliche dosisabhängige Reaktion auf UVA₁-Licht zeigten und mit höher werdender UVA₁-Dosis eine höhere Anzahl toter Zellen aufwiesen, konnte bei der Zelllinie 9F0889 eine kaum stattfindende dosisbasierte Veränderung und keinerlei UV-Sensitivität beobachtet werden.

Obwohl in der Literatur eine empfohlene UVA₁-Therapie für Sklerodermie-Patienten mit Dosierungen von bis zu 130 J/cm² beschrieben ist (1, 35), handelte es sich bei den in der *in vitro* Studie verwendeten Zellen um isolierte Zellen, die anders als beim *in vivo*-Modell, keinerlei zusätzliche Hautbarrieren besitzen und UVA₁-Strahlungen ungeschützt direkt absorbieren. Aufgrund dessen ist es nachvollziehbar, dass die Dosis entsprechend angepasst und geringere UVA₁-Dosen verwendet werden müssen, um vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können.

Die finalen Zellkultur-Versuche wurden deshalb mit Bestrahlungsdosen von 20, 40 und 60 J/cm² (Tabelle 2) durchgeführt, wobei kein Ventilator zur Kühlung zum Einsatz kam, um zu vermeiden, dass Mikropartikel die bestrahlten Wells während der UVA₁-Strahlung verunreinigen. Auf die transparente Abdeckung der Wellplatten wurde verzichtet, da sich durch die ebenfalls einwirkende Wärme Feuchtigkeit in Form von Niederschlag am Deckel zeigte und die Transmission der UV-Strahlung im Well beeinflusste.

4.1.2 In vivo: Mausversuch

Für die *in vivo* Untersuchungen wurde das bereits durch *Yamamoto et al.*, 1999 etablierte Bleomycin-induzierte Fibrose-Mausmodell verwendet (88). Dieses Sklerodermie-Modell nutzt ein in der Onkologie bei Tumorpatienten eingesetztes Medikament Bleomycin (BLM), welches bei akzidenteller lokaler, subkutaner Injektion beispielsweise als Folge eines Paravasats eine umschriebene Hautverhärtung im Sinne einer Fibrose auslöst. Die dadurch induzierte Fibrose stellt ein bereits etabliertes Modell dar, um die Sklerodermie im Mausmodell nachzuahmen (40, 88, 93-95). Es wurden bei den Mäusen insgesamt 28 subkutane Injektionen von BLM (100 µl einer 500 µg/ml Lösung) fünfmal pro Woche unter ein rasiertes Areal der Rückenhaut von 2x2 cm² verabreicht (88, 95). Die durch eine gesteigerte Fibroblasten-Aktivität und erhöhte Kollagensynthese entstandene dermale Fibrose bei den Versuchsmäusen ist vergleichbar mit den bei Sklerodermie-Patienten beobachteten bindegewebsartigen Verhärtungen der Haut (96). Da sich die Injektionen auf das lokale Hautareal am Rücken beschränken, entsteht auch nur hier eine begrenzte dermale Fibrose bzw. zirkumskripte Sklerodermie. Für die Bleomycinversuche wurden in Gruppe 2-7 ausschließlich männliche Mäuse verwendet, da vorherige Studien zeigten, dass männliche Mäuse zu einer stärkeren Fibrosebildung neigen als weibliche Mäuse (97).

Zunächst wurde im Rahmen einer Pilotstudie eine Testung auf Erythem-Bildung vorgenommen (Abbildung 20). Weder das MHL-UVA₁-Gerät noch das neue LED-UVA₁-Gerät führte bei den verwendeten Dosierungen zu einer Erythembildung bei den Mäusen. Für die eigentliche UVA₁-Bestrahlungsstudie wurden dann die Versuchsmäuse in Gruppen eingeteilt (Tabelle 3). Entsprechend den jeweiligen

Versuchsgruppen bzw. Kontrollgruppen erfolgte die dazugehörige Behandlung. Die Mäuse, die eine UVA₁-Bestrahlung erhielten, wurden entweder für 33,20 Minuten mit einer hoch-dosierten (100 J/cm²) oder für 20 Minuten mit einer mitteldosierten (60 J/cm²) UVA₁-Dosis bestrahlt. Auf den Einsatz einer niedrig-dosierten UVA₁-Bestrahlung (≤ 20 J/cm²) wurde im Mausexperiment verzichtet, da bereits Stege et al. beim Einsatz an Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie eine deutliche Überlegenheit und höhere Effektivität mit den höher dosierten UVA₁-Behandlungen feststellen konnten, und auch tierexperimentell in der Arbeit von Ju et al. niedrig-dosierte Bestrahlungen nur geringe Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen induzierten (37, 95).

Die Mäuse wurden fünfmal pro Woche innerhalb von 6 Wochen bestrahlt, insgesamt erfolgten so 30 Sitzungen pro Behandlungsgruppe. Da es sich bei beiden dosisabhängigen Bestrahlungszeiten um relativ lange Zeiträume handelte (20 und 33,2 Minuten), wurden die UVA₁-Bestrahlungen mit dem Breitbandgerät unter Verwendung eines Ventilators durchgeführt. Dadurch sollte die Hitzebelastung der Mäuse verhindert werden. Die UVA₁-Lampe mit LED-Technologie führte zu keiner Wärmeentwicklung, was ebenfalls ein Vorteil dieser neuen Technologie darstellt. Beim Versuchsaufbau wurden beide Bestrahlungslampen mit ihrem Abstand zum Versuchskäfig so installiert, dass ihre Leistungsdifferenz ausgeglichen und immer die gleiche Lichtintensität von 50 mW/cm² am Mäuserücken erreicht wurde (Abbildung 9).

Die *in vitro* sowie *in vivo* Bestrahlungsstudien liefen konstant unter den zuvor etablierten Bedingungen ab und wurden nach Versuchsende mittels molekularbiologischer Methoden ausgewertet.

4.2 Bestrahlungsstudie mit molekularbiologischer Auswertung

4.2.1. Einfluss von UVA₁ auf Fibroblasten und Keratinozyten

Ziel für die *in vitro* Studie war es zu untersuchen, welchen Einfluss beide UVA₁-Geräte auf primäre epidermale Keratinozyten und dermale Fibroblasten ausüben. Dabei sollten mögliche Unterschiede oder Gemeinsamkeiten der zwei Bestrahlungsquellen, Standard UVA₁-Bestrahlungsgerät mit Metallhalogenidlampe

und Prototyp-LED-UVA₁-Bestrahlungsgerät, beide von Sellamed®, aufgezeigt werden. Epidermale Keratinozyten und dermale Fibroblasten wurden für diese Studie ausgewählt, da sie entscheidende Prozesse der Sklerodermie-Erkrankung und der darauffolgenden UV-Behandlung vermitteln und beeinflussen. Während vor allem dermale Fibroblasten für die Überproduktion von Kollagen und die daraus resultierende dermale Fibrose verantwortlich sind, löst die UV-Strahlung sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis und stellvertretend dafür in ihren jeweilig vorherrschenden Zelltypen, den Keratinozyten und Fibroblasten, wichtige immunmodulatorische Effekte aus.

Die erste Kontaktstelle von UVA₁-Licht mit der Haut und somit die bestehende Barriere zwischen Organismus und Außenwelt, stellt die Epidermis dar (83). Hierbei bilden die epidermalen Keratinozyten nicht nur eine mechanische Barriere, sondern agieren auch, in Antwort auf äußere Einflüsse wie beispielsweise UV-Licht, als immunkompetente Zellen (98). In dieser Rolle produzieren Keratinozyten in Folge der UV-Exposition epidermale Zytokine wie z.B. IL-1, IL-6 und TNF α , welche immunologische Reaktionen, Zellwachstum sowie Zelldifferenzierung bei sich selbst oder in anderen Zellen in Form von autokrinen, juxtakrinen oder parakrinen Signalwegen auslösen oder stimulieren (83, 98-100). Vor allem über parakrine Signaltransduktionsmechanismen via Zytokine oder immunmodulatorische Moleküle, können epidermale Keratinozyten mit den in der Dermis lokalisierten Fibroblasten kommunizieren und interagieren. Dabei permeieren beispielsweise epidermale Zytokine wie z.B. IL-1 α , IL-6 und TNF α durch die Basalmembran und beeinflussen dermale Fibroblasten (101).

Studien zeigen, dass UVB-Strahlen die Epidermis nicht in suffizienter Menge durchdringen, wohingegen UVA-Strahlen in tiefer gelegene Hautschichten eindringen und dort photoimmunologische Effekte bewirken (102). UVA₁ induziert demnach nicht nur eine Reihe immunmodulatorischer Mechanismen in der Epidermis, sondern kann auch direkt in der Dermis verschiedenste biologische Prozesse auslösen. Dies liegt vor allem an der hohen Eindringtiefe von UVA₁-Licht (Abbildung 4). Aufgrund dessen beschränkt sich die direkte biologische Wirkung von UVA₁ nicht nur auf die epidermalen Keratinozyten, sondern auch auf die dermalen Fibroblasten.

4.2.1.1 Fibroblasten

In dieser Studie wurden UVA₁-induzierte Prozesse wie beispielsweise die anti- und pro-fibrotischen Effekte des UVA₁-Lichts, von normalen, gesunden Fibroblasten (Abbildung 5) sowie von Sklerodermie-Fibroblasten (Abbildung 6) schematisch aufgezeigt und molekulare *in vitro* Studien an normalen, dermalen Fibroblasten vorgenommen. Um die bei der UVA₁-Therapie stattfindenden wichtigen Prozesse der Fibroblasten in Bezug auf wichtige Fibrose-Marker nachvollziehen zu können, wurden Genexpressionsanalysen folgender Biomoleküle vorgenommen: MMP-1, Coll-1, IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF α , TGF β -1 und TGF β -2 (Abbildung 15,16 und 17).

Die durch UVA₁-Licht induzierte erhöhte MMP-1-Produktion stellt dabei einen der wichtigsten Prozesse dar. Durch UVA₁-Bestrahlung wird die MMP-1-Expression von Fibroblasten auf Gen- sowie Protein-Ebene stimuliert und deutlich erhöht (103). Diese Beobachtung ist schon länger bekannt und wird auch in aktuellen Forschungen bestätigt und als wesentlicher Mechanismus der UVA₁-induzierten anti-fibrotischen Wirkungen erachtet (30, 51, 58-61, 65). Auch diese Studie konnte eine signifikant erhöhte MMP-1-Genexpression nach UVA₁-Bestrahlung bei dermalen Fibroblasten feststellen (Abbildung 15, rechts). Vergleichbare Studien beobachteten die Auswirkung von UVA₁-Strahlung auf die MMP-1-Genexpression bei Fibroblasten 24 Stunden nach Exposition. *Scharffetter et al.*, 1991 konnten eine 5,2-fache Aktivierungsrate von MMP-1 zeigen (30 J/cm²), *Polte und Tyrrell*, 2004 eine 7-10-fache (25 J/cm²) und *Vielhaber et al.*, eine um 8-fache gesteigerte MMP-1 Induktion (20 J/cm²) (65, 104, 105). Unter gleichen Bedingungen, also niedrig dosierter UVA₁-Strahlung (20 J/cm²) und 24 Stunden nach Bestrahlung, wurde in vorliegender Studie durchschnittlich eine ca. 3-fach erhöhte MMP-1-Expression festgestellt (Abbildung 15, rechts), welche dosisabhängig mit steigender Bestrahlungsintensität, vor allem bei hoch dosierter UVA₁-Bestrahlung (60 J/cm²) sehr stark zunimmt. Signifikante Aktivierungssteigerungen zeigten sich dabei 24 Stunden aber vor allem 48 Stunden nach UVA₁-Bestrahlung. So zeigte die MMP-1-Genexpression in Abbildung 15 bei Hochdosis-UVA₁ nach 48 Stunden eine 31,5-fache Erhöhung bei breiterem Spektrum (24h: 20-fach) und eine sogar um 56,2-fach gesteigerte Aktivierung bei Verwendung des schmaleren UVA₁-Spektrums (24h: 26-fach). Die

dosisabhängige Induktion von MMP-1-mRNA *in vitro* wurde bereits in einer Arbeit von *Scharffetter et al.*, 1991 beschrieben (65). In den Plaques der an zirkumskripter Sklerodermie leidenden Patienten konnte auch durch *Stege et al.* eine 20-fach erhöhte MMP-1-mRNA Expression nach hoch dosierter (130 J/cm²) UVA₁-Behandlung nachgewiesen werden (37). Wichtig hierbei ist die Betrachtung der Unterschiede zwischen Sklerodermie-Fibroblasten und normalen, gesunden Fibroblasten. Die in dieser Studie verwendeten humanen dermalen Fibroblasten weisen, verglichen zu Sklerodermie-Fibroblasten bzw. aus Sklerodermie-Patienten isolierten Fibroblasten, eine deutlich höhere MMP-1-Induktion nach UVA₁-Bestrahlung auf. Dies kann vor allem an der krankhaft niedrigen MMP-1-Expression der Sklerose-Fibroblasten vor einer UVA₁-Behandlung liegen (56).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die erhöhte MMP-1-Expression ein wichtiger Indikator für eine erfolgreiche UVA₁-Behandlung der zirkumskripten Sklerodermie darstellt (37). In der Literatur wird die UVA₁-induzierte gesteigerte MMP-1-Expression bei Fibroblasten als wesentlicher Mechanismus der antifibrotischen Wirkung beschrieben (33, 58, 65, 104, 105). Auch in dieser Studie kann eine signifikante MMP-1-Induktion mit beiden Lampensystemen beobachtet werden, wobei die mit LED-UVA₁ bestrahlten Fibroblasten durchschnittlich höhere Aktivierungsraten in der MMP-1-Genexpression beobachten ließen (Abbildung 15, rechts). Das LED-UVA₁-Gerät zeigt somit wie das bereits etablierte MHL-UVA₁-Gerät antifibrotische Effekte durch die gesteigerte MMP-1 Induktion und kann im direkten Vergleich sogar leicht effektivere Ergebnisse liefern.

Einhergehend zur MMP-1-Induktion findet im Bestrahlungsexperiment zugleich eine Coll-1-Reduktion statt (Abbildung 15, links). Eine UVA₁-induzierte verringerte Coll-1 Expression ist sowohl bei normalen, humanen Fibroblasten (30, 64) als auch bei Sklerodermie-Fibroblasten (56, 58, 106) zu beobachten. Obwohl der Kollagenhaushalt bei Sklerodermie-Erkrankungen besonders wichtig ist, spielt die Verminderung der Kollagensynthese durch die UVA₁-Behandlung im Gegensatz zur MMP-1-Induktion eine verhältnismäßig untergeordnete, aber nicht weniger bedeutsame Rolle. Prozentual wirkt sich eine UVA₁-Strahlung deutlich stärker auf die MMP-1-Aktivierung aus als auf die reduzierende Wirkung auf Coll-1 (58). Der Kollagenverlust durch dessen reduzierte Produktion ist jedoch für eine

erfolgreiche UVA₁-Therapie ebenso wichtig und wird auch in dieser Studie anhand der Genexpressionsanalyse von Coll-1 (Abbildung 15, links) mit beiden Bestrahlungsgeräten und deren Emissionsspektren bestätigt. Beide UVA₁-Geräte weisen hier vergleichbare Werte auf und können wie auch bei der MMP-1 Induktion keine deutlichen Unterschiede erkennen lassen.

Neben dem Eingreifen in den Kollagenhaushalt der Fibroblasten ist ein weiterer wichtiger Mechanismus der UVA₁-Bestrahlung die immunmodulatorische Wirkung. Diese betrifft vor allem die in dieser Studie betrachteten pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF α , welche signalvermittelnde Funktionen innerhalb sowie außerhalb einer Zelle ausführen und zu entsprechenden Reaktionen (Abbildung 16) in Antwort auf eine UVA₁-Bestrahlung führen.

Da es sich bei der Sklerodermie um eine entzündliche, autoimmune Krankheit handelt, soll eine UVA₁-Therapie insbesondere den inflammatorischen Charakter der Erkrankung vor allem durch entsprechende Zytokin-Modulationen beeinflussen. Pro-inflammatorische Zytokine, welche über Reaktionskaskaden als entzündungsfördernde, bioaktive Moleküle agieren wie beispielsweise die bereits erwähnten Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF α , sollten reduziert und ihre Synthese durch die UVA₁-Behandlung gehemmt werden. Studien haben gezeigt, dass die Zytokinproduktion von IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF α bei Sklerodermie-Fibroblasten bezüglich der Pathogenese von großer Bedeutung ist und deren gesteigerte Genexpression mit einer Sklerodermie-Erkrankung in Verbindung gebracht wird (60, 107, 108). Der Einsatz der UVA₁-Therapie bei ZS-Patienten hat demnach eine Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion und eine damit einhergehende entzündungshemmende Wirkung zum Ziel.

Kreuter et al., 2006 zeigten in ihrer Studie eine signifikante Herunterregulierung der mRNA-Expression von IL-6 und IL-8 in LS-Patienten nach erfolgter UVA₁-Behandlung. Diese Beobachtung konnte hingegen bei gesunder Haut nach UVA₁-Bestrahlung anhand unveränderter Zytokin-Expressionen nicht gemacht werden (60). Kontrovers hierzu diskutierten *Vielhaber et al.*, 2005 in ihrer Studie, dass die UVA₁-induzierte erhöhte MMP-1-Produktion im Zusammenhang mit einer Hochregulierung des Zytokins IL-1 α und der daraus resultierenden gesteigerten

IL-6 Synthese steht (105). Eine gesteigerte IL-1 α - und IL-6-Genexpression nach UVA₁-Bestrahlung von Fibroblasten konnte auch durch *Wlaschek et al.*, 1992 und 1997 festgestellt werden (66, 109). Dies zeigt den Unterschied zwischen normalen, gesunden Fibroblasten und Sklerodermie-Fibroblasten. Deutliche Unterschiede bezüglich der UVA₁-induzierten Modulationen zwischen den beiden Fibroblastentypen lassen sich möglicherweise durch den aufkommenden oxidativen Stress durch die einwirkende UVA₁-Strahlung erklären (30). Bei Sklerodermie-Fibroblasten wurde ein reduzierter Glutathion (GSH)-Status im Vergleich zu normalen Fibroblasten festgestellt und damit einhergehend auch eine eingeschränkte Fähigkeit oxidativen Stress, wie er bei einer UVA₁-Bestrahlung entsteht, zu bewältigen. Wesentlich empfindlicher zeigten sich somit die Sklerodermie-Fibroblasten gegenüber den normalen Fibroblasten in Reaktion auf UVA₁-Strahlung und wiesen im Vergleich erhöhte MMP-1-Genexpressionen nach UVA₁-Bestrahlung auf (61). In den hier durchgeführten Experimenten führte die UVA₁-Exposition dermalen, normaler Fibroblasten ebenfalls zur erhöhten IL-1 α -Zytokin-Genexpression wohingegen eine darauf folgende IL-6-Aktivierungssteigerung, welche normalerweise nach einer IL-1 α -Ausschüttung auftritt (69), ausblieb (Abbildung 16). Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass gerade Zytokine frühzeitig nach UVA₁-Bestrahlung exprimiert werden und unsere Studie einen „späten“ Zeitpunkt mit 24h und 48h nach Bestrahlung untersuchte. Eine ergänzende Studie, die schon 6h und 24h nach Bestrahlung die Expression von IL-1 α und IL-6 analysierte, konnte die zu erwartende erhöhte IL-6 Aktivierungsrate nach UVA₁-Bestrahlung zeigen. (110) Desweiteren konnte eine erhöhte TNF α - und teilweise gesteigerte IL-8-Genexpression beobachtet werden, wobei TNF α nur 24 Stunden nach UVA₁-Exposition vermehrt synthetisiert wurde (Abbildung 16). Vergleicht man in Abbildung 16 die IL-1 α -Aktivitätssteigerung nach UVA₁-Bestrahlung mit der von IL-8, so erkennt man eindeutig die Abhängigkeit der IL-8-Genexpression in Beziehung zur IL-1 α -Synthese. Die Produktion von IL-8 ist abhängig von proinflammatorischen Mediatoren, vor allem von IL-1 α oder auch TNF α (70). Die Aktivierungen der oben genannten Zytokine wiesen sowohl im LED-UVA₁-Gerät als auch im MHL-UVA₁-Gerät mit Ausnahme einzelner Werte aber im Trend übereinstimmende Aktivierungsraten auf und konnten somit eine vergleichbare Wirkung verzeichnen.

Neben den wichtigen Biomolekülen im Kollagenhaushalt (MMP-1 und Coll-1) und den entzündungsfördernden Zytokinen gelten die Wachstumsfaktoren der TGF β -Familie als weitere wichtige Fibrose-Indikatoren und spielen bei der Sklerodermie-Erkrankung eine wesentliche Rolle. TGF β kann in der Epidermis das Zellwachstum inhibieren und kann kontrollierend auf die Differenzierung epidermaler Zellschichten wirken (62, 111). In der Dermis stimuliert TGF β die Proliferation dermalen Fibroblasten, welche wiederum EZM-Komponenten des Bindegewebes wie z.B. Coll-1 vermehrt sezernieren und wirkt sich reduzierend auf die MMP-1-Expression aus (62, 111, 112). Zusätzlich kann TGF β die Produktion von IL-1, TNF α und IL-8 supprimieren, was wiederum das Wechselspiel zwischen pro- und antiinflammatorischer Funktionen bei zytokinvermittelten Entzündungsreaktionen zeigt (68). Die beiden wichtigsten Isoformen von TGF β sind TGF β -1 und TGF β -2. Beide Wachstumsfaktoren werden in der Literatur und den dazugehörigen Studien als entscheidende Faktoren bezüglich ihrer Rolle als pro-fibrotische Zytokine in der Pathogenese der Fibrose diskutiert (73-75, 113, 114). So ist bereits bewiesen, dass in aktivierten Sklerodermie-Fibroblasten der Wachstumsfaktor TGF β -1 exzessiv ausgeschüttet wird (62), während zugleich die TGF β -Rezeptoren (TGF β I und TGF β II) ebenfalls vermehrt exprimiert werden (55, 112). Außerdem wurde beobachtet, dass die mRNA-Genexpression von TGF β in läsionalen Hautarealen bei Patienten mit ZS nach erfolgter UVA₁-Therapie (mit einer kumulativen Gesamtdosis von 400 J/cm²) signifikant abnimmt (58). Andere *in vivo* Studien anhand normaler humaner Hautproben ergaben allerdings konträre Ergebnisse. *Quan et al.*, beschrieben eine deutliche Hochregulierung von TGF β -1, verbunden mit einem zugleich stattfindenden Abfall von TGF β -2 nach UV-Strahleneinfluss (115), wohingegen *Gambichler et al.*, 2007 bei ihren Ergebnissen eine signifikante Reduzierung von TGF β -1 auf mRNA-Level sowie auf Protein-Ebene nach erfolgter UVA₁-Strahlung feststellen konnten (62). Bei Versuchen mit Fibroblasten der Haut beobachteten *Yin et al.*, 2003 eine signifikante Induktion von TGF β -1 nach UVA-Behandlung (111). Dieses Ergebnis findet sich auch in unserer Studie in den *in vitro* Genexpressionsanalysen wieder (Abbildung 17). 24 Stunden nach UVA₁-Einwirkung kann eine dosisübergreifend signifikant erhöhte und deutlich ansteigende TGF β -1-Induktion beobachtet werden. Die verstärkte TGF β -1-Genexpression erhöht sich mit steigender Bestrahlungsdosis und

erreicht ihr Maximum bei 60 J/cm^2 . Wie bei *Quan et al.*, kann in dieser Studie neben der TGF β -1-Aktivierungssteigerung zeitgleich eine TGF β -2-Reduktion festgestellt werden (Abbildung 17). TGF β -2 führt wie TGF β -1 zu einer Kollagen-Typ-I-Genexpressionsinduktion und inhibiert den Abbau der extrazellulären Matrix durch eine hemmende Proteasen-Sekretion und stimulierender Proteasen-Inhibitorproduktion (81). Nach 24 Stunden, wie in Abbildung 17 zu sehen, zeigte TGF β -2 nach UVA $_1$ -Bestrahlung eine signifikante Reduzierung vor allem bei hoher Dosis (60 J/cm^2). Eine Erholung der TGF β -2-Genexpression zeigte sich bereits nach 48 Stunden, wohingegen die mit 20 J/cm^2 bestrahlten Fibroblasten eine signifikante TGF β -2-Induktion beobachten ließen. Auffallend sind hier im Vergleich beider UVA $_1$ -Geräte die stark ähnelnden Aktivierungsraten der Wachstumsfaktoren nach Bestrahlung mit den jeweils unterschiedlichen Bestrahlungsdosen. Insofern unterscheiden sich beide Geräte diesbezüglich nicht.

4.2.1.2 Keratinozyten

Neben den wichtigen UVA $_1$ -induzierten Mechanismen in den Fibroblasten wurden in dieser Studie auch humane Keratinozyten (HEK) mit UVA $_1$ bestrahlt und Genexpressionen, insbesondere auf Zytokin-Ebene (IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF α) anschließend molekularbiologisch ausgewertet.

Allgemein bekannt ist die Existenz und funktionelle Relevanz der Zytokin-vermittelnden, autokrinen Abläufe in humanen Keratinozyten (116). Ein eng verflochtenes Zytokin-Netzwerk führt über komplexe Signalwege parakriner, juxtakriner oder autokriner Natur zur gegenseitigen Stimulation oder Hemmung. So konnte bereits herausgefunden werden, dass IL-1 α und TNF α sich untereinander stimulieren (67) und beide zusätzlich die Produktion und Sekretion von IL-6 sowie IL-8 induzieren (70, 84). Wie schon bei den Fibroblasten besprochen, weisen LS-Patienten erhöhte pro-inflammatorische Zytokin-Werte auf (27, 60) in Folge einer bei verschiedenen Hauterkrankungen typischen Dysregulation und abnormalen Zytokinproduktion (99). Eine UVA $_1$ -Therapie zielt daher auf eine Herunterregulierung entzündungsfördernder Zytokine ab. Das komplexe Geflecht der Zytokine und Wechselspiel des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-inflammatorischer Funktionen erschwert allerdings eindeutige

Aussagen über UVA₁-induzierte Wirkmechanismen, auch innerhalb der Keratinozyten. So zeigen sich durch verschiedene Studien (33, 62, 85, 98, 99, 102, 117-121) unterschiedliche Ergebnisse in den Genexpressionsanalysen der Zytokine in Folge einer UVA₁-Bestrahlung von epidermalen Keratinozyten.

UV-Licht gilt als starker Stimulus der IL-1-Synthese in der Epidermis (69) und kann daher nicht nur eine anti-inflammatorische Wirkung auslösen, sondern auch pro-inflammatorische Effekte hervorrufen (122). Diese ambivalenten Auswirkungen von UVA₁ auf Keratinozyten äußern sich entweder direkt über Modulationen der Zytokin-Genexpression oder werden indirekt durch photobiologische Mechanismen wie z.B. der ROS-Generation oder ICAM-1-Expressionshemmung vermittelt (33, 120, 122). *Morita et al.*, 1997 konnten in ihrer Studie mit Keratinozyten eine deutliche Steigerung in der mRNA- und Protein-Expression der entzündungsfördernden Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF α nach erfolgter UVA₁-Bestrahlung beobachten (116, 120). Hierfür wurden jedoch keine normalen Keratinozyten, sondern aus epithelialen Tumorzellen stammende Keratinozyten (KB) verwendet und die Expression von IL-1 α und IL-6 stellte sich abhängig von ihrem endogenen Glutathion-Status dar. Während in der vorliegenden Studie lediglich normale humane Keratinozyten bestrahlt wurden, zeigten sich dann in den Ergebnissen alle inflammatorischen Zytokine nach UVA₁-Exposition durchschnittlich signifikant erniedrigt (Abbildung 18). Die differierenden Ergebnisse bezüglich der Zytokin-Modulationen nach UVA₁-Bestrahlung von Keratinozyten innerhalb weiterer Studien verdeutlichen ebenfalls die Komplexität der Zytokin-Aktivität durch UVA-Licht. *Corsini et al.*, 1997, *Tebbe et al.*, 1997 und *Kondo et al.*, 1999 konnten Steigerungen der IL-1 α -Synthese nach niedrig dosierten (>20 J/cm²) UVA₁-Bestrahlungen beobachten (99, 102, 123) wohingegen *Chung et al.*, 1994 und *Imokawa et al.*, 1996 unter den gleichen Bedingungen eine erniedrigte IL-1 α -Produktion feststellen konnten (118, 124). Weitere Divergenzen zeigten sich bei der IL-6-Aktivierung nach UVA-Einwirkung. Während *Imokawa et al.*, 1996, *Tebbe et al.*, 1997 und *Kondo et al.*, 1999 ebenfalls eine Hochregulierung von IL-6 nach UVA₁-Bestrahlung aufzeigen konnten (99, 123, 124), stellten *Kirnbauer et al.*, 1991 keine Veränderungen in der IL-6-Zytokinproduktion nach UVA₁-Exposition fest (119). Eine Erhöhung der TNF α -Expression konnten auch *Corsini et al.*, 1997 beobachten (102),

wohingegen *Kondo et al.*, 1999 eine verringerte TNF α -Aktivierung nach UVA₁-Bestrahlung beobachteten (99). Lediglich bei der UVA₁-induzierten verstärkten Synthese der IL-8-Zytokinproduktion gab es einheitliche Beobachtungen (99, 121, 124). Auffällig sind die geringen Dosen, welche alle erwähnten Studien für die UVA₁-Bestrahlung verwenden und die nicht über 30 J/cm² hinausgehen. Bemerkenswert sind deshalb die Unterschiede innerhalb unserer Studie in Bezug auf die hier verwendeten niedrig (20 J/cm²), mittel (40 J/cm²) und hohen (60 J/cm²) Bestrahlungsdosen (Abbildung 18). Signifikant erhöhte Zytokin-Produktionen von IL-6, IL-8 und TNF α konnten auch hier beobachtet werden, jedoch erreichten die Genexpressionen der Zytokine ihre durch UVA₁ induzierten maximalen Aktivierungssteigerungen nur bei Verwendung einer niedrigen Dosis von 20 J/cm² 48 Stunden nach Bestrahlung. UVA₁-Bestrahlungen mithilfe höherer Dosen (40 und 60 J/cm²) führten bei IL-6 und TNF α zu signifikant erniedrigten Expressionen, sowohl 24h als auch 48h nach UVA₁-Behandlung. Die IL-8-Produktion steigerte sich 24h nach UVA₁-Exposition und verringerte sich anschließend 48h nach Bestrahlung auf signifikant erniedrigte Expressionswerte. Bei IL-1 α verhält es sich eindeutiger. Tendenziell sinkt die IL-1 α -Genexpressionsrate mit steigender Bestrahlungsdosis. Generell kann bereits ab 20 J/cm² schon eine signifikant erniedrigte IL-1 α -Synthese beobachtet werden (Abbildung 18). In Anbetracht der vielen verschiedenen Ergebnisse bei den Genexpressionen der Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF α nach UVA₁-Einwirkung im Rahmen der aufgeführten Studien bestätigt sich die Komplexität des Zytokin-Netzwerks und verdeutlicht die Schwierigkeit, einen eindeutigen Mechanismus zu ergründen. Die Aktivierungsraten der Zytokine zeigten nichtsdestotrotz, dass auch in ihrer Wirkung auf Keratinozyten beide UVA₁-Geräte keine maßgeblichen Unterschiede aufwiesen.

Anschließend an die Expressionsanalysen der Zytokine wurden zusätzliche Genexpressionen der Wachstumsfaktoren TGF β -1 und TGF β -2 in den Keratinozyten nach UVA₁-Einfluss untersucht. Während TGF β in der Dermis als wichtiger Wachstumsfaktor in der EZM-Synthese agiert, stellt er in der Epidermis und somit auch bei den epidermalen Keratinozyten einen potenten Wachstumshemmer dar (111). Das aus den Keratinozyten stammende TGF β kann immunologische und inflammatorische Reaktionen supprimieren und übt

daher eine immunosuppressive Funktion aus (98). Analysen, sowohl bei TGF β -1 als auch bei TGF β -2, haben signifikant erniedrigte Expressionswerte nach erfolgter UVA₁-Bestrahlung der Keratinozyten ergeben (Abbildung 19). Diese Beobachtung konnten auch *Kondo et al.*, 1999 in ihrer Studie bestätigen (99). Die zuvor stark reduzierten Expressionen der Wachstumsfaktoren 24 Stunden nach Bestrahlung konnten sich bei beiden Markern (TGF β -1 und TGF β -2) nach 48 Stunden wieder erholen, wobei die TGF β -2-Genexpression zu diesem Zeitpunkt bereits das Kontroll-Niveau überstieg und gesteigerte Aktivierungsraten erzielte. Dies konnte sowohl bei dem MHL-UVA₁-Gerät als auch beim LED-UVA₁-Gerät beobachtet werden. Eine nennenswerte Differenz konnte auch hier nicht festgestellt werden.

Neben UV-induzierten inflammatorischen Reaktionen auf epidermale Keratinozyten durch Zytokinausschüttung (IL-1 α , IL-6, TNF α) können demnach auch immunosuppressive Faktoren durch UV-Stimulation aktiviert werden (98).

Zusammenfassend konnten in Bezug auf die durchgeführten Genexpressionsanalysen an den Zellkulturen nach UVA₁-Bestrahlung weder bei Fibroblasten noch bei Keratinozyten wesentliche Unterschiede durch die Verwendung unterschiedlicher UVA₁-Spektren (LED-UVA₁ und MHL-UVA₁) festgestellt werden. Sowohl das MHL-UVA₁ (340-400 nm) als auch das LED-UVA₁ (360-400 nm) wiesen typische, UVA₁-induzierte molekularbiologische Reaktionsmuster auf, welche sich untereinander jedoch kaum bzw. in nur geringem Maße unterschieden.

4.2.2. Einfluss von UVA₁ auf die zirkumskripte Sklerodermie am Bleomycin-induzierten Fibrose-Mausmodell

Mithilfe molekularbiologischer Untersuchungen bestimmter Biomoleküle und histologischen Untersuchungen (H&E, Sirius Red/Fast green und α SMA) mit zusätzlichen Vermessungen der Dermisdicke als Maß der Fibroseinduktion, sollte die Wirkung beider Spektren (UVA₁ breit und schmal) zusätzlich an einem *in vivo* Fibrose-Mausmodell untersucht und verglichen werden.

4.2.2.1 Histologische und immunhistologische Auswertungen

Mit Hilfe der histologischen Auswertungen konnte das von *Yamamoto et al.*, 1998 beschriebene Bleomycin-induzierte Fibrose-Mausmodell bestätigt werden und somit als etabliertes *in vivo* Modell zu weiteren molekularbiologischen Untersuchungen herangezogen werden (Abbildung 22-28) (88, 125). Die in den Abbildungen 22ff. gezeigten histologischen Schnitte repräsentieren jeweils mithilfe eines ausgesuchten Beispiels das Gesamtbild der jeweiligen Versuchsgruppe (Tabelle 3). Alle Gruppen mit Ausnahme der Kontrollgruppe 1 erhielten Bleomycin-Injektionen und entwickelten das typische Bild des Fibrose-Mausmodells. In erster Linie ahmt das Modell eine Sklerodermieerkrankung mit den für die Krankheit typischen verdickten Kollagenfaserbündeln und dadurch ebenfalls verdickter Dermis mit Zellinfiltraten nach (96, 125). Deutlich sichtbar weisen die beiden BLM-Kontrollgruppen 2 und 7 eine höhere Dermisdicke auf im Vergleich zu den zusätzlich mit UVA₁ behandelten Gruppen 3, 4, 5 und 6 (Abbildung 10). Ebenfalls deutlich sichtbar sind die durch die dermale Fibrose verdrängten Fettzellen, welche in dieser Studie vor allem bei den Kontrollgruppen 2 und 7 auch in einem vollkommenen Fehlen durch die stark ausgeprägte Fibrose resultieren. Hierbei werden die Fettzellen durch eine so genannte Adipozyt-Myofibroblast-Transformation durch fibrotisches Gewebe ersetzt (126, 127). Eine Regeneration des Fettgewebes konnte in den mit UVA₁ behandelten Versuchsgruppen festgestellt werden (Abbildungen 24ff.). Die gesteigerte Myofibroblasten-Aktivität und damit verbundenen profibrotischen Prozesse, welche maßgeblich zur Entwicklung der Fibrosen beitragen (91, 128), konnten in den α SMA-Färbungen der mit Bleomycin behandelten Gruppen 2-7 beobachtet werden. Hierbei wurden Fibroblasten durch Bleomycin in ihren Phänotypen zu Myofibroblasten verwandelt und der fibrotische Effekt der Bleomycin-induzierten Sklerodermie-Entwicklung verstärkt (91). In der immunhistopathologischen Auswertung der mit α SMA markierten Gewebeschnitte zeigte sich ein zahlenmäßiger Rückgang der aktivierten Myofibroblasten nach UVA₁-Behandlung. Dies konnte sowohl bei der Behandlung mit dem LED-UVA₁-Gerät als auch mit dem MHL-UVA₁-Gerät beobachtet werden. Mittels der α SMA-Färbung ließ sich auch die Induktion der Neoangiogenese beobachten, welcher sich als Wundheilungsprozess bei den UVA₁-behandelten Mäusen einstellt, wie

Trompezinski et al. im Jahr 2000 im experimentellen Ansatz zeigen konnten (129). Da sich auch dieser Prozess im histologischen Bild durch eine starke rote Anfärbung um Gefäße äußert, wurde dieser Effekt bei der Erfassung α SMA positiver Fibroblasten durch die unterschiedliche räumliche Zuordnung (i.e. Gefäßnähe) bei der Auswertung selbstverständlich ausgeschlossen. Innerhalb der histologischen sowie auch immunologischen Auswertungen zeigten sich daher keine sichtbaren Unterschiede im Vergleich beider UVA₁-Geräte. Somit konnte in der morphologischen Analyse der histologischen Schnittpräparate und der Dermisdickenbestimmungen in den unterschiedlichen Versuchsgruppen bereits eine deutliche Verbesserung des fibrosierten Areals unter begleitender UVA₁-Bestrahlung (MHL- und LED-UVA₁) festgestellt werden. Verbesserte Resultate zeigten sich sowohl bei mitteldosierter sowie hochdosierter UVA₁-Therapie.

4.2.2.2 Genexpressionsanalysen

Als weiterer Aspekt in dieser Arbeit soll nun ein direkter Vergleich zwischen beiden Spektren (LED-UVA₁ und MHL-UVA₁) getroffen werden und wichtige molekularbiologische Mechanismen betrachtet werden. Abbildung 30 zeigt die beiden Genexpressionsanalysen von MMP-1 und Coll-1 im Vergleich der mit MHL-UVA₁ und mit der LED-UVA₁ erfolgten Bestrahlungen, jeweils mit einer hohen Dosis (100 J/cm²) und einer mittleren Dosis (60 J/cm²). Während Coll-1 keine Unterschiede erkennen lässt und mit steigender Bestrahlungsdosis bei beiden Spektren durch UVA₁ reduziert exprimiert wird, bestehen bei der MMP-1-Induktion signifikante Unterschiede. Die erhöhte MMP-1-Synthese ausgelöst durch die UVA₁-Bestrahlung ist ein wichtiger therapeutischer Effekt der Phototherapie im Einsatz für den Kollagenabbau in dermalen Fibrosen bzw. der Sklerodermieerkrankung. Mit MHL-UVA₁ bestrahlte Fibroseareale der Versuchsmäuse zeigten erst bei einer Dosis von 100 J/cm² wesentlich erhöhte MMP-1-Expressionen auf, wohingegen UVA₁-Behandlungen mit LED-UVA₁ schon bei 60 J/cm² diesen Effekt auslösten, welcher zudem um ein Vielfaches größer ausfiel. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass bei LED-UVA₁-Bestrahlungen bei 100 J/cm² eine geringe bzw. kaum eine MMP-1-Induktion stattfand, sondern lediglich bei der niedrigeren Bestrahlungsdosis von 60 J/cm².

Interessanterweise lässt sich diese Beobachtung auch in den folgenden Genexpressionsanalysen von TGF β -1 und TGF β -2 feststellen (Abbildung 31). Während die höchsten TGF β -Expressionen bei der MHL-UVA₁-Exposition mit hoher Dosis (100 J/cm²) erzielt werden, sind die TGF β -Werte bei LED-UVA₁ Bestrahlung bei niedrigerer Dosis (60 J/cm²) am höchsten. Während bei den TGF β -1-Produktionen keine deutlichen Unterschiede beider Spektren festzustellen sind, konnten in der TGF β -2 Expression bei beiden Bestrahlungsdosen im Vergleich der beiden Emissionsspektren untereinander signifikante Unterschiede ausgemacht werden. Dieser Unterschied besteht vor allem in der großen Differenz zwischen den beiden Bestrahlungsdosen der mit LED-UVA₁ bestrahlten Hautareale. Dabei scheint das LED-UVA₁ bei 60 J/cm² im Allgemeinen eine stärkere Wirkung und einen weitreichenderen Effekt auszulösen, als es die höhere Bestrahlungsdosis von 100 J/cm² tut. Dieser Effekt ist auch in der α SMA-Genexpression zu beobachten (Abbildung 32). Beide Bestrahlungsspektren erzielen hierbei durch hohe Bestrahlungsdosen den gewünschten Therapie-Effekt der Herunterregulierung der α SMA-Expression. Dabei konnten bei der MHL-UVA₁-Bestrahlung signifikant niedrigere α SMA-Expressionen nach Bestrahlung beobachtet werden. Hierzu wurden jedoch im Rahmen einer ergänzenden Studie oben beschriebene α SMA-Expressionswerte der verschiedenen Mäusegruppen beider UVA₁-Geräte nochmals unter dem Gesichtspunkt der aktivierten Myofibroblasten analysiert. Dabei wurden die Gruppen nicht wie in dieser Studie untereinander anhand der Bestrahlungsdosen (60 J/cm² und 100 J/cm²) der beiden UVA₁-Geräte, sondern im Verhältnis zur Kontrollgruppe statistisch ausgewertet. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden UVA₁-Geräten (110) .

Wie in bereits erfolgten Studien mit UVA₁-LED-Lichttherapien (39, 40), kann zusammenfassend auch in der vorliegenden Arbeit die Effektivität der LED-Lichttechnologie herausgestellt und durch präklinische Experimente bestätigt werden. Betrachtet man nun allumfassend die *in vitro* und *in vivo* Experimente, kann hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung keine klare Abgrenzung oder deutliche Überlegenheit eines der beiden UVA₁-Systeme herausgestellt werden. Beide Geräte zeigen, vor allem in den *in vitro* Versuchen, vergleichbare immunmodulatorische Effekte. Signifikante Unterschiede manifestieren sich

teilweise in den *in vivo Studien*, gleichen sich jedoch bei veränderten Bestrahlungsdosen (60 J/cm² vs. 100 J/cm²) wieder aus (z.B. TGFβ-1 und TGFβ-2 Produktion). Ein repräsentativer Unterschied jedoch bleibt aus und verdeutlicht somit die gleiche Eignung beider UVA₁-Systeme in Bezug auf ihre Wirksamkeit bei der Behandlung fibrotischer Hautareale.

Allerdings bietet die LED-UVA₁-Bestrahlung elementare Vorteile in der Phototherapie aufgrund der zahlreichen technologischen Innovationen wie beispielsweise der niedrigere Energieverbrauch, die längere Lebensdauer der Dioden, die größere Versatilität und Mobilität, der fehlenden Abwärme, sowie die damit verbundenen geringeren Anschaffungs- und Wartungskosten. Dies unterstreicht nun die Notwendigkeit von klinischen Studien am Patienten, um die gezeigten Effekte auch in der humanen Haut zu bestätigen und eine standardisierte LED-UVA₁ rasch im klinischen Alltag zu etablieren.

5. Zusammenfassung

Die Phototherapie mit UVA₁ stellt eine sehr effektive Behandlungsmöglichkeit der zirkumskripten Sklerodermie und anderer fibrosierender und entzündlicher Hauterkrankungen dar. Aufgrund zahlreicher technischer Nachteile und aufwendiger Handhabung haben sich allerdings die bisher auf dem Markt befindlichen UVA₁-Metallhalogenid Hochdruckstrahler (MHL) in Klinik und Praxis nicht ausreichend durchgesetzt. Ziel dieser Studie war es eine neuartige, lichtstärkere LED-Leuchtmitteltechnologie mit einem schmaleren und damit weniger erythematoenen und kanzerogenen Emissionsspektrum (360-400 nm) und weiteren Vorteilen, wie weniger Energieverbrauch, weniger Platzbedarf, einer deutlichen Reduktion der Wärmebelastung mit Wegfall aufwendiger Entlüftungssysteme und kürzerer Bestrahlungsdauer bezüglich ihrer biologischen Wirkung, mit den herkömmlichen Metallhalogenid Hochdruckstrahlern mit breiterem UVA₁-Emissionsspektrum (340-400 nm) zu vergleichen.

Die biologischen Effekte beider Geräte auf die dermale Fibrose wurden sowohl *in vitro* an kultivierten Fibroblasten und Keratinozyten als auch *in vivo* an einem Fibrose-Mausmodell untersucht. Dabei wurden vor allem UVA₁-Strahlung induzierte zytokinvermittelte photoimmunologische Prozesse in der Haut untersucht und zwischen beiden Geräten verglichen. Proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise IL-1 α oder TNF α sowie Schlüsselenzyme des Kollagenhaushalts (MMP-1 und Coll-1) sollten anhand von *in vitro* Untersuchungen Aufschluss über die antifibrotische Wirkung der UVA₁ Strahlung liefern und die Frage beantworten, ob das neuartige LED-UVA₁ Gerät gleiche bzw. ähnliche Resultate erzielt wie das herkömmliche MHL-UVA₁ Gerät. Im *in vivo* Modell (Bleomycin-induziertes Fibrose-Mausmodell) wurde dann die Wirkung beider Geräte anhand molekularbiologischer Marker (MMP-1, Coll-1, TGF β -1, TGF β -2 und α SMA) verglichen und zusätzlich der antifibrotische Effekt mittels histologischer und immunologischer Untersuchungen visualisiert.

Die vorliegenden Experimente konnten aufzeigen, dass – unabhängig vom verwendeten System – UVA₁-Strahlung viele verschiedene immunmodulatorische Effekte in kultivierten Fibroblasten und Keratinozyten sowie auch im murinen

Mausmodell auslöst. Diese Prozesse, darunter vor allem die Hemmung der Kollagen-Typ-I-Synthese, die Stimulation der Matrix-Metallo-Proteinase-1 und die zytokinvermittelten Reaktionen, führen bei einer UVA₁-Phototherapie zur Verbesserung der Hautfibrose, wie es letztendlich auch bei Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie der Fall ist. Sowohl das konventionelle MHL-UVA₁-Gerät als auch das LED-UVA₁-Gerät induzierten eine verstärkte MMP-1 Synthese, reduzierten die Coll-1 Produktion und modulierten die zytokinvermittelten, im Entzündungsprozess beteiligten Marker und Wachstumsfaktoren IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α , TGF β -1 und TGF β -2 in ähnlicher Weise ohne maßgebliche Unterschiede *in vitro*. Die *in vivo* Versuche erfolgten im direkten Vergleich beider Systeme (MHL und LED) und wiesen einzelne dosisabhängige Unterschiede auf. So induzierte das LED-UVA₁-Gerät eine höhere MMP-1 Produktion bei 60 J/cm² Bestrahlungsdosis als das MHL-UVA₁-Gerät, wies jedoch bei 100 J/cm² Bestrahlungsdosis eine geringere MMP-1 Expression auf als das MHL-UVA₁-Gerät. Solche dosisabhängigen Unterschiede wurden auch bei den Wachstumsfaktoren beobachtet. Die Coll-1 Reduktion zeigte für beide Geräte eine ähnliche Aktivierungsrate. Auch histologisch zeigten die murinen Schnittpräparate gleiche morphologische Veränderungen der Haut innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen im Sinne einer Abnahme der dermalen Fibrose unter Phototherapie. Beide UVA₁-Systeme, das LED-UVA₁-Gerät sowie das MHL-UVA₁-Gerät, konnten demnach zusammenfassend im direkten Vergleich keine repräsentativen Unterschiede aufweisen.

Beide Geräte sind somit hinsichtlich ihrer antifibrotischen Wirkung biologisch gleichwertig, die wesentlichen Vorteile des neuen LED-basierten Systems liegen eindeutig in seiner Versatilität, der Langlebigkeit, dem geringen Energieverbrauch, einer kürzeren Behandlungsdauer, einer verminderten Strahlenbelastung in Bezug auf das schmalere Emissionsspektrum sowie der fehlenden Wärmeentwicklung. Es bleibt zu hoffen, dass sich die Wirksamkeit der LED-UVA₁-Therapie in kontrollierten klinischen Studien bestätigt und so die Vorteile der neuen LED-Technologie für eine verbesserte Versorgung von Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie genutzt werden können.

6. Anhang

6.1 Tabellen

Tabelle 1:	Klassifikation der ZS nach <i>Kreuter</i> et al., 2016	11
Tabelle 2:	Bestrahlungsparameter der Zellkulturversuche mit UVA ₁	40
Tabelle 3:	Einteilung der Versuchsmäuse in unterschiedliche Versuchsgruppen	43
Tabelle 4:	Bestrahlungsparameter der Versuchsmäuse	44
Tabelle 5:	Primer Bedingungen für humane und murine Oligonukleotide	47
Tabelle 6:	Legende LUNA-FL Zellzahlen-Auswertung	56

6.2 Abbildungen

Abbildung 1:	Sklerodermie typisches klinisches Hautbild	10
Abbildung 2:	Auszug des Therapie-Algorithmus	13
Abbildung 3:	Elektromagnetische Strahlung	14
Abbildung 4:	Schematische Darstellung eines Hautmodells	16
Abbildung 5:	Molekulare Wirkmechanismen bei normalen dermalen Fibroblasten	21
Abbildung 6:	Molekulare Wirkmechanismen bei Sklerodermie-Fibroblasten	23
Abbildung 7:	Emissionsspektren der UVA ₁ -Geräte	37
Abbildung 8:	Bestrahlungsaufbau	42
Abbildung 9:	UVA ₁ -Geräteaufbau bei dem Mausmodell	45
Abbildung 10:	Vermessung der Dermisdicke	49
Abbildung 11:	Durchlichtmikroskopie von Keratinozyten	52
Abbildung 12:	Durchlichtmikroskopie von Fibroblasten	53
Abbildung 13:	MTT-Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität	54
Abbildung 14:	Zellzahlbestimmung	55
Abbildung 15:	Genexpressionsanalyse MMP-1 und Coll-1 aus den Fibroblasten	58

Abbildung 16:	Genexpressionsanalyse der Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF- α aus den Fibroblasten	59
Abbildung 17:	Genexpressionsanalyse der Wachstumsfaktoren TGF β -1 und TGF β -2 aus den Fibroblasten	61
Abbildung 18:	Genexpressionsanalyse der Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF- α aus den Keratinozyten	63
Abbildung 19:	Genexpressionsanalyse der Wachstumsfaktoren TGF β -1 und TGF β -2 aus den Keratinozyten	65
Abbildung 20:	Erythem-Test	66
Abbildung 21:	Vergleich Normalhaut	67
Abbildung 22 und 23:	Histologische Färbung und Histochemische Analyse der Kontrollgruppen 1 und 2	69
Abbildung 24 und 25:	Histologische Färbung und Histochemische Analyse der mit Hochdosis (100 J/cm ²) bestrahlten Versuchsgruppen 3 und 4	70
Abbildung 26 und 27:	Histologische Färbung und Histochemische Analyse der mit Mitteldosis (60 J/cm ²) bestrahlten Versuchsgruppen 5 und 6	71
Abbildung 28:	Histologische Färbung und Histochemische Analyse der Kontrollgruppe 7 (BLM über gesamte Versuchsdauer)	72
Abbildung 29:	Ergebnis Dermisvermessung und Übersicht Kontrollgruppen	73
Abbildung 30:	Analysen der mRNA Genexpression MMP-1 und Coll-1	75
Abbildung 31:	Analysen der mRNA Genexpression TGF β -1 und TGF β -2	76
Abbildung 32:	Analysen der mRNA Genexpression α SMA	77

6.3 Abkürzungsverzeichnis

a.u.	arbitrary unit (dt. beliebige Einheit)
AMV-RT	Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase
BLM	Bleomycin
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA (dt. komplementär DNS)
Coll-1	Collagenase-1
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium (Nährmedium Zellkultur)
dNTP's	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate (Desoxyribonukleosidtriphosphate)
DTT	Dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fötale Kälber Serum
GSH	Glutathion oder γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin
H&E	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	Wasser
HEKn	Humane Epidermale Keratinozyten, neonatal
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IL-1 α	Interleukin 1 alpha, auch Hämatopoetin 1
IL-6	Interleukin 6, auch B-Zell stimulierender Faktor
IL-8	Interleukin 8, körpereigenes chemotaktisches Zytokin
K	Kelvin (0°C = 273,15 Kelvin)
LED	„light-emitting diode“ (dt. lichtemittierende Diode oder auch Leuchtdiode)
MDB	Ethanol 5-15%
MED	Minimale Erythemdosis
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHL	Metallhalogenid-Hochdrucklampe
MMP-1	Matrix-Metalloproteinase-1

mRNA	messenger RNA (dt. Boten-RNS)
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) oder Thiazolyl blau
nm	nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline (dt. Phosphatgepufferte Salzlösung)
PGE ₂	Prostaglandin E2
PLE	„polymorphic light eruption“ (dt. polymorphe Lichtdermatose)
PUVA	Psoralen plus Ultraviolett A Strahlung
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (dt. quantitative Polymerase-Kettenreaktion)
RA1	Guanidinthiocyanat 30-60%
RAW2	Guanidinhydrochlorid 24-36% und Ethanol 20-35%
RNasin®	spez. Ribonuklease Inhibitor von Promega
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-Puffer	Reverse Transkriptase Puffer
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPF	Specific pathogen free (dt. spezifiziert pathogenfrei)
SS	Systemische Sklerodermie
SYBR green I	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation oder Cyanin-Farbstoff
TGFβ	Transforming-growth-factor-beta (dt. Wachstumsfaktor beta)
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ZS	Zirkumskripte Sklerodermie
αMSH	alpha - Melanozyten stimulierendes Hormon
αSMA	alpha - smooth muscle actin

7. Literaturverzeichnis

1. Kreuter A, Krieg T, Worm M, Wenzel J, Moinzadeh P, Kuhn A, et al. Deutsche Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der zirkumskripten Sklerodermie. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology* : JDDG. 2016;14(2):199-216. Epub 2016/01/29. doi: 10.1111/ddg.12724. PubMed PMID: 26819124.
2. Altmeyer P. Sklerodermie zirkumskripte (Übersicht) Bilder Berlin: Springer Medizin Verlag GmbH; 2018 [cited 2018 07.05.2018]. Available from: altmeyers-enzyklopaedie.de.
3. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH. Sklerodermien. In: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, editors. *Dermatologie und Venerologie*. Heidelberg: Springer-Verlag; 1984. p. 510-8.
4. Fett N, Werth VP. Update on morphea: part I. Epidemiology, clinical presentation, and pathogenesis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011;64(2):217-28; quiz 29-30. Epub 2011/01/18. doi: 10.1016/j.jaad.2010.05.045. PubMed PMID: 21238823.
5. Birdi N, Laxer RM, Thorner P, Fritzler MJ, Silverman ED. Localized Scleroderma progressing to systemic Disease. *Arthritis and Rheumatism*. 1993;36(3):410-5.
6. Careta MF, Romiti R. Localized scleroderma: clinical spectrum and therapeutic update. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2015;90(1):62-73. Epub 2015/02/13. doi: 10.1590/abd1806-4841.20152890. PubMed PMID: 25672301; PubMed Central PMCID: PMC4323700.
7. Dehen L, Roujeau JC, Cosnes A, Revuz J. Internal involvement in localized scleroderma. *Medicine*. 1994;73(5):241-5. Epub 1994/09/01. PubMed PMID: 7934808.
8. Mayorquin FJ, McCurley TL, Levernier JE, Myers LK, Becker JA, Graham TP, et al. Progression of childhood linear scleroderma to fatal systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 1994;21(10):1955-7. Epub 1994/10/01. PubMed PMID: 7837166.
9. Peterson LS, Nelson AM, Su WP, Mason T, O'Fallon WM, Gabriel SE. The epidemiology of morphea (localized scleroderma) in Olmsted County 1960-1993. *The Journal of rheumatology*. 1997;24(1):73-80. Epub 1997/01/01. PubMed PMID: 9002014.

10. Silman A, Jannini S, Symmons D, Bacon P. An epidemiological study of scleroderma in the West Midlands. *British journal of rheumatology*. 1988;27(4):286-90. Epub 1988/08/01. PubMed PMID: 3261609.
11. Krieg T. Sklerodermie. 2005. In: *Dermatologie und Venerologie* [Internet]. Heidelberg: Springer. 5. [676-89].
12. Fritsch P, Grassegger A. Sklerodermie. In: Fritsch P, editor. *Dermatologie Venerologie*: Springer Verlag; 2004. p. 501-4.
13. Torrelo A, Suarez J, Colmenero I, Azorin D, Perera A, Zambrano A. Deep morphea after vaccination in two young children. *Pediatr Dermatol*. 2006;23(5):484-7. Epub 2006/10/04. doi: 10.1111/j.1525-1470.2006.00289.x. PubMed PMID: 17014648.
14. Alonso-Llamazares J, Ahmed I. Vitamin K1-induced localized scleroderma (morphea) with linear deposition of IgA in the basement membrane zone. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1998;38(2 Pt 2):322-4. Epub 1998/03/05. PubMed PMID: 9486707.
15. Guidetti MS, Vincenzi C, Papi M, Tosti A. Sclerodermatous skin reaction after vitamin K1 injections. *Contact dermatitis*. 1994;31(1):45-6. Epub 1994/07/01. PubMed PMID: 7924294.
16. Ho J, Rothchild YH, Sengelmann R. Vitamin B12-associated localized scleroderma and its treatment. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery* [et al]. 2004;30(9):1252-5. Epub 2004/09/10. doi: 10.1111/j.1524-4725.2004.30387.x. PubMed PMID: 15355372.
17. Morell A, Betlloch I, Sevilla A, Banuls J, Botella R. Morphea-like reaction from vitamin K1. *Int J Dermatol*. 1995;34(3):201-2. Epub 1995/03/01. PubMed PMID: 7751098.
18. Peroni A, Zini A, Braga V, Colato C, Adami S, Girolomoni G. Drug-induced morphea: report of a case induced by balicatib and review of the literature. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2008;59(1):125-9. Epub 2008/04/16. doi: 10.1016/j.jaad.2008.03.009. PubMed PMID: 18410981.
19. Prinz JC, Kutasi Z, Weisenseel P, Poto L, Battyani Z, Ruzicka T. "Borrelia-associated early-onset morphea": a particular type of scleroderma in childhood and adolescence with high titer antinuclear antibodies? Results of a cohort analysis and presentation of three cases. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2009;60(2):248-55. Epub 2008/11/22. doi: 10.1016/j.jaad.2008.09.023. PubMed PMID: 19022534.

20. Wienecke R, Schlüpen E, Zöchling N, Neubert U, Meurer M, Volkenandt M. No Evidence for *Borrelia burgdorferi*-Specific DNA in Lesions of Localized Scleroderma. *Journal of Investigative Dermatology*. 1995;104(1):23-6. doi: 10.1111/1523-1747.ep12613456.
21. Takehara K, Sato S. Localized scleroderma is an autoimmune disorder. *Rheumatology*. 2005;44(3):274-9. doi: 10.1093/rheumatology/keh487. PubMed PMID: ISI:000227241400003.
22. Harrington CI, Dunsmore IR. An investigation into the incidence of auto-immune disorders in patients with localized morphea. *British Journal of Dermatology*. 1989;120:645-8.
23. Leitenberger JJ, Cayce RL, Haley RW, Adams-Huet B, Bergstresser PR, Jacobe HT. Distinct Autoimmune Syndromes in Morphea - A review of 245 Adult and Pediatric Cases. *Arch Dermatol* 2009;145(5):545-50.
24. Dirschka T, Hartwig R, Oster-Schmidt C. Zirkumskripte Sklerodermie. In: Dirschka T, Hartwig R, Oster-Schmidt C, editors. *Klinikleitfaden Dermatologie*. München: Elsevier; 2011. p. 216-8.
25. Peterson LS, Nelson AM, Su WP. Classification of morphea (localized scleroderma). *Mayo Clinic proceedings*. 1995;70(11):1068-76. Epub 1995/11/01. doi: 10.1016/S0025-6196(11)64442-X. PubMed PMID: 7475336.
26. (DDG) DDG, (GKJR) GfK-uJ, Kreuter A, Worm M, Wenzel J, Moinzadeh P, et al. S2k Leitlinie Diagnostik und Therapie der zirkumskripten Sklerodermie. AWMF online - Das Portal der wissenschaftlichen Medizin. 2014.
27. Distler O, Cozzio A. Systemic sclerosis and localized scleroderma--current concepts and novel targets for therapy. *Seminars in immunopathology*. 2016;38(1):87-95. Epub 2015/11/19. doi: 10.1007/s00281-015-0551-z. PubMed PMID: 26577237.
28. Knobler R, Moinzadeh P, Hunzelmann N, Kreuter A, Cozzio A, Mouthon L, et al. European Dermatology Forum S1-guideline on the diagnosis and treatment of sclerosing diseases of the skin, Part 1: localized scleroderma, systemic sclerosis and overlap syndromes. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2017. Epub 2017/08/10. doi: 10.1111/jdv.14458. PubMed PMID: 28792092.
29. Endres L, Breit R. Physikalische Grundlagen, Lichtquellen, Dosimetrie. In: Krutmann J, Hönigsmann H, editors. *Handbuch der dermatologischen Phototherapie und Photodiagnostik*. Heidelberg: Springer-Verlag; 1997. p. 3-43.

30. Nisar MF, Parsons KS, Bian CX, Zhong JL. UVA irradiation induced heme oxygenase-1: a novel phototherapy for morphea. *Photochemistry and photobiology*. 2015;91(1):210-20. Epub 2014/09/11. doi: 10.1111/php.12342. PubMed PMID: 25207998.
31. Kerr AC, Ferguson J, Attili SK, Beattie PE, Coleman AJ, Dawe RS, et al. Ultraviolet A1 phototherapy: a British Photodermatology Group workshop report. *Clinical and experimental dermatology*. 2012;37(3):219-26. Epub 2012/01/27. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04256.x. PubMed PMID: 22277060.
32. Hölzle E. Physikalische Therapie: Licht, Kälte, Wärme. 2005. In: *Dermatologie und Venerologie [Internet]*. Braun-Falco, O.; [1481-92].
33. Krutmann J, Morita A. Mechanisms of Ultraviolet (UV) B and UVA Phototherapy. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 1999;4(1):70-2. doi: 10.1038/sj.jidsp.5640185.
34. Gesellschaft DD. S1 Leitlinie zur UV-Phototherapie und Photochemotherapie. AMWF- Leitlinien Register. 2015;013-029(1).
35. Krutmann J, Stege H. Ultraviolett-A1-Therapie entzündlicher Hautkrankheiten. In: Krutmann J, Hönigsmann H, editors. *Handbuch der dermatologischen Phototherapie und Photodiagnostik*. Heidelberg: Springer Verlag Berlin; 1997. p. 245-58.
36. Krutmann J. High-dose ultraviolet A1 (UVA1) phototherapy: does it work? *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 1997;13:78-81.
37. Stege H, Berneburg M, Humke S, Klammer M, Grewe M, Grether-Beck S, et al. High-dose UVA1 radiation for localized scleroderma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1997;36(6):938-44.
38. Morton C, Szeimies RM, Sidoroff A, Wennberg AM, Basset-Sequin N, Calzavara-Pinton P, et al. European Dermatology Forum Guidelines on topical photodynamic therapy. *European journal of dermatology : EJD*. 2015;25(4):296-311. doi: 10.1684/ejd.2015.2570. PubMed Central PMCID: PMC26065545.
39. Inada S, Kamiyama S, Akasaki I, Torii K, Furuhashi T, Amano H, et al. Development of an Ultraviolet A1 Light Emitting Diode-based Device for Phototherapy. *The Open Dermatology Journal*. 2012;6:13-24.
40. Karpec D, Rudys R, Leonaviciene L, Mackiewicz Z, Bradunaite R, Kirdaite G, et al. The safety and efficacy of light emitting diodes-based ultraviolet A1 phototherapy in bleomycin-induced scleroderma in mice. *Advances in medical sciences*. 2017;63(1):152-9. Epub 2017/11/10. doi: 10.1016/j.advms.2017.09.001. PubMed PMID: 29120857.

41. Heckman CJ, Chandler R, Kloss JD, Benson A, Rooney D, Munshi T, et al. Minimal Erythema Dose (MED) testing. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013(75):e50175. Epub 2013/06/12. doi: 10.3791/50175. PubMed PMID: 23748556; PubMed Central PMCID: PMC3734971.
42. Zandi S, Kalia S, Lui H. UVA1 Phototherapy: A Concise and Practical Review. *Skin Therapy Letter* [Internet]. 2012; 17(1). Available from: <http://www.skintherapyletter.com/cutaneous-t-cell-lymphomas/uva1-phototherapy/>.
43. Gambichler T, Majert J, Pljakic A, Rooms I, Wolf P. Determination of the minimal erythema dose for ultraviolet A1 radiation. *The British journal of dermatology*. 2017;177(1):238-44. Epub 2016/12/21. doi: 10.1111/bjd.15245. PubMed PMID: 27995628.
44. Berneburg M, Grether-Beck S, Kürten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, et al. Singlet Oxygen Mediates the UVA-induced Generation of the Photoaging-associated Mitochondrial Common Deletion. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(May 28):15345-9.
45. Dawe RS. Ultraviolet A1 phototherapy. *British Journal of Dermatology*. 2003;148:626-37.
46. Tuchinda C., Kerr H. A., Taylor C. R., Jacobe H., Bergamo B. M., Elmetts C., et al. UVA 1 phototherapy for the cutaneous diseases: an experience of 92 cases in the United States. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 2006;22:247-53.
47. Herzinger T, Berneburg M, Ghoreschi K, Gollnick H, Holzle E, Honigsmann H, et al. S1-Leitlinie zur UV-Phototherapie und Photochemotherapie. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2016;14(8):853-76. Epub 2016/08/12. doi: 10.1111/ddg.12912. PubMed PMID: 27509435.
48. Godar DE. UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *The Journal of investigative dermatology*. 1999;112(1):3-12. Epub 1999/01/14. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00474.x. PubMed PMID: 9886256.
49. Lee CH, Wu SB, Hong CH, Yu HS, Wei YH. Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(3):6414-35. Epub 2013/03/23. doi: 10.3390/ijms14036414. PubMed PMID: 23519108; PubMed Central PMCID: PMC3634415.

50. Mang R, Krutmann J. UVA-1 Phototherapy. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 2005;21:103-8.
51. Petersen MJ, Hansen C, Craig S. Ultraviolet A Irradiation Stimulates Collagenase Production in Cultured Human Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*. 1992;99(4):440-4. doi: 10.1111/1523-1747.ep12616142.
52. Vangipuram R, Feldman SR. Ultraviolet phototherapy for cutaneous diseases: a concise review. *Oral diseases*. 2016;22(4):253-9. Epub 2015/10/16. doi: 10.1111/odi.12366. PubMed PMID: 26464123.
53. Andres C, Kollmar A, Mempel M, Hein R, Ring J, Eberlein B. Successful ultraviolet A1 phototherapy in the treatment of localized scleroderma: a retrospective and prospective study. *The British journal of dermatology*. 2010;162(2):445-7. Epub 2009/09/30. doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09438.x. PubMed PMID: 19785603.
54. Tyrrell RM. Modulation of gene expression by the oxidative stress generated in human skin cells by UVA radiation and the restoration of redox homeostasis. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2012;11(1):135-47. Epub 2011/10/20. doi: 10.1039/c1pp05222e. PubMed PMID: 22008784.
55. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *The Journal of investigative dermatology*. 1998;110(1):47-51. Epub 1998/01/10. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00073.x. PubMed PMID: 9424086.
56. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *The Journal of clinical investigation*. 1974;54(4):880-9. Epub 1974/10/01. doi: 10.1172/JCI107827. PubMed PMID: 4430718; PubMed Central PMCID: PMC301627.
57. Kähäri V-M, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinase in skin. *Experimental Dermatology*. 1997;6:199-213.
58. El-Mofty M, Mostafa W, Esmat S, Youssef R, Bousseila M, Nagi N, et al. Suggested mechanisms of action of UVA phototherapy in morphea: a molecular study. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 2004;20:93-100.
59. Gruss C, Reed JA, Altmeyer P, McNutt NS, Kerscher M. Induction of interstitial collagenase (MMP-1) by UVA-1 phototherapy in morphea fibroblasts. *The Lancet*. 1997;350(9087):1295-6. doi: 10.1016/s0140-6736(05)62472-5.

60. Kreuter A, Hyun J, Skrygan M, Sommer A, Bastian A, Altmeyer P, et al. Ultraviolet A1-induced downregulation of human beta-defensins and interleukin-6 and interleukin-8 correlates with clinical improvement in localized scleroderma. *The British journal of dermatology*. 2006;155(3):600-7. Epub 2006/08/17. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07391.x. PubMed PMID: 16911288.
61. Yin L, Yamauchi R, Tsuji T, Krutmann J, Morita A. The Expression of Matrix Metalloproteinase-1 mRNA Induced by Ultraviolet A1 (340-400nm) Is Phototherapy Relevant to the Glutathione (GSH) Content in Skin Fibroblasts of Systemic Sclerosis. *The Journal of Dermatology*. 2003;30:173-80.
62. Gambichler T, Skrygan M, Tomi NS, Breuksch S, Altmeyer P, Kreuter A. Significant downregulation of transforming growth factor-beta signal transducers in human skin following ultraviolet-A1 irradiation. *The British journal of dermatology*. 2007;156(5):951-6. Epub 2007/03/27. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.07802.x. PubMed PMID: 17381457.
63. Mauviel A. Cytokine Regulation of Metalloproteinase Gene Expression. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1993;53:288-95.
64. Kroft EB, Berkhof NJ, van de Kerkhof PC, Gerritsen RM, de Jong EM. Ultraviolet A phototherapy for sclerotic skin diseases: a systematic review. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2008;59(6):1017-30. Epub 2008/10/07. doi: 10.1016/j.jaad.2008.07.042. PubMed PMID: 18835066.
65. Scharffetter K, Wlaschek M, Hogg A, Bolsen K, Schotthorst A, Goerz G, et al. UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch Dermatol Res*. 1991;283:506-11.
66. Wlaschek M, Wenk J, Brenneisen P, Briviba K, Schwarz A, Sies H, et al. Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro. *FEBS Letters*. 1997;413(2):239-42. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00919-8.
67. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *The FASEB Journal*. 1990;4:2860-7.
68. Dinarello CA. Proinflammatory Cytokines. *Chest*. 2000;118(2):503-8. doi: 10.1378/chest.118.2.503.
69. Nashan D, Luger TA. Interleukin 1-Teil 2: Wirkmechanismen und therapeutische Möglichkeiten. *Hautarzt*. 1999;50:756-63.

70. Larsen CG, Anderson AO, Oppenheim JJ, Matsushima K. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology*. 1989;68:31-6.
71. Zhang L, Yan JW, Wang YJ, Wan YN, Wang BX, Tao JH, et al. Association of interleukin 1 family with systemic sclerosis. *Inflammation*. 2014;37(4):1213-20. Epub 2014/02/18. doi: 10.1007/s10753-014-9848-7. PubMed PMID: 24531856.
72. Kawaguchi Y, McCarthy SA, Watkins SC, Wright TM. Autocrine activation by interleukin 1alpha induces the fibrogenic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts. *The Journal of rheumatology*. 2004;31:1946-54.
73. Nakerakanti S, Trojanowska M. The Role of TGF- β Receptors in Fibrosis. *The Open Rheumatology Journal* 2012;6(1):156-62.
74. Branton MH, Kopp JB. TGF- β and fibrosis. *Microbes and Infection*. 1999;1:1349-65.
75. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor- β and fibrosis. *World Journal of Gastroenterology* 2007;13(22):3056-62.
76. Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *The Journal of cell biology*. 2007;179(6):1311-23. Epub 2007/12/19. doi: 10.1083/jcb.200704042. PubMed PMID: 18086923; PubMed Central PMCID: PMC2140013.
77. Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hinz B. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions. *F1000Research*. 2016;5. Epub 2016/05/10. doi: 10.12688/f1000research.8190.1. PubMed PMID: 27158462; PubMed Central PMCID: PMC4847562.
78. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming Growth Factor- β 1 Induces α -Smooth Muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts. *The Journal of cell biology*. 1993;122:103-11.
79. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. *Molecular Biology of the Cell*. 2001;12:2730-41.
80. John AE, Porte J, Jenkins G, Tatler AL. Methods for the Assessment of Active Transforming Growth Factor- β in Cells and Tissues. In: Rittié L, editor. *Fibrosis: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology: Springer Nature; 2017. p. 351-65.

81. Kulozik M, Hogg A, Lankat-Buttgereit B, Krieg T. Co-Localization of Transforming Growth Factor β 2 with α 1(I) Procollagen mRNA in Tissue Sections of Patients with Systemic Sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 1990;86:917-22.
82. Luger TA, Schwarz T. Evidence for an Epidermal Cytokine Network. *Journal of Investigative Dermatology*. 1990;95(6):S100-S4. doi: 10.1111/1523-1747.ep12874944.
83. Lacroix M, Bovy T, Nusgens BV, Lapière CM. Keratinocytes modulate the biosynthetic phenotype of dermal fibroblasts at a pretranslational level in a human skin equivalent. *Arch Dermatol Res*. 1995;287:659-64.
84. Ansel J, Perry P, Brown J, Damm D, Phan T, Hart C, et al. Cytokine Modulation of Keratinocyte Cytokines. *Journal of Investigative Dermatology*. 1990;94(6):s101-s7. doi: 10.1111/1523-1747.ep12876053.
85. Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, Landthaler M, Szeimies RM. Keratinocyte-derived cytokines after photodynamic therapy and their paracrine induction of matrix metalloproteinases in fibroblasts. *The British journal of dermatology*. 2004;151(4):776-83. Epub 2004/10/20. doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.06209.x. PubMed PMID: 15491416.
86. Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, Landthaler M, Szeimies RM. Influence of 5-aminolevulinic acid and red light on collagen metabolism of human dermal fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;120(2):325-31. Epub 2003/01/25. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12037.x. PubMed PMID: 12542540.
87. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65:55-63.
88. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *The Journal of investigative dermatology*. 1999;112(4):456-62. Epub 1999/04/14. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00528.x. PubMed PMID: 10201529.
89. Yamamoto T. Intradermal Injections of Bleomycin to Model Skin Fibrosis. *Methods Mol Biol*. 2017;1627:43-7. Epub 2017/08/25. doi: 10.1007/978-1-4939-7113-8_3. PubMed PMID: 28836193.
90. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, et al. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. *PloS one*.

2013;8(11):e79325. Epub 2013/11/23. doi: 10.1371/journal.pone.0079325. PubMed PMID: 24265766; PubMed Central PMCID: PMC3825691.

91. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. V: Increased expression of alpha-smooth muscle actin in fibroblastic cells in bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol.* 2002;102(1):77-83. Epub 2002/01/10. doi: 10.1006/clim.2001.5138. PubMed PMID: 11781070.

92. McCoy SS, Reed TJ, Berthier CC, Tsou PS, Liu J, Gudjonsson JE, et al. Scleroderma keratinocytes promote fibroblast activation independent of transforming growth factor beta. *Rheumatology (Oxford).* 2017;56(11):1970-81. Epub 2017/10/03. doi: 10.1093/rheumatology/kex280. PubMed PMID: 28968684; PubMed Central PMCID: PMC5850806.

93. Luo J, Liu X, Liu J, Jiang M, Luo M, Zhao J. Activation of TGF-beta1 by AQP3-Mediated H₂O₂ Transport into Fibroblasts of a Bleomycin-Induced Mouse Model of Scleroderma. *The Journal of investigative dermatology.* 2016;136(12):2372-9. Epub 2016/07/28. doi: 10.1016/j.jid.2016.07.014. PubMed PMID: 27456753.

94. Maeda T, Yamamoto T, Imamura T, Tsuboi R. Impaired wound healing in bleomycin-induced murine scleroderma: a new model of wound retardation. *Arch Dermatol Res.* 2016;308(2):87-94. Epub 2015/12/15. doi: 10.1007/s00403-015-1614-7. PubMed PMID: 26660455.

95. Ju M, Chen K, Chang B, Gu H. UVA1 irradiation inhibits fibroblast proliferation and alleviates pathological changes of scleroderma in a mouse model. *Journal of Biomedical Research.* 2012;26(2):135-42.

96. Yamamoto T, Nishioka K. Cellular and molecular mechanism of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Experimental Dermatology* 2005;14:81-95.

97. Ruzehaji N, Avouac J, Elhai M, Frechet M, Frantz C, Ruiz B, et al. Combined effect of genetic background and gender in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis research & therapy.* 2015;17:145. Epub 2015/05/31. doi: 10.1186/s13075-015-0659-5. PubMed PMID: 26025306; PubMed Central PMCID: PMC4461998.

98. Schwarz T, Luger TA. Effect of UV Irradiation on epidermal cell cytokine production. *Journal of Photochemistry and Photobiology.* 1989;4:1-13.

99. Kondo S. The Roles of Keratinocyte-Derived Cytokines in the Epidermis and Their Possible Responses to UVA-Irradiation. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings.* 1999;4(2):177-83. doi: 10.1038/sj.jidsp.5640205.

100. Luger TA, Schwarz T. Therapeutic use of cytokines in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1991;24(6):915-26.
101. Kondo S, Kooshesh F, Sauder DN. Penetration of Keratinocyte-Derived Cytokines Into Basement Membrane. *Journal of Cellular Physiology*. 1997;171:190-6.
102. Corsini E, Sangha N, Feldman SR. Epidermal stratification reduces the effects of UVB (but not UVA) on keratinocyte cytokine production and cytotoxicity *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 1997;13:147-52.
103. Hassani J, Feldman SR. Phototherapy in Scleroderma. *Dermatology and therapy*. 2016;6(4):519-53. Epub 2016/08/16. doi: 10.1007/s13555-016-0136-3. PubMed PMID: 27519050; PubMed Central PMCID: PMC5120625.
104. Polte T, Tyrrell RM. Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Free radical biology & medicine*. 2004;36(12):1566-74. Epub 2004/06/09. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.003. PubMed PMID: 15182858.
105. Vielhaber G, Grether-Beck S, Koch O, Johncock W, Krutmann J. Sunscreens with an absorption maximum of $>$ or $=360$ nm provide optimal protection against UVA1-induced expression of matrix metalloproteinase-1, interleukin-1, and interleukin-6 in human dermal fibroblasts. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2006;5(3):275-82. Epub 2006/03/08. doi: 10.1039/b516702g. PubMed PMID: 16520862.
106. El-Mofty M., Zaher H., Bosseila M., Yousef R., B. S. Low-dose broad-band UVA in morphea using a new method for evaluation *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 2000;16:43-9.
107. Ihn H. Scleroderma, Fibroblast, Signaling and Excessive Extracellular Matrix. *Current Rheumatology Reports*. 2005;7:156-62.
108. Trojanowska M. What did we learn by studying scleroderma fibroblasts? *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22(33):59-63.
109. Wlaschek M, Bolsen K, Herrmann G, Schwarz A, Wilmroth F, Heinrich PC, et al. UVA-Induced Autocrine Stimulation of Fibroblast-Derived-Collagenase by IL-6: A Possible Mechanism in Dermal Photodamage? *Journal of Investigative Dermatology*. 1993;101(2):164-8. doi: 10.1111/1523-1747.ep12363644.

110. Arndt S, Lissner C, Unger P, Baumler W, Berneburg M, Karrer S. Biological effects of a new ultraviolet A1 prototype based on light-emitting diodes on the treatment of localized scleroderma. *Exp Dermatol*. 2020. Epub 2020/06/28. doi: 10.1111/exd.14135. PubMed PMID: 32592187.
111. Yin L, Morita A, Tsuji T. The crucial role of TGF-beta in the age-related alterations induced by ultraviolet A irradiation. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;120(4):703-5. Epub 2003/03/22. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12099.x. PubMed PMID: 12648238.
112. Kubo M, Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Upregulated Expression of Transforming Growth Factor- β Receptors in Dermal Fibroblasts of Skin Sections from Patients with Systemic Sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2002;29(12):2558-64.
113. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(7):816-27. Epub 2004/05/01. doi: 10.1096/fj.03-1273rev. PubMed PMID: 15117886.
114. Smith EA, LeRoy EC. A Possible Role for Transforming Growth Factor- β in Systemic Sclerosis. *Journal of Investigative Dermatology*. 1990;95(6):S125-S7. doi: 10.1111/1523-1747.ep12874998.
115. Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor beta/smad pathway in human skin in vivo. *The Journal of investigative dermatology*. 2002;119(2):499-506. Epub 2002/08/23. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01834.x. PubMed PMID: 12190876.
116. Morita A, Grewe M, Grether-Beck S, Olaizola-Horn S, Krutmann J. Induction of Proinflammatory Cytokines in Human Epidermoid Carcinoma Cells by in vitro Ultraviolet A1 Irradiation. *Photochemistry and photobiology*. 1997;65(4):630-5.
117. Assefa Z, Van Laethem A, Garmyn M, Agostinis P. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1755(2):90-106. Epub 2005/06/21. doi: 10.1016/j.bbcan.2005.04.001. PubMed PMID: 15964692.
118. Chung JH, Youn JI. Effect of ultraviolet A on IL-1 production by ultraviolet B in cultured human keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*. 1995;9:87-93.
119. Kirnbauer R, Köck A, Neuner P, Förster E, Krutmann J, Urbanski A, et al. Regulation of Epidermal Cell Interleukin-6 production by UV Light and Corticosteroids. *Journal of Investigative Dermatology*. 1991;96(4):484-9. doi: 10.1111/1523-1747.ep12470181.

120. Krutmann J. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoageing and photodermatosis. *Journal of Dermatological Science*. 2000;23(1):22-6.
121. Pernet I, Sagot V, Schmitt D, Viac J. UVA1 and UVB radiation but not PGE2 stimulate IL-8 release in normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. 1999;291:527-9.
122. Krutmann J, Grewe M. Involvement of Cytokines, DNA Damage, and Reactive Oxygen Intermediates in Ultraviolet Radiation-Induced Modulation of Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression. *Journal of Investigative Dermatology*. 1995;105(1):S67-S70. doi: 10.1038/jid.1995.14.
123. Tebbe B, Wu SB, Geilen CC, Eberle J, Kodelja V, Orfanos CE. L-Ascorbic Acid Inhibits UVA-Induced Lipid Peroxidation and Secretion of IL-1 α and IL-6 in Cultured Human Keratinocytes In Vitro. *Journal of Investigative Dermatology*. 1997;108(3):302-6. doi: 10.1111/1523-1747.ep12286468.
124. Imokawa G, Yada Y, Kimura M, Morisaki N. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is an intrinsic keratinocyte-derived growth factor for human melanocytes in UVA-induced melanosis. *Biochem J*. 1996;313:625-31.
125. Yamamoto T, Kuroda M, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res*. 2000;292:535-41.
126. Kruglikov IL. Dermale Adipozyten in Dermatologie und Ästhetischer Medizin: Fakten und Hypothesen. *Journal of Applied Aesthetics*. 2016;2:16.
127. Marangoni RG, Lu TT. The roles of dermal white adipose tissue loss in scleroderma skin fibrosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29(6):585-90. Epub 2017/08/12. doi: 10.1097/BOR.0000000000000437. PubMed PMID: 28800024.
128. Rao KB, Malathi N, Narashiman S, Rajan ST. Evaluation of myofibroblasts by expression of alpha smooth muscle actin: a marker in fibrosis, dysplasia and carcinoma. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2014;8(4):ZC14-7. Epub 2014/06/25. doi: 10.7860/JCDR/2014/7820.4231. PubMed PMID: 24959509; PubMed Central PMCID: PMC4064839.
129. Trompezinski S, Pernet I, Mayoux C, Schmitt D, Viac J. Transforming growth factor- β 1 and ultraviolet A1 radiation increase production of vascular endothelial growth factor but not endothelin-1 in human dermal fibroblasts. *British Journal of Dermatology*. 2000;143:539-45.

8. Danksagung

Den Abschluss möchte ich all jenen widmen, die mich in der Zeit meiner Promotionsarbeit gefördert, unterstützt und begleitet haben:

Zu allererst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Sigrid Karrer für das große Vertrauen in mich und für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Mark Berneburg, Chefarzt der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, für die Ermöglichung dieser Promotionsarbeit bedanken.

Von ganzem Herzen und mit besonderer Wertschätzung möchte ich meinen beiden Laborbüro-„Kolleginnen“ und Kaffeepartnerinnen Petra Unger und Dr. rer. nat. Stephanie Arndt danken!

Für die Einarbeitung in die praktischen Methoden im Labor und die enorme Unterstützung bei jeglichen Fragen rund um die experimentellen Versuche sowie auch statistische Auswertungen danke ich dir Petra. Mit viel Geduld hast du mit mir dein unglaubliches Wissen und deine langjährige Erfahrung im Labor geteilt und mir alles über das wissenschaftliche Arbeiten im Labor beigebracht.

Neben den in vivo Studien hast du mir, Steffi, auch bei allen fachlichen Fragen immer beiseite gestanden und mir jederzeit – auch wenn es mal stressig wurde – deine wertvolle Zeit gewidmet. Bei Problemen und wissenschaftlichen Fragen konnte ich immer auf deine fachkundige Unterstützung zählen und habe während meiner Zeit im Labor viel von dir lernen dürfen, vielen lieben Dank dafür!

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Mitarbeiter des Forschungslabors der Dermatologie darunter vor allem Tim, Gabi, Irina, Susanne und Barbara, danke für eure Hilfe bei jeglichen Fragen, eine wahnsinnig tolle Zeit und eine sehr familiäre Arbeitsatmosphäre! Vielen lieben Dank Judith für deine Hilfsbereitschaft und die aufbauenden Worte am Nachmittag.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie von Herzen, die mir zu jeder Zeit den Rücken gestärkt und mich unterstützt hat.