

C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) als physiologischer Antagonist der allergischen  
Kontaktdermatitis (ACD)

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Wendel, Michael  
aus Gießen

Gießen (2025)

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Klinik für Dermatologie und Allergologie (UKGM Standort Gießen)

Experimentelle Dermatologie und Allergologie

1. Gutachter: Prof. Dr. Thilo Jakob

2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Schäffler

Tag der Disputation: 13.03.2025

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Die allergische Kontaktdermatitis (ACD).....	1
1.2 C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3).....	5
1.3 Zytokine und Chemokine .....	6
1.4 Molekulare Mechanismen der Nickelallergie .....	8
1.5 Contact Hypersensitivity Modell (CHS-Modell) .....	11
1.6 Adipozytenspezifischer CTRP3-Knockout .....	13
1.7 Zielsetzung.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Zellkulturmedien.....	14
2.1.2 Verwendetes CTRP3 .....	16
2.1.3 Verwendete ELISA-Kits und sonstige Kits.....	16
2.1.4 Verwendete FACS-Antikörper .....	17
2.1.5 Chemikalien, Stimulanzen & Pufferbestandteile .....	19
2.1.6 Einweg und Verbrauchsmaterialien .....	23
2.1.7 Geräte und Apparaturen .....	26
2.1.8 Mäuse und Zelllinien .....	29
2.1.9 Software .....	29
2.2 Methoden der Zellkulturexperimente .....	30
2.2.1 Kultivierung und Stimulation humaner THP (Tohoku Hospital Pediatrics) – 1 Zellen .....	30
2.2.2 Kultivierung und Stimulation von HUVEC's (Human Umbilical Vein Endothelial Cells).....	32
2.2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	34
2.2.4 Laktatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay) .....	36
2.2.5 Durchflusszytometrie (FACS) .....	37
2.2.6. Annexin V-FITC Apoptose-Färbung (FACS).....	38
2.3 Methoden der Mausexperimente.....	40
2.3.1 Mausmodell der CHS: Sensibilisierung und Provokation mit TNCB.....	40
2.3.2 Messung der Ohrschwellung .....	41
2.3.3 Organentnahmen.....	41
2.3.4 Organverdau für die FACS-Analysen.....	42
2.3.5 Standard FACS-Messungen .....	43
2.3.6 <i>Fat explant</i> - Stimmulationsversuche.....	44

2.3.7 Histologische Färbungen.....	45
2.4 Statistische Analysen .....	46
3. Ergebnisse .....	47
3.1 Einfluss von CTRP3 auf die Nickel-induzierte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen in HUVECs .....	49
3.1.1 Laktatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay) .....	49
3.1.2 FACS-Analyse (Annexin V-FITC Apoptose-Färbung).....	50
3.1.3 Einfluss von CTRP3 auf die LPS/Nickel-induzierte Sekretion von IL-6, IL-8 und MCP-1 in HUVEC's.....	51
3.2 Einfluss von CTRP3 auf die Nickel-induzierte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen in THP-1 Zellen.....	54
3.2.1 Laktatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay) .....	54
3.2.2 FACS-Analyse (Annexin V-FITC/PE-Färbung) .....	56
3.2.3 Einfluss von CTRP3 auf die LPS/Nickel-induzierte Sekretion von IL-8 und MCP-1 in THP-1 Zellen.....	57
3.3 Ergebnisse der CTRP3-Knockout Mausexperimente: .....	61
3.3.1 Ohrdickenmessung nach erfolgter Challenge mit TNCB.....	61
3.3.2 ELISA-Ergebnisse der <i>Fat explant</i> -Stimulationsversuche .....	63
3.3.3 Durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS-Analysen):.....	64
4. Diskussion .....	76
4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse .....	76
4.2 Diskussion der Methoden .....	77
4.3 Diskussion der Ergebnisse .....	80
5. Zusammenfassung .....	84
6. Summary .....	85
7. Abbildungsverzeichnis.....	86
8. Abkürzungsverzeichnis .....	88
9. Literaturverzeichnis.....	93
10. Anhang .....	104
11. Ehrenwörtliche Erklärung.....	110
12. Danksagung.....	111

## 1. Einleitung

### 1.1 Die allergische Kontaktdermatitis (ACD)

Die allergische Kontaktdermatitis (Englisch: *allergic contact dermatitis*, ACD) ist eine durch allergenspezifische T-Zellen vermittelte Entzündung der Haut (McSweeney et al., 2020). Klassifiziert wird sie als Typ IV-Allergie (Englisch: *delayed-type hypersensitivity response*) (Nassau et al., 2020).

Die Allergene der ACD sind überwiegend Haptene. Haptene sind niedermolekulare Substanzen wie zum Beispiel Nickel, Duft- oder Konservierungsstoffe (Martin et al., 2018). Mehr als die Hälfte aller ACD-Erkrankungen lässt sich auf die Sensibilisierung gegenüber Nickel zurückführen (Alinaghi et al., 2018).

In den Jahren 2005-2016 zeigte allein die Nickelallergie eine gemittelte Prävalenz von 8-18 % innerhalb der europäischen Bevölkerung (Ahlström et al., 2017). In der US-amerikanischen Bevölkerung lag die gemittelte Prävalenz der Nickelallergie im gleichen Zeitraum zwischen 15 % und 20 % (Moon et al., 2021).

Die hohe Prävalenz der Nickelsensibilisierung wird in erster Linie auf die Verwendung von Nickel-freisetzenden Konsumgütern zurückgeführt, die in direkten und längeren Kontakt mit der Haut gelangen (z.B. Schmuck, Armbanduhren, Piercings, etc.) (Nixon et al., 2018; Ahlström et al., 2019; Brar et al., 2021).

In der Europäischen Union wurde bereits in den 2000er Jahren die zugelassene Nickelfreisetzung solcher Gegenstände reglementiert. In den Vereinigten Staaten von Amerika fehlt eine solche Regelung bisher (Moon et al., 2021). Trotz signifikanter Erfolge der Regulierung blieb die Prävalenz in den EU-Ländern weiterhin sehr hoch (Ahlström et al., 2017). Deshalb fordern unterschiedliche Forschergruppen diesbezüglich auch in Europa noch weitergehende Beschränkungen der Nickelfreisetzung (Ahlström et al., 2017; Thyssen et al., 2011; Symanzik et al., 2019).

Die Nickel-induzierte ACD ist aber auch eine der häufigsten Berufskrankheiten der Haut (z.B. im Friseurberuf, oder in der Metallverarbeitung) und verursacht bei Chronifizierung schwere und langanhaltende Gesundheitsprobleme, die mit hohen sozioökonomischen Kosten verbunden sind (Martin et al., 2011; Kostner et al., 2017). In den USA wurden die Kosten für die Behandlung von berufsbedingter ACD im Allgemeinen für das Jahr 2005 mit 1,4 Milliarden Dollar angegeben (Cashman et al., 2012). Die Doktorarbeit beschäftigt sich mit regulierenden Mechanismen der Nickel-induzierten ACD.

### Klinisches Erscheinungsbild:

Die akute Phase der ACD äußert sich klinisch zunächst durch Bläschen und Erythem, daraufhin folgen Krustenbildung und Exsudation. Geht die Erkrankung in ein chronisches Stadium über kommt es zur Ausbildung von Papeln und Plaques, in der Folge zu Hyperkeratosen, Rhagaden, Schuppung und Lichenifikation (Werfel et al. 2021) Nach dem Erstkontakt mit einem Kontaktallergen folgt eine ca. 10-15 Tage lange Sensibilisierungsphase die klinisch nicht sichtbar ist. Erfolgt ein erneuter Allergenkontakt kommt es innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen zur Auslösung der beschriebenen Ekzemreaktion (Werfel et al. 2021).

### Pathogenese:

Die Pathogenese der ACD wird in zwei zeitlich getrennte Phasen unterteilt:

#### Phase 1: Sensibilisierung

Zunächst erfolgt die sogenannte Sensibilisierung (Englisch: sensitization). Dabei kommt das Immunsystem zum ersten Mal mit einem Allergen in Kontakt (siehe Abb. 1). Die Allergene der ACD können die Haut durchdringen und Komplexe mit intra- oder extrazellulären Proteinen bilden. Die dadurch entstehenden antigenen Strukturen sind groß genug, um von epidermalen Langerhans-Zellen und dermalen dendritischen Zellen erkannt zu werden (Martin et al., 2011; Corsini et al., 2018; Azeem et al., 2020).

Nickel- und Cobaltionen können auch ohne Komplexbildung zu einer Sensibilisierung führen, da sie in der Lage sind den humanen Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) direkt zu aktivieren (Schmidt et al., 2010, Raghavan et al., 2012). Dieser Prozess und die Rolle der innate Immunantwort bei der Entwicklung einer ACD werden unter Punkt 1.4 „Molekulare Mechanismen der Nickelallergie“ näher erläutert.

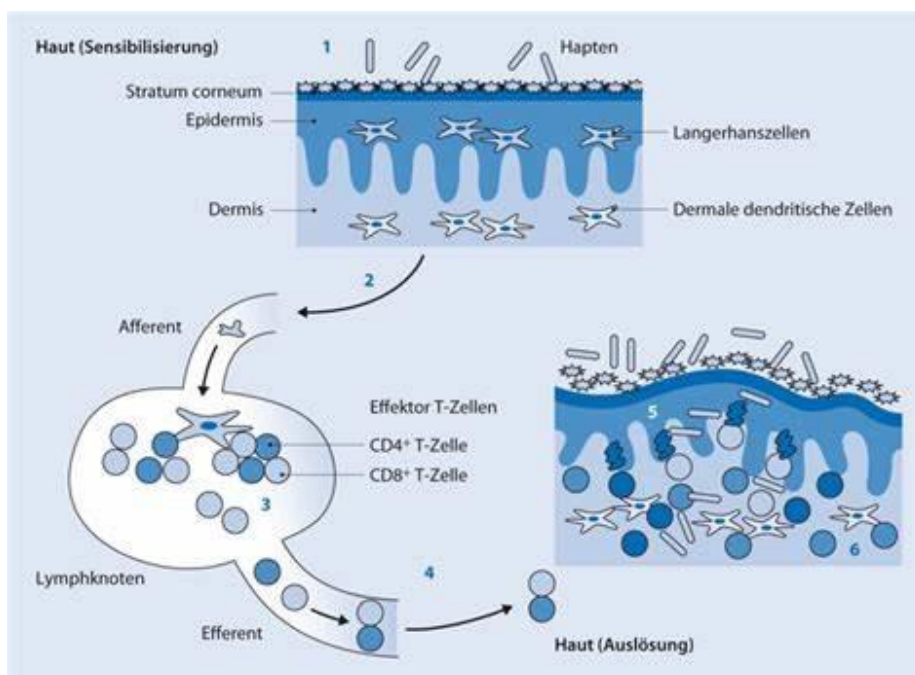
Die aktivierten epidermalen Langerhans-Zellen und dendritischen Zellen der Dermis begeben sich zum lokalen Lymphknoten und präsentieren dort die aufgenommenen Kontaktallergene naiven T-Zellen (siehe Abb. 1). Die Präsentation erfolgt dabei über Major Histocompatibility Complex (MHC) - Moleküle (Azeem et al., 2020).

In der Folge proliferieren allergenspezifische CD8(+) Tc1/Tc17- Zellen und CD4(+) Th1/Th17-Zellen und treten in den Blutkreislauf ein (Martin et al., 2011). Außerdem bilden sich allergenspezifische T<sub>RM</sub>-Zellen (Tissue resident memory T-cells), die im betroffenen Hautareal verbleiben und bei Reexposition zu einer schnellen Immunantwort führen (Martin et al., 2018).

## Phase 2: Auslösung

In der Auslösungsphase (Englisch: Elicitation phase, Challenge) induziert wiederholter Hautkontakt mit dem entsprechenden Allergen eine lokale Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. Interleukin (IL)-6, IL-12 und TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) und Chemokinen (z.B. IL-8 und MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1), wodurch die zirkulierenden, allergenspezifischen T-Zellen in das betroffene Hautareal rekrutiert werden (siehe Abb. 1) (Loré et al., 1998; Martin, 2014; Saito et al., 2016; Martin et al., 2018). Dort führen sie durch die Ausübung ihrer Effektorfunktionen zusammen mit den T<sub>RM</sub>-Zellen zu den klinischen Symptomen der ACD (Martin et al., 2018). Bei der ACD handelt es sich um eine Th1- prädominierte Entzündungsreaktion (Martin et al., 2018). Die Molekularen Mechanismen der ACD, sowie die Funktionen der einzelnen Zytokine und Chemokine werden aus Übersichtsgründen in eigenen Kapiteln dargestellt.

In der Folge kommt es zur Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen, die eine überschießende Immunreaktion verhindern sollen (Christensen et al., 2015; Martin et al., 2014).



**Abbildung 1: Schematische Übersichtsgrafik zur Pathogenese der ACD**

**Quelle der Abbildung:** Ott, Hagen: Allergisches Kontaktekzem, in: Kinderallergologie in Klinik und Praxis, Springer eBooks, 2014, doi: 10.1007/978-3-642-36999-5\_10, S. 199-209, die Genehmigung zur Verwendung der Abbildung befindet sich im Anhang.

### Beweggründe für die vorliegende Arbeit:

Die „Volkskrankheit“ Nickelallergie kann bei den Betroffenen im Alltag mit sehr belastenden Symptomen einhergehen (AWMF-S1-Leitlinie: „Kontaktekzem“, 2021).

Die AWMF-S1-Leitlinie zur Behandlung der ACD (Dickel et al., 2021) sieht bisher lediglich eine symptomlindernde Therapie vor (z.B. durch die topische Anwendung von Glukokortikoiden, oder den Off-Label Einsatz von Calcineurininhibitoren). Vor allem in Bezug auf die möglicherweise resultierende Berufsunfähigkeit der Patienten ist es sehr wichtig, die molekularen Mechanismen der ACD genauer zu charakterisieren und konsekutiv potentielle Ansätze für alternative Behandlungsmöglichkeiten der Nickel-induzierten ACD zu finden.

In dieser Doktorarbeit vorausgegangenen Untersuchungen wurde herausgefunden, dass Nickel- und Cobaltionen in der Lage sind, den humanen Toll-like Rezeptor 4 direkt zu aktivieren. Dadurch wurde klar, dass sie die gleiche Signalkaskade wie Lipopolysaccharid (LPS) nutzen (Schmidt et al., 2010; Raghavan et al., 2012).

In der Untersuchung von *Kopp et al., 2010* konnte gezeigt werden, dass das Adipokin CTRP3 (C1q/TNF-related protein-3) einen inhibitorischen Effekt auf die LPS-induzierte, Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) -abhängige, pro-inflammatorische Immunantwort von Monozyten und Adipozyten ausübt.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob der von *Kopp et al.* beschriebene entzündungshemmende Effekt von CTRP3 auch bei der Nickel-induzierten Inflammation nachgewiesen werden kann. Sollte sich diese Theorie bestätigen, liefert die Doktorarbeit möglicherweise einen erfolgversprechenden Ansatz für die weitere Forschung im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten der Nickel-induzierten ACD.

Einen Hinweis zur Erhärtung der Theorie liefert die Kombination der Erkenntnisse aus mehreren epidemiologischen Untersuchungen:

So stellten die Arbeitsgruppen *Lusi et al., 2015* und *Watanabe et al., 2018* fest, dass adipöse Menschen signifikant häufiger von einer Nickelallergie betroffen sind, als nicht adipöse Menschen.

*Deng et al., 2015* und *Wolf et al., 2015* lieferten Daten darüber, dass adipöse Menschen signifikant niedrigere CTRP3 Serum-Konzentrationen aufweisen.

Die Kombination der genannten Untersuchungsergebnisse deutet auf einen möglichen Kausalzusammenhang hin.

Im Folgenden soll deshalb der Einfluss von CTRP3 auf die Ausprägung einer Nickel-induzierten Kontaktallergie wissenschaftlich untersucht werden.

## 1.2 C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3)

Die Familie der C1q/TNF-related proteins (CTRP's) gehört zur Gruppe der Adipokine (Li et al., 2017). Adipokine sind vom Fettgewebe sezernierte, physiologisch und immunologisch wirksame Moleküle (Trujillo et al., 2006; Kovács et al., 2020). Adipokine spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation von systemischen Entzündungsprozessen. Es gibt sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirksame Adipokine (Kovács et al., 2020). Die Familie der CTRP's bildet zusammen mit Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , Adiponektin und anderen Proteinen, welche die charakteristische C1q-Domäne besitzen, die sogenannte C1q/TNF-Superfamilie (Li et al., 2017).

Das C1q/TNF-related Protein 3 (CTRP3) stellt aufgrund seiner Eigenschaften einen besonderen Vertreter innerhalb der CTRP-Familie dar (Li et al., 2017). Es gilt als anti-inflammatorisch, anti-apoptotisch, pro-angiogen, kardioprotektiv und anti-diabetogen (Jain et al., 2019).

Synonyme für CTRP3 sind CORS26 (Maeda et al., 2001), Cartductin (Akiyama et al., 2006; Maeda et al., 2005) und Cartonectin (Schäffler et al., 2007; Wölfling et al., 2008).

Es konnte insbesondere gezeigt werden, dass CTRP3 eine inhibitorische Wirkung auf die über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) vermittelte, pro-inflammatorische Immunantwort nach Stimulation mit LPS aufweist (Kopp et al., 2010). Klassische Kontaktallergene wie Nickel (Ni) und Cobalt (Co) aktivieren ebenfalls den TLR4 und die damit verbundenen pro-inflammatorischen Signalwege (näheres siehe Punkt 1.4 „Molekulare Mechanismen der Nickelallergie“, S. 8) (Schmidt et al., 2010; Raghavan et al., 2012). In der bisherigen Literatur finden sich keine Daten zum Einfluss von CTRP3 auf die Nickel-induzierte Immunantwort.

Bis dato ist noch kein Rezeptor bekannt, über den CTRP3 seine anti-inflammatorische Wirkung vermittelt (Schmid et al., 2021b).

Menschen mit Adipositas weisen signifikant reduzierte Konzentrationen von zirkulierendem CTRP3 auf (Deng et al., 2015; Vgl. Wolf et al., 2015). In der Untersuchung von *Deng et al., 2015* lag die CTRP3-Serumkonzentration von

Normalgewichtigen bei  $136.29 \pm 41.86$  ng/ml und die der Probanden mit Übergewicht bei  $93.11 \pm 40.26$  ng/ml.

Im Blut zirkuliert CTRP3 in unterschiedlich schweren oligomeren Komplexen: Als Trimer (<100 kDA), mit mittlerem molekularem Gewicht (=MMW: 100-300 kDA), oder mit hohem molekularem Gewicht (=HMW: >300 kDA) (Alamian et al., 2020). Es zirkuliert dabei hauptsächlich als HMW-Komplex (>50 %) oder MMW-Komplex (Trogen et al., 2019). Trimer- oder Monomerformen konnten in der Untersuchung von Trogen et al., 2019 nicht nachgewiesen werden. Bei Kindern im Alter von 7-10 Jahren konnte eine signifikante, negative Korrelation zwischen MMW-CTRP3 und dem BMI festgestellt werden (Alamian et al., 2020). Die Serumkonzentrationen der Triglyceride, sowie die von VLDL (very low-density lipoprotein) und Insulin korrelierten ebenfalls negativ mit MMW-CTRP3 (Alamian et al., 2020). Bei Erwachsenen zeigte sich eine positive Korrelation zwischen HMW-CTRP3 und der Serum Triglycerid-Konzentration (Trogen et al., 2019). Möglicherweise spielt nicht nur die absolute CTRP3-Konzentration, sondern auch die Art der Komplexbildung eine Rolle bei den verschiedenen CTRP3-induzierten Effekten.

### 1.3 Zytokine und Chemokine

Zytokine und Chemokine sind elementarer Bestandteil aller Phasen der ACD. (Weber et al., 2010, Martin, 2014) Es handelt sich dabei um eine vielseitige Gruppe von Peptiden und Proteinen die der Signalübertragung von Zellen dienen und die Interaktionen zwischen Zellen beeinflussen (Opal et al., 2000, Jarczok et al., 2022). Man unterteilt die Familie der Zytokine und Chemokine in weitere Subfamilien, darunter die Familie der Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren und koloniestimulierenden Faktoren (Tilg et al., 2000). Im folgenden Abschnitt wird die Funktion von ausgewählten ACD-relevanten Zytokinen und Chemokinen orientierend dargestellt. Die Einordnung der genannten Zytokine in die pathophysiologischen Mechanismen der ACD erfolgt unter Punkt 1.4 „Molekulare Mechanismen der Nickelallergie“:

#### Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ):

TNF- $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle bei der Stimulation und Aktivierung von Immunzellen und ist damit an der Bekämpfung von Krankheitserregern und Tumoren beteiligt (Idriss et al., 2000, Fajgenbaum et al., 2020). Es ist ein potenter Aktivator des NF- $\kappa$ B Signalwegs und führt unter anderem zur Expression multipler proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6) und Chemokine (z.B. IL-8 und MCP-1) (Fajgenbaum et al., 2020, Yu et al., 2020). Im Mausmodell der ACD konnte gezeigt werden, dass es ohne TNF- $\alpha$  nicht

zu einer Migration von dendritischen Zellen zum regionalen Lymphknoten und damit auch nicht zu einer Sensibilisierung kommt (Cumberbatch et al., 1997).

#### Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-18 (IL-18) und Interleukin-12 (IL-12):

IL-1 $\beta$  und IL-18 werden von Inflammasomen aus Vorstufen (pro-IL-1 $\beta$ /pro-IL-18) aktiviert (Martin 2014). Inflammasomen sind multimolekulare zytosolische Sensoren, die pathogene Mikroorganismen und sterile Stressoren (z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS)) erkennen können (Martin 2014, Fajgenbaum et al., 2020). Es resultiert die Aktivierung der Caspase-1, welche pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in die aktive Form überführt. IL-18 synergisiert mit IL-1 $\beta$ , IL-12 und IL-15 und stimuliert die Freisetzung von Interferon- $\gamma$  aus T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), wodurch Entzündungsreaktionen vom Th1-Typ (wie z.B. im Rahmen der ACD) gefördert werden (Martin et al., 2018, Fajgenbaum et al., 2020). Im Mausmodell der ACD konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  vorliegen muss damit eine Migration von Langerhans-Zellen in den regionalen Lymphknoten - und damit eine Sensibilisierung – erfolgen kann (Cumberbatch et al., 1997). IL-18 fördert die Migration von Langerhans-Zellen ebenfalls (Cumberbatch et al., 2001).

#### Interleukin-6 (IL-6):

Interleukin-6 ist ein wichtiger Mediator von akuten Entzündungsreaktionen (Fajgenbaum et al., 2020). Es handelt sich dabei um ein komplexeres Zytokin mit pleiotropen Funktionen, da es sowohl von Immunzellen als auch von Nicht-Immunzellen in den unterschiedlichsten Geweben produziert und erkannt werden kann (Kang et al., 2019, Fajgenbaum et al., 2020). Hohe IL-6 Konzentrationen führen beispielsweise zu einer verminderten E-cadherin-Expression von Endothelzellen, wodurch sich die vaskuläre Permeabilität erhöht (Fajgenbaum et al., 2020). Außerdem fördert IL-6 die Sekretion der Chemokine IL-8 und MCP-1 (Fajgenbaum et al., 2020).

#### Interferon- $\alpha$ (INF- $\alpha$ ):

Im Rahmen der ACD kommt es zur Sekretion von INF- $\alpha$  im betroffenen Hautareal (Martin, 2014). Die Stimulation mit INF- $\alpha$  führt zu einem Heranreifen von dendritischen Zellen und fördert deren Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren (Niewold et al., 2010). Die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen wird durch die Behandlung von dendritischen Zellen mit INF- $\alpha$  unterdrückt, während Th1-vermittelte Entzündungsreaktionen gefördert werden (Gigante et al., 2008).

#### Interleukin-8 (IL-8, CXCL8):

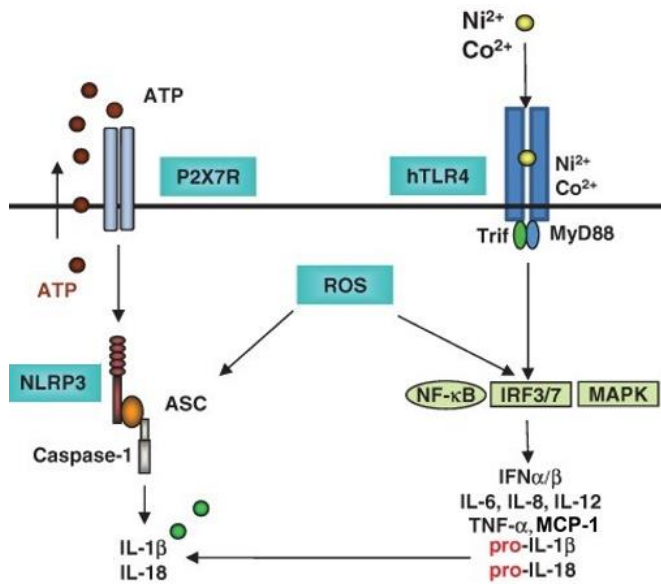
IL-8 ist ein Chemokin welches sowohl neutrophile Granulozyten, als auch Monozyten anlockt und eine Wanderungsbewegung dieser Zellen induziert (Lund et al., 2004). Im Rahmen der ACD spielt es eine entscheidende Rolle, da für die Sensibilisierungs- und Auslösungsphase der ACD neutrophile Granulozyten im betroffenen Hautareal benötigt werden (Weber et al., 2014).

#### Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, CCL2):

Das Chemokin MCP-1 ist kritisch an der Entwicklung von Th1-vermittelten Entzündungsreaktionen beteiligt (Yoshimura et al., 2007). Im Mausmodell der ACD konnte gezeigt werden, dass MCP-1 von entscheidender Bedeutung für die Rekrutierung von T-Zellen und Monozyten in das betroffene Hautareal ist (Rand et al., 1996). In einem anderen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine MCP-1-Defizienz zu einer verminderten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt (Singh et al., 2021). ROS spielen im Rahmen der ACD eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, welches über die Caspase-1 pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in die aktive Form überführt (Martin, 2014).

### 1.4 Molekulare Mechanismen der Nickelallergie

Für die Ausbildung der ACD werden pro-inflammatorische Signale der angeborenen Immunantwort benötigt (Martin und Jakob, 2008; Weber et al., 2010; Schmidt et al., 2010). Der humane Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) spielt bei der Entwicklung einer Nickelallergie eine besonders entscheidende Rolle. Der Rezeptor wird unter anderem von Mastzellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen exprimiert (De Filippo et al., 2013, Olona et al., 2021, Cagliero et al., 2022, Stierschneider et al., 2023). TLR4 defiziente Mäuse, die einen humanen TLR4 exprimierten, konnten erfolgreich gegenüber Nickel sensibilisiert werden. Mäuse mit murinem TLR4 entwickelten dagegen keine Nickelallergie (Schmidt et al., 2010).



**Abbildung 2: TLR4-abhängige Mechanismen der allergischen Kontaktdermatitis**

**Quelle der Abbildung:** Martin, Stefan F.: New concepts in cutaneous allergy, in: Contact Dermatitis, Bd. 72, Nr. 1, 2014, doi:10.1111/cod.12311. Die Genehmigung zur Verwendung der Abbildung befindet sich im Anhang.

Nickelionen (Ni<sup>2+</sup>) sind in der Lage, direkt an Histidin-Reste des humanen TLR4 (hTLR4) zu binden und diesen zu aktivieren – dem murinen TLR4 fehlt diese Bindungsstelle (Schmidt et al., 2010). Über die Adapterproteine Trif und MyD88 resultiert die Aktivierung vom Transkriptionsfaktor NF-κB, der p38 Mitogen-activated-protein-Kinase (MAPK), sowie des Interferon regulatory factor 3 (IRF3) und IRF7 (Martin 2014; Saito et al., 2016). Daraufhin kommt es zur Expression mehrerer pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6, IL-12, Interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) und TNF- $\alpha$ ) und Chemokine (z.B. IL-8 und MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1) (Loré et al., 1998; Martin, 2014; Rachmawati et al., 2013; Saito et al., 2016). Außerdem kommt es zur Expression der inaktiven Zytokin-Vorstufen pro-IL-18 und pro-IL-1 $\beta$  (siehe Abb. 2) (Martin, 2014).

Die IL-6, IL-8 und MCP-1-Freisetzung von THP-1 Zellen (humane Monozytenzelllinie) und HUVEC's (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) wurde im Rahmen der *in vitro* Versuche als Indikator zur Quantifizierung der Nickel-induzierten Immunantwort verwendet. Ergebnisse über den Einfluss von CTRP3 auf die Nickel-induzierte Immunantwort dieser Zellen fehlen in der bisherigen Literatur.

Die Kontaktallergene induzieren außerdem die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Freisetzung von ATP (Adenosintriphosphat). ROS fördern die TLR-Signalgebung und die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung (Martin, 2014). ATP führt über den P2X7-Rezeptor ebenfalls zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (Adinolfi et al.,

2018). Daraufhin werden pro-Interleukin-18 (pro-IL-18) und pro-IL-1 $\beta$  von der Caspase-1 in die aktive Form überführt (siehe Abb. 2) (Martin, 2014).

Die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sind für die Migration von Langerhans-Zellen und dendritischen Zellen zum regionalen Lymphknoten von besonderer Bedeutung (Cumberbatch et al., 2001). Sowohl TNF- $\alpha$  als auch IL-1 $\beta$  müssen vorliegen, damit eine Migration von Langerhans-Zellen in den lokalen Lymphknoten - und damit eine Sensibilisierung - induziert werden kann (Cumberbatch et al., 1997). Das von Keratinozyten und Langerhans-Zellen produzierte Zytokin IL-18 fördert die Migration von Langerhans-Zellen ebenfalls (Cumberbatch et al., 2001).

Nach Aktivierung der p38 MAP-Kinase durch Nickel wurde bei dendritischen Zellen eine Hochregulation der Oberflächenmoleküle CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) CD83 und MHC-II beobachtet (Arrighi et al., 2001; Saito et al., 2016). CD80 und CD86 sind sogenannte Kostimulatoren. Durch ihre Interaktion mit dem T-Zell Oberflächenmolekül CD28 spielen sie für die Aktivierung von T-Zellen eine wichtige Rolle (Xiang et al., 2007). Das CD83-Molekül hat immunmodulatorische Funktionen und ist an der Reifung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt (Grosche et al., 2020). Die Funktion von MHC-II im Rahmen der ACD wurde unter Punkt 1.1 „Die Allergische Kontaktdermatitis (ACD)“ beschrieben.

Die TRL4-Aktivierung von Mastzellen und M1-Makrophagen führt im Mausmodell der ACD zur Sekretion der Chemokine CXCL1 und CXCL2 (CXC chemokine ligands 1/2) (De Filippo, 2013, Viola et al., 2019). In murinen Mastzellen liegen die genannten Zytokine als Granula gespeichert vor (De Filippo, 2013). IL-8 (Synonym: CXCL8) stellt das humane Analogon zu CXCL1/2 dar (Liew et al., 2019). Menschliche Mastzellen im Gewebe der Haut speichern IL-8 ebenfalls in Form von Granula (Möller et al., 1993). Sowohl CXCL1/2, als auch IL-8 führen zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das betroffene Hautareal. (De Filippo, 2013, Weber et al., 2014). Im Mausmodell der ACD konnte gezeigt werden, dass eine fehlende Freisetzung von CXCL1/2 aus Mastzellen zu einer signifikant reduzierten allergischen Reaktion führt (Martin et al., 2018). Für die Sensibilisierungs- und Auslösungsphase der ACD werden neutrophile Granulozyten im betroffenen Hautareal benötigt (Weber et al., 2014). Die von den neutrophilen Granulozyten sezernierte Myeloperoxidase (MPO) führt über die Oxidation von Biomolekülen zu Zellschädigungen (Strzępa et al. 2021). Konsekutiv wird die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6) und Chemokine (z.B. IL-8 und MCP-1) in der betroffenen Region deutlich gesteigert (Haegens et al. 2009, Strzępa et al., 2017, Fajgenbaum et al., 2020). Außerdem führt

die Freisetzung der MPO zu einer gesteigerten vaskulären Permeabilität (Strzępa et al. 2021).

In der Auslösungsphase führt die wiederholte Nিকেlexposition und die damit einhergehende lokale Zytokin- und Chemokinexpression zur Rekrutierung von allergenspezifischen, zirkulierenden T-Zellen in das betroffene Hautareal (Martin et al., 2018). Damit die Immunzellen die Blutbahn an der richtigen Stelle verlassen, werden unter anderem entsprechende Chemokine (z.B. MCP-1, Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL 10) und IL-8) und Adhäsionsmoleküle (z.B. intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) und E-Selektin) von den durch die Inflammation aktivierten Endothelzellen der betroffenen Region exprimiert (Goebeler et al., 1995; Sebastiani et al., 2001; Mai et al., 2013). Die genannten Adhäsionsmoleküle ermöglichen den von den Chemokinen angelockten Leukozyten das Anheften an die Endothelzellen und damit die Transmigration in das betroffene Hautareal (Mai et al., 2013).

Das Chemokin CCL1 (Chemokin (C-C motif) ligand 1; I-309) wird bei Patienten mit Nickel-induzierter ACD im bereits betroffenen Hautareal exprimiert. Dadurch werden selektiv regulatorische Th<sup>L10</sup>-Zellen und etwas weniger effektiv Th2-Zellen, jedoch keine Th1-Zellen, rekrutiert. Regulatorische T-Zellen sind ein wichtiger Regulator von Dauer und Ausmaß der Th1-vermittelten Entzündung und wirken über die Freisetzung von IL-10 einer überschießenden Immunantwort entgegen (Sebastiani et al., 2001; Martin et al., 2018).

Insgesamt ist die Pathogenese der allergischen Antwort hochkomplex und die präzisen Mechanismen der Nickelallergie sind weiterhin Gegenstand der Forschung (Ahlström et al., 2019; Genchi et al., 2020).

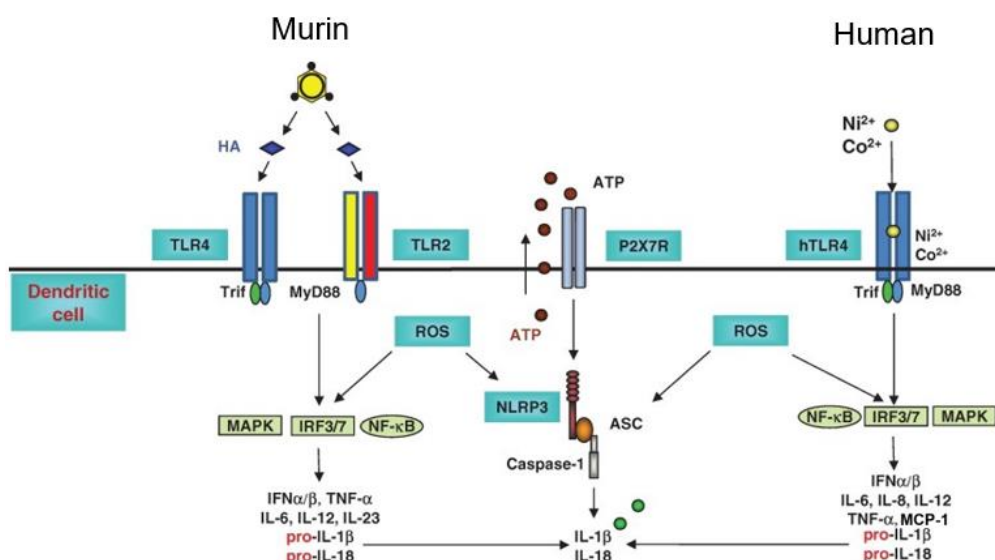
### 1.5 Contact Hypersensitivity Modell (CHS-Modell)

Das Mausmodell der ACD wird in der Literatur als Contact Hypersensitivity-Modell (CHS-Modell) bezeichnet (Christensen et al., 2011). Da Nickel den murinen TLR4 nicht direkt aktivieren kann, werden im CHS-Modell andere Kontaktallergene wie zum Beispiel 2,4,6-Trinitrochlorobenzene (TNCB) oder Oxazolone verwendet (Martin, 2014; Schmidt et al., 2010). In diesem Modell konnte eine entscheidende Rolle der Toll-like-Rezeptoren 2 und 4, sowie des NLRP3-Inflammasoms bei der Entwicklung einer CHS-Reaktion festgestellt werden (Martin und Jakob, 2008; Martin et al., 2008; Weber et al., 2010).

Mäuse die weder einen TLR4 noch einen TLR2 exprimierten konnten nicht gegen TNCB sensibilisiert werden (Martin et al., 2008).

Mäuse ohne den Adenosintriphosphat-Rezeptor (ATP-Rezeptor) P2X7 konnten ebenfalls nicht gegen die Kontaktallergene TNCB und Oxazolone sensibilisiert werden. P2X7-defiziente dendritische Zellen produzierten kein IL-1 $\beta$  nach Stimulation mit LPS oder ATP. Durch die Injektion von IL-1 $\beta$  ließen sich auch P2X7-defiziente Mäuse erfolgreich gegen TNCB sensibilisieren (Weber et al., 2010).

Im Rahmen der *in vivo* Versuche der Doktorarbeit wurde zur Sensibilisierung TNCB verwendet. Die molekularen Mechanismen der TNCB induzierten Kontaktallergie werden auf *Abbildung 3* vereinfacht dargestellt (Signalweg über murinen TLR2/TLR4) Die Mechanismen der Nickel-induzierten Sensibilisierungsreaktion beim Menschen werden zum Vergleich ebenfalls auf *Abbildung 3* ergänzend mit dargestellt (Signalweg über den humanen TLR4):



**Abbildung 3: TLR4-abhängige Mechanismen der allergischen Kontaktdermatitis im CHS-Modell**

Quelle der Abbildung: Martin, Stefan F.: New concepts in cutaneous allergy, in: Contact Dermatitis, Bd. 72, Nr. 1, 2014, doi:10.1111/cod.12311, S. 2–10. Die Genehmigung zur Verwendung der Abbildung befindet sich im Anhang.

Nickel- und Cobaltionen können direkt an den humanen TLR4 (hTLR4) binden. Kontaktallergene wie TNCB (2,4,6-Trinitrochlorobenzene) oder Oxazolone induzieren die Bildung von Hyaluronsäure (Englisch: hyaluronic acid; HA) - Fragmenten, die TLR2 und TLR4 aktivieren. Die gemeinsame Endstrecke der darauffolgenden pathophysiologischen Mechanismen wurde unter Punkt 1.4 „Molekulare Mechanismen der Nickelallergie“ bereits dargestellt.

## 1.6 Adipozytenspezifischer CTRP3-Knockout

Die in dieser Arbeit verwendeten CTRP3-Knockout Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe „Molekulare Adipokinforschung“ (Molekulare Endokrinologie Universitätsklinik Gießen) entwickelt und bereitgestellt. Es handelt sich dabei nicht um einen vollständigen, sondern um einen auf Adipozyten beschränkten CTRP3-Knockout. Die volle Nomenklatur der Mäuse lautet *C57BL/6-Tg(AP2-cre)-C1qtnf3<sup>tm1Schea</sup>*. Es handelt sich dabei um das erste etablierte Mausmodell mit einem adipozytenspezifischen CTRP3-Knockout. In der bisherigen Literatur fehlen Untersuchungen über den Einfluss des Knockouts auf die CHS-Reaktion.

Der makroskopische Phänotyp des abdominalen Situs zwischen den Knockoutmäusen und Wurfgeschwister-Kontrollmäusen war identisch (Schmid et al., 2021a). Auf zellulärer Ebene fanden sich keine knockoutbedingten Veränderungen des Phänotyps der Adipozyten (Schmid et al., 2021a). Der adipozytenspezifische CTRP3-Knockout zeigte überraschenderweise keinen Einfluss auf die Serumkonzentrationen von zirkulierendem CTRP3 (Schmid et al., 2021a). Diese Informationen waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung der vorliegenden Doktorarbeit jedoch noch nicht bekannt. Schmid et al. empfehlen aufgrund der unbeeinträchtigten Serumkonzentrationen CTRP3 nicht mehr als klassisches Adipokin zu betrachten (Schmid et al., 2021a).

## 1.7 Zielsetzung:

Epidemiologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass Menschen mit niedrigeren C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3) -Serum Konzentrationen häufiger an Nickel-induzierter ACD erkranken könnten (Lusi et al., 2015; Watanabe et al., 2018; Deng et al., 2015; Wolf et al., 2015). Es konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass CTRP3 einen inhibitorischen Effekt auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte, Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) -abhängige, pro-inflammatorische Immunantwort ausübt (Kopp et al., 2010). Nickel- und Cobaltionen aktivieren den TLR4 im Rahmen der ACD ebenfalls direkt und nutzen damit die gleiche Signalkaskade wie LPS (Schmidt et al., 2010; Raghavan et al., 2012).

Wesentliches Ziel der Doktorarbeit war es daher zunächst *in vitro* herauszufinden ob CTRP3 prinzipiell in der Lage ist, neben der LPS-induzierten Inflammation, auch die Nickel-induzierte Inflammation im Zellkulturmodell zu unterdrücken. Die Ergebnisse der *in vitro* Experimente wurden dann in einem zweiten Schritt *in vivo* mit Hilfe eines CTRP3-Knockout Mausmodells überprüft.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellkulturmedien

<b>Kulturmedium der THP-1 Zellen:</b>		
<b>Ware</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
500 ml RPMI 1640 Medium, no glutamine	Cat: 31870025	ThermoFisher Scientific; produziert in Paisley, Schottland
50 ml fetal bovine serum (FBS) Superior	Cat: S 0615	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
5 ml Penicillin-Streptomycin, 10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin	Cat: P06-07100	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
2-Mercaptoethanol, 99 %, extra rein, ACROS Organics™	Cat: 125470010	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

<b>Einfriermedium der THP-1 Zellen:</b>	Kulturmedium der THP-1-Zellen + 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Cat: D2650)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
-----------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------

<b>Kulturmedium der HUVEC's:</b>		
<b>Ware</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
500 ml Endothelial Cell Growth Medium	Cat: C-22010	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland

SupplementPack Endothelial Cell GM	Cat: C-39210	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gentamicin sulfate- Amphotericin (GA-1000)	Cat: CC-4083	Lonza Group AG, Basel, Schweiz

<b>Einfriermedium der HUVEC's:</b>	Kulturmedium der HUVEC's + 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Cat: D2650)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------

<b>Hanks-Medium:</b>		
<b>Ware</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
200 ml Hanks' balanced salt solution	Cat: P04-3350	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
2 ml Gibco™, Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Cat: 15140122	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
3 ml Gibco™ HEPES (1M), (steril filtrieren; 0,22 µm Filter)	Cat: 15630056	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

<b>Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) - Puffer:</b>		
<b>Ware</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
1 l Phosphate-buffered saline (PBS) - Puffer	Cat: A0964,9100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
20 ml FBS Superior	Cat: S 0615	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
10 ml UltraPure™ 0.5M Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH 8.0	Cat: 15575020	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
0,02% Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Cat: 4221.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.2 Verwendetes CTRP3

<b>Ware</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
CTRP3	Cat: 9398-TN-025/CF	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA
CTRP3	Cat: H00114899-P01	Abnova, Taipeh, Taiwan
CTRP3	Cat: TP313742	OriGene Technologies, Inc., Rockville, Maryland, USA
CTRP3	Mol. Endokrinologie Gießen	Arbeitsgruppe Molekulare Adipokinforschung, Gießen, Deutschland

### 2.1.3 Verwendete ELISA-Kits und sonstige Kits

<b>ELISA-Kits</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
GM-CSF ELISA (Human)	Cat: 432001	BioLegend, Inc., San Diego, California, uSA
IL-6 ELISA (Human)	Cat: 555220	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
IL-6 ELISA (Maus)	Cat: 431301	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
IL-8 ELISA (Human)	Cat: 431501	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
MCP-1 ELISA (Human)	Cat: 438804	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
MCP-1 ELISA (Maus)	Cat: 432701	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
TNF- $\alpha$ ELISA (Human)	Cat: 430201	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
TNF- $\alpha$ ELISA (Maus)	Cat: 430901	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA

Sonstige Kits	Bestellnummer	Hersteller
Annexin V-FITC Apoptose Färbung	Cat: ab14085	Abcam plc, Cambridge, GB
Fixierbarer Viabilitätsfarbstoff eFluor™ 506,	Cat: 65-0866-14	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zytotoxizitäts-Assay	Cat: 11644793001	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

#### 2.1.4 Verwendete FACS-Antikörper

Zielmolekül	Fluorochrom	Klon	Ursprung	Klasse	Hersteller
<b>CD103</b>	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	2E7	Hamster	IgG	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
<b>CD115</b>	Allophycocyanin (APC)	AFS98	Ratte	IgG2a	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
<b>CD11b</b>	APC/Cyanine7	M1/70	Ratte	IgG2b	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
<b>CD11c</b>	PE/Cyanine 7	N418	Hamster	IgG	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
<b>CD16/CD32</b>	Purified	93	Ratte	IgG2a	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<b>CD206</b>	APC	C068C2	Ratte	IgG2a	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
<b>CD25</b>	PE/Cyanine 7	PC61	Ratte	IgG1	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
<b>CD3</b>	APC-eFluor780	145-2C11	Hamster	IgG	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

<b>CD4</b>	FITC	RM4-5	Ratte	IgG2a	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>CD45</b>	Brilliant Violet 421	30-F11	Ratte	IgG2b	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
<b>CD45R</b>	PE/Cyanine 5	RA3-6B2	Ratte	IgG2a	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>CD49b</b>	APC	DX5	Ratte	IgM	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
<b>CD68</b>	Alexa Fluor® 488	FA-11	Ratte	IgG2a	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
<b>CD8a</b>	Peridin Chlorophyll Phycoerythrin (PerCP)	53-66.7	Ratte	IgG2a	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
<b>F4/80</b>	Phycoerythrin (PE)	BM8	Ratte	IgG2a	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
<b>GR-1</b>	PE	RB6-8C5	Ratte	IgG2a	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>MHC-II</b>	APC/Cyanine7	M5/114.15.2	Ratte	IgG2b	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
<b>NK-1.1</b>	PE	PK136	Maus	IgG2a	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA

## 2.1.5 Chemikalien, Stimulanzen & Pufferbestandteile

<b>Chemikalie</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
2,4,6-Trinitro-chlorbenzol (TNCB)	Cat: 79874	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Aceton, 1 l, Glas	Cat.: 5025.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V (pH 7,0)	Cat: A1391	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	Cat: sc-203004A	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, USA
Decosept AF, Alkoholisches Schnelldesinfektionsmittel	Cat: 00-311-010	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Cat: D2650	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
DNase I, fraction II, 100 mg (in H <sub>2</sub> O lösen, 10 mg/ml)	Cat: 05401160001	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), ohne Ca und Mg	Cat: P04-36500	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
ELISA-Beschichtungspuffer	4,2g NaHCO <sub>3</sub> + 1,78g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 500ml vollentsalztem Wasser	Kombination der in dieser Tabelle aufgelisteten Bestandteile
Eosin G-Lösung 1 % wässrig, 1 l	Cat: 3137.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure, 1 l, Kunst.	Cat: 3738.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Essigwasser	2 % Essigsäure in vollentsalztem H <sub>2</sub> O	Kombination der in dieser Tabelle aufgelisteten Materialien
Ethanol 100 %	Cat: 27693	Otto Fischer GmbH & Co.KG, Saarbrücken, Deutschland
Ethanol 70 %	Cat: ETO-5000-70-1	Liquid Production-GmbH, Flintsbach, Deutschland
Ethanol 96 %	Cat: 27685	Otto Fischer GmbH & Co.KG, Saarbrücken, Deutschland
Gelatine aus Schweinehaut	Cat: G1890	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Gibco™, DPBS, no calcium, no magnesium	Cat: 14190094	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Giemsa-Stammlösung, 1 l	Cat: T862.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CAS: 7664-93-9	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III	Cat: 1051740500	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), w: Ca and Mg, w: 0.35 g/L NaHCO <sub>3</sub>	Cat: P04-32500	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Liberase™ TM Research Grade (in HBSS lösen 26U/ml)	Cat: 5401119001	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Natriumcarbonat)	Cat: 8563.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat)	Cat: S5761-500G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Cat: 4221.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (Nickel(II)-chlorid- Hexahydrat)	Cat: 654507-25G	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
NiSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O (Nickel(II)-sulfat- Hexahydrat)	Cat: 227676-100G	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Olivenöl	Cat: O1514	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Cat: CN49.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Puffer (1X Dulbecco's) – Pulver, (Das Pulver wurde in destilliertem Wasser gelöst um unsterilen PBS-Puffer zu erhalten)	Cat: A0964,9100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phorbol-12-Myristat-13- Acetat (PMA)	Cat: P1585	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Probenverdünner	Phosphate-buffered saline (PBS) - Puffer + 1 % Bovines Serumalbumin (BSA) und 0,02 % Natriumazid	Kombination der in dieser Tabelle aufgelisteten Bestandteile
ROTI®Histofix	Cat: A146.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

ROTI®Histokitt	Cat: 6638.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ROTI®Histol, 2.5 l	Cat: 6640.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Staurosporin	Cat: S5921	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
TMB Substrate Set	Cat: 421101	BioLegend, Inc., San Diego, California, USA
TNBS	Cat: P2297	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Triton™ X-100	Cat: T9284	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
TrypLE™ Express Enzyme (1x), phenol red	Cat: 12605028	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TWEEN® 20	Cat: P1379-250ML	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
UltraPure™ 0.5M EDTA, pH 8.0	Cat: 15575020	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Weise-Pufferkonzentrat (100x) pH 7,2 zur Herstellung von phosphatgepufferter Salzlösung	Cat: 1740.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Cat: 4436.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

<b>Stimulanz</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Lipopolysaccharid (LPS) aus <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) O111:B4	Cat: L4391	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Ultrapure LPS, <i>E. coli</i> O111:B4, (Nur im Rahmen der Mausexperimente)	Cat: t1rl-3pelps	InvivoGen Corp, San Diego, Kalifornien, USA

### 2.1.6 Einweg und Verbrauchsmaterialien

<b>Ware</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
10 ml serologische Pipette	Cat: 607180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
25 ml serologische Pipette	Cat: 760180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
5 ml serologische Pipette	Cat: 606180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Half Area ELISA 96-Loch-Mikrotiterplatte, transparent	Cat: 675061	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Polystyrol 96-Loch-Mikrotiterplatte, transparent („Verdünnungsplatte“)	Cat: 650101	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Polystyrol Zellkultur 96-Loch-Mikrotiterplatte, transparent	Cat: 650180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® 24-Loch-Zellkulturplatte	Cat: 662160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® Filter Top Zellkultur Flasche, (T75)	Cat: 658175	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

CELLSTAR® 12-Loch-Zellkulturplatte	Cat: 665180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellsieb 30 µm, steril	Cat: 04-004-2326	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland
Zellsieb 50 µm, steril	Cat: 04-004-2327	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland
Pipettenspitzen, (Combitips advanced®) 0.5 ml	Cat: 0030089634	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, (Combitips advanced®) 2.5 ml	Cat: 0030089650	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, (Combitips advanced®) 5 ml	Cat: 0030089669	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einfrierröhrchen, (Cryo.s®), 1 ml	Cat: 123279	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser Grösse 24 x 60, Stärke 1	Cat: 01-2460/1	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Zellsieb (Falcon®) 70 µm, weiß, steril	Cat: 352350	Corning Incorporated, Glendale, Arizona, USA
Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5 ml, 75x12mm	Ref: 55.1579	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Kosmetiktücher Brozell hochweiß, 2-lagig	Cat: 90663	Brod GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland
Nunc™ Dichtungsbänder	Cat: 236366	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Nunc™ EasYFlask™ 175 cm <sup>2</sup> Zellkulturkolben, (T175)	Cat: 159920	ThermoFisher Scientific, produziert in Roskilde, Dänemark

Nunc™ EasYFlask™ 75 cm <sup>2</sup> Zellkulturkolben, (T75)	Cat: 156472	ThermoFisher Scientific, produziert in Roskilde, Dänemark
Objektträger 90° geschliffen, weiß, SuperFrost®	Cat: 03-0060	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Pasteurpipetten, 150 mm	Cat: M4150NO250SP4	Kimble Chase Life Science and Research Products LLC, Vineland, New Jersey, USA
Pehazell® Clean (Zellstoff)	Cat: 9130740	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Pipettenspitzen (0,2-20 µl), Rainin® LTS®	Cat: 613-0721	VWR (Avantor Incorporated), Radnor, Pennsylvania, USA
Pipettenspitzen (0,5-250 µl), Rainin® LTS®	Cat: 613-0727	VWR (Avantor Incorporated), Radnor, Pennsylvania, USA
Pipettenspitzen (100-1000 µl), Rainin® LTS®	Cat: 613-0729	VWR (Avantor Incorporated), Radnor, Pennsylvania, USA
Pipettenspitzen (500-5000 µl)	Cat: 022492080	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Polypropylen Röhren, konischer Boden, natur, steril, 15 ml	Cat: 188271-N	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Polypropylen Röhren, konischer Boden, natur, steril, 50 ml	Cat: 227261	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Polystyrene Reservoir, 50 ml	Cat: 89094-682	VWR (Avantor Incorporated), Radnor, Pennsylvania, USA

Probenfläschchen ROTILABO® 2 ml mit Gewinde, Klarglas	Cat: E159.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäß (0,5 ml)	Safe-Lock-Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Safe-Lock-Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß (2 ml)	Safe-Lock-Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß (5 ml)	Safe-Lock-Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss (2 ml)	Safe-Seal-Microtubes	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen, 1,3 ml, PP, 8,5/44 mm, runder Boden, Natur	Cat: 102201	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Vasco® Nitril white, Nitril Untersuchungshandschuhe L	Cat: 9208437	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Vernichtungsbeutel	Cat: 86.1197	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zubehör für Probenfläschchen ROTILABO® 0,1 und 2 ml, Schraubkappen ohne Loch	Cat: E162.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.7 Geräte und Apparaturen

<b>Geräte</b>	<b>Herstellerbezeichnung/ Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugsystem mit Vakuumpumpe	Vacunsafe comfort	Integra Biosciences AG, Biebertal, Deutschland

CO2-Inkubator (Brutschrank)	HERAcell 150i	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ELISA-Reader	InfiniteM200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Durchflusszytometer	FACSCanto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
FACS-Software	BD FACSDiva Software	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Gefrierschrank – 20 °C	Premium NoFrost	Liebherr-International Deutschland GmbH; Biberach an der Riß; Deutschland
Gefrierschrank – 80 °C	HFU T Series	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gefrierschrank – 80 °C	Ultra Low Temperatur Freezer	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, USA
Hybridisierungsöfen		Bachofer Laboratoriumsgeräte GmbH + Co KG, Reutlingen, Deutschland
Inverses Labormikroskop	DM IL LED	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kühl-/Gefrierschrank 4 °C; - 20 °C	Economic - Cooler	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Kühl-/Gefrierschrank 4 °C; - 20 °C	Premium NoFrost	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Magnetrührer	RCT	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland

Magnetstäbchen ROTILABO®, Ø 2 mm, Länge 5 mm	Cat: 0955.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrometer	Pocket thickness measures, Model 25M	B. C. Ames Incorporated, Framingham, Massachusetts, USA
Multipette® M4	Cat: 4982000012	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetboy2	Integra Biosciences AG, Biebertal, Deutschland
Pipetten (12-Kanal): 10- 100 µl, 30-300 µl	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten (1-Kanal): 0,1- 2,5 µl; 0,5-10 µl; 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100- 1000 µl, 0,5-5 ml	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Scherkopf	Scherkopf für GT416; #GT608	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Schermaschine	Aesculap Akku- Schermaschine Isis GT421	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Sicherheitswerkbank (Sterilbank)	HERAsafe KS	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stickstoffbehälter	K Series	Cryo Products B.V., 's- Hertogenbosch, Niederlande
Trockenschrank		Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Vortexmischer	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA
Waschsystem	StatMatic II	Tricontinent Scientific Inc., Auburn, California, USA
Wasserbad	SW22	JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland

Zählkammer	Neubauer Improved Brightline	LO - Laboroptik Ltd., Lancing, England
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge	Megafuge 40 R	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

### 2.1.8 Mäuse und Zelllinien

<b>Mäuse/Zellen</b>	<b>Bezeichnung/ Bestellnummer</b>	<b>Herkunft</b>
CTRP3-Knockout Mäuse	C57BL/6-Tg(AP2-cre)- C1qtnf3tm1Schea	Arbeitsgruppe „Molekulare Adipokinforschung“, Medizinische Klinik und Poliklinik III: Endokrinologie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Gießen, Deutschland
Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)	Cat: C-12203	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tohoku Hospital Pediatrics-1 (THP-1) Zellen	ATCC-Nr.: TIB-202	American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA

### 2.1.9 Software

<b>Software</b>	<b>Bezeichnung/Version</b>	<b>Hersteller</b>
FACS- Auswertungssoftware	FlowJo Version 10.6.1	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Statistik-/ und Auswertungssoftware	GraphPad Prism Version 5.01	GraphPad Software, San Diego, USA
Grafikprogramm	Procreate Version 5.3.7	Savage Interactive Pty Ltd., Hobart, Australien

## 2.2 Methoden der Zellkulturexperimente

Im Folgenden werden die Methoden der Dissertation angeführt. Die verwendeten Materialien, Reagenzien, Geräte und Softwareprogramme wurden unter Punkt 2.1 „Material“, S. 14-29 aufgelistet.

### 2.2.1 Kultivierung und Stimulation humaner THP (Tohoku Hospital Pediatrics) - 1 Zellen

Die THP (Tohoku Hospital Pediatrics) - 1 Zellen (ATCC-Nr. TIB-202) wurden aus dem peripheren Blut eines einjährigen Kindes männlichen Geschlechts mit akuter monozytärer Leukämie abgeleitet.

Die THP-1 Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in stehenden T75-Flaschen (CELLSTAR®) kultiviert.

Außerdem wurden die Zellen zwei bis dreimal wöchentlich unter sterilen Bedingungen passagiert. Die Zellsuspension wurde dafür innerhalb einer Sterilbank in ein 50 ml Polypropylen Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 x g für sieben Minuten zentrifugiert (Megafuge 40 R). Nach dem Absaugen des Überstandes mit Hilfe eines Absaugsystems, wurden die Zellen in 5 ml THP-1 Kulturmedium (siehe Punkt 2.1.1 „Zellkulturmedien“, S. 14) resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die manuelle Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Zählkammer unter dem inversen Labormikroskop:

Hierfür wurde zunächst 90 µl Farbstoff (Trypanblau 0,04% Lösung in PBS) pro Vertiefung in zwei Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Im Anschluss wurde den Farbstoffvertiefungen jeweils 10 µl der zu untersuchenden Zellsuspension hinzugefügt.

Nach sorgfältigem Auf- und Abpipettieren wurden 10 µl der so entstandenen Zellsuspension entnommen und auf den oberen Teil des Objektträgers einer Zählkammer gegeben. Anschließend wurden 10 µl aus der anderen Vertiefung auf den unteren Teil des Objektträgers gegeben. Danach wurden die gesunden Zellen in den vier 4x4 Quadranten auf beiden Teilen des Objektträgers unter dem inversen Labormikroskop gezählt. Aus den beiden Werten wurde der Mittelwert errechnet. Aus diesem Mittelwert konnte dann anhand der folgenden Formel die Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension errechnet werden:

$$\frac{(\text{Mittelwert der gezählten Zellen}) \times 10 \times 10\,000}{4} = \text{Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension}$$

10: Verdünnungsfaktor bedingt durch die 1/10 Verdünnung der Zellsuspension im Farbstoff.

10 000: Zählkammerspezifischer Faktor.

4: Ergibt sich aus der Verwendung der vier 4x4 Quadrate der Zählkammer.

Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen mit Kulturmedium auf die gewünschte Konzentration ( $1 \times 10^5$  bis  $8 \times 10^5$  Zellen pro ml) eingestellt und in eine T75-Zellkulturflasche (CELLSTAR®) überführt.

Für die Stimulation wurden die THP-1 Zellen nach dem gleichen Verfahren statt in eine T75-Flasche auf eine sterile 96-Loch Polystyrol Zellkultur-Mikrotiterplatte überführt. Die Zellkonzentration auf der Platte nach Zugabe der Stimulanzen betrug dabei  $10^5$  Zellen in 200 µl Überstand.

Die proinflammatorische Zytokinantwort der THP-1 Zellen sollte möglichst in einem sensitiven Bereich für einen potentiell antiinflammatorischen Effekt des CTRP3's liegen. Deshalb wurde für jedes Zytokin und Chemokin (IL-6, IL-8, MCP-1 & GM-CSF) zunächst eine LPS-Konzentration ermittelt, bei der die zugehörige Zytokinantwort der THP-1 Zellen auf einem mittleren Niveau zwischen minimaler und maximaler Zytokinantwort lag. Dafür wurde mit LPS aus *E. coli* O111:B4 sowohl zeitabhängig (3 h, 6 h, 9 h, 24 h), als auch konzentrationsabhängig (0,01 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 1,5 µg/ml) stimuliert. Im Anschluss wurde via ELISA die Zytokinantwort der Zellen quantifiziert (siehe Abb. 27).

Nach der Ermittlung der optimalen LPS-Konzentration (0,1 µg/ml), wurden in den Vorversuchen Experimente mit CTRP3 von den Herstellern R&D Systems, Molekulare Endokrinologie Gießen, Abnova und Origene durchgeführt. Die aus den Datenblättern hervorgehenden Unterschiede zwischen den verschiedenen CTRP3-Varianten werden im Anhang auf Abbildung 28 dargestellt. Das CTRP3 der Molekularen Endokrinologie Gießen wurde mit Hilfe eines Baculovirus-Expressionssystems in H5-Insektenzellen exprimiert (Weigert et al. 2005, Schmid et al., 2021b) und von der Arbeitsgruppe „Molekulare Adipokinforschung“ zur Verwendung im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit bereitgestellt.

Vor der Stimulation mit LPS 0,1 µg/ml oder Nickel 1000 µM erfolgte eine dem Template entsprechende, dreißigminütige Vorinkubation der THP-1 Zellen mit CTRP3 0,3-10 µg. Diese Vorinkubation fand bei einem Überstandsvolumen von 150 µl auf einer sterilen 96-Loch Polystyrol Zellkultur Mikrotiterplatte bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank statt. Anschließend wurden die Stimulanzen (LPS und Nickel) vierfach konzentriert zugegeben, um die gewünschte Zellkonzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen in 200 µl in den einzelnen Vertiefungen herzustellen.

Nach Ablauf der Stimulationszeit (4 h, 12 h, 24 h) erfolgte die Quantifizierung der Chemokine MCP-1 und IL-8 in den Zellkulturüberständen via ELISA.

### 2.2.2 Kultivierung und Stimulation von HUVEC's (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

Primäre menschliche Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC's) werden aus den Venen der Nabelschnur isoliert und ermöglichen die *in vitro* Untersuchung von Endothelzellfunktionen.

Die HUVEC's wurden maximal bis zur sechsten Passage in Kultur gehalten, da sich die morphologischen Eigenschaften der Zellen durch längere Kultivierung ändern können (Bala et al., 2011). Für weitere Experimente wurde jeweils eine jüngere Passage aus dem Stickstoffbehälter aufgetaut. In der Vorbereitung wurde dazu das Wasserbad und ein darin befindliches 15 ml Polypropylen Röhrchen mit 8 ml HUVEC-Kulturmedium auf 37 °C erwärmt. Außerdem wurden die zu verwendenden Kulturflaschen (Nunc™ EasYFlask™ 75 cm<sup>2</sup> bzw. 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturkolben) in der Vorbereitung mit Gelatine beschichtet. Dazu wurde in die liegende Zellkulturflasche 8 ml (75 cm<sup>2</sup>-Flasche) bzw. 12 ml (175 cm<sup>2</sup>-Flasche) Gelatine pipettiert. Nach zehn Minuten Inkubationszeit wurde die überflüssige Gelatine mit Hilfe eines Absaugsystems entfernt. Nach der Entnahme aus dem Stickstofftank wurden die aliquotierten, gefrorenen HUVEC-Zellen für zwei Minuten im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Direkt nach dem Auftauen wurden die Zellen in das bereits vorgewärmte HUVEC-Kulturmedium überführt, um toxische Effekte des Einfriermediums zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Zellen bei 300 x g für sechs Minuten zentrifugiert (Megafuge 40 R).

Nach initialem Absaugen des Überstandes und anschließender Resuspendierung in 5 ml Kulturmedium, wurden die Zellen in die zuvor mit Gelatine beschichtete Zellkulturflasche (Nunc™) überführt. Kultiviert wurden die Zellen in der 75 cm<sup>2</sup>-Flasche in 12 ml und in der 175 cm<sup>2</sup>-Flasche in 20 ml Kulturmedium. Nach 24 h wurde einmalig

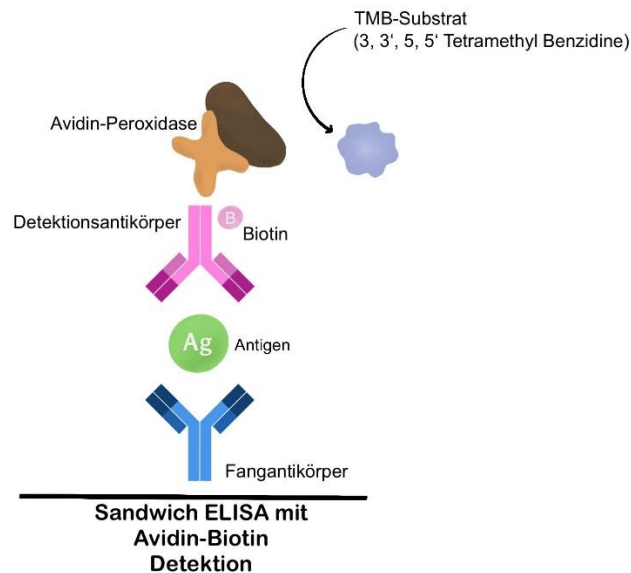
ein Mediumwechsel durchgeführt. Dabei wurde das ursprüngliche Kulturmedium mit Hilfe eines Absaugsystems entfernt und im Anschluss durch frisches Kulturmedium ersetzt. Da es sich bei den HUVEC's um adhärenente Zellen handelte, war für den Mediumwechsel kein Zentrifugationsschritt erforderlich.

Nach dem Auftauen benötigten die Zellen drei bis vier Tage, bis der Zellrasen ca. 95 % des Bodens der 75 cm<sup>2</sup>- bzw. 175 cm<sup>2</sup>-Flasche bedeckte. War dieser Punkt erreicht, wurden die Zellen zur Stimulation verwendet.

Da es sich bei den HUVEC's um adhärenente Zellen handelte, mussten die Zellen zunächst abgelöst werden. Verwendet wurde hierfür 0,05 % Trypsin (TrypLE™). Nach zweimaligem Waschen mit sterilem DPBS (P04-36500) wurde das Trypsin für zehn Minuten zugegeben. Nachdem sich die Zellen erfolgreich abgelöst hatten, wurde die Trypsinreaktion mit 5 ml Kulturmedium abgestoppt. Die abgelösten Zellen wurden bei 300 x g für 6 Minuten zentrifugiert (Megafuge 40 R). Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach der manuellen Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Zählkammer unter dem inversen Labormikroskop konnten die Zellen zur Stimulation verwendet werden. Die Stimulation der HUVEC's erfolgte auf sterilen 12-Loch Platten (CELLSTAR®), die in der Vorbereitung für zehn Minuten mit 500 µl Gelatine pro Vertiefung beschichtet wurden. Nach dem Absaugen der Gelatine wurden jeder Vertiefung  $8 \times 10^4$  HUVEC's in 250 µl Kulturmedium zugegeben. Im Anschluss wurde jeder Vertiefung zur dreißigminütigen Vorinkubation abhängig vom Versuchsaufbau entweder 125 µl Kulturmedium oder CTRP3 + Kulturmedium (Gesamtvolumen 125 µl) zugegeben. Nach der dreißigminütigen Vorinkubation mit CTRP3 (1-10 µg/ml) erfolgte die Stimulation mit Nickel 1500 µM bzw. LPS 0,01 µg/ml (O111:B4). Die Zellkonzentration in den einzelnen Vertiefungen betrug nach Zugabe der Stimulanzen  $8 \times 10^4$  Zellen in 500 µl Überstand.

### 2.2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA steht für Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Die Methode kann unter anderem zum quantitativen Nachweis von Antigenen in Zellkulturüberständen verwendet werden. Angewandt wurde die sogenannte Sandwich-ELISA Methode:



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der verwendeten Sandwich-ELISA Methode mit Avidin-Biotin Detektionssystem**

**Quelle der Abbildung:** Angefertigt mit der Software Procreate Version 5.3.7.

Die Fangantikörper befinden sich am Boden der Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte. An diese binden im Anschluss die zu detektierenden Antigene aus dem Zellkulturüberstand. Nach einem Waschschrift werden ebenfalls gegen das Antigen gerichtete Detektionsantikörper hinzugefügt, welche am C-terminalen Ende mit Biotin assoziiert sind. Nach erneutem Waschen wird mit Avidin assoziierte Peroxidase hinzugegeben. Es entsteht eine starke Bindung zwischen Avidin und Biotin. Nach abschließendem Waschen und dem darauffolgenden Hinzufügen von 3, 3', 5, 5' Tetramethyl Benzidine - Substrat (TMB-Substrat) verursacht die Peroxidase einen Farbumschlag von farblos zu blau, welcher proportional zu der zu detektierenden Antigenmenge in der Vertiefung ausfällt. Durch die Mitführung eines Standards lässt sich die Antigen-Konzentration in den zu untersuchenden Zellkulturüberständen - nach photometrischer Messung des Farbumschlags im ELISA-Reader – ermitteln (siehe Abb. 4).

Die Fangantikörper (siehe Punkt 2.1.3 „Verwendete ELISA-Kits“, S. 16) gegen das zu bestimmende Antigen (MCP-1, IL-8, IL-6, GM-CSF) wurden an eine 96-Loch-

Mikrotiterplatte gebunden. Hierfür wurde ein Teil der Fangantikörper-Stammlösung entnommen und nach Herstellerangaben mit ELISA-Beschichtungspuffer verdünnt, um die vom jeweiligen Kit vorgegebene Fangantikörper-Konzentration zur Beschichtung einzustellen. Die benötigte Menge Beschichtungspuffer und Fangantikörper-Stammlösung variierte dabei abhängig von der Anzahl der zu untersuchenden Zellkulturüberstände. Der Beschichtungspuffer wurde in ein 15 ml Polypropylen Röhrchen pipettiert. Nach dem Hinzufügen der Fangantikörper wurde das Röhrchen mittels Vortexmischer geschüttelt. Nach dem Auftragen von 50 µl verdünnter Fangantikörper-Lösung pro Vertiefung verblieb die Platte über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank (Premium NoFrost).

Am nächsten Tag wurde die Platte zunächst viermalig mit unsterilem PBS - Puffer + 0,02 % Tween ausgewaschen (StatMatic II). Im Anschluss wurde jede Vertiefung mit 50 µl Probenverdünner (PBS - Puffer + 1 % BSA + 0,02% Natriumazid) für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) geblockt. Danach wurde erneut viermalig gewaschen und der zu untersuchende Überstand der stimulierten Zellen, sowie die mitzuführenden Standards der jeweiligen ELISA-Kits hinzugegeben (50 µl/ Vertiefung). Die Überstände und Standards wurden vorher auf einer 96-Loch Verdünnungsplatte oder in 1,3 ml Röhrchen mit unsterilem Probenverdünner verdünnt, um im detektierbaren Bereich des jeweiligen ELISA zu bleiben. Dabei variierte die zu verwendende Verdünnungsstufe je nach Zytokin/Chemokin, Zelllinie und eingesetzter Stimulanzien-Konzentration. Ermittelt wurden die verschiedenen Verdünnungsstufen im Rahmen von Vorversuchen. Das zu untersuchende Zytokin band innerhalb der folgenden zweistündigen Inkubationszeit an den auf der Mikrotiterplatte befindlichen Antikörper.

Nach erneutem, viermaligem Auswaschen wurde der zugehörige Detektionsantikörper (siehe Punkt 2.1.3 „Verwendete ELISA-Kits“, S.16) hinzugegeben. Dabei handelte es sich um einen Antikörper, der ebenfalls gegen das zu quantifizierende Zytokin gerichtet war. Die Detektionsantikörper-Lösung wurde mit Probenverdünner den Herstellerangaben entsprechend in einem 15 ml Polypropylen Röhrchen verdünnt und mittels Vortexmischer geschüttelt. Abhängig von den Zytokin/Chemokin-Konzentrationen in den zu untersuchenden Zellkulturüberständen befanden sich unterschiedlich viele Bindungsstellen für die Detektions-Antikörper in den einzelnen Vertiefungen. Die Inkubationszeit (50 µl/ Vertiefung) betrug eine Stunde. Am C-terminalen Ende waren die Detektionsantikörper mit Biotin assoziiert.

Nach vier weiteren Waschvorgängen wurde eine im ELISA-Kit enthaltene, mit Avidin assoziierte Peroxidase - den Herstellerangaben entsprechend in Probenverdünner

verdünnt - hinzugegeben (50 µl/ Vertiefung). Nach einer dreißigminütigen Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte fünfmal gewaschen. Analog zur unterschiedlichen Detektions-Antikörperkonzentration, befanden sich nach dem Auswaschen unterschiedliche Peroxidase-Konzentrationen in den einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte.

Im letzten Schritt wurde ein farbloses TMB-Substrat (50 µl/ Vertiefung) hinzugegeben und bei Dunkelheit für ca. 15 Minuten inkubiert. Die Peroxidase war in der Lage das TMB-Substrat bei RT zu verstoffwechseln und somit einen blauen Farbumschlag herbeizuführen. Die Ausprägung des Farbumschlags war dabei proportional zu der zu detektierenden Antigenmenge in den einzelnen Vertiefungen. Abgestoppt wurde die Reaktion nach 10 - 25 Minuten mit 25 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Vertiefung, sobald der letzte Standard optisch dunkler war als die mitgeführte Negativkontrolle.

Durch die Mitführung eines Standards ließ sich die Zytokin/Chemokin-Konzentration in den zu untersuchenden Überständen - nach photometrischer Messung des Farbumschlags im ELISA-Reader - ermitteln. Die Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgten via GraphPadPrism Version 5.01.

#### 2.2.4 Laktatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay)

Um die Zytotoxizität der einzelnen Stimulationsbedingungen beurteilen zu können, wurde bei jedem ELISA-Experiment zusätzlich die Laktatdehydrogenase (LDH) - Konzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt.

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym, das in allen Zellen vorkommt. LDH wird bei Schäden an der Plasmamembran (wie z.B. im Rahmen von Apoptose und Nekrose) in den Zellkulturüberstand freigesetzt (Kumar et al., 2018). Laktatdehydrogenase wandelt Laktat in Pyruvat um. Das bei dieser Reaktion anfallende Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) wird im Rahmen des Laktatdehydrogenase-Assays verwendet, um eine zweite Verbindung in einer gekoppelten Reaktion zu einem Produkt mit leicht quantifizierbaren Eigenschaften zu reduzieren. Dabei handelt es sich um die Reduktion von einem gelben Tetrazoliumsalz (Iodonitrotetrazoliumchlorid) in einen roten Farbstoff der Formazan-Klasse (Absorptionsmaximum bei 490 nm Wellenlänge). Die Menge an Formazan ist direkt proportional zur Menge an LDH im Zellkulturüberstand, die wiederum direkt proportional zur Anzahl der toten oder beschädigten Zellen ist (Kumar et al., 2018). Durch die Mitführung einer Positivkontrolle (Stimulationsbedingung bei der die Zellen sicher tot sind), sowie einer Negativ- bzw.

Hintergrundkontrolle lässt sich die Zytotoxizität der einzelnen Stimulationsbedingungen nach photometrischer Messung im ELISA-Reader quantifizieren.

Für den LDH-Assay wurde bei jedem Zellkultur-Experiment, zusätzlich zu den ELISA-Stimulationsbedingungen, eine Positivkontrolle (1% Triton X-100 + Zellkulturmedium + Zellen) und eine Hintergrundkontrolle (Zellkulturmedium ohne Zellen) angesetzt. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde die 96-Loch Zellkultur Mikrotiterplatte der THP-1 Zellen für drei Minuten bei 300 x g zentrifugiert (Megafuge 40 R). Bei den HUVEC's wurde kein Zentrifugationsschritt durchgeführt, da es sich um adhärenente Zellen handelt. Im Anschluss wurde jeder Bedingung mit einer 12-Kanal Pipette vorsichtig 50 µl Überstand entnommen, ohne dabei den Zellrasen zu berühren. Der entnommene Überstand wurde auf eine 96-Loch Verdünnungsplatte überführt. Im Anschluss wurde jeder Vertiefung insgesamt 50 µl Reagenz + Katalysator (1:46 verdünnt) des Zytotoxizitäts-Assays zugegeben. Im Anschluss erfolgte ein Farbumschlag der bisher gelblichen Lösung, hin zu einer roten Formazan-Lösung (Absorptionsmaximum bei 490 nm). Nach 15 bis 25-minütiger Inkubation bei Dunkelheit und RT erfolgte die Messung der OD bei 490 - 690 nm Referenzwellenlänge im ELISA-Reader. Die Auswertung der Daten erfolgte via GraphPadPrism Version 5.01.

### 2.2.5 Durchflusszytometrie (FACS)

#### Allgemeiner Hintergrund:

FACS steht für Fluorescence-activated cell sorting (Synonym: Durchflusszytometrie) und stellt eine Methode dar, die unter anderem dafür eingesetzt werden kann physikalische Eigenschaften (z.B. Größe, Granularität und Oberflächenmerkmale) von Zellen zu quantifizieren.

Für eine FACS-Messung werden die zu untersuchenden Oberflächenmerkmale der Zellen in der Vorbereitung mit einem Antikörper versehen, der an einen Farbstoff gekoppelt ist. Anschließend erfolgt die durchflusszytometrische Messung der Zellen im FACS-Gerät. Dabei werden die in FACS-Puffer suspendierten Zellen vom FACS-Gerät aufgenommen und innerhalb des Geräts einzeln monochromatischem Laserlicht ausgesetzt. Die FACS-Farbstoffe, mit denen die zu quantifizierenden Oberflächenmerkmale markiert worden sind, absorbieren das Laserlicht und gehen in einen angeregten Zustand über. Dabei werden Elektronen innerhalb des Farbstoffes auf ein höheres Energieniveau angehoben. Kurz darauf fallen die Elektronen wieder in ein niedrigeres Energieniveau. Bei diesem Vorgang emittiert der Farbstoff Photonen mit der

für ihn spezifischen Wellenlänge. Die Intensität des emittierten Lichts ist dabei proportional zur Anzahl der mit dem Farbstoff angefärbten Oberflächenmerkmale. Innerhalb des FACS-Geräts gibt es ein Filtersystem und verschiedene Detektoren, die für die unterschiedlichen Wellenlängen der verschiedenen Farbstoffe spezifisch sind. Jede einzelne Zelle führt dabei zu einem Signal. Neben den Oberflächenmerkmalen werden auch Zellgröße durch Vorwärtsstreulicht (Englisch: forward scatter, FSC) und Zellgranularität durch Seitwärtsstreulicht (Englisch: sideward scatter, SSC) erfasst. Durch die Kombination der Parameter kann je nach verwendeten Antikörpern zum Beispiel die Zuordnung einer Einzelzelle zu einer bestimmten Zellpopulation (z.B. Makrophagen, T-Zellen, etc.) erfolgen.

### 2.2.6. Annexin V-FITC Apoptose-Färbung (FACS)

Ziel der Annexin V-FITC Apoptose-Färbung war es, im Rahmen der *in vitro* Versuche mögliche Effekte von CTRP3 auf den Nickel-induzierten Zelltod detektieren und darstellen zu können. Eines der früheren Ereignisse der Apoptose ist die Translokation von Membranphosphatidylserin (PS) von der Innenseite der Plasmamembran an die Oberfläche (Lee et al., 2012). Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für PS (Lin et al., 2020). Mit Fluorochrom-markiertes Annexin V wie das mit dem Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markierte Annexin V-FITC kann daher für den Nachweis von exponiertem Phosphatidylserin mittels Durchflusszytometrie verwendet werden. Im Unterschied zum LDH-Assay konnten in der FACS-Analyse der Annexin V-FITC Apoptose-Färbung so auch frühe Stadien der Apoptose (vor Beginn des LDH-Austritts durch die beschädigten Plasmamembranen) erfasst werden.

Die Annexin-V-FITC Färbung wird häufig mit einer Propidiumiodid-Färbung kombiniert. Propidiumiodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff der spezifisch an DNA bindet. Es kann die perforierte Zellmembran von toten Zellen durchdringen, jedoch nicht die intakte Membran von lebenden Zellen (Crowley et al., 2016). Lebende Zellen die sich noch in einem frühen Stadium der Apoptose befinden wären dementsprechend Annexin-V-FITC positiv, aber aufgrund der noch intakten Zellmembranen PI negativ. Tote Zellen mit beschädigten Plasmamembranen erscheinen in der Durchflusszytometrie entsprechend Annexin-V-FITC und PI positiv.

#### Erste Arbeitsschritte bei THP1-Zellen:

Nach Ablauf der 24-stündigen Stimulation von THP-1 Zellen ( $10^5$  Zellen pro Bedingung in 200  $\mu$ l Überstand) mit 1000  $\mu$ M Nickel +/- CTRP3 10  $\mu$ g/ml, wurde die 96-Loch-Mikrotiterplatte mit THP1-Zellen zunächst für drei Minuten bei 300 x g zentrifugiert (Megafuge 40 R). Im Anschluss wurden die Überstände vorsichtig mit einer 12-Kanal-Pipette entfernt und für die ELISA/LDH-Messungen bereitgestellt. Die auf der Platte verbliebenen THP-1 Zellen wurden in 150  $\mu$ l DPBS (P04-36500) resuspendiert und nach Stimulationsbedingungen geordnet in eisgekühlte Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt.

#### Erste Arbeitsschritte bei HUVEC's:

Nach Ablauf der 24-stündigen Stimulation von HUVEC's ( $8 \times 10^4$  Zellen pro Bedingung in 500  $\mu$ l Überstand) mit 1500  $\mu$ M Nickel +/- CTRP3 0,3-10  $\mu$ g/ml, wurden die Überstände der 24-Loch-Zellkulturplatte entfernt und für die ELISA/LDH-Messungen bereitgestellt. Die auf der Platte verbliebenen adhärennten HUVEC's wurden, wie unter Punkt 2.2.2 „Kultivierung und Stimulation von HUVECS“ beschrieben, mit Trypsin abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden nach Stimulationsbedingungen geordnet in eisgekühlte Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt und bei 300 x g für 6 Minuten zentrifugiert (Megafuge 40 R). Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert.

#### Gemeinsame Endstrecke der Arbeitsschritte (sowohl THP-1 Zellen als auch HUVEC's):

Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Innerhalb eines Waschdurchgangs wurden die Zellen zunächst für drei Minuten bei 300 x g zentrifugiert (Megafuge 40 R) und nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und mittels Vortexmischer geschüttelt. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 500  $\mu$ l Binding-Puffer des Annexin V-FITC Apoptosis Staining / Detection Kits resuspendiert. Anschließend wurde jedem Röhrchen 5  $\mu$ l Annexin V-FITC, sowie 5  $\mu$ l Propidiumiodid (beide waren Bestandteil des Annexin V-FITC Apoptosis Staining / Detection Kits) zugegeben. Nach fünf Minuten Inkubation bei RT und Dunkelheit erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Zellen im FACS-Gerät. Während des Messvorgangs wurden die noch nicht gemessenen Röhrchen bei Dunkelheit auf Eis gelagert. Die Auswertung der Daten erfolgte via FlowJo v10.6., die graphische Darstellung und statistische Auswertung via GraphPadPrism Version 5.01.

## 2.3 Methoden der Mausexperimente

Die ersten Arbeitsschritte aller im Folgenden erläuterten Methoden der Mausexperimente wurden aus Standardisierungsgründen für zukünftige Experimente von **Britta Dorn** (Laborleitung Experimentelle Dermatologie und Allergologie in Gießen) durchgeführt. Ab welchem Punkt der Verfasser die restlichen Arbeitsschritte der Methoden übernommen hat wird im Folgenden jeweils dargestellt.

### 2.3.1 Mausmodell der CHS: Sensibilisierung und Provokation mit TNCB

#### Allgemeine Versuchsdurchführung:

Untersucht wurden insgesamt 30 fünf Monate alte Mäuse. Davon hatten 16 Mäuse einen adipozytenspezifischen CTRP3-Knockout. Die volle Nomenklatur der Knockout-Mäuse lautete *C57BL/6-Tg(AP2-cre)-C1qtnf3<sup>tm1Schea</sup>*. Als Kontrollgruppe dienten 14 Wurfgeschwister Wildtypmäuse. Die Mäuse waren bezüglich Alter und Geschlecht gleichmäßig auf die beiden Gruppen verteilt. Im Folgenden wird zunächst die Durchführung der Sensibilisierungs- und Auslösungsphase der CHS beschrieben. Die Methoden der darauffolgenden Untersuchungen (Ohrdickenmessung, Organentnahme und Organverdau, Fat-explant-Stimulationsversuche, FACS-Messungen und histologische Färbungen) werden jeweils in eigenen Kapiteln dargestellt.

#### Sensibilisierungsphase:

Um eine allergische Kontaktdermatitis hervorzurufen, mussten die CTRP3-Knockout bzw. Wildtyp Mäuse (Wurfgeschwister ohne CTRP3-Knockout) zunächst sensibilisiert werden. In der Vorbereitung wurde das Fell auf der Bauchhaut der Mäuse mit einer Schermaschine rasiert. Als Vehikel für das Allergen diente eine Mischung aus 75 % Aceton und 25 % Olivenöl. Für die Sensibilisierung wurde 3 % TNCB in 100 µl Vehikel-Lösung mit einer Pipette auf die rasierte Bauchhaut aufgetragen. Die dadurch ausgelösten pathophysiologischen Mechanismen wurden unter Punkt 1.5 „Contact Hypersensitivity Modell (CHS-Modell)“ bereits dargestellt.

#### Auslösungsphase:

Am fünften Tag nach der Sensibilisierung wurde die Auslösung der CHS-Reaktion durchgeführt. Dafür wurden die Tiere in der Vorbereitung zunächst mit Isofluran betäubt. Anschließend wurde das in 15 µl Aceton gelöste Allergen (0,6 % TNCB) auf die dorsale Ohrseite der Mäuse aufgetragen. Die dadurch ausgelösten pathophysiologischen

Mechanismen wurden unter Punkt 1.5 „Contact Hypersensitivity Modell (CHS-Modell)“ bereits dargestellt.

### 2.3.2 Messung der Ohrschwellung

Im Rahmen der CHS-Reaktion kommt es zu einer lokalen Schwellung im betroffenen Hautareal. Da das TNCB im Bereich der dorsalen Ohrseite der Mäuse aufgetragen wurde, konnte so die Ohrdicke als Parameter der CHS-Reaktionsausprägung herangezogen werden. Die Ohren der Mäuse wurden im Vorfeld nicht gelocht (z.B. aus Identifizierungsgründen), da eine darauffolgende Narbenbildung möglicherweise die Messergebnisse verfälscht hätte.

Unmittelbar vor dem Auftragen der TNCB-Lösung im Rahmen der Auslösungsphase wurden die Ohrdicken beider Ohren mit Hilfe eines Mikrometers zum ersten Mal vorsichtig bestimmt. Die Ohrdicken wurde intra- und interindividuell beidseits zu jedem Messzeitpunkt 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h an der gleichen Stelle bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet die Ohrdicke abzulesen, bevor der leichte Druck des Mikrometers die Ohrdicke beeinträchtigte. Die Auswertung und die grafische Darstellung der Daten erfolgten durch den Verfasser via GraphPadPrism Version 5.01.

### 2.3.3 Organentnahmen

Die Tötung der Mäuse erfolgte unter Isofluranbetäubung per cervikaler Dislokation 120 h nach der Auslösung mit TNCB.

#### Entnahme von Milz und subkutanem Fettgewebe:

Die Bauchhaut wurde gründlich mit 70 % Ethanol eingesprüht und im Anschluss mit einem sterilen Besteck aufgeschnitten. Es folgte die vorsichtige Entnahme von subkutanem Fettgewebe mit Hilfe einer sterilen Pinzette. Dabei wurde darauf geachtet, von jeder Maus kraniales, mediales und kaudales Fettgewebe zu gewinnen. Von jeder Maus wurden etwa 180 µg Fettgewebe für die „*Fat explant*“- Stimulationsversuche (siehe Punkt 2.3.6 „*Fat explant*- Stimulationsversuche“, S. 43) entnommen. Hierfür wurde das entnommene Gewebe pro Maus in ein separates 5 ml Reaktionsgefäß mit 4 ml kaltem Hanks-Medium überführt und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert. Die weitere Verarbeitung des restlichen Fettgewebes wird unter Punkt 2.3.4 „Organverdau für die FACS-Analysen“ dargestellt. Im Anschluss wurde mithilfe eines sterilen Bestecks die Milz entnommen. Diese wurde in möglichst kleine Stücke geschnitten und in ein

Probenröhrchen überführt. Die weitere Verarbeitung wird unter Punkt 2.3.4 „Organverdau für die FACS-Analysen“ dargestellt.

#### Entnahme der Ohrhaut, sowie des drainierenden Lymphknotengewebes:

Von jeder Maus wurden beide Ohren mit Hilfe eines sterilen Bestecks entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst keine Haare mit entnommen wurden. Die Ohren wurden in ein Probenfläschchen überführt und in möglichst kleine Stücke geschnitten. Die weitere Verarbeitung wird unter Punkt 2.3.4 „Organverdau für die FACS-Analysen“ dargestellt. Außerdem wurden die drainierenden Lymphknoten der Ohrhaut mit Hilfe eines sterilen Bestecks freipräpariert und für den Organverdau in ein Probenfläschchen überführt. Die Lymphknoten wurden vor dem Organverdau nicht manuell zerkleinert.

#### 2.3.4 Organverdau für die FACS-Analysen

Mithilfe von 40 µl HBSS + 200 µl Liberase™ + 400 µl DNase I (10mg/ml) erfolgte bei jeder Maus das Herauslösen von Einzelzellen aus den entnommenen Geweben. Das Gemisch wird im folgenden Absatz als „Verdau“ bezeichnet.

Der Verdau erfolgte bei 37 °C in einem Probenfläschchen mit Schraubkappen ohne Loch auf dem Magnetrührer. Milz- (+ 300 µl Liberase), Lymphknoten- (+ 200 µl Liberase) und Fettgewebe (Masseabhängig + 200-500 µl Liberase) wurden für 15-20 Minuten verdaut. Rasierte und mit Hilfe eines sterilen Bestecks entnommene Haut (Ohren) wurde für eine Stunde mit 500 µl Liberase verdaut. Anschließend wurden die verdauten Organe auf ein steriles 30 µm Zellsieb gegeben und es wurde mit Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Gibco™) nachgespült. Im Anschluss wurde die Zellzahl wie unter Punkt 2.2.1 „Kultivierung und Stimulation humaner THP1-Zellen“ beschrieben ermittelt. Danach wurde die Zellsuspension für zehn Minuten bei 300 x g zentrifugiert (Megafuge 40 R). Abschließend wurde der Überstand abgesaugt. Lymphknoten, Haut- und Fettgewebszellen wurden jeweils in 110 µl Viabilitätsfarbstoff-Lösung (1,1 µl Viabilitätsfarbstoff eFluor™ 506 + 108,9 µl DPBS) resuspendiert. Die Zellen der Milz wurden zunächst in 500 µl DPBS resuspendiert. Im Anschluss erfolgte zellzahlabhängig die Zugabe der benötigten Menge Viabilitätsfarbstoff-Lösung. Die weitere Verarbeitung der Zellen wird unter Punkt 2.3.5 „Standard FACS-Messungen“ beschrieben.

### 2.3.5 Standard FACS-Messungen

Ziel der Messungen war es, nach erfolgter Auslösung mit TNCB, Unterschiede in den Zellpopulationen von CTRP3-Knockout Mäusen (n=16) im Vergleich mit Wurfgeschwister-Wildtypmäusen (n=14) zu identifizieren und charakterisieren. Von jeder Maus (n=30) wurden dabei Zellen aus Milz, subkutanem Fettgewebe, Ohrhaut und den drainierenden Lymphknoten der Ohrhaut untersucht. Die Gewinnung der Zellpopulationen wurde unter Punkt 2.3.3 „Organentnahmen“, sowie Punkt 2.3.4 „Organverdau für die FACS-Analysen“ bereits beschrieben. Die verwendeten Antikörper-Farbstoff Kombinationen der einzelnen Färbungen dienten zur Quantifizierung von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, T-Zellen und NK-Zellen innerhalb der Proben.

#### Durchführung der durchflusszytometrischen Standard-Messungen:

In die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden zunächst pro vorgesehener Färbung 20 µl der verschiedenen unter Punkt 2.3.4 „Organverdau für die FACS-Analysen“ beschriebenen Zellsuspensionen pipettiert. Die Zellzahl pro Vertiefung variierte dabei je nach Organverdauausbeute und wurde anhand der unter Punkt 2.3.4 „Organverdau für die FACS-Analysen“ beschriebenen Zellzahlbestimmung ermittelt. Im Anschluss wurden jeder Vertiefung 10 µl in FACS-Puffer gelöste FACS-Antikörper (die benötigte Antikörpermenge variierte dabei je nach Antikörper, Zelltyp und Zellzahl) zugegeben. Danach wurde die 96-Loch-Mikrotiterplatte für zwei Sekunden bei 600 rpm geschüttelt. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation der Zellen bei Dunkelheit auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit je 150 µl FACS-Puffer gewaschen. Hierfür wurde jedem Well zunächst 150 µl FACS-Puffer hinzugefügt. Danach erfolgte eine einminütige Zentrifugation (Megafuge 40 R) der 96-Loch-Mikrotiterplatte bei 300 x g. Nach dem Abkippen der Überstände wurde dieser Vorgang einmal wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen in 150 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Bis zur Messung wurden diese im Dunklen auf Eis gelagert. Die durchflusszytometrischen Messungen im FACS-Gerät (FACSCanto II), sowie die Auswertung und grafische Darstellung der Daten via FlowJo Version 10.6.1 erfolgten durch den Verfasser.

### 2.3.6 *Fat explant*- Stimmulationsversuche

Bei den *Fat explant*- Stimmulationsversuchen handelt es sich um die Stimulation von entnommenem subkutanem Fettgewebe der CTRP3-Knockout (n=16) und Wurfgeschwister-Wildtyp-Kontrollmäuse (n=14) mit 100 ng/ml LPS (*E. coli* 0111:B4) oder 25 mM TNBS. Neben Adipozyten enthält das entnommene subkutane Fettgewebe auch andere Zelltypen wie Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten. Durch die Berücksichtigung des natürlichen Mikromilieus sollte die Relevanz von CTRP3 bei der CHS-Reaktion besser untersucht werden.

Die Durchführung der Entnahme des subkutanen Fettgewebes wurde unter Punkt 2.3.3 „Organentnahmen“ bereits erläutert. Das Gewebe wurde in ein vorher abgewogenes 5 ml Reaktionsgefäß mit 4 ml kaltem Hanks-Medium überführt und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Gefäß erneut gewogen und das Gewicht des entnommenen Fettes berechnet. Im nächsten Schritt wurde das entnommene Fett mithilfe eines sterilen Skalpells in ca. 60 mg schwere Stücke geteilt. Anschließend wurden die Fettstückchen dem Template entsprechend in einer 12- oder 24-Loch-Zellkulturplatte (CELLSTAR®) in je 2 ml (24-Lochplatte), bzw. 1 ml (12-Lochplatte) Hanks-Medium für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Stimulation mit 100 ng/ml LPS (*E. coli* 0111:B4) oder 25 mM TNBS erfolgte im Anschluss in frischem Hanks-Medium. Im Optimalfall waren pro Vertiefung (12-Lochplatte) jeweils drei 60 mg schwere Fettstückchen aus verschiedenen Bereichen (kraniales, mediales & kaudales Bauchfett) enthalten. Bei geringerer Fettausbeute wurde die Stimulation stattdessen mit 1-2 Fettstückchen pro Vertiefung durchgeführt. Nach diesem Arbeitsschritt wurden die weiteren Schritte vom Verfasser durchgeführt. Nach 24 h Stimulation wurden die Überstände der „*Fat explants*“ aliquotiert und bei -20°C im Gefrierschrank eingefroren. Die Fettstückchen wurden in Cryo-Einfrierröhrchen überführt und erneut gewogen. Nach dem Wiegen wurden die Fettstückchen in Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung (Anfertigen der histologischen Schnitte) bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Mit den eingefrorenen Überständen wurde ein IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  und Adiponektin-ELISA (siehe Punkt 2.2.3 „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“, S.33) durchgeführt. Abschließend erfolgte die Auswertung und grafische Darstellung der Daten via GraphPadPrism Version 5.01.

### 2.3.7 Histologische Färbungen

Die Entnahme des subkutanen Fettgewebes wurde unter Punkt 2.3.6 „*Fat explant*-Stimulationsversuche“ bereits beschrieben. Um die Zellen auf phänotypische Unterschiede zwischen Wildtyp- und CTRP3 Knockoutmäusen zu untersuchen, wurden von Frau Britta Dorn histologische Schnitte des subkutanen Fettgewebes der Mäuse (n=30) angefertigt. Hierfür wurde das Gewebe zunächst für 18 h bei Raumtemperatur (RT) in einer Fixierlösung (ROTI®-Histofix) gebadet. Danach wurde es bei RT in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80 %, 90%, 2 x 100% Ethanol für jeweils neunzig Minuten) dehydriert. Zur Klärung erfolgten drei Bäder in Xylol bei RT für jeweils eine Stunde. Im Anschluss wurde das Gewebe in Paraffin 52-54° C gebadet (24 h) und eingebettet. Abschließend wurden mit einem Mikrotom 5 µm dicke Schnitte des Fettgewebes angefertigt und auf einem Objektträger platziert.

Die anschließenden Färbungen und das Entparaffinieren der Proben wurden vom Verfasser durchgeführt:

#### Entparaffinieren der Proben:

Für die Durchführung der Färbungen mussten die angefertigten Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert werden. Dazu wurden die auf Objektträgern befindlichen Schnitte für 30 Minuten bei 60°C im Trockenschrank aufgeheizt. Nach fünfminütigem Abkühlen auf RT wurde der Ständer mit den Objektträgern für 8 Minuten in einem ROTI®Histol-Bad bei RT inkubiert. Es folgten Bäder in 100 % Ethanol; 96 % Ethanol und 70 % Ethanol für jeweils drei Minuten. Abschließend erfolgte ein Bad in destilliertem Wasser für zwei Minuten. Alle Bäder wurden bei RT durchgeführt.

#### Giemsa-Färbung:

Die entparaffinierten und auf Objektträgern befindlichen Gewebeschnitte wurden für 30 Minuten bei 37°C im Hybridisierungssofen in Giemsa-Lösung gebadet. Zur Herstellung der Giemsa-Lösung wurde Giemsa-Stammlösung im Verhältnis 1:5 mit phosphatgepuffertes Salzlösung verdünnt. Die phosphatgepufferte Salzlösung wurde aus Weise-Pufferkonzentrat und destilliertem Wasser hergestellt. Das korrekte Verhältnis von Konzentrat zu destilliertem Wasser wurde den Herstellerangaben entnommen.

Es folgte ein Bad bei RT in 1 % Essigsäure (15 Sekunden), 96 % Ethanol (4 Minuten), 100 % Ethanol (4 Minuten) und ROTI®Histol (7 Minuten). Abschließend wurden die so

eigefärbten Schnitte mit ROTI® Histokitt eingedeckt und unter dem inversen Labormikroskop untersucht.

#### Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

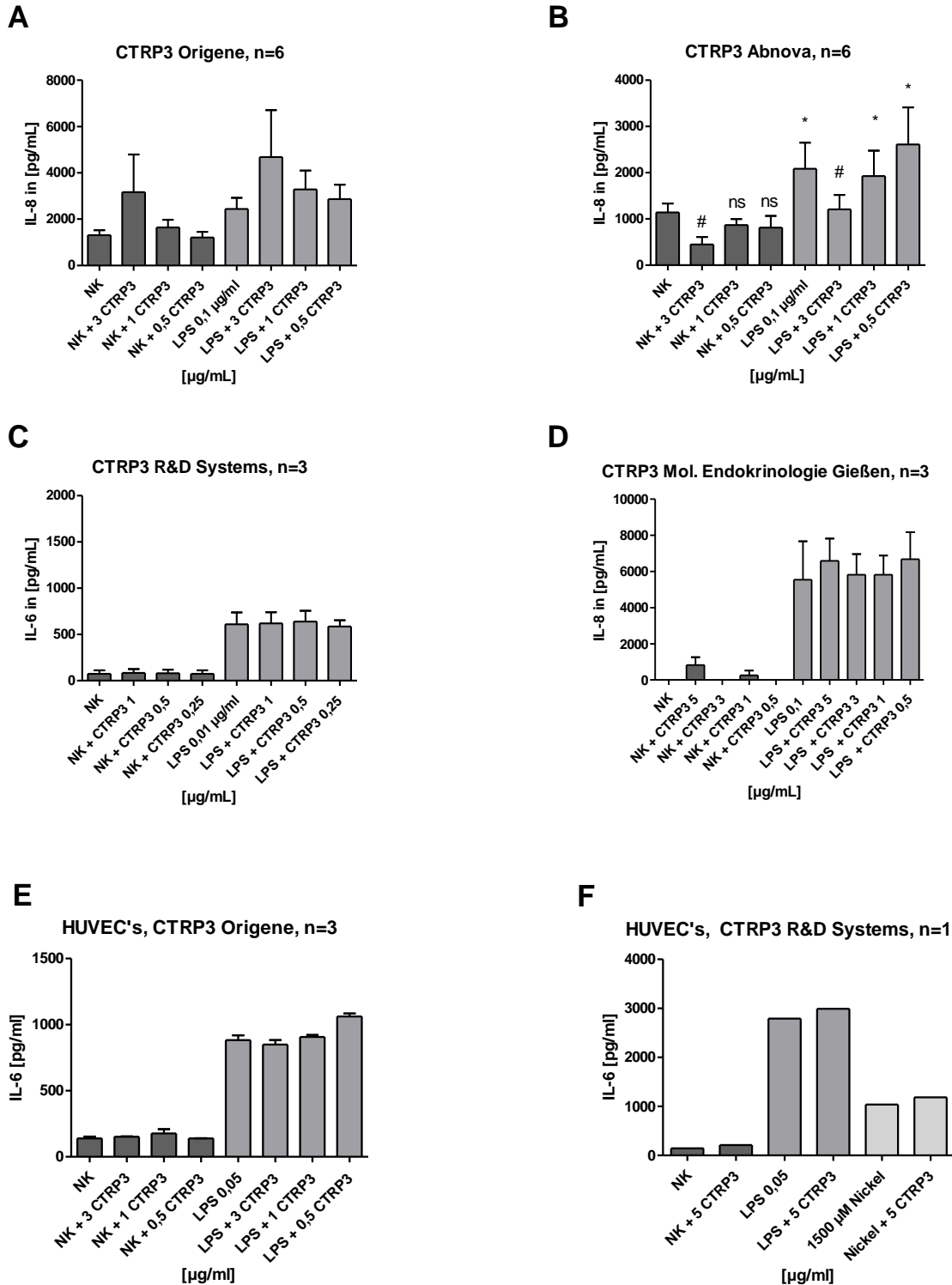
Die entparaffinierten und auf Objektträgern befindlichen Gewebeschnitte wurden zunächst für 4 Minuten in Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger mit Essigwasser (2 % Essigsäure in vollentsalztem H<sub>2</sub>O) abgespült. Das Abspülen erfolgte dabei via Eintauchen der Objektträger in eine mit Essigwasser gefüllte Wanne. Nach initialem Abspülen folgten Bäder in Essigwasser (zwei Minuten), Leitungswasser (vier Minuten), Eosin G-Lösung (eine Minute), sowie in 96 % Ethanol + 3% Essigsäure (zwei Minuten). Nach dreimaligem Abspülen mit 100 % Ethanol erfolgte ein Bad in 100 % Ethanol (drei Minuten) sowie in ROTI® Histol (sieben Minuten). Abschließend wurden die eingefärbten Schnitte mit ROTI® Histokitt eingedeckt und unter dem inversen Labormikroskop untersucht.

## 2.4 Statistische Analysen

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm GraphPadPrism Version 5.01 verwendet. Alle Ergebnisse wurden für den jeweiligen Stichprobenumfang als arithmetische Mittelwerte (Mean) + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Um geeignete Testverfahren auswählen zu können, wurden die Daten zunächst auf Normalverteilung geprüft. Statistische Signifikanz wurde mit einem ungepaarten *t*-Test, bzw. dem Wilcoxon-Test für nicht normalverteilte Datensätze, berechnet. Um Vergleiche zwischen zwei Gruppen durchzuführen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden *p*-Werte <0,05 (\**p*<0,05; \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0,001) angesehen.

### 3. Ergebnisse

Um den in der Literatur (Kopp et al., 2010) beschriebenen inhibitorischen Effekt des CTRP3 auf die LPS-induzierte, TLR4 vermittelte Entzündungsreaktionen im *in vitro* Modell reproduzieren zu können, mussten im Rahmen der Doktorarbeit sehr umfangreiche Vorversuche durchgeführt werden. In den Vorversuchen wurde mit CTRP3 von insgesamt vier verschiedenen Herstellern (siehe Punkt 2.1.2 „Verwendetes CTRP3“, S.16) gearbeitet. Dabei zeigte sich der erwartete inhibitorische Effekt lediglich bei dem CTRP3 vom Hersteller Abnova (Taiwan) signifikant und reproduzierbar. In den Vorversuchen wurden HUVEC/THP-1 Experimente mit CTRP3 von den Herstellern R&D Systems, Molekulare Endokrinologie Gießen, Abnova und Origene durchgeführt. Auf der folgenden Abbildung wurde aus Übersichtsgründen jeweils nur eine Versuchsreihe pro CTRP3-Hersteller dargestellt (Abb. 5).



**Abbildung 5: In vitro Experimente mit CTRP3 von unterschiedlichen Herstellern**

Exemplarische Darstellung jeweils einer **A-D** THP-1 Zellen **E-F** HUVEC-Versuchsreihe pro CTRP3-Hersteller während der Vorversuche. Quantifizierung via ELISA-Verfahren. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Statistik: Wilcoxon-Test: ns = nicht signifikant, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. NK (# statt \* vs. LPS 0,1 µg/ml). NK: Negativkontrolle. LPS: Lipopolysaccharid aus Escherichia coli O111:B4. **A:** Stimuliert wurden THP-1 Zellen unterschiedlicher Passagen (n=6). Darstellung der IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand nach 24 h Stimulation mit 0,1 µg/ml LPS und dreißigminütiger Vorinkubation

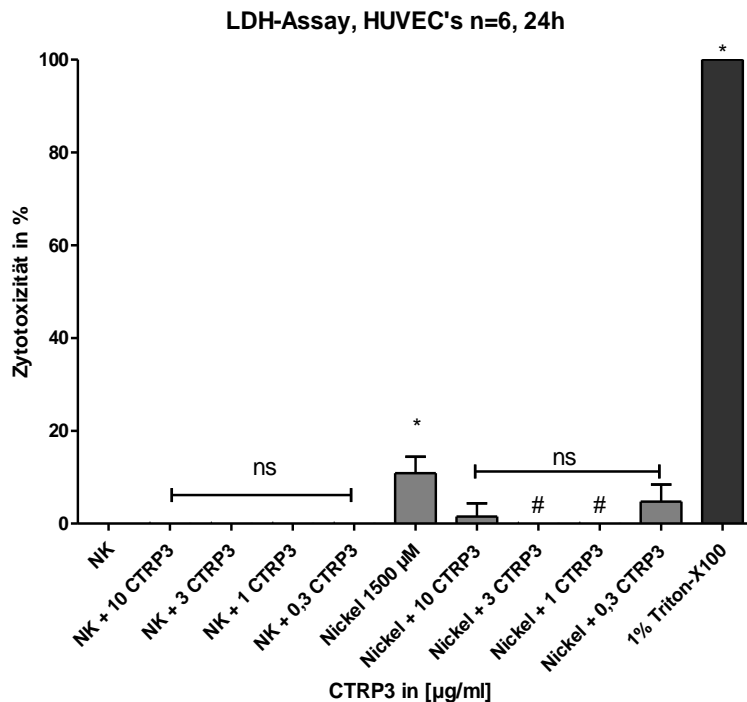
mit 0,5-3 µg/ml CTRP3 des Herstellers Origene. **B:** Stimuliert wurden THP-1 Zellen unterschiedlicher Passagen (n=6). Darstellung der IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand nach 24 h Stimulation mit 0,01 µg/ml LPS und dreißigminütiger Vorinkubation mit 0,5-3 µg/ml CTRP3 des Herstellers Abnova. **C:** Stimuliert wurden THP-1 Zellen unterschiedlicher Passagen (n=3). Darstellung der IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand nach 24 h Stimulation mit 0,01 µg/ml LPS und dreißigminütiger Vorinkubation mit 0,25-1 µg/ml CTRP3 des Herstellers R&D Systems. **D:** Stimuliert wurden THP-1 Zellen unterschiedlicher Passagen (n=3). Darstellung der IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand nach 24 h Stimulation mit 0,01 µg/ml LPS und dreißigminütiger Vorinkubation mit 0,25-1 µg/ml CTRP3 des Herstellers Molekulare Endokrinologie Gießen. **E:** Stimuliert wurden HUVEC's unterschiedlicher Passagen (n=3). Darstellung der IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand nach 24 h Stimulation mit 0,05 µg/ml LPS und dreißigminütiger Vorinkubation mit 0,5-3 µg/ml CTRP3 des Herstellers Origene. **F:** Stimuliert wurde eine HUVEC Passage (n=1). Darstellung der IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand nach 24 h Stimulation mit 0,05 µg/ml LPS und dreißigminütiger Vorinkubation mit 5 µg/ml CTRP3 des Herstellers R&D Systems.

Zusätzlich zu den in *Abbildung 5* repräsentativ dargestellten Experimenten wurden in den Vorversuchen auch höhere CTRP3-Konzentrationen (5 µg/ml - 10 µg/ml) und andere Zytokine (IL-8, MCP-1, IL-6, GM-CSF) getestet. Lediglich das CTRP3 vom Hersteller Abnova zeigte dabei den erwarteten inhibitorischen Effekt auf die LPS-induzierte, TLR4 vermittelte Entzündungsreaktion. Die in den folgenden Abschnitten dargestellten Experimente wurden daher ausschließlich mit dem CTRP3 vom Hersteller Abnova durchgeführt:

### 3.1 Einfluss von CTRP3 auf die Nickel-induzierte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen in HUVECs

#### 3.1.1 Laktatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay)

Um den Einfluss der unterschiedlichen Stimulationsbedingungen auf die Zytotoxizität in HUVEC's zu untersuchen, wurde nach 24 h Stimulation ein Laktatdehydrogenase-Assay der Zellkulturüberstände angefertigt. Die Stimulation mit 1500 µM Nickel zeigte einen geringen, dennoch signifikanten Anstieg der Zytotoxizität im LDH-Assay. Es zeigte sich eine signifikant reduzierte Zytotoxizität unter der Stimulation mit Nickel 1500 µM + 1 bzw. 3 µg/ml CTRP3 gegenüber Nickel 1500 µM alleine (Abb. 6). Die Stimulation mit der Positivkontrolle 1 % Triton X-100 führte wie erwartet zu einem signifikanten Anstieg der Zytotoxizität im Vergleich zur Negativkontrolle.



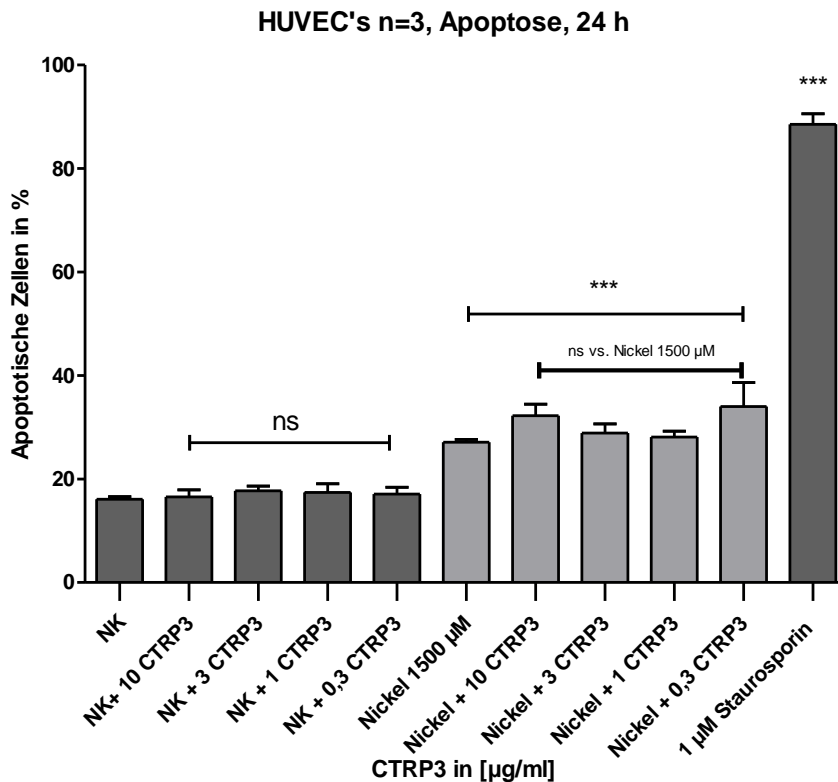
**Abbildung 6: LDH-Assay der CTRP3-Experimente mit HUVEC's**

Unterschiedliche HUVEC-Passagen (n=6) wurden für 24 h mit 1500 µM Nickel +/- 0,3, 1, 3 und 10 µg/ml CTRP3 stimuliert. Das CTRP3 wurde dabei bereits dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation mit Nickel zugegeben. Nach 24 h wurde die Zytotoxizität der einzelnen Bedingungen via Laktatdehydrogenase-Assay ermittelt und relativ zur Positivkontrolle (Stimulation mit 1 % Triton X-100) dargestellt. Darstellung: Mean + SEM. Statistik: Wilcoxon-Test: ns = nicht signifikant, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs. NK (# statt \* vs. Nickel 1500 µM). NK, Negativkontrolle.

### 3.1.2 FACS-Analyse (Annexin V-FITC Apoptose-Färbung)

Da Zellen die sich in einem frühen Stadium der Apoptose befinden in der Zytotoxizitätsmessung des LDH-Assays nicht berücksichtigt werden können, wurde nach Ablauf der 24 h Stimulation zusätzlich eine durchflusszytometrische Untersuchung (Annexin V-FITC Apoptose-Färbung) der HUVEC's (n=3) durchgeführt. Ein Ziel der Versuchsreihe war es, den Einfluss von 0,3; 1; 3 und 10 µg/ml CTRP3 auf die Nickel-induzierte Apoptose in HUVEC's zu analysieren. Im Rahmen von apoptotischen Prozessen kann es zur Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen kommen (Heinrich et al., 2022). Durch die Ermittlung von möglichst geringfügig toxischen Stimulationsbedingungen, sollte daher außerdem die Störvariable Apoptose im Rahmen der Zytokin-ELISA-Experimente minimiert werden. Im Gegensatz zum LDH-Assay zeigten sich in der durchflusszytometrischen Untersuchung keine signifikanten Unterschiede zwischen der Stimulation mit 1500 µM Nickel und 1500 µM Nickel + 0,3-

10 µg/ml CTRP3 (Abb. 7). Die Stimulation mit der Positivkontrolle 1 µM Staurosporin induzierte wie erwartet Apoptose in den stimulierten HUVEC's. Auch die Stimulation mit 1500 µM Nickel induzierte signifikant Apoptose im Vergleich zur Negativkontrolle.



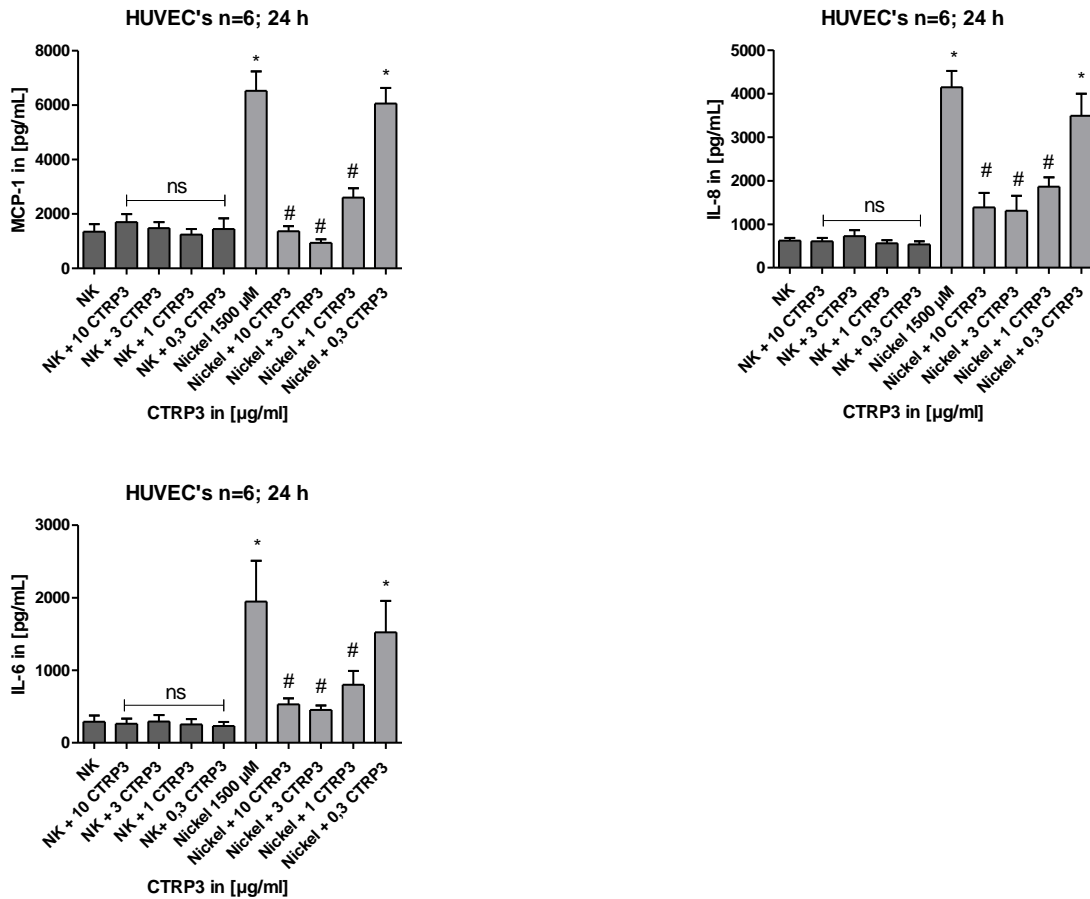
**Abbildung 7: Durchflusszytometrische Untersuchung (Annexin V-FITC Apoptose-Färbung) der HUVEC's im Rahmen der CTRP3-Experimente**

Unterschiedliche HUVEC-Passagen (n=3) wurden für 24 h mit 1500 µM Nickel +/- 0,3, 1, 3 und 10 µg/ml CTRP3 stimuliert. Das CTRP3 wurde dabei bereits dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation mit Nickel zugegeben. Nach 24 h wurden die apoptotischen Zellen innerhalb der einzelnen Stimulationsbedingungen via Annexin-V FITC Apoptose-Färbung quantifiziert und relativ zur Positivkontrolle (Stimulation mit 1 µM Saurosporin) dargestellt. Darstellung: Mean + SEM. Statistik: Ungepaarter *t*-Test: ns = nicht signifikant, \**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001 vs. NK; NK, Negativkontrolle.

### 3.1.3 Einfluss von CTRP3 auf die LPS/Nickel-induzierte Sekretion von IL-6, IL-8 und MCP-1 in HUVEC's

Ziel des Versuchs war es potentielle Auswirkungen von CTRP3 auf TLR4 abhängige Mechanismen in HUVEC's zu untersuchen. Die HUVEC's wurden zunächst für 24 h in 1000 µl HUVEC-Kulturmedium auf flachen, sterilen 12-Loch Zellkulturplatten (Greiner) zum Anwachsen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium (500 µl) für 24 h mit 1500 µM Nickel +/- 0,3, 1, 3, 10 µg/ml CTRP3 stimuliert. Dabei wurde das CTRP3 jeweils dreißig Minuten vor der Stimulation mit Nickel zugegeben. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte HUVEC's in ebenfalls frischem HUVEC-

Kulturmedium +/- 0,3-10 µg/ml CTRP3. Nach der 24-stündigen Stimulation mit 1500 µM Nickel + 1, 3 und 10 µg/ml CTRP3 zeigte sich im IL-6, IL-8 und MCP-1 ELISA eine signifikante Inhibition der Zytokinsekretion im Vergleich zur alleinigen Stimulation der HUVEC's mit 1500 µM Nickel (Abb. 8).

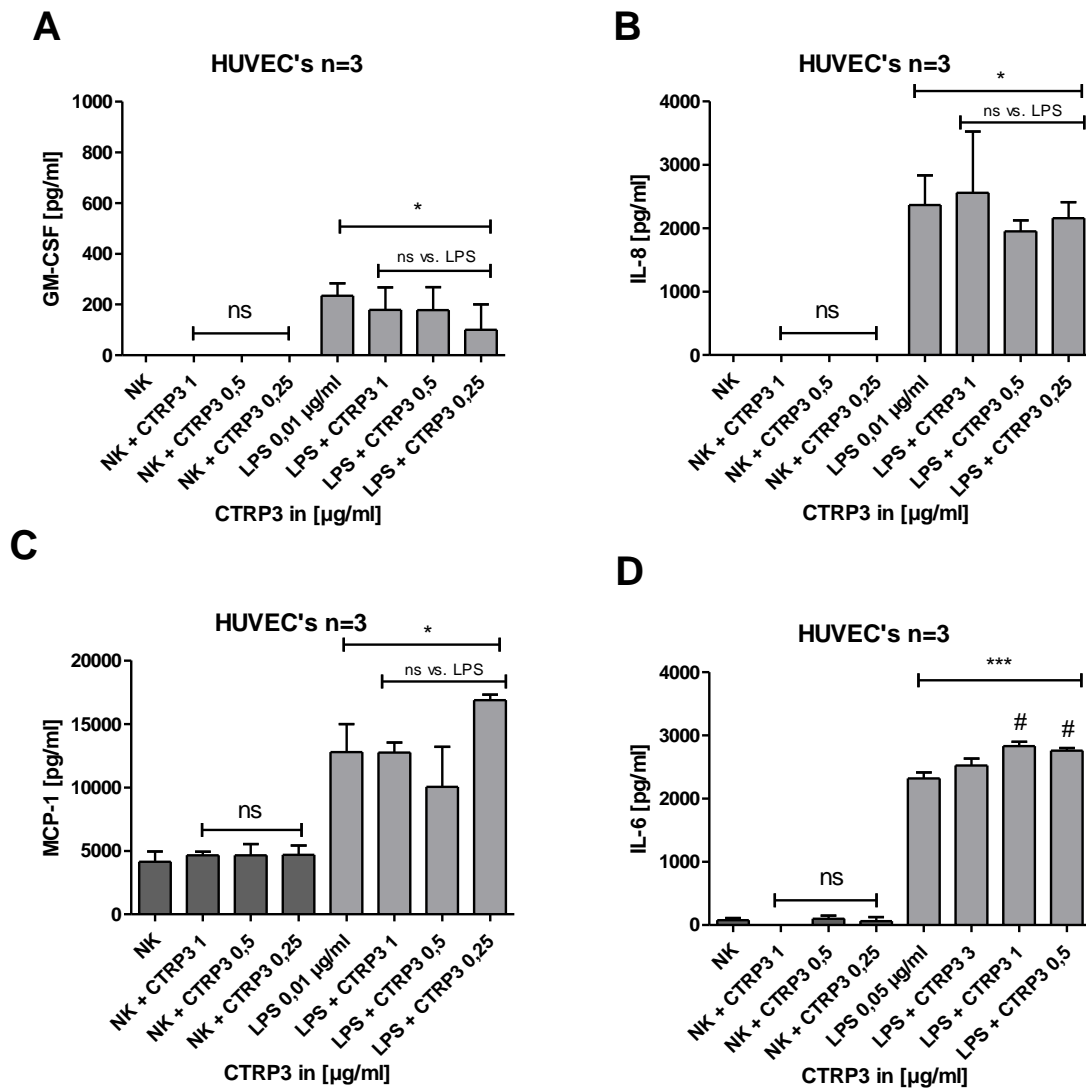


**Abbildung 8: IL-6, IL-8 und MCP-1 ELISA-Ergebnisse der HUVEC CTRP3-Experimente**

Unterschiedliche HUVEC-Passagen (n=6) wurden für 24 h mit 1500 µM Nickel +/- 0,3, 1, 3 und 10 µg/ml CTRP3 stimuliert. Das CTRP3 wurde dabei bereits dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation mit Nickel zugegeben. Nach der Stimulation wurde via ELISA-Verfahren die IL-6, IL-8 und MCP-1 Konzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt. Darstellung: Mean + SEM. Statistik: Wilcoxon-Test: ns = nicht signifikant, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs. NK (# statt \* vs. Nickel 1500 µM). IL, Interleukin. MCP-1, Monocyte chemoattractant protein-1. NK, Negativkontrolle.

Um die Zytotoxizität möglichst gering zu halten, wurde in den Vorversuchen die niedrigste Nickelkonzentration (1500 µM) ermittelt, die nach 24 h Stimulation zuverlässig ein signifikantes und im ELISA detektierbares Zytokinsignal (IL-6, MCP-1, IL-8) hervorruft.

Anders als bei den THP-1 Zellen oder bei der Stimulation mit 1500  $\mu\text{M}$  Nickel, konnte bei den HUVEC's in den Vorversuchen bei keinem der getesteten Zytokine und Chemokine (IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF) ein signifikanter inhibitorischer Effekt des CTRP3's auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung festgestellt werden (Abb. 9).



**Abbildung 9: GM-CSF, MCP-1, IL-8, IL-6 ELISA-Ergebnisse der HUVEC's nach Stimulation mit LPS +/- CTRP3**

Unterschiedliche HUVEC-Passagen (n=3) wurden für 24 h mit **A-C**: 0,01  $\mu\text{g/ml}$  LPS +/- 0,25; 0,5; 1  $\mu\text{g/ml}$  CTRP3 **D**: 0,05  $\mu\text{g/ml}$  LPS +/- 0,5; 1; 3  $\mu\text{g/ml}$  CTRP3 stimuliert. Das CTRP3 wurde dabei bereits dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation mit LPS zugegeben. Nach der Stimulation wurde via ELISA-Verfahren die **A**: GM-CSF, **B**: IL-8, **C**: MCP-1, **D**: IL-6 Konzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt. Darstellung: Mean + SEM. Statistik: t-Test: ns = nicht signifikant, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. NK (# statt \* vs. LPS 0,05  $\mu\text{g/ml}$ ). GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. IL, Interleukin. MCP-1, Monocyte chemoattractant protein-1. NK, Negativkontrolle.

### 3.2 Einfluss von CTRP3 auf die Nickel-induzierte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen in THP-1 Zellen

#### 3.2.1 Laktatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay)

Die THP-1 Zellen wurden zunächst für 24h innerhalb einer T-75 Kulturflasche mit 100 ng/ml PMA in frischem Kulturmedium vorstimuliert um eine stärkere Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine nach der Stimulation mit 1000  $\mu$ M Nickel/0,01  $\mu$ g/ml LPS +/- 0,3-10  $\mu$ g/ml CTRP3 zu induzieren und die THP-1 Zellen in Richtung eines Makrophagen-ähnlichen Phänotyps zu differenzieren (Takashiba et al., 1999, Zeng et al., 2015, Liu et al., 2023). Um den Einfluss der unterschiedlichen Stimulationsbedingungen auf die Zytotoxizität in THP-1 Zellen zu untersuchen, wurde nach 24 h Stimulation ein Laktatdehydrogenase-Assay der Zellkulturüberstände angefertigt. Die Stimulation mit LPS alleine verursachte keinen signifikanten Anstieg der Zytotoxizität. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg der Zytotoxizität bei der Stimulation mit 1000  $\mu$ M Nickel im Vergleich zur Negativkontrolle. Bei der Bedingung Nickel 1000  $\mu$ M + 10  $\mu$ g/ml CTRP3 fiel dieser Anstieg signifikant geringer aus (Abb. 10).

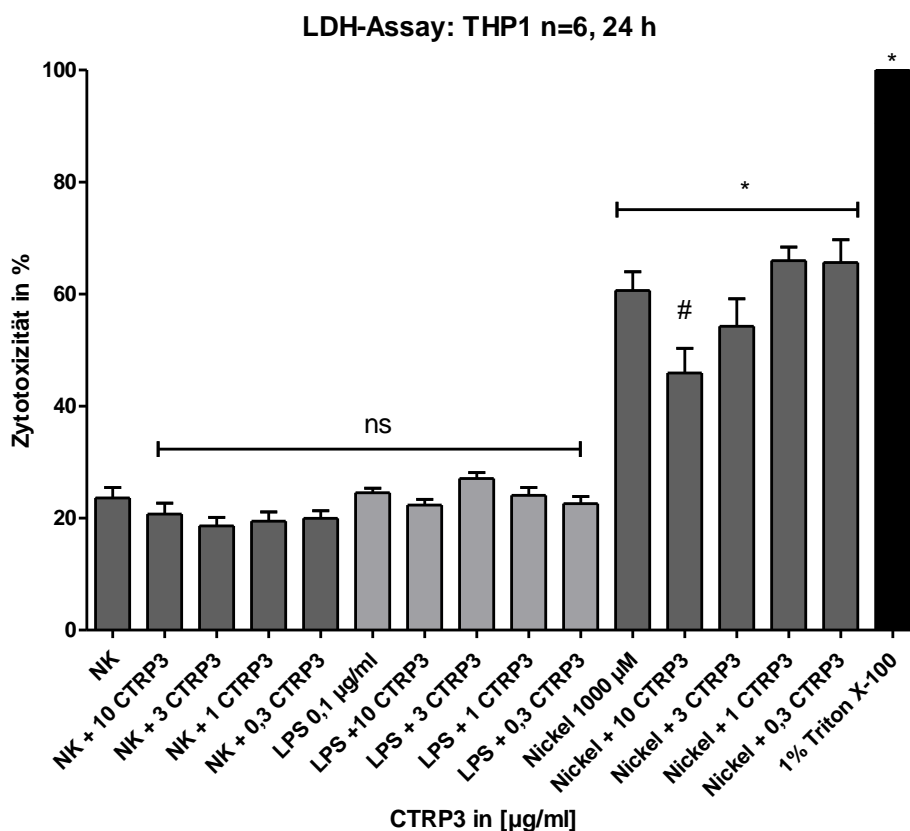


Abbildung 10: LDH-Assay der CTRP3-Experimente mit THP-1 Zellen

Unterschiedliche Passagen von THP1-Zellen (n=6) wurden, nach 24 h Vorstimulation mit 100 ng/ml PMA, für 24 h mit 1000  $\mu$ M Nickel bzw. 0,1  $\mu$ g/ml LPS +/- 0,3, 1, 3 und 10  $\mu$ g/ml CTRP3 stimuliert. Das CTRP3 wurde dabei bereits dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation mit Nickel/LPS zugegeben. Nach 24 h wurde die Zytotoxizität der einzelnen Bedingungen via Laktatdehydrogenase-Assay ermittelt und relativ zur Positivkontrolle (Stimulation mit 1 % Triton X-100) dargestellt. Alle Experimente auf 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden in Duplikaten durchgeführt. NK, Negativkontrolle; Statistik: Wilcoxon-Test: ns = nicht signifikant, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs. NK (# statt \* vs. Nickel 1000  $\mu$ M); Darstellung: Mean + SEM.

Der in Abbildung 10 gezeigte Einfluss von 10  $\mu$ g/ml CTRP3 auf die Zytotoxizität in THP-1 Zellen wurde zusätzlich im zeitlichen Verlauf untersucht. Hierfür wurden in einer weiteren THP-1 Versuchsreihe (n=7) nach 4h, 12 h und 24 h Stimulation mit 1000  $\mu$ M Nickel +/- 10  $\mu$ g/ml CTRP3 LDH-Assays der Zellkulturüberstände angefertigt. Bereits nach 12 h Stimulation zeigte sich eine signifikant reduzierte Zytotoxizität bei der Stimulation mit 1000  $\mu$ M Nickel + 10  $\mu$ g/ml CTRP3 gegenüber 1000  $\mu$ M Nickel alleine (Abb. 11).

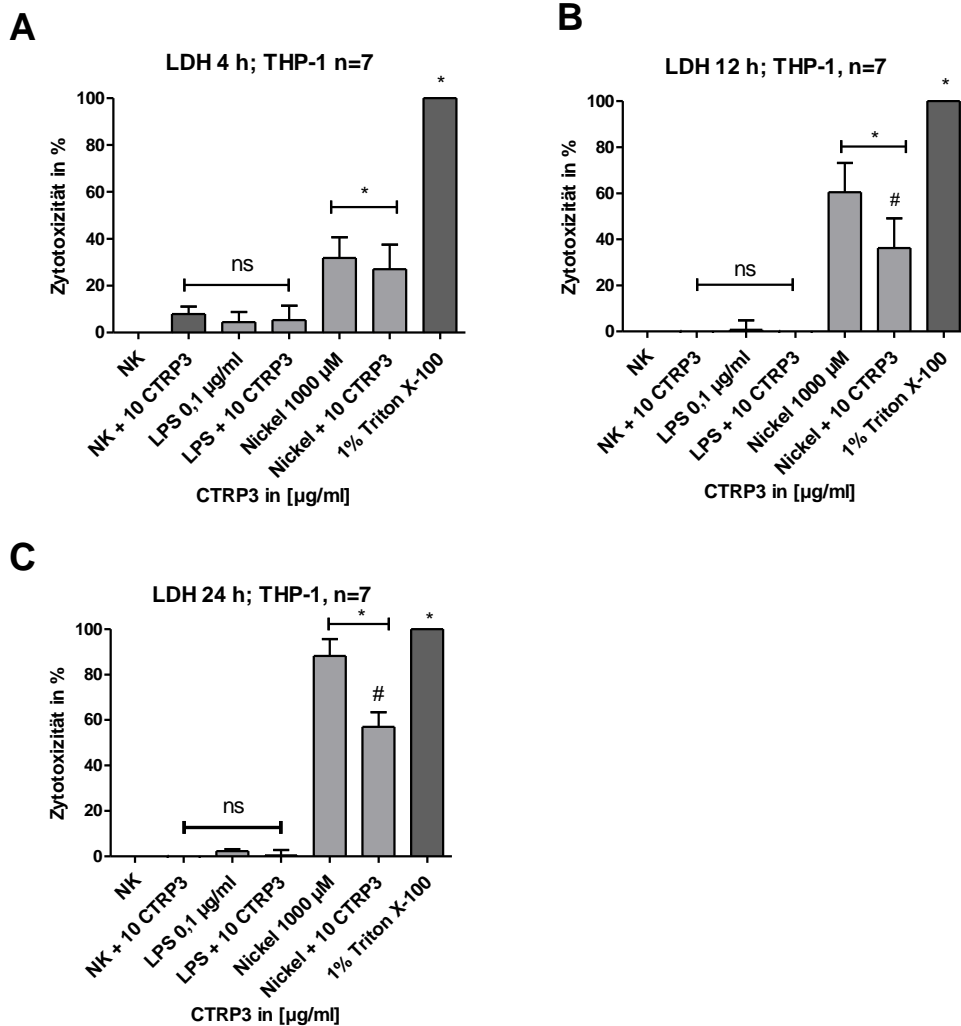
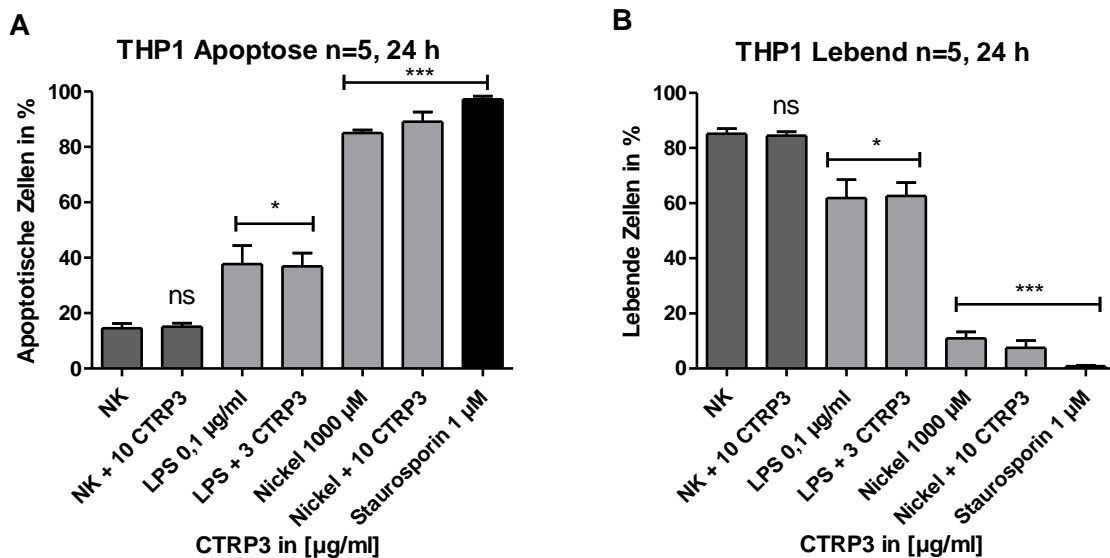


Abbildung 11: LDH-Assay der CTRP3-Experimente mit THP-1 Zellen im zeitlichen Verlauf

Unterschiedliche Passagen von THP1-Zellen (n=6) wurden, nach 24 h Vorstimulation mit 100 ng/ml PMA, für **A**: 4h, **B**: 12 h, **C**: 24 h mit 1000 µM Nickel +/- 10 µg/ml CTRP3 stimuliert. Das CTRP3 wurde dabei bereits dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation mit Nickel/LPS zugegeben. Nach **A**: 4h, **B**: 12 h, **C**: 24 h wurde die Zytotoxizität der einzelnen Bedingungen via Laktatdehydrogenase-Assay ermittelt und relativ zur Positivkontrolle (Stimulation mit 1 % Triton X-100) dargestellt. Alle Experimente auf 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden in Duplikaten durchgeführt. NK, Negativkontrolle. Statistik: Wilcoxon-Test: ns = nicht signifikant, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs. NK (# statt \* vs. Nickel 1000 µM); Darstellung: Mean + SEM.

### 3.2.2 FACS-Analyse (Annexin V-FITC/PE-Färbung)

Da Zellen die sich in einem frühen Stadium der Apoptose befinden in der Zytotoxizitätsmessung des LDH-Assays nicht berücksichtigt werden können, wurde nach Ablauf der 24 h Stimulation zusätzlich eine durchflusszytometrische Untersuchung (Annexin V-FITC Apoptose-Färbung) der THP-1 Zellen durchgeführt. Ein Ziel der Versuchsreihe war es, den Einfluss von 10 µg/ml CTRP3 auf die Nickel-induzierte Apoptose in THP-1 Zellen zu analysieren. Im Gegensatz zum LDH-Assay zeigten sich in der durchflusszytometrischen Untersuchung keine signifikanten Unterschiede zwischen der Stimulation mit 1000 µM Nickel + 10 µg/ml CTRP3 gegenüber 1000 µM Nickel alleine (siehe Abb. 12).

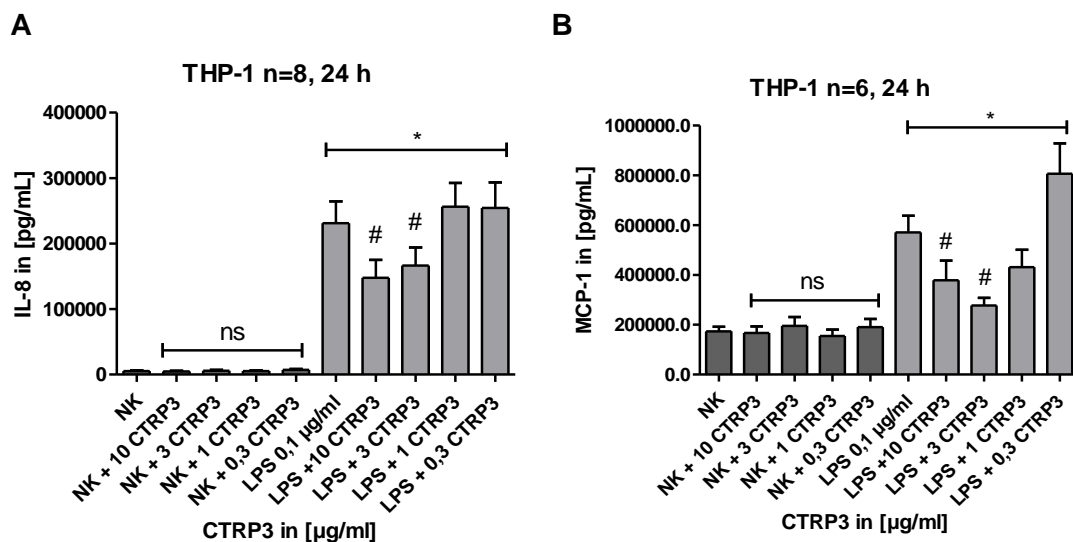


**Abbildung 12: Durchflusszytometrische Untersuchung (Annexin V-FITC Apoptose Färbung) der THP-1 Zellen im Rahmen der CTRP3-Experimente**

Unterschiedliche Passagen von THP-1 Zellen (n=5) wurden, nach 24 h Vorstimulation mit 100 ng/ml PMA, für 24 h mit 1000 µM Nickel +/- 10 µg/ml CTRP3, sowie mit 0,1 µg/ml LPS +/- 3 µg/ml CTRP3 stimuliert. Das CTRP3 wurde dabei bereits dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation mit Nickel/LPS zugegeben. **A**: Nach 24 h wurden die apoptotischen THP1-Zellen innerhalb der einzelnen Stimulationsbedingungen via Annexin-V FITC Apoptose-Färbung quantifiziert und relativ zur Positivkontrolle (Stimulation mit 1 µM Staurosporin) dargestellt. **B**: Ergänzende Darstellung der lebenden THP1-Zellen nach 24 h Stimulation. Darstellung: Mean + SEM. Statistik: t-Test: ns = nicht signifiaknt, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs. NK. LPS, Lipopolysaccharid. NK, Negativkontrolle.

### 3.2.3 Einfluss von CTRP3 auf die LPS/Nickel-induzierte Sekretion von IL-8 und MCP-1 in THP-1 Zellen

Ziel des Versuchs war es potentielle Auswirkungen von CTRP3 auf TLR4 abhängige Mechanismen in THP-1 Zellen zu untersuchen. Die THP-1 Zellen wurden zunächst für 24 h innerhalb einer T-75 Kulturf flasche mit 100 ng/ml PMA in frischem Kulturmedium vorstimuliert um eine stärkere Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine nach der Stimulation mit 0,01 µg/ml LPS/ 1000 µM Nickel +/- 0,3-10 µg/ml CTRP3 zu induzieren und die THP-1 Zellen in Richtung eines Makrophagen-ähnlichen Phänotyps zu differenzieren (Takashiba et al., 1999, Zeng et al., 2015, Liu et al., 2023). Anschließend wurden die Zellen in Duplikaten bei  $5 \times 10^4$  Zellen in 100 µl Kulturmedium pro Vertiefung auf einer sterilen 96-Loch-Mikrotiterplatte für 24 h stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit 1000 µM Nickel +/- 0,3; 1; 3; 10 µg/ml CTRP3. Als Positivkontrolle für einen TLR4-abhängigen Effekt diente LPS 0,1 µg/ml +/- 0,3-10 µg/ml CTRP3. Als Negativkontrolle dienten THP-1 Zellen in Kulturmedium +/- 0,3-10 µg/ml CTRP3. Das CTRP3 wurde jeweils dreißig Minuten vor der Stimulation zugegeben (Abb. 13). Analog zu den HUVEC's, wurde bei den THP-1 Zellen die niedrigste Nickel Konzentration (1000 µM) verwendet, die in den Vorversuchen zu einer zuverlässig signifikanten und im ELISA detektierbaren IL-8 Ausschüttung geführt hatte.

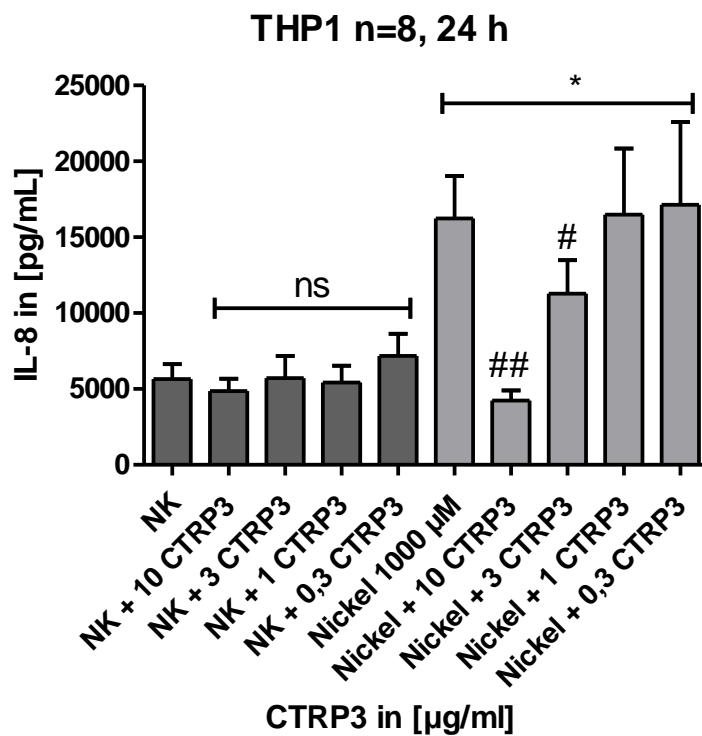


**Abbildung 13: IL-8 und MCP-1 ELISA-Ergebnisse der THP-1 Zellen nach Stimulation mit LPS +/- CTRP3**

Unterschiedliche Passagen von THP-1 Zellen (**A**: n=8; **B**: n=6) wurden, nach 24 h Vorstimulation mit 100 ng/ml PMA, für 24 h mit 0,1 µg/ml LPS +/- 0,3-10 µg/ml CTRP3 stimuliert. Das CTRP3 wurde dabei bereits dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation mit LPS zugegeben. Nach der Stimulation wurde via ELISA-Verfahren die IL-8 und MCP-1 Konzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt. Alle Experimente auf 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden in

Duplikaten durchgeführt. Darstellung: Mean + SEM. Statistik: Wilcoxon-Test: ns = nicht signifikant, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs. NK (# statt \* vs. LPS 0,01 µg/ml). IL, Interleukin. LPS, Lipopolysaccharid. MCP-1, Monocyte chemoattractant protein-1. NK, Negativkontrolle.

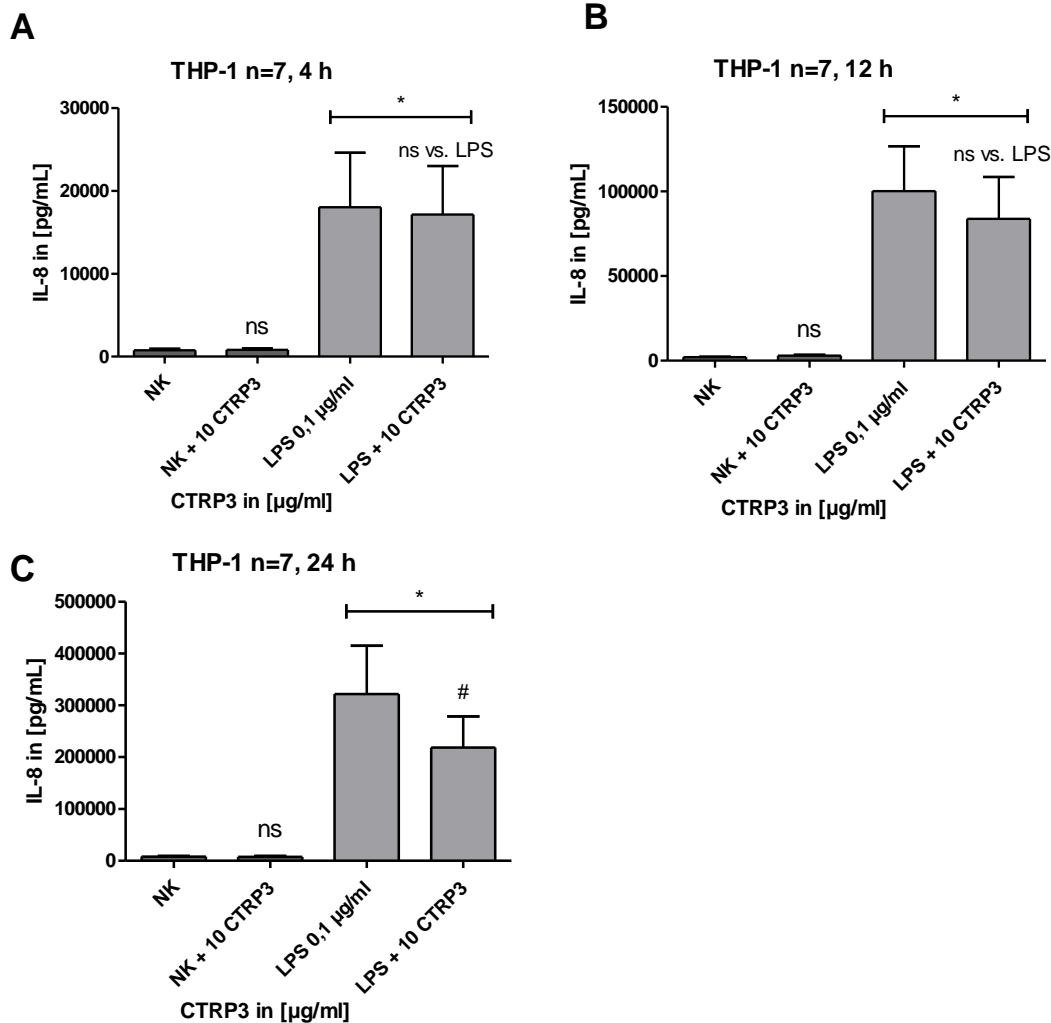
Bei der Stimulation mit 0,1 µg/ml LPS + CTRP3 der Konzentrationen 1; 3 und 10 µg/ml zeigte sich im IL-8 und MCP-1 ELISA eine signifikante Inhibition der Zytokin-Sekretion im Vergleich zur alleinigen Stimulation der THP-1 Zellen mit 0,1 µg/ml LPS. Die Stimulation mit Nickel führte bei den THP-1 Zellen nicht zu einer signifikanten MCP-1 Ausschüttung. Analog zur Stimulation mit LPS zeigte sich im IL-8 ELISA bei der Stimulation mit 1000 µM Nickel + CTRP3 der Konzentrationen 3 und 10 µg/ml eine signifikante Inhibition der Zytokin Sekretion im Vergleich zur alleinigen Stimulation der THP-1 Zellen mit 1000 µM Nickel (Abb. 14).



**Abbildung 14: IL-8 ELISA-Ergebnisse der THP-1 Zellen nach Stimulation mit Nickel +/- CTRP3**

Unterschiedliche Passagen von THP-1 Zellen (n=8) wurden, nach 24 h Vorstimulation mit 100 ng/ml PMA, für 24 h mit 1000 µM Nickel +/- 0,3-10 µg/ml CTRP3 stimuliert. Das CTRP3 wurde dabei bereits dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation mit Nickel zugegeben. Nach der Stimulation wurde via ELISA-Verfahren die IL-8 und MCP-1 Konzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt. Alle Experimente auf 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden in Duplikaten durchgeführt. Darstellung: Mean + SEM. Statistik: Wilcoxon-Test: ns = nicht signifikant, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs. NK (# statt \* vs. Nickel 1000 µM). IL, Interleukin. LPS, Lipopolysaccharid. MCP-1, Monocyte chemoattractant protein-1. NK, Negativkontrolle.

Nachdem CTRP3-induzierte inhibitorische Effekte in den konzentrationsabhängigen Experimenten signifikant und reproduzierbar nachgewiesen werden konnten, wurden die Effekte zusätzlich im zeitlichen Verlauf untersucht. Auf der folgenden Abbildung wurde zunächst der auf Abbildung 13 dargestellte inhibitorische Effekt von CTRP3 auf die LPS-induzierte Sekretion von IL-8 in THP-1 Zellen im zeitlichen Verlauf untersucht (Abb. 15).

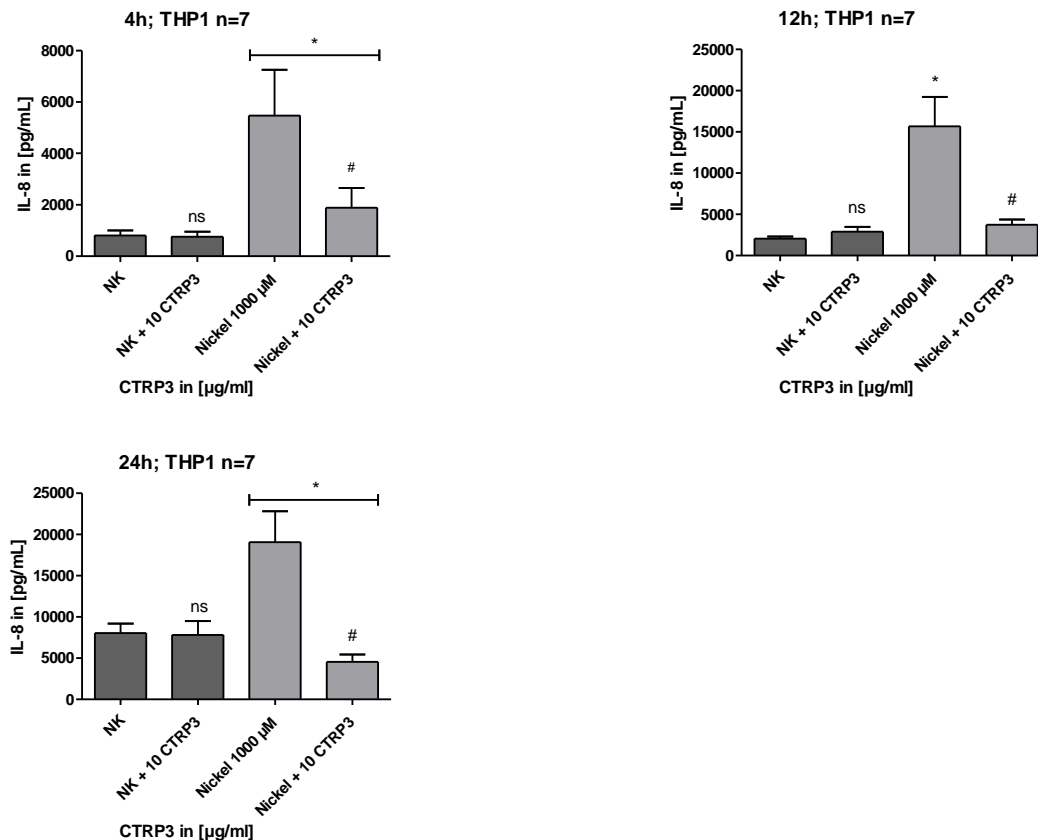


**Abbildung 15: IL-8 ELISA-Ergebnisse der zeitabhängigen THP-1 Zellen CTRP3-Experimente (Stimulation mit LPS +/- CTRP3)**

Unterschiedliche Passagen von THP-1 Zellen (n=7) wurden, nach 24 h Vorstimulation mit 100 ng/ml PMA, für **A**: 4 h, **B**: 12 h und **C**: 24 h mit 0,1 µg/ml LPS +/- 10 µg/ml CTRP3 stimuliert. Das CTRP3 wurde dabei bereits dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation mit LPS zugegeben. Nach der Stimulation wurde via ELISA-Verfahren die IL-8 Konzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt. Alle Experimente auf 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden in Duplikaten durchgeführt. Darstellung: Mean + SEM. Statistik: Wilcoxon-Test: ns = nicht signifikant, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs. NK (# statt \* vs. LPS 0,01 µg/ml). IL, Interleukin. LPS, Lipopolysaccharid. NK, Negativkontrolle.

Nach 24 h Stimulation zeigte sich ein signifikanter inhibitorischer Effekt im IL-8 ELISA bei der Stimulation mit 0,1 µg/ml LPS + 10 µg/ml CTRP3 im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit 0,1 µg/ml LPS. Ein nicht signifikanter inhibitorischer Trend ließ sich bereits nach 12 h Stimulation erkennen (Abb. 15).

Auch der in Abbildung 14 gezeigte inhibitorische Effekt von CTRP3 auf die Nickel-induzierte IL-8 Sekretion wurde im zeitlichen Verlauf untersucht (Abb. 16).



**Abbildung 16: IL-8 ELISA-Ergebnisse der zeitabhängigen THP-1 Zellen CTRP3-Experimente (Stimulation mit Nickel +/- CTRP3)**

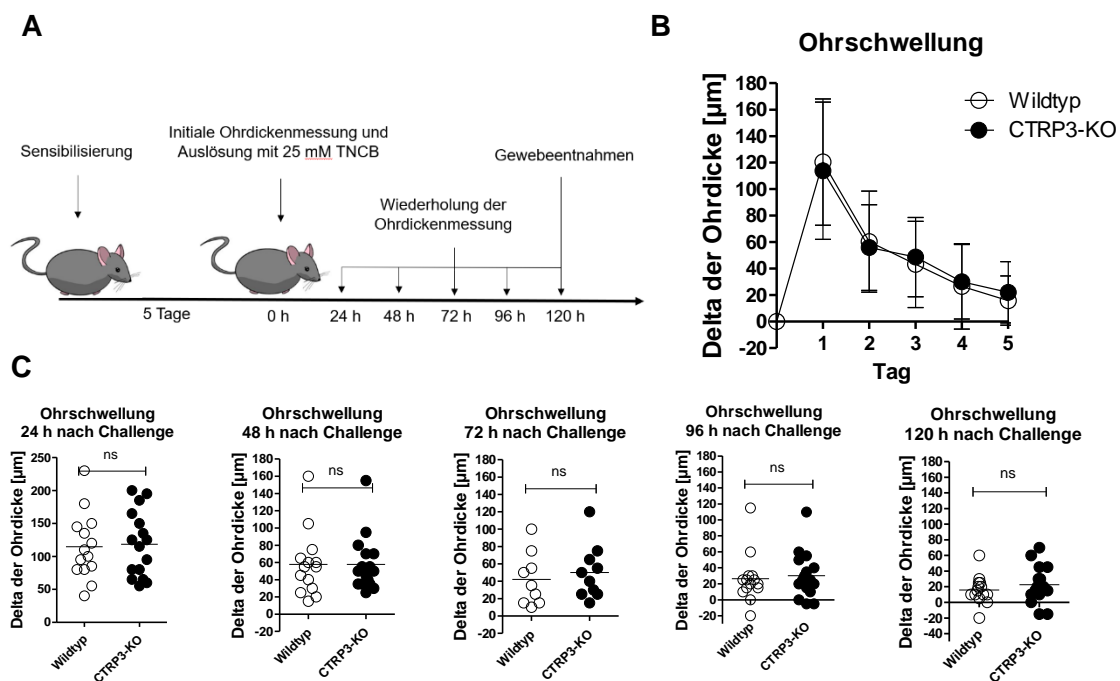
Unterschiedliche Passagen von THP-1 Zellen (n=7) wurden, nach 24 h Vorstimulation mit 100 ng/ml PMA, für **A**: 4 h, **B**: 12 h und **C**: 24 h mit 1000 µM Nickel +/- 10 µg/ml CTRP3 stimuliert. Das CTRP3 wurde dabei bereits dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation mit LPS zugegeben. Nach der Stimulation wurde via ELISA-Verfahren die IL-8 Konzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt. Alle Experimente auf 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden in Duplikaten durchgeführt. Darstellung: Mean + SEM. Statistik: Wilcoxon-Test: ns = nicht signifikant, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs. NK (# statt \* vs. Nickel 1000 µM). IL, Interleukin. LPS, Lipopolysaccharid. NK, Negativkontrolle.

Zu allen Messzeitpunkten (4 h, 12 h und 24 h) zeigte sich der inhibitorische Effekt im IL-8 ELISA bei der Stimulation mit 1000 µM Nickel + 10 µg/ml CTRP3 im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit 1000 µM Nickel signifikant und reproduzierbar (Abb. 16).

### 3.3 Ergebnisse der CTRP3-Knockout Mausexperimente:

#### 3.3.1 Ohrdickenmessung nach erfolgter Challenge mit TNCB

Im Rahmen der CHS-Reaktion kommt es zu einer lokalen Schwellung im betroffenen Hautareal. Da das TNCB im Bereich der dorsalen Ohrseite der Mäuse aufgetragen wurde, konnte so die Ohrschwellung als Parameter der CHS-Reaktionsausprägung herangezogen werden. Die Ohrdicke der Mäuse wurde direkt vor der Auslösung mit TNCB, sowie 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h danach an beiden Ohren gemessen (Abb. 17A). Die Ohrdicken wurde intra- und interindividuell beidseits zu jedem Messzeitpunkt an der gleichen Stelle bestimmt. Es zeigte sich in der Ohrdickenmessung zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der CTRP3-Knockout Mäuse (n=16) und den der Wildtyp-Kontrollmäuse (n=14). Das Maximum der Ohrschwellung zeigte sich 24 h nach der Challenge (Abb. 17 B, C).

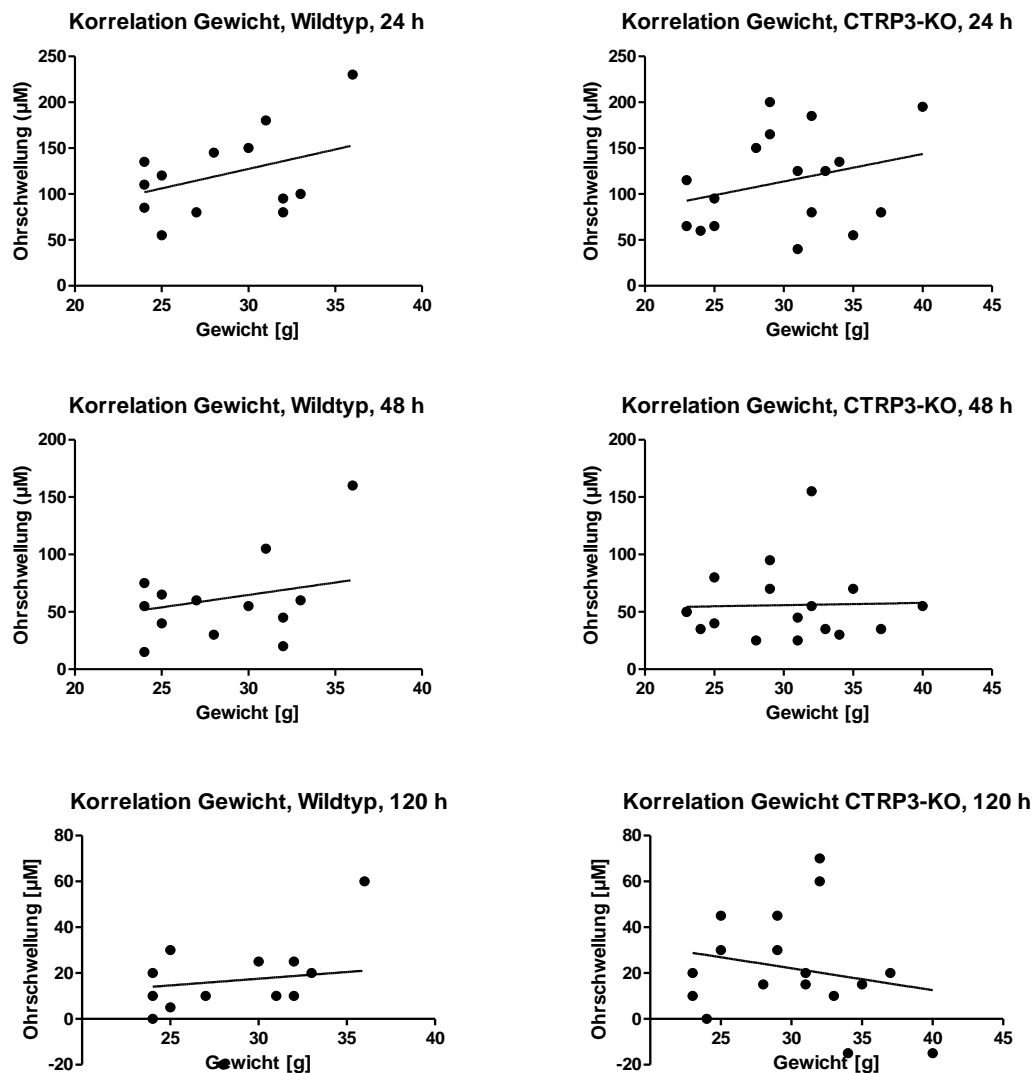


**Abbildung 17: Ohrdickenmessung nach erfolgter Challenge mit TNCB**

Messung der Ohrschwellung Wildtyp-Mäuse (n=14) vs. CTRP3-Knockout (KO) Mäuse (n=16) nach Sensibilisierung und Allergenprovokation in absoluten Werten ( $\mu\text{m}$ ). **A:** Protokoll des Experiments. **B:** Übersichtsgrafik über den zeitlichen Verlauf der Ohrschwellung aller Mäuse. Die schwarzen Punkte in der Grafik stellen die Messwerte der CTRP3-Knockout Mäuse (CTRP3-KO, n=16) dar. Diese Mäuse konnten in Ihrem Fettgewebe kein CTRP3 produzieren. Die Messwerte der Wildtyp-Kontrollmäuse (n=14) wurden in der Grafik in weiß dargestellt. Die Abbildung zeigt zu jedem Messzeitpunkt (1-5 Tage nach der Provokation mit TNCB) die gemittelte Veränderung der Ohrdicke aller Mäuse in  $\mu\text{m}$  (gemittelter Wert beider Ohren), in Bezug auf den ersten Messwert (kurz vor der Auslösung mit TNCB). Darstellung: Mean  $\pm$  SD. **C:** Gegenüberstellung der Ohrschwellung (CTRP3-KO vs. Wildtyp-Mäuse) zu jedem Messzeitpunkt (24 h, 48 h, 72 h,

96 h, 120 h) zur statistischen Analyse. Darstellung: Mean, Statistik: Mann-Whitney-Test: ns = nicht signifikant vs. Wildtyp.

Das Gewicht der Mäuse variierte innerhalb der beiden Gruppen (CTRP3-KO/Wildtyp) durch Unterschiede im Verhalten und abhängig vom Geschlecht. Daher wurde zusätzlich untersucht, ob das Gewicht der einzelnen Mäuse Auswirkungen auf die Ausprägung der Ohrschwellung hatte (Abb.18).



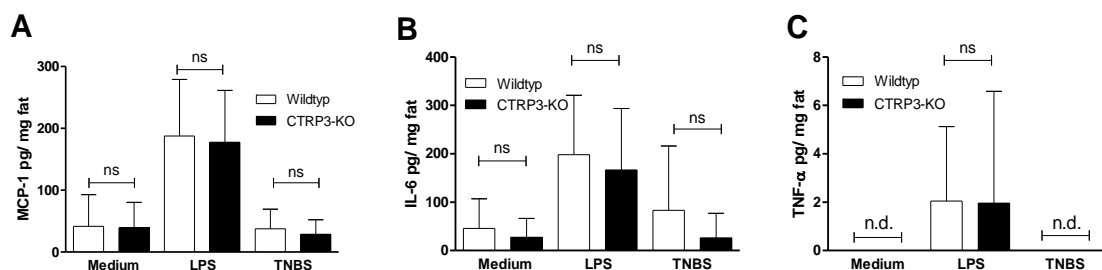
**Abbildung 18: Korrelation zwischen Gewicht und Ohrschwellung der Mäuse**

Die Y-Achse zeigt jeweils die Messung der Ohrschwellungen von Wildtyp-Mäusen (n=14) und CTRP3-Knockout (KO) Mäusen (n=16) nach Sensibilisierung und Allergenprovokation (24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h nach der Provokation mit TNCB) in absoluten Werten (µm). Auf der X-Achse ist das Gewicht [g] der gemessenen Mäuse dargestellt. Mittels linearer Regressionsgerade wurde bestimmt, ob eine signifikante Korrelation zwischen dem Gewicht und der Ohrschwellung der einzelnen Mäuse bestand.

Die Ergebnisse zeigten zu keinem Messzeitpunkt eine signifikante Korrelation ( $p < 0,05$ ) zwischen der Ohrschwellung und dem Gewicht der Mäuse (Abb. 18).

### 3.3.2 ELISA-Ergebnisse der *Fat explant*-Stimulationsversuche

Bei den *Fat explant*-Stimulationsversuchen handelte es sich um die Stimulation von entnommenem subkutanem Fettgewebe von CTRP3-Knockout (n=16) bzw. Wurfgeschwister-Wildtyp-Kontrollmäusen (n=14) mit 100 ng/ml LPS (*E. coli* 0111:B4) oder 25 mM TNBS. Das Gewebe wurde 120 h nach der Allergenprovokation mit TNCB entnommen. Neben Adipozyten enthält das entnommene subkutane Fettgewebe auch andere Zelltypen wie Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten. Durch die Berücksichtigung des natürlichen Mikromilieus sollte die Relevanz von CTRP3 auf die CHS-Reaktion besser untersucht werden.

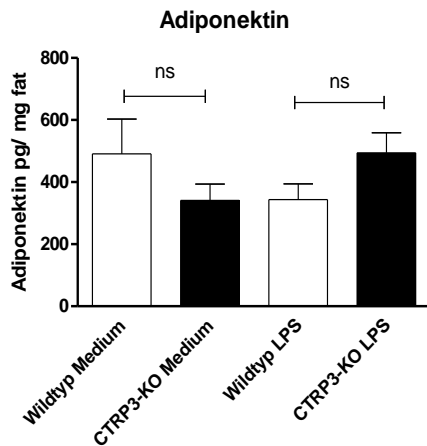


**Abbildung 19: MCP-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  ELISA der *Fat explant*-Überstände nach 24 h Stimulation**

Im Rahmen der Mausexperimente wurde subkutanes Fettgewebe von CTRP3-Knockout (KO) Mäusen (n=16) und Wildtyp-Kontrollmäusen (n=14) 120 h nach der Allergenprovokation mit TNCB entnommen und für 24 h in Hanks-Medium kultiviert. Im Anschluss erfolgte eine Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) 100 ng/ml oder 25 mM TNBS in frischem Medium für 24 h. Abschließend wurde die Konzentration von **A**: MCP-1, **B**: IL-6, **C**: TNF- $\alpha$  via ELISA im Kulturüberstand bestimmt. **C**: Die TNF- $\alpha$  Konzentrationen nach Stimulation mit TNBS, sowie mit Medium alleine waren nicht detektierbar (n.d.). Die Ergebnisse von CTRP3-KO vs. Wildtyp wurden statistisch mittels Mann-Whitney-Test untersucht: ns = nicht signifikant, Darstellung Mean + SEM.

Es zeigten sich bei der Auswertung der *Fat explant*-Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen CTRP3-Knockout (CTRP3-KO) und Wildtyp-Mäusen im IL-6, MCP-1 und TNF- $\alpha$  ELISA (Abb. 19).

Adiponectin ist neben CTRP3 ein weiteres anti-inflammatorisch wirksames Adipokinin (Han et al., 2018). Im Folgenden wurde im Rahmen der *Fat explant*-Stimulationsversuche untersucht, ob der adipozytenspezifische CTRP3-Knockout einen kompensatorischen Anstieg der Adiponectinsekretion zur Folge hatte.



**Abbildung 20: Adiponectin-ELISA der Fat explant- Überstände nach 24 h Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS)**

Im Rahmen der *Fat explants* wurde subkutanes Fettgewebe von CTRP3-Knockout (KO) Mäusen (n=16) und Wildtyp-Kontrollmäusen (n=14) 120 h nach der Allergenprovokation mit TNCB entnommen und für 24 h in Hanks-Medium kultiviert. Im Anschluss erfolgte eine Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) 100 ng/ml oder 25 mM TNBS in frischem Medium für 24 h. Abschließend wurde die Konzentration von Adiponectin via ELISA im Kulturüberstand bestimmt. Die Ergebnisse von CTRP3-KO vs. Wildtyp wurden statistisch mittels Mann-Whitney-Test untersucht: ns = nicht signifikant. Darstellung Mean + SEM.

Weder innerhalb der jeweiligen Gruppe (z.B. Wildtyp Medium vs. Wildtyp LPS), noch zwischen Wildtyp- und CTRP3-Knockout (CTRP3-KO) Mäusen (z.B. Wildtyp LPS vs. CTRP3-KO LPS) zeigten sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) im Adiponectin-ELISA der *Fat explant*-Überstände (Abb. 20).

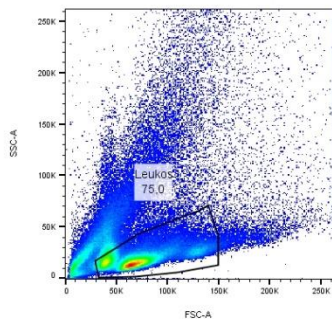
### 3.3.3 Durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS-Analysen):

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde den Mäusen 120 h nach der Challenge mit TNCB Gewebe aus Ohr-, Milz-, Lymphknoten (LK) - und Fettgewebe entnommen. Die Gewebeentnahme und der anschließende Organverlauf wurden unter Punkt 2.3.3 „Organentnahmen“, bzw. unter Punkt 2.3.4 „Organverlauf für die FACS-Analysen“ beschrieben. Die Durchführung der Färbungen für die FACS-Analyse wurde unter Punkt 2.2.5 „Durchflusszytometrie (FACS)“ erläutert. Das entnommene Gewebe wurde auf Unterschiede in der lokalen relativen Häufigkeit verschiedener ACD-relevanter Zellpopulationen (T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen) zwischen CTRP3-Knockout (CTRP3-KO) und Wildtyp-Mäusen untersucht. Im Folgenden wird zunächst exemplarisch die für den jeweiligen Zelltyp spezifische Gating-Strategie vorgestellt. Im Anschluss werden jeweils alle Messergebnisse (n=30) hinsichtlich dieses Zelltyps im Vergleich (CTRP3-KO vs. CTRP3-Wildtyp) gewebeabhängig dargestellt.

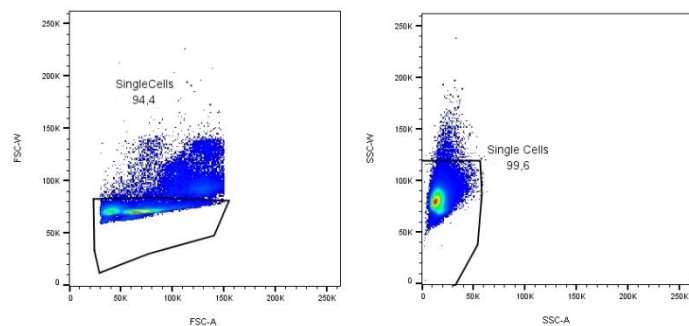
## T-Zellen und NK-Zellen:

### FACS Gating-Strategie für T-Zellen, NK-Zellen und T-Zell Subtypen

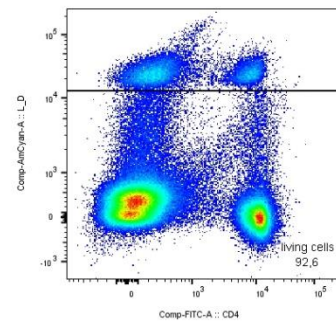
#### 1. Gating auf Leukozyten im FSC/SSC



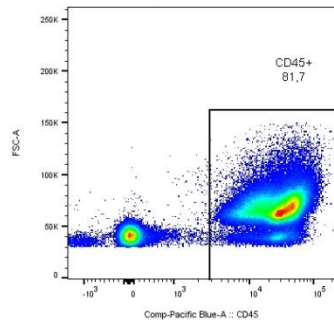
#### 2. Ausschließen von zusammengelagerten Zellen im FSC/SSC



#### 3. Ausschließen von toten Zellen



#### 4. Gating auf CD45+ Zellen



#### 5. Gating auf T-Zellen, NK-Zellen und T-Zell Subtypen

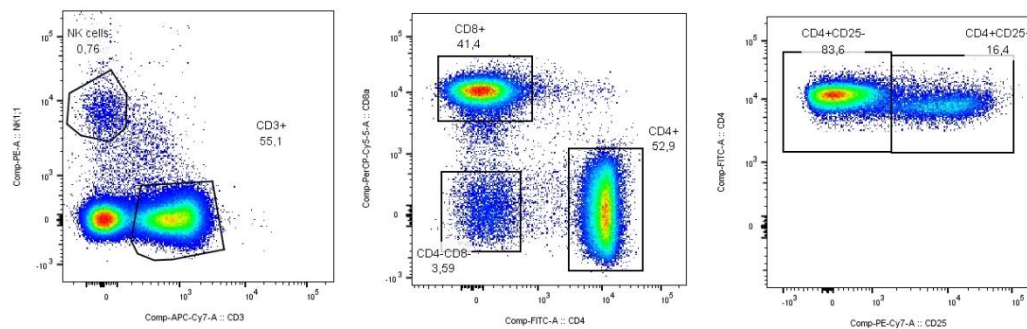
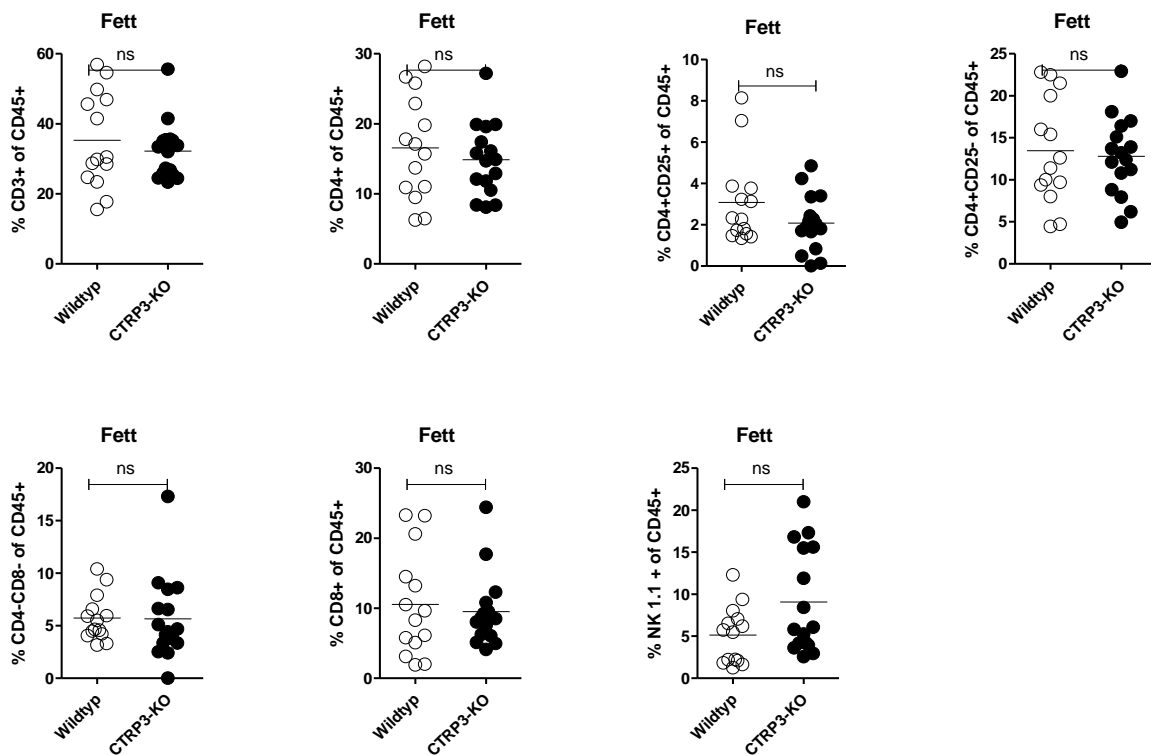


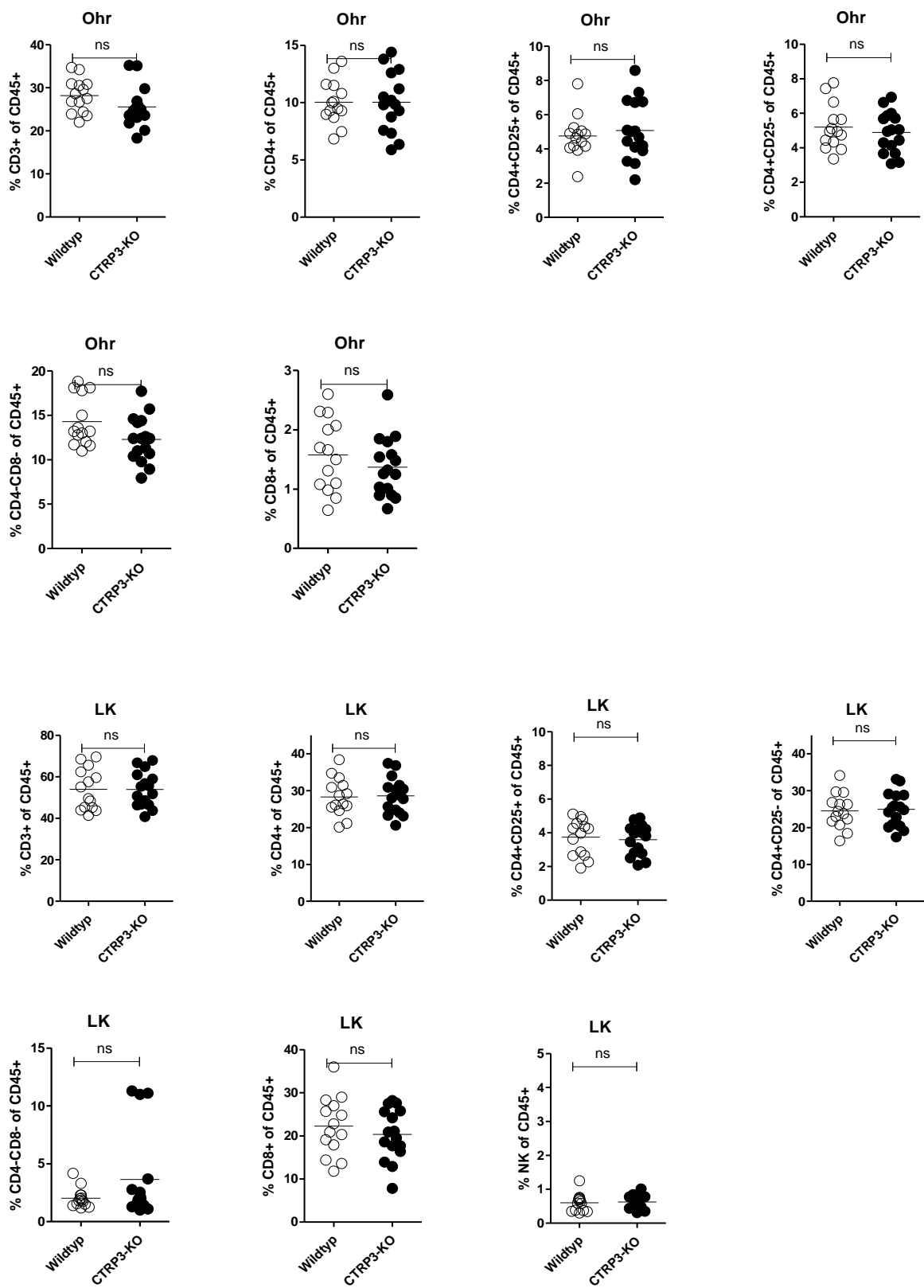
Abbildung 21: FACS Gating-Strategie für T-Zellen, NK-Zellen und T-Zell Subtypen

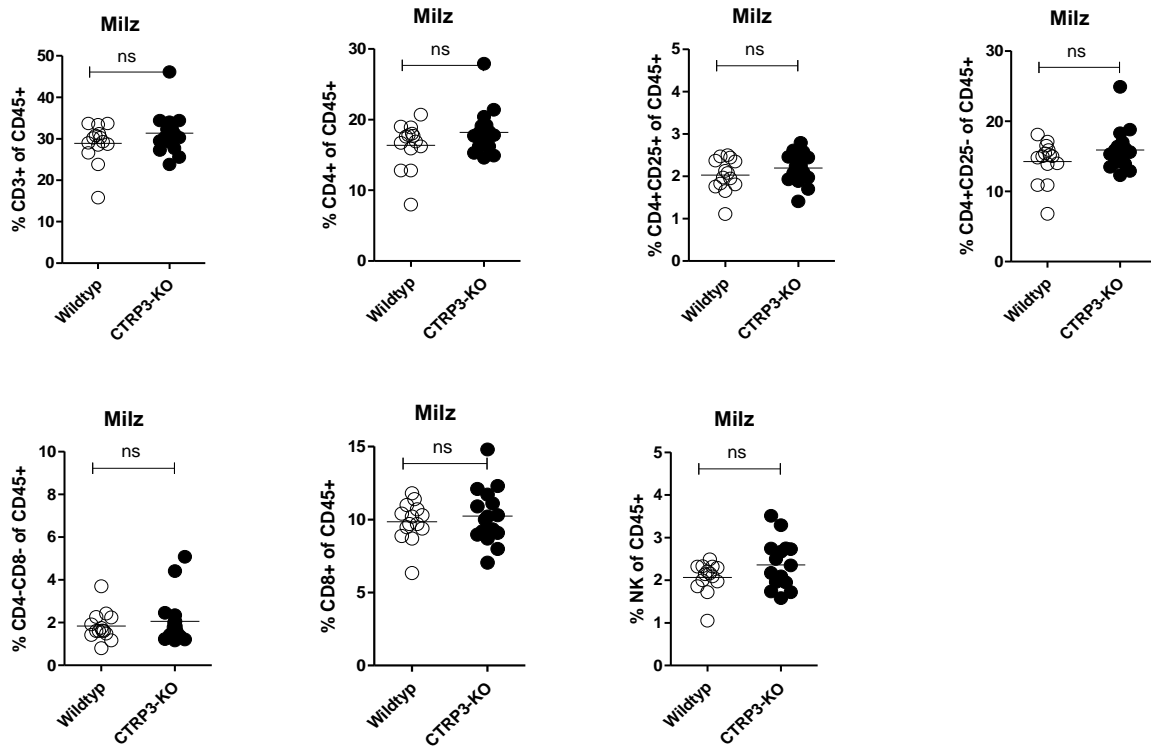
Untersucht wurden Zellen aus Ohr-, Milz-, Lymphknoten (LK) - und Fettgewebe, um mögliche Unterschiede in den T- und NK-Zellpopulationen von CTRP3-Wildtyp (n=14) und CTRP3-KO Mäusen (n=16) 120 h nach der Allergenprovokation mit TNCB festzustellen. Die Gewinnung der Zellen für die Untersuchung wurde unter Punkt 2.3.4 „Organverdauer für die FACS-Analysen“

beschrieben. Verwendete Gating Strategie: **1.**: Zunächst wurden die Leukozyten mit Hilfe des FSC/SSC aus der Gesamtzellzahl isoliert. Nach dem Ausschluss von **2.** zusammengelagerten Zellen (FSC/SSC) und **3.** toten Zellen (Live/Dead-Färbung) wurden **4.** zunächst alle CD45+ Zellen isoliert. **5.** Links: Innerhalb der CD45+ Zellen wurde weiter differenziert zwischen NK-Zellen (NK-1.1+) und T-Zellen (CD3+). Mitte: Im nächsten Schritt wurde innerhalb der T-Zellen (CD3+) weiter differenziert zwischen zytotoxischen T-Zellen (CD8+) und T-Helferzellen (CD4+). Rechts: Innerhalb der T-Helferzellen (CD4+) wurde ferner differenziert zwischen regulatorischen (CD4+/CD25+) und nicht regulatorischen (CD4-/CD25-) T-Helferzellen. CD, Cluster of differentiation. FSC, Forward Scatter. SSC, Side Scatter.

Auf Abbildung 22 werden die Messergebnisse aller Proben unter Verwendung der in Abbildung 21 dargestellten Gating-Strategie gewebeabhängig im Vergleich CTRP3-KO (n=16) vs. CTRP3-Wildtypmaus (n=14) dargestellt







**Abbildung 22: Durchflusszytometrische Untersuchung von T-Zellen und Natural Killer (NK)-Zellen in gewonnenem Ohr-, Fett-, Milz- und Lymphknotengewebe**

Untersucht wurden Zellen aus Ohr-, Milz-, Lymphknoten (LK) - und Fettgewebe, um mögliche Unterschiede in den T- und NK-Zellpopulationen von CTRP3-Wildtyp ( $n=14$ ; *in weiß dargestellt*) und CTRP3-KO Mäusen ( $n=16$ ; *in schwarz dargestellt*) 120 h nach der Allergenprovokation mit TNCB festzustellen. Die Gewinnung der Zellen für die Untersuchung wurde unter Punkt 2.3.4 „Organverdau für die FACS-Analysen“ beschrieben. Die verwendete Gating-Strategie und die untersuchten Zell-Subpopulationen wurden in Abbildung 21 erläutert. Für jedes Gewebe (Ohrhaut, Lymphknoten (LK)-, Milz- und Fettgewebe) ist der prozentuale Anteil von jeder untersuchten CD45+ Zell-Subpopulation (CD3+; CD4+; CD3+/CD25+; CD4+/CD25-; CD4-/CD8-; CD8+; NK 1.1+) an der Gesamtheit aller CD45+ Zellen einzeln dargestellt. Statistik: Mann-Whitney-Test: ns = nicht signifikant. Darstellung: Mean. CD, Cluster of differentiation.

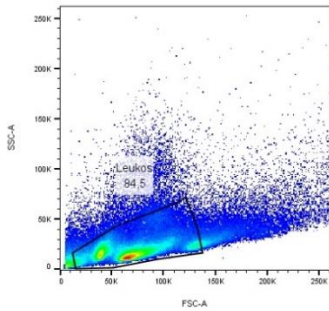
In der FACS-Analyse zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen CTRP3-Knockout (CTRP3-KO) und Wildtyp-Mäusen.

Im nächsten Schritt wurden Zellen aus Ohr-, Milz-, Lymphknoten (LK) - und Fettgewebe untersucht, um mögliche Unterschiede in den Makrophagenpopulationen (proinflammatorische M1- vs. antiinflammatorische M2-Makrophagen) von CTRP3-Wildtyp gegenüber CTRP3-KO Mäusen 120 h nach der Allergenprovokation mit TNCB feststellen zu können (Abb. 23, 34). Insbesondere M1-Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der ACD (siehe Punkt 1.4 „Molekulare Mechanismen der Nickel-Allergie“). Die Gewinnung der Zellen für die Untersuchung wurde unter Punkt 2.3.4 „Organverdau für die FACS-Analysen“ beschrieben.

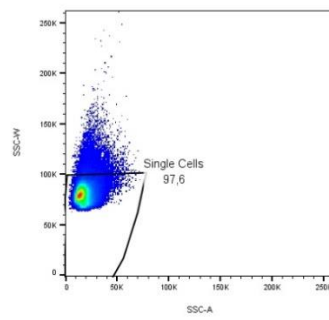
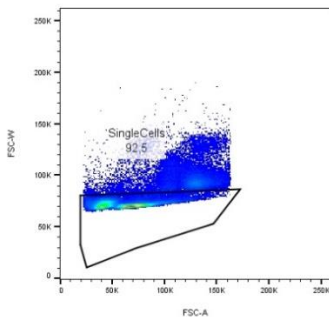
# Makrophagen:

## FACS Gating-Strategie für Makrophagen

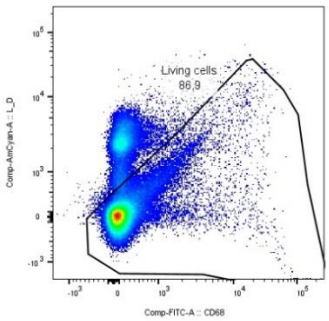
### 1. Gating auf Leukozyten im FSC/SSC



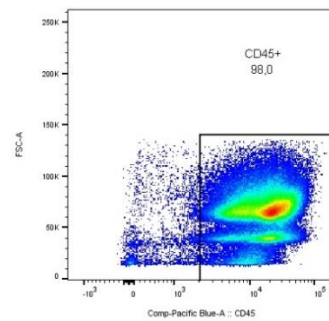
### 2. Ausschließen von zusammengelagerten Zellen im FSC/SSC



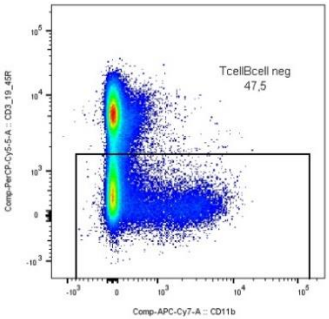
### 3. Ausschließen von toten Zellen



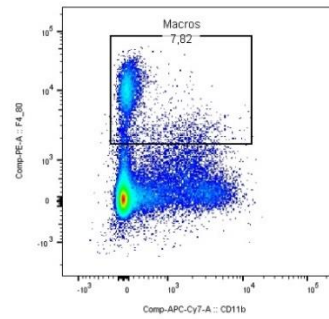
### 4. Gating auf CD45+ Zellen



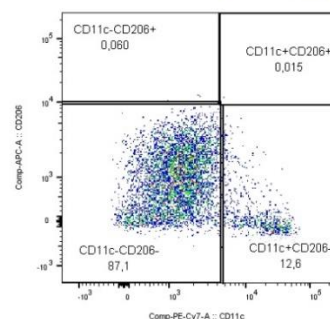
### 5. Ausschließen von T- und B-Zellen



### 6. Gating auf Makrophagen



### 7. Differenzierung von Subtypen

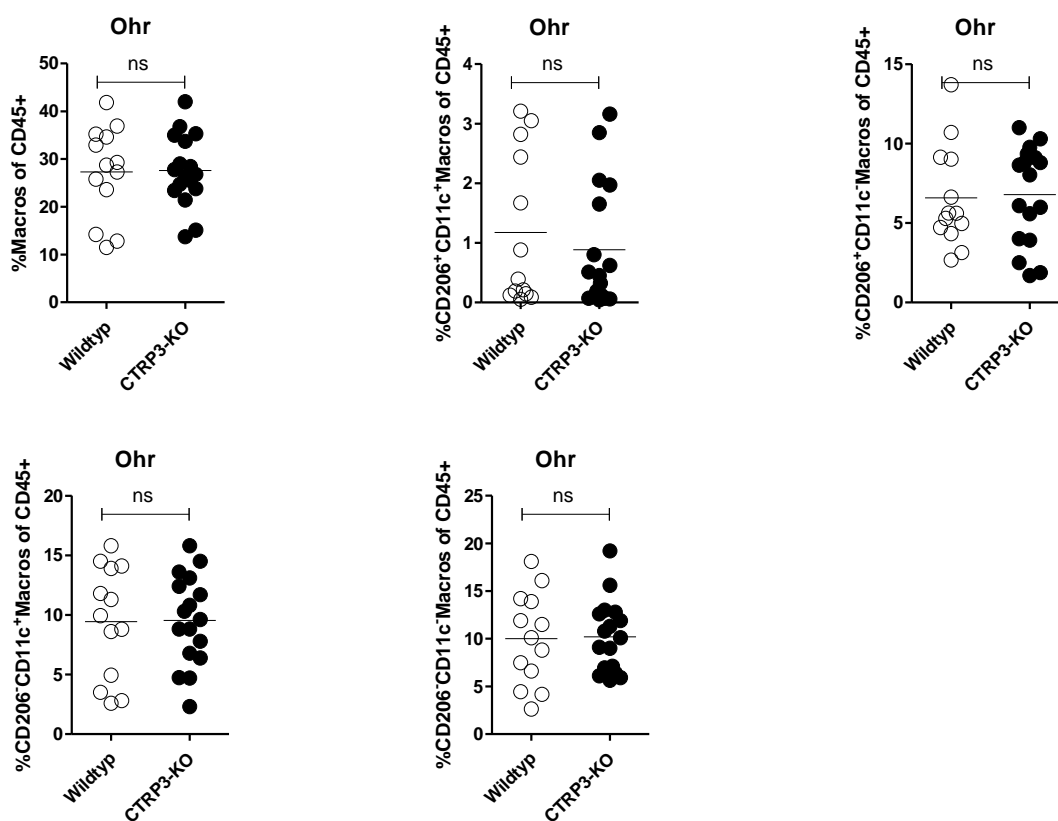


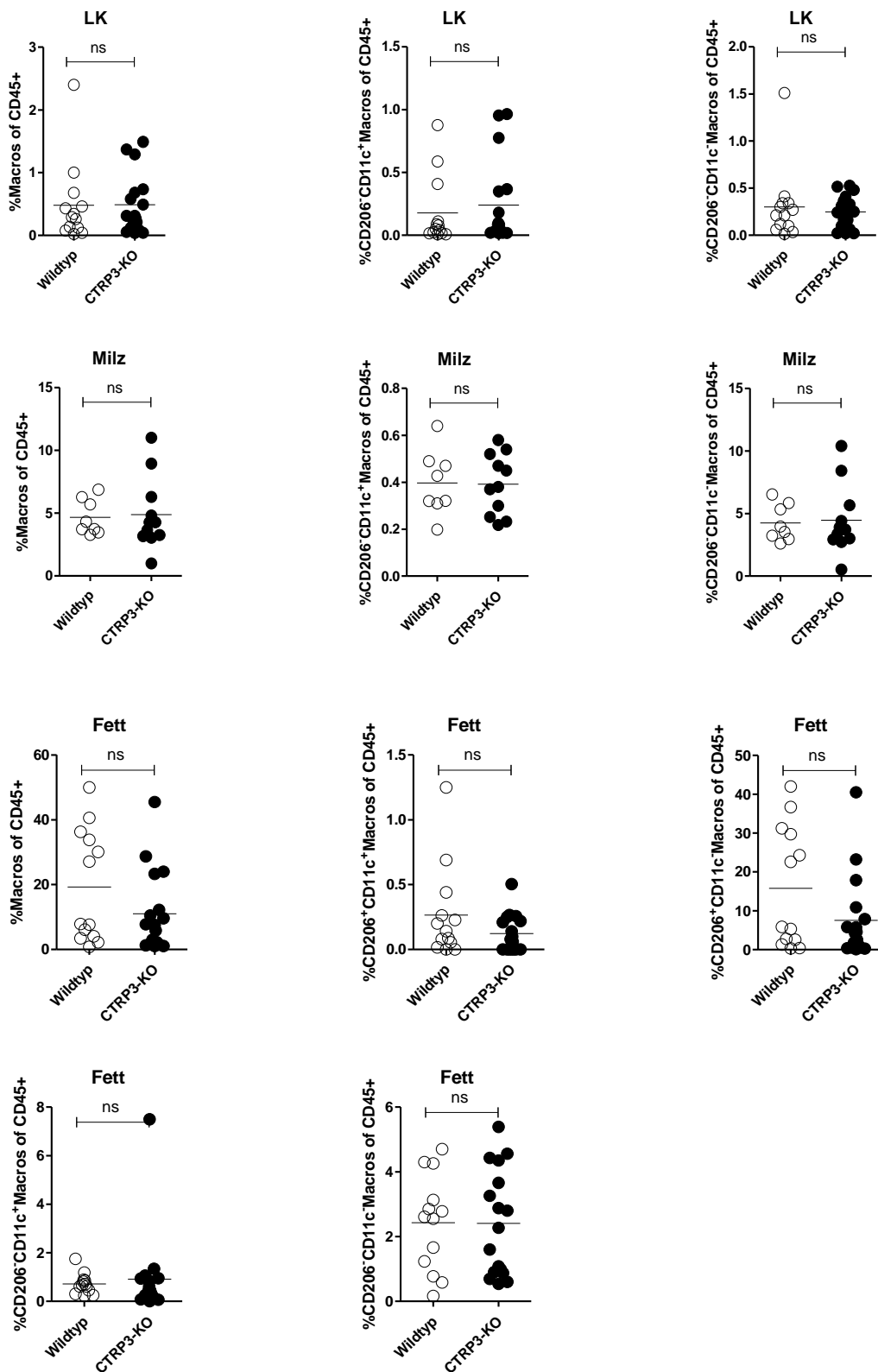
**Abbildung 23: FACS Gating-Strategie für Makrophagen**

Zellen aus Ohr-, Milz-, Lymphknoten (LK) - und Fettgewebe untersucht, um mögliche Unterschiede in den Makrophagenpopulationen (proinflammatorische M1- vs. antiinflammatorische M2-Makrophagen) von CTRP3-Wildtyp (n=14) gegenüber CTRP3-KO

Mäusen (n=6) 120 h nach der Allergenprovokation mit TNCB feststellen zu können. Verwendete Gating-Strategie: **1.**: Zunächst wurden die Leukozyten mit Hilfe des FSC/SSC aus der Gesamtzellzahl isoliert. Nach dem Ausschluss von **2.** zusammengelagerten Zellen (FSC/SSC) und **3.** toten Zellen (Live/Dead-Färbung), wurden **4.** zunächst alle CD45+ Zellen isoliert. **5.** Im nächsten Gating-Schritt wurden T- und B-Zellen durch die Selektion von CD3-/CD19-/CD45R-Zellen von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. **6.** Innerhalb der CD3-/CD19-/CD45R-Zellen wurden die Makrophagen (F4/80+) isoliert. **7.** Im letzten Schritt wurde zwischen proinflammatorischen M1-Makrophagen (CD206-) und antiinflammatorischen M2-Makrophagen (CD206+) differenziert. Die Makrophagen wurden zusätzlich hinsichtlich ihrer CD11c-Ausprägung untersucht. In Zelltransferexperimenten konnte gezeigt werden, dass CD11c+ Zellen eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung der Sensibilisierung, sowie bei der Induktion von Niedrigtoleranz im murinen Modell der Kontaktallergie spielen (Romer, 2016). CD, Cluster of differentiation. FSC, Forward Scatter. SSC, Side Scatter.

In Abbildung 24 werden die Messergebnisse aller Proben unter Verwendung der in Abbildung 23 dargestellten Gating-Strategie gewebeabhängig im Vergleich CTRP3-KO (n=16) vs. CTRP3-Wildtypmaus (n=14) dargestellt:





**Abbildung 24: Durchflusszytometrische Untersuchung von Makrophagen in gewonnenem Ohr-, Fett-, Milz- und Lymphknotengewebe (LK)**

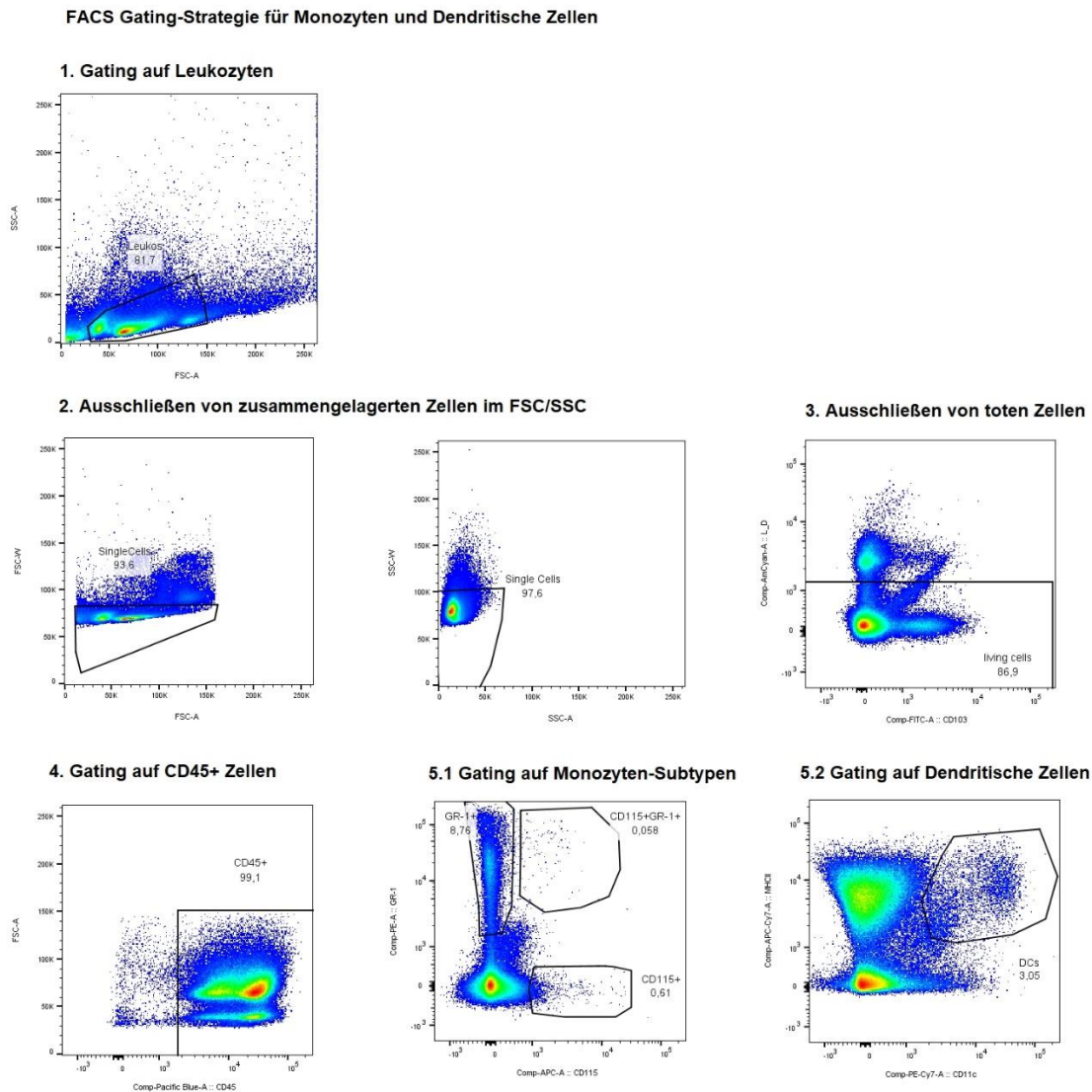
Untersucht wurden Zellen aus Ohr-, Milz-, Lymphknoten (LK) - und Fettgewebe, um mögliche Unterschiede in den Makrophagenpopulationen (proinflammatorische M1- vs.

antiinflammatorische M2-Makrophagen) von CTRP3-Wildtyp (n=14, *in weiß dargestellt*) gegenüber CTRP3-KO Mäusen (n=16, *in schwarz dargestellt*) 120 h nach der Allergenprovokation mit TNCB feststellen zu können. Die Gewinnung der Zellen für die Untersuchung wurde unter Punkt 2.3.4 „Organverdau für die FACS-Analysen“ beschrieben. Die verwendete Gating-Strategie, sowie die Bedeutung der untersuchten Zell-Subpopulationen wurden in Abbildung 23 erläutert. Zunächst wird für jedes Gewebe (Ohrhaut, Lymphknoten (LK)-, Milz- und Fettgewebe) der prozentuale Anteil von Makrophagen im Allgemeinen an der Gesamtheit der CD45+ Zellen dargestellt. Daraufhin wird der prozentuale Anteil der untersuchten Makrophagen-Subpopulationen (CD206-/CD11c-; CD206-/CD11c+; CD206+/CD11c-; CD206+/CD11c+) an der Gesamtheit aller CD45+ Zellen jeweils einzeln dargestellt. Statistik: Mann-Whitney-Test: ns = nicht signifikant. Darstellung: Mean. CD, Cluster of differentiation.

In der FACS-Analyse zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen CTRP3-Knockout (CTRP3-KO) und Wildtyp-Mäusen.

Bestimmte Subpopulationen von Monozyten können T-Zell vermittelte Immunreaktionen unterdrücken (Ferrer et al., 2021). Die suppressive Aktivität dieser Zellen korreliert dabei mit der Ausprägung von CD115 und Gr-1 (Huang et al., 2006). Daher wurden FACS-Analysen der Monozyten und dendritischen Zellen aus dem entnommenen Ohr-, Milz-, Lymphknoten (LK) - und Fettgewebe ergänzt (Abb. 25, 26).

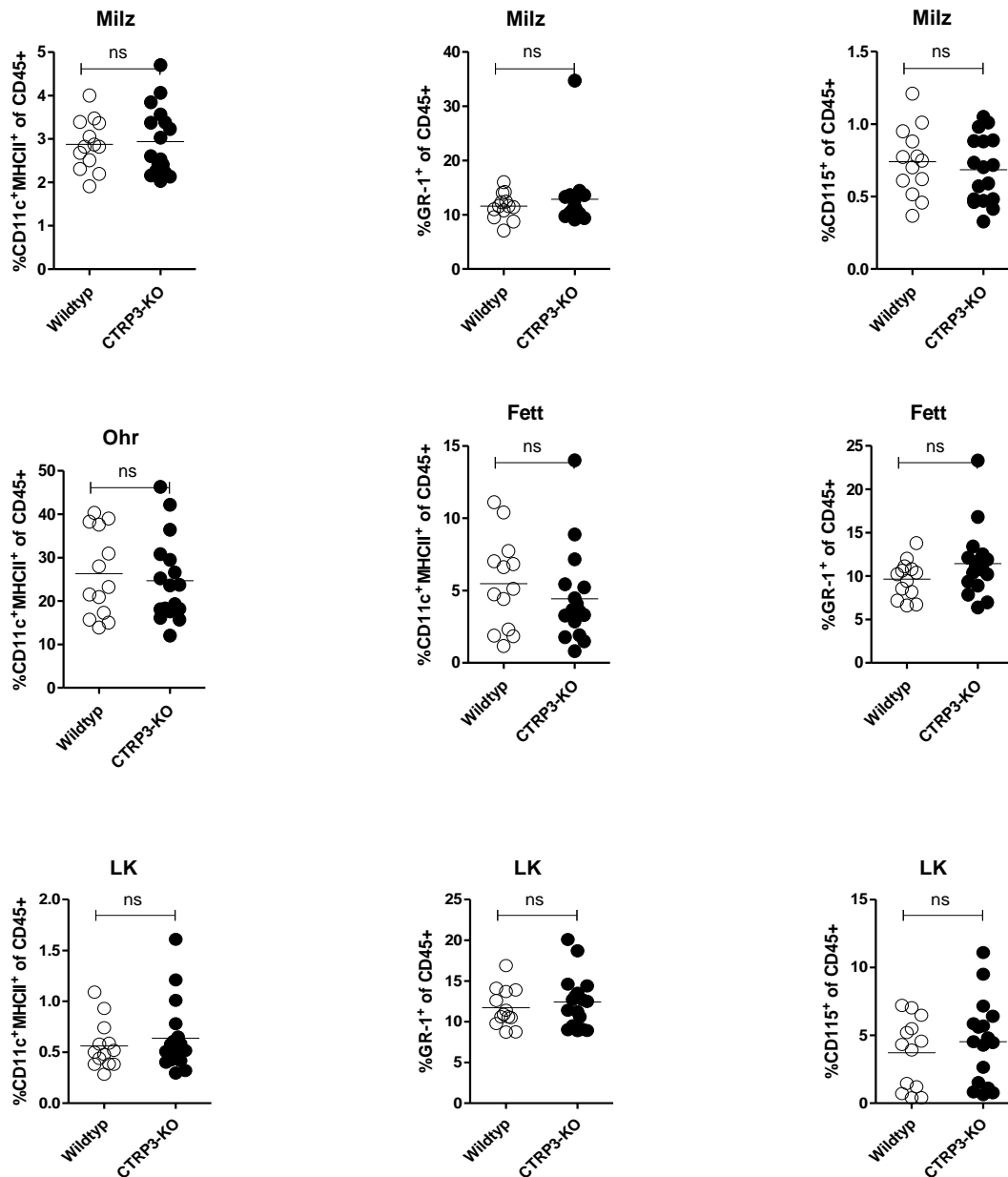
## Monozyten und Dendritische Zellen:



**Abbildung 25: FACS Gating-Strategie für Monozyten und dendritische Zellen**

Untersucht wurden Zellen aus Ohr-, Milz-, Lymphknoten (LK) - und Fettgewebe, um mögliche Unterschiede bei der dendritischen Zellpopulation, sowie in den Monozyten-Subpopulationen von CTRP3-Wildtyp (n=14) gegenüber CTRP3-KO Mäusen (n=16) 120 h nach der Allergenprovokation mit TNCB feststellen zu können. Verwendete Gating-Strategie: **1.**: Zunächst wurden die Leukozyten mit Hilfe des FSC/SSC aus der Gesamtzellzahl isoliert. Nach dem Ausschluss von **2.** zusammengelagerten Zellen (FSC/SSC) und **3.** toten Zellen (Live/Dead-Färbung), wurden **4.** zunächst alle CD45+ Zellen isoliert. **5.1** Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der CD45+ Zellen hinsichtlich der Ausprägung von Gr-1 und CD115. **5.2** Außerdem erfolgte die Quantifizierung von dendritischen Zellen (CD11c+/MHC-II+) innerhalb der CD45+ Zellen. Die Bedeutung von dendritischen Zellen im Rahmen der ACD wurde unter Punkt 1.1 „Die Allergische Kontaktdermatitis“ dargelegt. CD, Cluster of differentiation. FSC, Forward Scatter. MHC-II, Major Histocompatibility Complex Klasse-II. SSC, Side Scatter.

Auf der folgenden Abbildung werden die Messergebnisse aller Proben unter Verwendung der in Abbildung 25 dargestellten Gating-Strategie gewebeabhängig im Vergleich CTRP3-KO (n=16) vs. CTRP3-Wildtypmaus (n=14) dargestellt:



**Abbildung 26: Durchflusszytometrische Untersuchung von Monozyten und dendritischen Zellen in gewonnenem Ohr-, Fett-, Milz- und Lymphknotengewebe**

Untersucht wurden Zellen aus Ohr-, Milz-, Lymphknoten (LK) - und Fettgewebe, um mögliche Unterschiede bei der dendritischen Zellpopulation, sowie in den Monozyten-Subpopulationen von CTRP3-Wildtyp (n=14, *in weiß dargestellt*) gegenüber CTRP3-KO Mäusen (n=16, *in schwarz dargestellt*) 120 h nach der Allergenprovokation mit TNCB feststellen zu können. Die Gewinnung der Zellen für die Untersuchung wurde unter Punkt 2.3.4 „Organverdau für die FACS-Analysen“

beschrieben. Die verwendete Gating-Strategie, sowie die Bedeutung der untersuchten Zell-Subpopulationen wurden in Abbildung 25 erläutert. Zunächst wird für jedes Gewebe der prozentuale Anteil der dendritischen Zellen (CD11c+/MHC-II+) an der Gesamtheit aller CD45+ Zellen dargestellt. Daraufhin folgt die Darstellung des prozentualen Anteils der GR-1+, sowie der CD115+ Zellen an der Gesamtheit aller CD45+ Zellen. Statistik: Mann-Whitney-Test: ns = nicht signifikant. Darstellung: Mean. CD, Cluster of differentiation, MHC-II, Major Histocompatibility Complex Klasse-II.

In der FACS-Analyse zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen CTRP3-Knockout (CTRP3-KO) und Wildtyp-Mäusen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Im *in vitro* Teil der Doktorarbeit konnte ein signifikanter und reproduzierbarer inhibitorischer Effekt von CTRP3 auf die Nickel-induzierte, pro-inflammatorische, TLR4-vermittelte Immunantwort von THP-1 Zellen und HUVEC's nachgewiesen werden.

In allen nachfolgend zusammengefassten Experimenten wurde CTRP3 bereits dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation zugegeben. Bei den HUVEC's zeigte sich der signifikante inhibitorische Effekt im MCP-1, IL-6 und IL-8 ELISA nach 24 h Stimulation mit 1500  $\mu$ M Nickel und CTRP3 (1-10  $\mu$ g/ml) gegenüber der alleinigen Behandlung mit 1500  $\mu$ M Nickel (siehe Abb. 8).

Bei den THP-1 Zellen zeigte sich der inhibitorische Effekt im IL-8 ELISA nach 24 h Stimulation mit 1000  $\mu$ M Nickel und CTRP3 (3; 10  $\mu$ g/ml) im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit 1000  $\mu$ M Nickel (siehe Abb. 14). Der beobachtete Effekt zeigte sich bei einer CTRP3-Konzentration von 10  $\mu$ g/ml auch in der zeitabhängigen Darstellung nach 4 h, 12 h und 24 h Stimulation mit 1000  $\mu$ M Nickel im IL-8 ELISA signifikant und reproduzierbar (siehe Abb. 15). Analog zur Stimulation mit Nickel 1000  $\mu$ M zeigte sich der inhibitorische Effekt von CTRP3 auch nach 24 h Stimulation mit 0,1  $\mu$ g/ml LPS im IL-8- und zusätzlich auch im MCP-1 ELISA (siehe Abb. 13). Die Stimulation mit Nickel alleine führte bei den THP-1 Zellen nicht zu einer signifikanten MCP-1 Sekretion.

Nach 24 h Stimulation von THP-1 Zellen mit Nickel 1000  $\mu$ M zeigte sich ein stark ausgeprägter Anstieg der LDH-Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle. Bei der Stimulation mit Nickel 1000  $\mu$ M und 10  $\mu$ g/ml CTRP3 fiel dieser Anstieg signifikant geringer aus (siehe Abb. 10). Nach 4 h Stimulation der THP-1 Zellen mit 1000  $\mu$ M Nickel im Vergleich zu 1000  $\mu$ M Nickel und 10  $\mu$ g/ml CTRP3 zeigte sich noch kein signifikanter Unterschied in der LDH-Konzentration. Bemerkenswert ist, dass sich der inhibitorische Effekt auf die Nickel-induzierte IL-8 Freisetzung der THP-1 Zellen zum gleichen Zeitpunkt (4 h) bereits signifikant und reproduzierbar beobachten ließ (vgl. Abb. 11 und Abb. 15).

Bei den HUVEC's zeigte sich eine signifikant reduzierte Zytotoxizität im LDH-Assay unter der 24-stündigen Stimulation mit 1500  $\mu$ M Nickel und 3  $\mu$ g/ml CTRP3 gegenüber der alleinigen Behandlung mit 1500  $\mu$ M Nickel (siehe Abb. 6).

Die *in vitro* beobachteten inhibitorischen Effekte von CTRP3 auf die TLR4-vermittelte Inflammation wurden in einem nächsten Schritt *in vivo* am CTRP3-Knockout Mausmodell überprüft. Dabei ist zu beachten, dass lediglich die Adipozyten der Knockout-Mäuse nicht in der Lage waren CTRP3 zu produzieren. Da Nickelionen den murinen TLR4 im Gegensatz zum humanen TLR4 nicht direkt aktivieren können (Schmidt et al., 2010), wurde im Mausmodell das Kontaktallergen TNCB verwendet, um eine CHS-Reaktion hervorzurufen.

Weder in der Ohrdickenmessung (24 h, 48 h, 72 h, 94 h, 120 h nach erfolgter Challenge), noch in der FACS-Analyse (120 h nach erfolgter Challenge) verschiedener Zellpopulationen (Monozyten, Dendritische Zellen, T-Zellen, Makrophagen) aus verschiedenen Organen (Lymphknoten-, Milz-, Haut- & Fettgewebe), zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und CTRP3-Knockoutmäusen (siehe Abb. 17 und Abb. 21-26). Auch die 24-stündige Stimulation von entnommenem subkutanem Fettgewebe (120 h nach erfolgter Challenge) mit TNBS oder LPS (*E. coli* 0111:B4) zeigte keine signifikanten Unterschiede im IL-6-, IL-8-, MCP-1- oder Adiponektin-ELISA zwischen Wildtyp- und CTRP3-Knockoutmäusen (siehe Abb. 19 und Abb. 20).

#### 4.2 Diskussion der Methoden

Im *in vitro* Teil der Arbeit wurden zur besseren Reproduzierbarkeit humane Zelllinien (THP-1 und HUVEC) verwendet. Die verwendete THP-1 Zelllinie wurde bereits im Jahr 1980 als reliable humane Monozytenzelllinie etabliert und charakterisiert (Tsuchiya et al., 1980). Monozyten sind zirkulierende Vorläuferzellen von Dendritischen Zellen und Makrophagen (Kratofil et al., 2017). Das sind wichtige Antigen-präsentierende Zellen, die in der Lage sind, eine nickelspezifische T-Zell-Aktivierung *in vivo* und *in vitro* zu vermitteln (Jakob et al., 2017). Zu beachten ist hierbei, dass die eingesetzte Nickelkonzentration von 1000  $\mu\text{M}$  einen deutlichen zytotoxischen Effekt auf die THP-1 Zellen ausübte (Abb. 10). Um diesen Effekt zu minimieren, wurde in den Vorversuchen die niedrigste Nickelkonzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) ermittelt, die zuverlässig zur signifikanten Sekretion von MCP-1 und IL-8 führte. Alle Experimente auf 96-Loch Mikrotiterplatten wurden in Duplikaten durchgeführt.

Um die beobachteten inhibitorischen Effekte von CTRP3 weiter zu validieren, könnte man in einem nächsten Schritt Monozyten aus frisch abgenommenem Blut isolieren. Durch Zugabe von GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) und IL-4 differenzieren die Monozyten zu moDC's (monozyte derived dendritic cells)

(Chometon et al., 2020). Danach könnte man den Einfluss von CTRP3 auf die Nickel-induzierte Immunantwort dieser Zellen *ex vivo* überprüfen. Der Nachteil dieser Methode wäre eine schlechtere Reproduzierbarkeit aufgrund der individuellen Monozyten-Donoren. Die periphere Blutentnahme zur Isolation der Monozyten wäre ein minimalinvasives Verfahren mit Infektionsrisiko und würde daher im Vorfeld ein Ethikvotum benötigen. Im THP1-Zellkulturmodell der vorliegenden Doktorarbeit wurden die THP-1 Zellen 24 h vor Beginn der Stimulation mit Nickel/LPS +/- CTRP3 mit 100 ng/ml PMA vorstimuliert, um eine reproduzierbare Differenzierung in Richtung eines Makrophagen-ähnlichen Phänotyps zu induzieren und so konsekutiv eine stärkere TLR4-abhängige, proinflammatorische Zytokinsekretion nach der Stimulation mit LPS/Nickel +/- CTRP3 zu erreichen. (Takashiba et al., 1999, Zeng et al., 2015, Liu et al., 2023).

Erste Forschungsergebnisse zur langfristigen Kultivierung von HUVEC's wurden bereits in den 1980er Jahren veröffentlicht (Kan et al., 1985). Im Gegensatz zu den immortalisierten THP-1 Zellen stellen HUVEC's eine primäre humane Zelllinie dar, die direkt aus Nabelschnurvenen gewonnen wird (Duranova et al., 2024). Bis dato stellen HUVEC-Modelle den Goldstandard in der Erforschung von Endothelzellfunktionen dar (Medina-Leyte et al., 2020, Duranova et al., 2024). Da HUVEC's ihre morphologischen Eigenschaften im Laufe der Kultivierung signifikant verändern können, wurden die Zellen in der vorliegenden Arbeit maximal bis zur sechsten Passage verwendet (Bala et al., 2011). Vasculäre Endothelzellen tragen entscheidend zur ACD bei, da die zirkulierenden, allergenspezifischen T-Zellen zunächst die Blutbahn verlassen müssen, um eine lokale allergische Reaktion hervorzurufen (Martin et al., 2018). Die via ELISA detektierten Chemokine MCP-1 und IL-8 begünstigen die Migration von Nickel-spezifischen T-Zellen (Sebastiani et al., 2001). Ein anderer Indikator für die Nickel-induzierte Aktivierung von HUVEC's ist die vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und E-Selektin (ELAM-1, endothelial leukocyte adhesion molecule-1) (Goebeler et al., 1993; Goebeler et al., 1995; Tsou et al., 2013). Neben der Freisetzung von IL-8 und MCP-1 könnte man in einem nächsten Schritt den Einfluss von CTRP3 auf die Nickel-induzierte Expression dieser Adhäsionsmoleküle bestimmen, um den beobachteten inhibitorischen Effekt weiter zu charakterisieren.

Bei jedem THP-1 bzw. HUVEC-Experiment wurde ein LDH-Assay durchgeführt, um die Zytotoxizität der Stimulationsbedingungen zu erfassen. Dabei zeigte sich bei beiden Zelllinien eine signifikant reduzierte LDH-Konzentration nach 24 h Stimulation mit Nickel

und dreißigminütiger Vorinkubation der Zellen mit CTRP3 im Vergleich zu Nickel ohne Vorinkubation mit CTRP3 (siehe Abb. 6, 10 und 11).

Um auch frühe Formen der Apoptose detektieren - und damit pro-apoptotische Effekte von Nickel ausschließen - zu können, wurde nach Ablauf der 24 h Stimulation zusätzlich zum LDH-Assay eine FACS-Analyse (Annexin V-FITC Apoptose-Färbung) der Zellen durchgeführt (siehe Abb. 7, 12).

In den Vorversuchen zum *in vivo* Teil der Arbeit wurden 6-12 Wochen alte Mäuse mit TNCB sensibilisiert. Nachdem in den Vorversuchen nach erfolgter Challenge keine Unterschiede zwischen Wildtyp und CTRP3-Knockout Mäusen festgestellt werden konnten, wurde das Alter der Mäuse im Rahmen der Doktorarbeit auf fünf Monate erhöht. Der Hintergrund dieser Maßnahme war, dass die jüngeren Mäuse weniger Fettgewebe besaßen. Durch den höheren Fettanteil der älteren Mäuse, sollte der auf Adipozyten beschränkte CTRP3-Knockout die bestmöglichen Voraussetzungen für die Entfaltung eines Effektes erhalten.

Nach der Challenge mit TNCB wurde bei den Mäusen eine Ohrdickenmessung nach 24, 48, 72, 96 und 120 h durchgeführt, um das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion quantifizieren und vergleichen zu können. Die maximale Ohrdicke wurde etwa 24 h nach der Challenge erreicht. Die Organentnahmen für die FACS-Messung, die histologischen Schnitte und die *Fat explants* erfolgten im Anschluss an die Ohrdickenmessung 120 h nach der Challenge. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Ohrdicke der Mäuse bereits wieder auf Normalniveau. Man könnte in einem nächsten Experiment die Organentnahme bereits 24 h nach der Allergenprovokation (zum Zeitpunkt der maximalen Ohrschwellung) durchführen, um die Auswirkungen des Knockouts auf die CHS-Reaktion innerhalb der einzelnen Organe zum Zeitpunkt der maximalen, klinisch-sichtbaren Krankheitsaktivität zu untersuchen. Alle *in vivo* Versuche wurden verblindet durchgeführt, um eine bestmögliche Objektivität zu gewährleisten.

Der *in vivo* Teil der Arbeit nutzt den Ansatz einer knockoutbedingten Wegnahme von CTRP3, wohingegen den Zelllinien im *in vitro* Teil rekombinantes CTRP3 zugegeben wurde. In weiteren *in vivo* Experimenten könnte man den Mäusen ebenfalls rekombinantes CTRP3 verabreichen, um im Anschluss die Auswirkungen auf die CHS-Reaktion zu analysieren. Die bis dato sehr hohen Kosten von rekombinantem CTRP3 wären ein Nachteil dieser Herangehensweise, da für diesen Versuchsaufbau größere Mengen CTRP3 benötigt werden würden.

Es handelte sich um das erste etablierte Mausmodell mit einem auf Adipozyten beschränkten CTRP3-Knockout. Die Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe um *Schmid et al.* entwickelt. Im Tierversuch konnte von *Schmid et al.* gezeigt werden, dass CTRP3 bei Mäusen nicht nur vom Fettgewebe, sondern auch von anderen Geweben (wie z.B. Aorten- und Schilddrüsengewebe), exprimiert wird (Schmid et al., 2021b). Der auf Adipozyten beschränkte CTRP3-Knockout führte nicht zu einer signifikanten Änderung der Serum CTRP3-Konzentration (Schmid et al., 2021a). Die Arbeitsgruppe um *Schmid et al.* spricht sich daher dafür aus, CTRP3 in Zukunft nicht mehr als klassisches Adipokin zu betrachten (Schmid et al., 2021a).

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung der Doktorarbeit war noch nicht bekannt, dass der auf Adipozyten beschränkte Knockout keinen signifikanten Einfluss auf die CTRP3 Serum-Konzentration ausübt. Um den Einfluss von CTRP3 auf die CHS-Reaktion in Mäusen weitergehend zu prüfen, könnten daher in zukünftigen Experimenten Mäuse mit ubiquitärem CTRP3-Knockout verwendet werden, um eine kompensatorische CTRP3 Produktion anderer Zelltypen (Schmid et al., 2021b) als Störvariable ausschließen zu können.

#### 4.3 Diskussion der Ergebnisse

In langwierigen Vorversuchen wurde im Rahmen der Doktorarbeit mit rekombinantem CTRP3 von insgesamt vier verschiedenen Herstellern (Abnova, R&D Systems, Origene, Molekulare Endokrinologie Gießen) gearbeitet (siehe Abb. 5). Lediglich das rekombinante CTRP3 vom Hersteller Abnova (Taiwan) zeigte *in vitro* die beschriebenen inhibitorischen Effekte. Möglicherweise spielten die unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen der verschiedenen Expressionssysteme im Herstellungsprozess eine Rolle für die Wirksamkeit von CTRP3 (Olzsha, 2019, Ramazi et al., 2021, Schütz et al., 2023). Die aus den Datenblättern hervorgehenden Unterschiede im CTRP3-Herstellungsprozess der verschiedenen Anbieter wurden auf Abbildung 28 mitveröffentlicht. Die Arbeitsgruppe *Schütz et al.* beschreibt unter anderem, dass sich verschiedene Expressionssysteme, wie z.B. Bakterien-, Pflanzen-, Säugetier- oder Insektenzellen, hinsichtlich ihrer Fähigkeiten zu posttranslationalen Modifikationen erheblich unterscheiden. Die Arbeitsgruppe betont, dass die Wahl des Expressionssystems und die damit verbundenen Unterschiede in der Glykosylierung die Funktionalität eines exprimierten Proteins bedeutend beeinträchtigen können (Schütz et al., 2023). In einem anderen Kontext konnte von *Levine et al.* demonstriert werden, wie

beispielsweise die posttranslationale Glykosylierung von  $\alpha$ -Synuclein die biochemischen Interaktionen dieses Proteins entscheidend beeinflusst (Levine et al., 2019).

Ein inhibitorischer Effekt von rekombinantem CTRP3 (ebenfalls vom Hersteller Abnova) auf die LPS-induzierte Zytokin- und Chemokinfreisetzung (TNF- $\alpha$  und MCP-1) von THP-1 Zellen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Lin et al., 2017). In den Experimenten von *Lin et al.* wurden CTRP3-Konzentrationen von 0-10  $\mu$ g/ml eingesetzt. Ab einer Konzentration von 0,25  $\mu$ g/ml CTRP3 konnte durch dreißigminütige Vorinkubation ein signifikanter inhibitorischer Effekt auf die MCP-1-Sekretion detektiert werden (Lin et al., 2017). *Lin et al.* stellten fest, dass die Vorinkubation mit CTRP3 zu einer vermehrten Differenzierung von THP-1 Zellen in M2-Makrophagen anstelle von M1-Makrophagen führt. M1-Makrophagen werden aufgrund ihrer Eigenschaften als proinflammatorisch und M2-Makrophagen als anti-inflammatorisch charakterisiert (Lin et al., 2017, Chen et al., 2023). Im Kontext der CHS-Reaktion tragen M1-Makrophagen durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach Aktivierung der unter Punkt 1.4 „Molekulare Mechanismen der Nickelallergie“ beschriebenen Signalwege (z.B. NF- $\kappa$ B, IRF3) zur Aufrechterhaltung des proinflammatorischen Milieus bei (Chen et al., 2023). M2-Makrophagen spielen dagegen eine wichtige Rolle bei der Inhibition von Entzündungsreaktion (z.B: durch die Sekretion von antiinflammatorisch wirksamem IL-10), sowie bei der Induktion von Heilungsprozessen (Kzhyshkowska. 2008, Chen et al., 2023).

Im Rahmen der Doktorarbeit ließ sich der beschriebene inhibitorische Effekt erst ab einer deutlich höheren CTRP3-Konzentration von 3  $\mu$ g/ml zuverlässig und signifikant reproduzieren. *Schmid et al.* stellten fest, dass CTRP3 die LPS-induzierte TLR4-Induktion von murinen Endothelzellen und HUVEC's signifikant inhibiert (Schmid et al., 2021b). Die Vermutung liegt nahe, dass dieser Effekt zu den in der Doktorarbeit beobachteten anti-inflammatorischen CTRP3-Eigenschaften beitragen könnte. Zusätzlich zu den Auswirkungen auf die LPS induzierte Inflammation wurden in der vorliegenden Arbeit speziell die Auswirkungen von CTRP3 auf die Nickel-induzierte Inflammation untersucht. Sowohl bei den HUVEC's als auch bei den THP-1 Zellen führte die dreißigminütige Vorinkubation mit CTRP3 zur signifikant reduzierten Sekretion von IL-8 und MCP-1 nach Stimulation mit Nickel und CTRP3 im Vergleich zu Nickel ohne CTRP3. In HUVEC-Experimenten der Arbeitsgruppe *Zhang et al.* verringerte eine CTRP3-Überexpression die TLR4-vermittelte Entzündung, reduzierte oxidativen Stress und die durch Harnsäure induzierte Endothelschädigung (Zhang et al., 2021).

In der Untersuchung von *Wang et al.* konnte bereits ein anti-apoptotischer Effekt von rekombinantem CTRP3 auf den Zelluntergang von HUVEC's nach Stimulation mit hochdosierter Glukose festgestellt werden (Wang et al., 2019). Im Rahmen der Doktorarbeit wurde eine signifikante Reduktion der Zytotoxizität nach Stimulation mit Nickel und Vorinkubation mit CTRP3 gegenüber Nickel ohne Vorinkubation beobachtet. In den Ergebnissen der vorliegenden Annexin V-FITC Färbung - die zusätzlich auch frühe Formen der Apoptose detektiert - zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Zusammenschau der Ergebnisse beider Methoden legt nahe, dass CTRP3 die Nickel-induzierte Apoptose verzögert. *Wang et al.* inkubierten die HUVEC's bereits eine Stunde vor Stimulationsbeginn mit CTRP3 – im Rahmen der Doktorarbeit wurde eine dreißigminütige Vorinkubationszeit gewählt. Die Untersuchung von *Wang et al.* deutet darauf hin, dass die beobachteten anti-apoptotischen Effekte bei den HUVEC's möglicherweise über die CTRP3-abhängige Aktivierung des AKT (Synonym: PKB/Proteinkinase B) – mTOR (mechanistic target of rapamycin) Signalwegs hervorgerufen werden (Wang et al., 2019).

Die Ergebnisse der *in vitro* Experimente stützen die Hypothese, dass CTRP3 als physiologischer Antagonist der Nickel-induzierten ACD in Frage kommt. In den Mausexperimenten der vorliegenden Doktorarbeit konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den CHS-Reaktionen von CTRP3-Knockout und Wildtyp-Mäusen beobachtet werden. Der in den Mausexperimenten verwendete CTRP3-Knockout war auf Adipozyten beschränkt. Da die Serumkonzentrationen des Adipokins CTRP3 davon unbeeinträchtigt blieben, liegt die Vermutung nahe, dass die *in vitro* beobachteten CTRP3-Effekte mit einem anderen Versuchsaufbau (siehe Punkt 4.2 „Diskussion der Methoden“, S. 78) möglicherweise auch *in vivo* beobachtet werden könnten. Die Arbeitsgruppe *Lin et al.* fand beispielsweise heraus, dass CTRP3 die Entzündung und den Umbau der Atemwege bei Ovalbumin-induzierten asthmatischen Mäusen durch die Regulierung der NF- $\kappa$ B- und TGF $\beta$ 1/Smad3-Signalwege reduzierte (Lin et al. 2023). Die Arbeitsgruppe *Yu et al.* fand heraus, dass CTRP3 Darmentzündungen über den SIRT1/NF- $\kappa$ B-Signalweg abschwächen kann (Yu et al., 2023). Wie bereits unter Punkt 1.5 „Contact Hypersensitivity Modell“ dargelegt, spielt der NF- $\kappa$ B Signalweg auch im CHS-Modell eine entscheidende Rolle, sodass eine weitergehende CHS-Forschung mit angepasster Methodik auf diesem Gebiet vielversprechend erscheint.

Unter Punkt 1.3 „Zytokine und Chemokine“, sowie unter Punkt 1.4 „Molekulare Mechanismen der Nickelallergie“ wurde bereits erläutert, dass die suffiziente, TLR4-abhängige Sekretion von IL-8 und MCP-1 von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese der Nickel-induzierten ACD ist. Die *in vitro* beobachteten inhibitorischen

Effekte von CTRP3 auf die Nickel-induzierte Sekretion von IL-8 und MCP-1 stützen daher die These, dass CTRP3 als potentieller TLR4-Antagonist und damit auch als physiologischer Antagonist der Nickel-induzierten ACD in Frage kommen könnte.

Eine weitergehende *in vivo* CHS-Forschung auf diesem Gebiet erscheint durch die Ergebnisse der *in vitro* Experimente vielversprechend und könnte einen neuen Ansatz für die Therapie der Nickel-induzierten ACD liefern.

## 5. Zusammenfassung

Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass CTRP3 einen inhibitorischen Effekt auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte, Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) - abhängige, pro-inflammatorische Immunantwort ausübt (Kopp et al., 2010). Nickel- und Cobaltionen aktivieren den TLR4 im Rahmen der ACD ebenfalls direkt und nutzen damit die gleiche Signalkaskade wie LPS (Schmidt et al., 2010; Raghavan et al., 2012). Wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zunächst herauszufinden, ob CTRP3 prinzipiell in der Lage ist, neben der LPS-induzierten Inflammation, auch die Nickel-induzierte Inflammation im Zellkulturmodell zu unterdrücken. Humane THP-1 Zellen (Monozyten-Zelllinie) und HUVEC's (Primäre humane Endothelzellen) wurden dafür mit Nickel +/- CTRP3 sowohl konzentrationsabhängig (0,3 – 10 µg/ml CTRP3), als auch zeitabhängig (4-24h) stimuliert. Das CTRP3 wurde den Zellen dreißig Minuten vor Beginn der Stimulation zugegeben. Im Anschluss an die Stimulation erfolgte eine IL-8 und MCP-1 ELISA-Messung der Zellkulturüberstände zur Quantifizierung der pro-inflammatorischen Immunantwort, sowie eine LDH-Messung/FACS-Analyse zur Beurteilung der Nickel-abhängigen Zytotoxizität und Apoptose.

Hierbei konnte ein signifikanter und reproduzierbarer inhibitorischer Effekt von CTRP3 auf die Nickel-induzierte, pro-inflammatorische, TLR4-vermittelte Immunantwort von THP-1 Zellen und HUVEC's nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich bei beiden Zelllinien eine signifikant reduzierte Zytotoxizität unter der Stimulation mit Nickel und CTRP3 im Vergleich zu Nickel ohne Vorstimulation mit CTRP3.

Die Ergebnisse der *in vitro* Experimente wurden in einem zweiten Schritt *in vivo* mit Hilfe eines Adipozytenspezifischen CTRP3-Knockout Mausmodells überprüft. Hierzu wurde die TNCB induzierte allergische Kontaktdermatitis in Wildtyp- und Adipozytenspezifischen CTRP3 Knockout Mäusen analysiert. Weder die Entzündungsreaktion der Haut (gemessen als Ohrschwellung) noch die Durchflusszytometrische Analyse der Zellpopulation der Haut, oder die *ex vivo* Stimulation von *Fat explants* zeigten hierbei Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout. Die *in vitro* beobachteten CTRP3-Effekte ließen sich somit unter den getesteten Bedingungen *in vivo* nicht bestätigen.

Eine weitergehende *in vivo* Forschung mit angepasster Methodik erscheint durch die Ergebnisse der *in vitro* Experimente vielversprechend und könnte einen neuen Ansatz für die Therapie der Nickel-induzierten ACD liefern.

## 6. Summary

CTRP3 has been shown to exert an inhibitory effect on the lipopolysaccharide (LPS)-induced, toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent, pro-inflammatory immune response (Kopp et al., 2010). Nickel and cobalt ions also activate the TLR4 directly - as part of the allergic contact dermatitis (ACD) - and thus use the same signal cascade as LPS (Schmidt et al., 2010; Raghavan et al., 2012). The main goal of the present work was therefore to find out whether CTRP3 is able to suppress nickel-induced inflammation in the cell culture model similar to the already reported suppression of LPS-induced inflammation. Human THP-1 cells (monocyte cell line) and HUVEC's (primary human endothelial cells) were stimulated with nickel +/- CTRP3 both concentration-dependent (0.3 – 10 µg/ml CTRP3) and time-dependent (4-24h). CTRP3 was added to the cells thirty minutes before stimulation. The stimulation was followed by an IL-8 and MCP-1 ELISA measurement of the cell culture supernatants to quantify the pro-inflammatory immune response, as well as an LDH measurement/FACS analysis to assess cell viability.

The results showed a significant and reproducible inhibitory effect of CTRP3 on the nickel-induced, pro-inflammatory, TLR4-mediated immune response of THP-1 cells and HUVEC's. In addition, both cell lines showed significantly reduced cytotoxicity under stimulation with nickel + CTRP3 vs. nickel alone.

The results of the *in vitro* experiments were tested *in vivo* in a second step using an adipocyte specific CTRP3 knockout mouse model. For this purpose, TNCB-induced allergic contact dermatitis was analyzed in wild-type and adipocyte-specific CTRP3 knockout mice. Neither the inflammatory response of the skin (measured as ear swelling) nor the flow cytometric analysis of the cell population of the skin, nor the *ex vivo* stimulation of fat explants showed differences between wild-type and knockout. The CTRP3 effects observed *in vitro* could therefore not be confirmed *in vivo* under the tested conditions.

Further *in vivo* research with adapted methodology appears promising due to the results of the *in vitro* experiments and could provide a new approach for the therapy of nickel-induced ACD.

## 7. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Schematische Übersichtsgrafik zur Pathogenese der ACD.....</b>	<b>3</b>
<b>Abbildung 2: TLR4-abhängige Mechanismen der allergischen Kontaktdermatitis .....</b>	<b>9</b>
<b>Abbildung 3: TLR4-abhängige Mechanismen der allergischen Kontaktdermatitis im CHS-Modell .....</b>	<b>12</b>
<b>Abbildung 4: Schematische Darstellung der verwendeten Sandwich-ELISA Methode mit Avidin-Biotin Detektionssystem .....</b>	<b>34</b>
<b>Abbildung 5: In vitro Experimente mit CTRP3 von unterschiedlichen Herstellern.....</b>	<b>48</b>
<b>Abbildung 6: LDH-Assay der CTRP3-Experimente mit HUVEC's.....</b>	<b>50</b>
<b>Abbildung 7: Durchflusszytometrische Untersuchung (Annexin V-FITC Apoptose-Färbung) der HUVEC's im Rahmen der CTRP3-Experimente .....</b>	<b>51</b>
<b>Abbildung 8: IL-6, IL-8 und MCP-1 ELISA-Ergebnisse der HUVEC CTRP3-Experimente .....</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung 9: GM-CSF, MCP-1, IL-8, IL-6 ELISA-Ergebnisse der HUVEC's nach Stimulation mit LPS +/- CTRP3 .....</b>	<b>53</b>
<b>Abbildung 10: LDH-Assay der CTRP3-Experimente mit THP-1 Zellen.....</b>	<b>54</b>
<b>Abbildung 11: LDH-Assay der CTRP3-Experimente mit THP-1 Zellen im zeitlichen Verlauf .....</b>	<b>55</b>
<b>Abbildung 12: Durchflusszytometrische Untersuchung (Annexin V-FITC Apoptose Färbung) der THP-1 Zellen im Rahmen der CTRP3-Experimente .....</b>	<b>56</b>
<b>Abbildung 13: IL-8 und MCP-1 ELISA-Ergebnisse der THP-1 Zellen nach Stimulation mit LPS +/- CTRP3 .....</b>	<b>57</b>
<b>Abbildung 14: IL-8 ELISA-Ergebnisse der THP-1 Zellen nach Stimulation mit Nickel +/- CTRP3.....</b>	<b>58</b>
<b>Abbildung 15: IL-8 ELISA-Ergebnisse der zeitabhängigen THP-1 Zellen CTRP3-Experimente (Stimulation mit LPS +/- CTRP3) .....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 16: IL-8 ELISA-Ergebnisse der zeitabhängigen THP-1 Zellen CTRP3-Experimente (Stimulation mit Nickel +/- CTRP3) .....</b>	<b>60</b>
<b>Abbildung 17: Ohrdickenmessung nach erfolgter Challenge mit TNCB .....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 18: Korrelation zwischen Gewicht und Ohrschwellung der Mäuse....</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 19: MCP-1, IL-6 und TNF-<math>\alpha</math> ELISA der Fat explant- Überstände nach 24 h Stimulation.....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 20: Adiponectin-ELISA der Fat explant- Überstände nach 24 h Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS).....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 21: FACS Gating-Strategie für T-Zellen, NK-Zellen und T-Zell Subtypen .....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 22: Durchflusszytometrische Untersuchung von T-Zellen und Natural Killer (NK)-Zellen in gewonnenem Ohr-, Fett-, Milz- und Lymphknotengewebe.....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 23: FACS Gating-Strategie für Makrophagen.....</b>	<b>69</b>
<b>Abbildung 24: Durchflusszytometrische Untersuchung von Makrophagen in gewonnenem Ohr-, Fett-, Milz- und Lymphknotengewebe (LK) ...</b>	<b>71</b>
<b>Abbildung 25: FACS Gating-Strategie für Monozyten und dendritische Zellen...</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 26: Durchflusszytometrische Untersuchung von Monozyten und dendritischen Zellen in gewonnenem Ohr-, Fett-, Milz- und Lymphknotengewebe .....</b>	<b>74</b>

<b>Abbildung 27: Konzentrationsermittlung der LPS-Positivkontrollen (n=3).....</b>	<b>104</b>
<b>Abbildung 28: Aus den Datenblättern der Hersteller Abnova, Origene und R&amp;D Systems hervorgehende CTRP3-Unterschiede.....</b>	<b>105</b>

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
ACD:	Allergische Kontaktdermatitis (Englisch: Allergic contact dermatitis)
AG:	Aktiengesellschaft
AKT/PKB:	Proteinkinase B
APC:	Allophycocyanin
ATCC:	American Type Culture Collection
ATP:	Adenosintriphosphat
AWMF:	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
Bd.:	Band
BMI:	Body-Mass-Index
B.V.:	Niederländische Gesellschaft mit beschränkter Haftung
C:	Celsius
ca.:	Circa
Cat:	Catalog
CCL2:	CC-Chemokin-Ligand-2, Synonym: MCP-1
CD:	Cluster of differentiation
CHS:	Contact Hypersensitivity
cm <sup>2</sup> :	Quadratzentimeter
CTRP:	C1q/TNF-related protein
CORS26:	Collagenous repeat-containing sequence of 26-kDa protein
CXCL 10:	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Cy:	Cyanin
Da:	Dalton

DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
doi:	Digital Object Identifier
DPBS:	Dulbecco's phosphate-buffered saline
Ebd.:	Ebenda
E. coli:	Escherichia coli
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
et al.:	Und andere
ELISA;	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS:	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS:	Fetal bovine serum
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
GmbH:	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GmbH & Co. KG:	Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft
GM-CSF:	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h:	Stunde
HA:	Hyaluronsäure
HBSS:	Hanks' Balanced Salt Solution
HMW:	Hohes molekulares Gewicht
Hrsg.:	Herausgeber
hTLR4:	Humaner Toll-like-Rezeptor 4
HUVEC's:	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IFN:	Interferon
IL:	Interleukin
Inc.:	Incorporation

IRF:	Interferon regulatory factor
KGaA:	Kommanditgesellschaft auf Aktien
Liberase™:	Liberase Thermolysin Medium
LK:	Lymphknoten
LLC:	Limited Liability Company
LPS:	Lipopolysaccharid
Ltd.:	Limited
MAPK:	Mitogen-activated-protein-Kinase
MCP-1:	Monocyte chemoattractant protein-1
MHC-II:	Major Histocompatibility Complex Klasse-II
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
MMW:	Mittleres molekulares Gewicht
moDC:	Monozyte derived dendritic cells
MPO:	Myeloperoxidase
mTOR:	Mechanistic target of rapamycin
MyD88:	Myeloid differentiation primary response 88
NADH:	Nicotinamidadenindinukleotid
NF-κB:	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK:	Negativkontrolle
NK-Zellen:	Natürliche Killerzellen
NLR:	Nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor
NLRP3:	NLR, pyrin domain-containing protein 3
nm:	Nanometer
Nr.:	Nummer
ns:	Nicht signifikant

PBS:	Phosphate-buffered saline
PE:	Phycoerythrin
PerCP:	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PLC:	Public Limited Company
PMA:	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Pty:	Proprietary
ROS:	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
RT:	Raumtemperatur
S.:	Seite
SEM:	Standardfehler des Mittelwertes
TLR:	Toll-like-Rezeptor
TMB:	3, 3', 5, 5' Tetramethyl Benzidine
TNCB:	2,4,6-Trinitrochlorobenzene
TNF:	Tumornekrosefaktor
Trif:	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
T <sub>C</sub> -Zellen:	Zytotoxische T-Zellen
T <sub>H</sub> -Zellen:	T-Helfer-Zellen
T <sub>RM</sub> -Zellen:	Tissue resident memory T-Zellen
US:	United States
Vgl.:	Vergleiche
VLDL:	Very low-density lipoprotein
Vs.:	Versus
w/o:	Without
x g:	Maßeinheit des Zentrifugierens
$\mu$ g:	Mikrogramm

$\mu\text{l}$ :	Mikroliter
$\mu\text{m}$ :	Mikrometer
$\mu\text{M}$ :	Mikromolar

## 9. Literaturverzeichnis

- Adinolfi, E./A. L. Giuliani/E. de Marchi/A. Pegoraro/E. Orioli/F. di Virgilio: The P2X7 receptor: A main player in inflammation, in: *Biochemical Pharmacology*, Bd. 151, 2018, doi:10.1016/j.bcp.2017.12.021, S. 234–244.
- Ahlström, M. G./J. P. Thyssen/T. Menné/J. D. Johansen: Prevalence of nickel allergy in Europe following the EU Nickel Directive - a review, in: *Contact Dermatitis*, Bd. 77, Nr. 4, 2017, doi:10.1111/cod.12846, S. 193–200.
- Ahlström, M. G./J. P. Thyssen/M. Wennervaldt/T. Menné/J. D. Johansen: Nickel allergy and allergic contact dermatitis: A clinical review of immunology, epidemiology, exposure, and treatment, in: *Contact Dermatitis*, Bd. 81, Nr. 4, 2019, doi:10.1111/cod.13327, S. 227–241.
- Akiyama, H./S. Furukawa/S. Wakisaka/T. Maeda: Cartducin stimulates mesenchymal chondrogenitor cell proliferation through both extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways, in: *FEBS Journal*, Bd. 273, Nr. 10, 2006, doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05240.x, S. 2257–2263.
- Alamian, A./J. Marrs/W. A. Clark/K. L. Thomas/J. M. Peterson: CTRP3 and serum triglycerides in children aged 7–10 years, in: Paolo Magni (Hrsg.), *PLOS ONE*, Bd. 15, Nr. 12: e0241813, 2020, doi:10.1371/journal.pone.0241813, S. 1–10.
- Alinaghi, F./N. H. Bennike/A. Egeberg/J. P. Thyssen/J. D. Johansen: Prevalence of contact allergy in the general population: A systematic review and meta-analysis, in: *Contact Dermatitis*, Bd. 80, Nr. 2, 2018, doi:10.1111/cod.13119, S. 77–85.
- Arrighi, J./M. Rebsamen/F. Rousset/V. Kindler/C. Hauser: A Critical Role for p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in the Maturation of Human Blood-Derived Dendritic Cells Induced by Lipopolysaccharide, TNF- $\alpha$ , and Contact Sensitizers, in: *The Journal of Immunology*, Bd. 166, Nr. 6, 2001, doi:10.4049/jimmunol.166.6.3837, S. 3837–3845.
- Azeem, M./H. Kader/A. Kerstan/H. F. Hetta/E. Serfling/M. Goebeler/K. Muhammad: Intricate Relationship Between Adaptive and Innate Immune System in Allergic Contact Dermatitis, in: *The Yale Journal of Biology and Medicine*, Bd. 93, Nr. 5, 2020, S. 699-709.
- Bala, K./K. Ambwani/N. K. Gohil: Effect of different mitogens and serum concentration on HUVEC morphology and characteristics: Implication on use of higher passage cells, in: *Tissue and Cell*, Bd. 43, Nr. 4, 2011, doi:10.1016/j.tice.2011.03.004, S. 216–222.
- Brar, K. K.: A review of contact dermatitis, in: *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, Bd. 126, Nr. 1, 2021, doi:10.1016/j.anai.2020.10.003, S. 32–39.
- Cagliero, J./F. Vernel-Pauillac/G. L. Murray/B. Adler/M. Matsui/C. Werts: Pathogenic leptospire limit dendritic cell activation through avoidance of TLR4 and TRIF signaling, in: *Frontiers in Immunology*, Bd. 13, 2022, doi:10.3389/fimmu.2022.911778, S. 1-16.

- Cashman, M. W./P. Reutemann/A. Ehrlich: Contact Dermatitis in the United States: Epidemiology, economic impact, and workplace prevention, in: *Dermatologic Clinics*, Bd. 30, Nr. 1, 2012, doi:10.1016/j.det.2011.08.004, S. 87–98.
- Chen, S./A. F. U. H. Saeed/Q. Liu/Q. Jiang/H. Xu/G. G. Xiao/L. Rao/Y. Duo: Macrophages in immunoregulation and therapeutics, in: *Signal Transduction and Targeted Therapy*, Bd. 8, Nr. 1, 2023, doi:10.1038/s41392-023-01452-1, S. 1-35.
- Chometon, T. Q./M. D. S. Siqueira/J. C. Sant'Anna/M. R. Almeida/M. Gandini/A. C. M. De Almeida Nogueira/P. R. Z. Antas: A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells, in: Henning Ulrich (Hrsg.), *PLOS ONE*, Bd. 15, Nr. 4: e0231132, 2020, doi:10.1371/journal.pone.0231132, S. 1–16.
- Christensen, A. D./S. Skov/P. H. Kvist/C. Haase: Depletion of regulatory T cells in a hapten-induced inflammation model results in prolonged and increased inflammation driven by T cells, in: *Clinical and Experimental Immunology*, Bd. 179, Nr. 3, 2015, doi:10.1111/cei.12466, S. 485–499.
- Christensen, A. D./C. Haase: Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice, in: *APMIS*, Bd. 120, Nr. 1, 2011, doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02832.x, S. 1–27.
- Corsini, E./A. B. Engin/M. Neagu/V. Galbiati/D. Nikitovic/G. Tzanakakis/A. M. Tsatsakis: Chemical-induced contact allergy: from mechanistic understanding to risk prevention, in: *Archives of Toxicology*, Bd. 92, Nr. 10, 2018, doi:10.1007/s00204-018-2283-z, S. 3031–3050.
- Cumberbatch, M./R. J. Dearman/C. Antonopoulos/R. W. Groves/I. Kimber: Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ -dependent mechanism, in: *Immunology*, Bd. 102, Nr. 3, 2001, doi:10.1046/j.1365-2567.2001.01187.x, S. 323–330.
- Cumberbatch, M./R. J. Dearman/I. Kimber: Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  for migration, in: *Immunology*, Bd. 92, Nr. 3, 1997, doi:10.1046/j.1365-2567.1997.00360.x, S. 388–395.
- Crowley, L. C./A. P. Scott/B. J. Marfell/J. A. Boughaba/G. Chojnowski/N. J. Waterhouse: Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry, in: *CSH Protocols*, Bd. 2016, Nr. 7, 01.07.2016, doi:10.1101/pdb.prot087163, S.1-17.
- Datenblatt Abnova-CTRP3: URL: [http://www.abnova.com/protocol\\_pdf/DS\\_H00114899-P01.pdf](http://www.abnova.com/protocol_pdf/DS_H00114899-P01.pdf), Datum des letzten Zugriffs: 26.04.2022.
- Datenblatt Origene-CTRP3: URL: <https://cdn.origene.com/datasheet/tp313742.pdf> , Datum des letzten Zugriffs: 26.04.2022.
- Datenblatt R&D Systems-CTRP3: URL: [https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/9398-tn\\_cf.pdf?v=20220426](https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/9398-tn_cf.pdf?v=20220426), Datum des letzten Zugriffs: 26.04.2022.

- De Filippo, K./A. Dudeck/M. Hasenberg/E. Nye/N. V. Rooijen/K. Hartmann/M. Gunzer/A. Roers/N. Hogg: Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation, in: *Blood*, Bd. 121, Nr. 24, 2013, doi:10.1182/blood-2013-02-486217, S. 4930–4937.
- Deng, W./C. Li/Y. Zhang/J. Zhao/M. Yang/M. Tian/L. Li/Y. Zheng/B. Chen/G. Yang: Serum C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3) levels are decreased in obesity and hypertension and are negatively correlated with parameters of insulin resistance, in: *Diabetology & Metabolic Syndrome*, Bd. 7, Nr. 33, 2015, doi:10.1186/s13098-015-0029-0, S. 1–8.
- Dickel, H./I. Neustädter/M. Worm: Therapeutisches Management, in: AWMF-S1-Leitlinie „Kontaktexzem“, 2021, URL: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/013-055l\\_S1\\_Kontaktexzem\\_2021-11.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-055l_S1_Kontaktexzem_2021-11.pdf), Datum des letzten Zugriffs: 26.09.2024, S. 18-26.
- Duranova, H./L. Kuzelova/P. Borotova/V. Simora/V. Fialkova: Human Umbilical Vein Endothelial Cells as a Versatile Cellular Model System in Diverse Experimental Paradigms: An Ultrastructural Perspective, in: *Microscopy and Microanalysis*, 2024, doi:10.1093/mam/ozae048, S. 419-439.
- Fajgenbaum, D. C./C. H. June: Cytokine Storm, in: *The New England Journal of Medicine*, Bd. 383, Nr. 23, 2020, doi:10.1056/nejmra2026131, S. 2255–2273.
- Ferrer, G./B. Jung/P. Y. Chiu/R. Aslam/F. Palacios/A. N. Mazzeo/S. Vergani/D. Bagnara/S. Chen/S. Yancopoulos/A. Xochelli/X. Yan/J. A. Burger/J. C. Barrientos/J. E. Kolitz/S. L. Allen/K. Stamatopoulos/R. Kanti/B. Sherry/N. Chiorazzi: Myeloid-derived suppressor cell subtypes differentially influence T-cell function, T-helper subset differentiation, and clinical course in CLL, in: *Leukemia*, Bd. 35, Nr. 11, 2021, doi:10.1038/s41375-021-01249-7, S. 3163–3175.
- Genchi, G./A. Carocci/G. Lauria/M. S. Sinicropi/A. Catalano: Nickel: Human Health and Environmental Toxicology, in: *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Bd. 17, Nr. 3: 679, 2020, doi:10.3390/ijerph17030679, S. 1–21.
- Gigante, M./M. Mandić/A. Wesa/E. Cavalcanti/M. Dambrosio/V. Mancini/M. Battaglia/L. Gesualdo/W. J. Storkus/E. Ranieri: Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ )-conditioned DC Preferentially Stimulate Type-1 and Limit Treg-type In Vitro T-cell Responses From RCC Patients, in: *Journal of Immunotherapy*, Bd. 31, Nr. 3, 2008, doi:10.1097/cji.0b013e318167b023, S. 254–262.
- Goebeler, M./J. Roth/E. B. Bröcker/C. Sorg/K. Schulze-Osthoff: Activation of nuclear factor-kappa B and gene expression in human endothelial cells by the common haptens nickel and cobalt, in: *The Journal of Immunology*, Bd. 155, Nr. 5, 1995, S.2459-2467.
- Goebeler, M./J. Roth/G. Meinardus-Hager/C. Sorg: The contact allergens nickel chloride and cobalt chloride directly induce expression of endothelial adhesion molecules, in: *Behring Institute Mitteilungen*, Bd. 92, 1993, S.191-201.

- Grosche, L./I. Knippertz/C. König/D. Royzman/A. B. Wild/E. Zinser/H. Sticht/Y. A. Muller/A. Steinkasserer/M. Lechmann: The CD83 Molecule – An Important Immune Checkpoint, in: *Frontiers in Immunology*, Bd. 11, Nr. 721, 2020, doi:10.3389/fimmu.2020.00721, S. 1–16.
- Haegens, A./P. Heeringa/R. J. Van Suylen/C. Steele/Y. Aratani/R. J.J. O'Donoghue/S. E. Mutsaers/B. T. Mossman/E. F.M. Wouters/J. H. J. Vernooij: Myeloperoxidase deficiency attenuates Lipopolysaccharide-Induced acute lung inflammation and subsequent cytokine and chemokine production, in: *Journal of Immunology*, Bd. 182, Nr. 12, 2009, doi:10.4049/jimmunol.0800377, S. 7990–7996.
- Han, F./R. L. Judd: Adiponectin Regulation and Function, in: *Comprehensive Physiology*, 18.06.2018, doi:10.1002/cphy.c170046, S. 1031–1063.
- Heinrich, P. C./H. Wajant/H. Koch/J. Brix: Der programmierte Zelltod – Apoptose, Nekroptose, Ferroptose und Pyroptose, in: *Springer eBooks*, 2022, doi:10.1007/978-3-662-60266-9\_51, S. 825–834.
- Huang, B./P. Pan/Q. Li/A. I. Sato/D. E. Levy/J. S. Bromberg/C. M. Divino/S. Chen: Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host, in: *Cancer Research*, Bd. 66, Nr. 2, 2006, doi:10.1158/0008-5472.can-05-1299, S. 1123–1131.
- Idriss, H T/Naismith: TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s), in: *Microscopy research and technique*, Bd. 50, Nr. 3, 2000, PMID: 10891884, S. 184–195.
- Jain, N. B./A. Yadav/N. Shankar/R. Ahmed: Correlation of C1q/TNF-Related Protein-3 with Cardiac Autonomic Tone and Metabolic Parameters in Obesity, in: *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, Bd. 17, Nr. 2, 2019, doi:10.5812/ijem.74250, S. 1–8.
- Jakob, A./F. Mussotter/S. Ohnesorge/L. Dietz/J. Pardo/I. D Haidl/H. Thierse: Immunoproteomic identification and characterization of Ni<sup>2+</sup>-regulated proteins implicates Ni<sup>2+</sup> in the induction of monocyte cell death, in: *Cell Death & Disease*, Bd. 8, Nr. 3: e2684, 2017, doi:10.1038/cddis.2017.112, S. 1–12.
- Jarczak, D./A. Nierhaus: Cytokine Storm - Definition, Causes, and Implications, in: *International Journal of Molecular Sciences*, Bd. 23, Nr. 11740, 2022, doi:10.3390/ijms231911740, S. 1–30.
- Kan, M./M. Kato/I. Yamane: Long-term serial cultivation and growth requirements for human umbilical vein endothelial cells, in: *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Bd. 21, Nr. 3, 1985, doi:10.1007/bf02621356, S. 181–188.
- Kang, S./T. Tanaka/M. Narazaki/T. Kishimoto: Targeting interleukin-6 signaling in clinic, in: *Immunity*, Bd. 50, Nr. 4, 2019, doi:10.1016/j.immuni.2019.03.026, S. 1007–1023.
- Kopp, A./M. Bala/C. Buechler/W. Falk/P. Gross/M. Neumeier/J. Schölmerich/A. Schäffler: C1q/TNF-Related Protein-3 Represents a Novel and Endogenous Lipopolysaccharide Antagonist of the Adipose Tissue, in: *Endocrinology*, Bd. 151, Nr. 11, 2010, doi:10.1210/en.2010-0571, S. 5267–5278.

- Kostner, L./F. Anzengruber/C. Guillod/M. Recher/P. Schmid-Grendelmeier/A. A. Navarini: Allergic Contact Dermatitis, in: *Immunology and Allergy Clinics of North America*, Bd. 37, Nr. 1, 2017, doi:10.1016/j.iac.2016.08.014, S. 141–152.
- Kovács, D./F. Fazekas/A. Oláh/D. Törőcsik: Adipokines in the Skin and in Dermatological Diseases, in: *International Journal of Molecular Sciences*, Bd. 21, Nr. 23, 2020, doi:10.3390/ijms21239048, S. 1–29.
- Kratofil, R. M./P. Kubes/J. F. Deniset: Monocyte Conversion During Inflammation and Injury, in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Bd. 37, Nr. 1, 2017, doi:10.1161/atvbaha.116.308198, S. 35–42.
- Kumar, P./A. Nagarajan/P. D. Uchil: Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay, in: *CSH Protocols*, Bd. 2018, Nr. 6, 2018, doi:10.1101/pdb.prot095497, S.465-469.
- Kzhyshkowska, J.: Die Rolle von Makrophagen in Entzündungen und Tumoren: neue Stabilin-1-vermittelte Prozesse, in: *Aktuelle Dermatologie*, Bd. 34, Nr. 3, 2008, doi:10.1055/s-2007-995658, S. 72–84.
- Lee, S. H./X. Meng/K. S. Flatten/D. A. Loegering/S. H. Kaufmann: Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm, in: *Cell Death & Differentiation*, Bd. 20, Nr. 1, 2012, doi:10.1038/cdd.2012.93, S. 64–76.
- Levine, P. M./A. Galesic/A. T. Balana/A. Mahul-Mellier/M. X. Navarro/C. A. De Leon/H. A. Lashuel/M. R. Pratt:  $\alpha$ -Synuclein O-GlcNAcylation alters aggregation and toxicity, revealing certain residues as potential inhibitors of Parkinson's disease, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, Bd. 116, Nr. 5, 2019, doi:10.1073/pnas.1808845116, S. 1511–1519.
- Li, Y./G. L. Wright/J. M. Peterson: C1q/TNF-Related Protein 3 (CTRP3) Function and Regulation, in: *Comprehensive Physiology*, Bd. 7, Nr. 3, 2017, doi:10.1002/cphy.c160044, S. 863–878.
- Liew, P. X./P. Kubes: The neutrophil's role during health and disease, in: *Physiological Reviews*, Bd. 99, Nr. 2, 2019, doi:10.1152/physrev.00012.2018, S. 1223–1248.
- Lin, H./J. Yi: CTRP3 regulates NF- $\kappa$ B and TGF $\beta$ 1/Smad3 pathways to alleviate airway inflammation and remodeling in asthmatic mice induced by OVA, in: *Allergologia et Immunopathologia*, Bd. 51, Nr. 4, 2023, doi:10.15586/aei.v51i4.867, S. 31–39.
- Lin, J./Q. Liu/H. Zhang/X. Huang/R. Zhang/S. Chen/X. Wang/B. Yu/J. Hou: C1q/Tumor necrosis factor-related protein-3 protects macrophages against LPS-induced lipid accumulation, inflammation and phenotype transition via PPAR $\gamma$  and TLR4-mediated pathways, in: *Oncotarget*, Bd. 8, Nr. 47, 2017, doi:10.18632/oncotarget.19657, S. 82541–82557.
- Lin, Y./C. Chipot/S. Scheuring: Annexin-V stabilizes membrane defects by inducing lipid phase transition, in: *Nature Communications*, Bd. 11, Nr. 1, 2020, doi:10.1038/s41467-019-14045-w, S. 1-13.

- Liu, T./T. Huang/J. Li/A. Li/C. Li/X. Huang/D. Li/S. Wang/M. Liang: Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA, in: *PloS One*, Bd. 18, Nr. 7, 17.07.2023, doi:10.1371/journal.pone.0286056, S. 1-14.
- Loré, K./A. Sönnnerborg/A. Spetz/U. Andersson/J. Andersson: Immunocytochemical detection of cytokines and chemokines in Langerhans cells and in vitro derived dendritic cells, in: *Journal of Immunological Methods*, Bd. 214, Nr. 1–2, 1998, doi:10.1016/s0022-1759(98)00040-4, S. 97–111.
- Lund, B. T./N. Ashikian/H. Q. Ta/Y. Chakryan/K. Manoukian/S. Groshen/W. Gilmore/G. S. Cheema/W. Stohl/M. Burnett/D. Ko/N. J. Kachuck/L. P. Weiner: Increased CXCL8 (IL-8) expression in Multiple Sclerosis, in: *Journal of Neuroimmunology*, Bd. 155, Nr. 1–2, 2004, doi:10.1016/j.jneuroim.2004.06.008, S. 161–171.
- Lusi, E. A./V. M. Ciommo/T. Patrissi/P. Guarascio: High Prevalence of Nickel Allergy in an Overweight Female Population: A Pilot Observational Analysis, in: *Lamberto Manzoli (Hrsg.), PLOS ONE*, Bd. 10, Nr. 3: e0123265, 2015, doi:10.1371/journal.pone.0123265, S. 1–9.
- Maeda, T./M. Abe/K. Kurisu/A. Jikko/S. Furukawa: Molecular Cloning and Characterization of a Novel Gene, CORS26, Encoding a Putative Secretory Protein and Its Possible Involvement in Skeletal Development, in: *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 276, Nr. 5, 2001, doi:10.1074/jbc.m007898200, S. 3628–3634.
- Maeda, T./A. Jikko/M. Abe/T. Yokohama-Tamaki/H. Akiyama/S. Furukawa/M. Takigawa/S. Wakisaka: Cartducin, a paralog of Acrp30/adiponectin, is induced during chondrogenic differentiation and promotes proliferation of chondrogenic precursors and chondrocytes, in: *Journal of Cellular Physiology*, Bd. 206, Nr. 2, 2005, doi:10.1002/jcp.20493, S. 537–544.
- Mai, J./A. Virtue/J. Shen/H. Wang/X. Yang: An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells, in: *Journal of Hematology & Oncology*, Bd. 6, Nr. 61, 2013, doi:10.1186/1756-8722-6-61, S. 1–13.
- Martin, S. F./P. R. Esser/F. C. Weber/T. Jakob/M. A. Freudenberg/M. Schmidt/M. Goebeler: Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis, in: *Allergy*, Bd. 66, Nr. 9, 2011, doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02652.x, S. 1152–1163.
- Martin, S. F.: New concepts in cutaneous allergy, in: *Contact Dermatitis*, Bd. 72, Nr. 1, 2014, doi:10.1111/cod.12311, S. 2–10.
- Martin, S. F./J. C. Dudda/E. Bachtanian/A. Lembo/S. Liller/C. Dürr/M. M. Heimesaat/S. Bereswill/G. Fejer/R. Vassileva/T. Jakob/N. Freudenberg/C. C. Termeer/C. Johner/C. Galanos/M. A. Freudenberg: Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity, in: *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 205, Nr. 9, 2008, doi:10.1084/jem.20070509, S. 2151–2162.
- Martin, S. F./T. Jakob: From innate to adaptive immune responses in contact hypersensitivity, in: *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*, Bd. 8, Nr. 4, 2008, doi:10.1097/aci.0b013e3283088cf9, S. 289–293.

- Martin, S. F./T. Rustemeyer/J. P. Thyssen: Recent advances in understanding and managing contact dermatitis, in: *F1000Research*, Bd. 7, Nr. F1000 Faculty Rev-810, 2018, doi:10.12688/f1000research.13499.1, S. 1–10.
- McSweeney, S. M./I. R. White/I. Kimber/J. P. McFadden/C. Tziotziou: Contact allergy across the human lifespan, in: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Bd. 145, Nr. 5, 2020, doi:10.1016/j.jaci.2020.03.014, S. 1352–1354.
- Medina-Leyte, D. J./M. Domínguez-Pérez/I. Mercado/M. T. Villarreal-Molina/L. Jacobo-Albavera: Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review, in: *Applied Sciences*, Bd. 10, Nr. 3, 2020, doi:10.3390/app10030938, S. 1-25.
- Moon, J./M. Reeder/A. R. Atwater: Contact Allergy to Nickel: Still #1 After All These Years, in: *Cutis*, Bd. 107, Nr. 1, 2021, doi:10.12788/cutis.0156, S. 12–15.
- Möller, A./U. Lippert/D. Lessmann/G. Kolde/K. Hamann/P. Welker/D. Schadendorf/T. Rosenbach/T. Luger/B. M. Czarnetzki: Human mast cells produce IL-8, in: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, Bd. 151, Nr. 6, 1993, PMID: 8376778, S. 3261–3266.
- Nassau, S./L. Fonacier: Allergic Contact Dermatitis, in: *Medical Clinics of North America*, Bd. 104, Nr. 1, 2020, doi:10.1016/j.mcna.2019.08.012, S. 61–76.
- Niewold, T. B./D. N. Clark/R. Salloum/B. Poole: Interferon alpha in systemic lupus erythematosus, in: *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Bd. 2010, 2010, doi:10.1155/2010/948364, S. 1–8.
- Nixon, R. L./C. L. Higgins/D. Maor/H. R. Bala/A. Lalji/K. E. Heim: Does clinical testing support the current guidance definition of prolonged contact for nickel allergy?, in: *Contact Dermatitis*, Bd. 79, Nr. 6, 2018, doi:10.1111/cod.13095, S. 356–364.
- Olona, A./C. Hateley/S. Muralidharan/M. R. Wenk/F. Torta/J. Behmoaras: Sphingolipid metabolism during toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated macrophage activation, in: *British Journal of Pharmacology*, Bd. 178, Nr. 23, 2021, doi:10.1111/bph.15642, S. 4575–4587.
- Olzscha, H.: Posttranslational modifications and proteinopathies: how guardians of the proteome are defeated, in: *Biological Chemistry*, Bd. 400, Nr. 7, 2019, doi:10.1515/hsz-2018-0458, S. 895–915.
- Opal, S. M./V. A. DePalo: Anti-inflammatory cytokines, in: *Chest*, Bd. 117, Nr. 4, 2000, doi:10.1378/chest.117.4.1162, S. 1162–1172.
- Ott, H.: Allergisches Kontaktekzem, in: *Kinderallergologie in Klinik und Praxis*, Springer eBooks, 2014, doi:10.1007/978-3-642-36999-5\_10, S. 199–209.
- Rachmawati, D./H. J. Bontkes/M. I. Verstege/J. Muris/B. M. E. von Blomberg/R. J. Scheper/I. M. W. van Hoogstraten: Transition metal sensing by Toll-like receptor-4: next to nickel, cobalt and palladium are potent human dendritic cell stimulators, in: *Contact Dermatitis*, Bd. 68, Nr. 6, 2013, doi:10.1111/cod.12042, S. 331–338.

- Raghavan, B./S. F. Martin/P. R. Esser/M. Goebeler/M. Schmidt: Metal allergens nickel and cobalt facilitate TLR4 homodimerization independently of MD2, in: *EMBO reports*, Bd. 13, Nr. 12, 2012, doi:10.1038/embor.2012.155, S. 1109–1115.
- Ramazi, S./J. Zahiri: Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods, in: *Database*, Bd. 2021, 2021, doi:10.1093/database/baab012, S.1-20.
- Rand, M. L./J. R. Warren/M. K. Mansour/W. Newman/D. J. Ringler: Inhibition of T cell recruitment and cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation with antibodies to monocyte chemoattractant protein-1, in: *American Journal of Pathology*, Bd. 148, Nr. 3, 1996, S. 855–64.
- Romer, M.: Zur Rolle CD11c+ dendritischer Zellen bei der Induktion der Niedrigzonentoleranz im murinen Modell der Kontaktallergie, Dissertation im Fachbereich Humanmedizin, Medizinische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2016, S. 1-91.
- Saito, M./R. Arakaki/A. Yamada/T. Tsunematsu/Y. Kudo/N. Ishimaru: Molecular Mechanisms of Nickel Allergy, in: *International Journal of Molecular Sciences*, Bd. 17, Nr. 2, 2016, doi:10.3390/ijms17020202, S. 1–8.
- Schäffler, A./J. Weigert/M. Neumeier/J. Schölmerich/C. Buechler: Regulation and Function of Collagenous Repeat Containing Sequence of 26-kDa Protein Gene Product “Cartonectin”, in: *Obesity*, Bd. 15, Nr. 2, 2007, doi:10.1038/oby.2007.566, S. 303–313.
- Schmid, A./M. Roderfeld/J. Gehl/E. Roeb/A. Nist/H. Chung/T. Stiewe/T. Karrasch/A. Schäffler: C1q/TNF-Related Protein 3 (CTRP-3) Deficiency of Adipocytes Affects White Adipose Tissue Mass but Not Systemic CTRP-3 Concentrations, in: *International Journal of Molecular Sciences*, Bd. 22, Nr. 4:1670, 02.2021a, doi:10.3390/ijms22041670, S. 1–17.
- Schmid, A./A. Vlacil/J. Schuett/T. Karrasch/B. Schieffer/A. Schäffler/K. Grote: Anti-Inflammatory Effects of C1q/Tumor Necrosis Factor-Related Protein 3 (CTRP3) in Endothelial Cells, in: *Cells*, Bd. 10, Nr. 8, 08.2021b, doi:10.3390/cells10082146, S. 1–13.
- Schmidt, M./B. Raghavan/V. Müller/T. Vogl/G. Fejer/S. Tchaptchet/S. Keck/C. Kalis/P. J. Nielsen/C. Galanos/J. Roth/A. Skerra/S. F. Martin/M. A. Freudenberg/M. Goebeler: Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel, in: *Nature Immunology*, Bd. 11, Nr. 9, 2010, doi:10.1038/ni.1919, S. 814–819.
- Schütz, A./F. Bernhard/N. S. Berrow/J. F. Buyel/F. Ferreira-Da-Silva/J. Haustraete/J. V. Heuvel/J. Hoffmann/A. De Marco/Y. Peleg/S. Suppmann/T. Unger/M. Vanhoucke/S. Witt/K. Remans: A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production, in: *STAR Protocols*, Bd. 4, Nr. 4, 2023, doi:10.1016/j.xpro.2023.102572, S. 1-16.
- Sebastiani, S./P. Allavena/C. Albanesi/F. Nasorri/G. Bianchi/C. Traidl/S. Sozzani/G. Girolomoni/A. Cavani: Chemokine Receptor Expression and Function in CD4+T Lymphocytes with Regulatory Activity, in: *The Journal of Immunology*, Bd. 166, Nr. 2, 2001, doi:10.4049/jimmunol.166.2.996, S. 996–1002.

- Singh, S./D. Anshita/V. Ravichandiran: MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease, in: *International Immunopharmacology*, Bd. 101, Nr. 107598, 2021, doi:10.1016/j.intimp.2021.107598, S. 1-10.
- Stierschneider, A./C. Wiesner: Shedding light on the molecular and regulatory mechanisms of TLR4 signaling in endothelial cells under physiological and inflamed conditions, in: *Frontiers in Immunology*, Bd. 14, 2023, doi:10.3389/fimmu.2023.1264889, S. 1-15.
- Strzępa, A./C. J. Gurski/L. J. Dittel/M. Szczepanik/K. A. Pritchard/B. N. Dittel: Neutrophil-Derived myeloperoxidase facilitates both the induction and elicitation phases of contact hypersensitivity, in: *Frontiers in Immunology*, Bd. 11, 2021, doi:10.3389/fimmu.2020.608871, S. 1-11.
- Strzępa, A./K. A. Pritchard/B. N. Dittel: Myeloperoxidase: a new player in autoimmunity, in: *Cellular Immunology*, Bd. 317, 2017, doi:10.1016/j.cellimm.2017.05.002, S. 1–8.
- Symanzik, C./S. M. John/M. Strunk: Nickel release from metal tools in the German hairdressing trade—A current analysis, in: *Contact Dermatitis*, Bd. 80, Nr. 6, 2019, doi:10.1111/cod.13251, S. 382–385.
- Takashiba, S./T. E. Van Dyke/S. Amar/Y. Murayama/A. W. Soskolne/L. Shapira: Differentiation of Monocytes to Macrophages Primes Cells for Lipopolysaccharide Stimulation via Accumulation of Cytoplasmic Nuclear Factor  $\kappa$ B, in: *Infection and Immunity*, Bd. 67, Nr. 11, 01.11.1999, doi:10.1128/iai.67.11.5573-5578.1999, S. 5573–5578.
- Thyssen, J. P./W. Uter/J. McFadden/T. Menné/R. Spiewak/M. Vigan/A. Gimenez-Arnau/C. Lidén: The EU Nickel Directive revisited-future steps towards better protection against nickel allergy, in: *Contact Dermatitis*, Bd. 64, Nr. 3, 2011, doi:10.1111/j.1600-0536.2010.01852.x, S. 121–125.
- Tilg, H./A. M. Diehl: Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis, in: *The New England Journal of Medicine*, Bd. 343, Nr. 20, 2000, doi:10.1056/nejm200011163432007, S. 1467–1476.
- Trogen, G./A. Alamian/J. M. Peterson: High molecular weight, but not total, CTRP3 levels are associated with serum triglyceride levels, in: *Physiological Reports*, Bd. 7, Nr. 23:e14306, 2019, doi:10.14814/phy2.14306, S. 1–7.
- Trujillo, M. E./P. E. Scherer: Adipose Tissue-Derived Factors: Impact on Health and Disease, in: *Endocrine Reviews*, Bd. 27, Nr. 7, 2006, doi:10.1210/er.2006-0033, S. 762–778.
- Tsou, T./S. Liou/S. Yeh/F. Tsai/H. Chao: Crucial role of Toll-like receptors in the zinc/nickel-induced inflammatory response in vascular endothelial cells, in: *Toxicology and Applied Pharmacology*, Bd. 273, Nr. 3, 2013, doi:10.1016/j.taap.2013.09.014, S. 492–499.
- Tsuchiya, S./M. Yamabe/Y. Yamaguchi/Y. Kobayashi/T. Konno/K. Tada: Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), in: *International Journal of Cancer*, Bd. 26, Nr. 2, 1980, doi:10.1002/ijc.2910260208, S. 171–176.

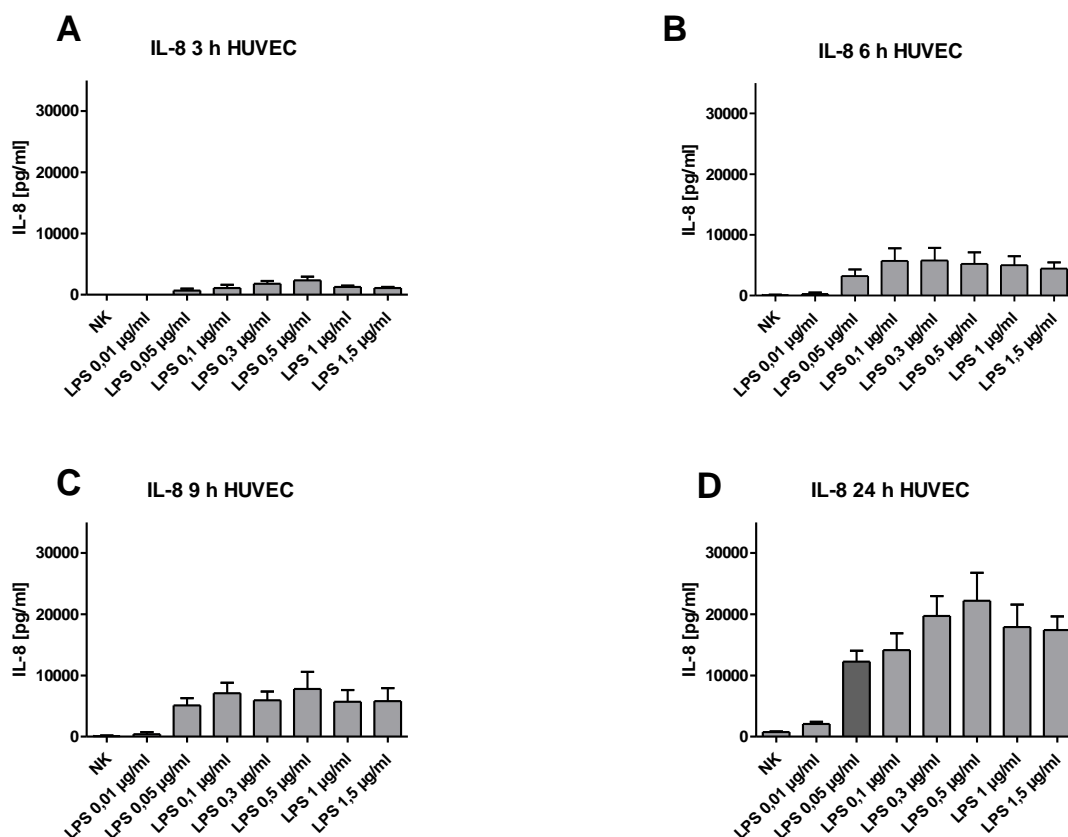
- Viola, A./F. Munari/R. Sánchez-Rodríguez/T. Scolaro/A. Castegna: The Metabolic Signature of Macrophage Responses, in: *Frontiers in Immunology*, Bd. 10, 03.07.2019, doi:10.3389/fimmu.2019.01462, S. 1-16.
- Wang, F./L. Zhao/Y. Shan/R. Li/G. Qin: CTRP3 Protects against High Glucose-Induced Cell Injury in Human Umbilical Vein Endothelial Cells, in: *Analytical Cellular Pathology*, Bd. 2019, Nr. 7405602, 2019, doi:10.1155/2019/7405602, S. 1–7.
- Watanabe, M./S. Masieri/D. Costantini/R. Tozzi/F. Giorgi/E. Gangitano/D. Tuccinardi/E. Poggiogalle/S. Mariani/S. Basciani/E. Petrangeli/L. Gnessi/C. Lubrano: Overweight and obese patients with nickel allergy have a worse metabolic profile compared to weight matched non-allergic individuals, in: *Amarjit Mishra (Hrsg.), PLOS ONE*, Bd. 13, Nr. 8: e0202683, 2018, doi:10.1371/journal.pone.0202683, S. 1–12.
- Weber, F. C./P. R. Esser/T. Müller/J. Ganesan/P. Pellegatti/M. M. Simon/R. Zeiser/M. Idzko/T. Jakob/S. F. Martin: Lack of the purinergic receptor P2X7 results in resistance to contact hypersensitivity, in: *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 207, Nr. 12, 2010, doi:10.1084/jem.20092489, S. 2609–2619.
- Weber, F./T. Németh/J. Z. Csepregi/A. Dudeck/A. Roers/B. Ózsvári/E. Oswald/L. G. Puskás/T. Jakob/A. Mócsai/S. F. Martin: Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity, in: *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 212, Nr. 1, 2014, doi:10.1084/jem.20130062, S. 15–22.
- Weigert, J./M. Neumeier/A. Schäffler/M. Fleck/J. Schölmerich/C. Schütz/C. Buechler: The adiponectin paralog CORS-26 has anti-inflammatory properties and is produced by human monocytic cells, in: *FEBS Letters*, Bd. 579, Nr. 25, 2005, doi:10.1016/j.febslet.2005.09.022, S. 5565–5570.
- Werfel, T./V. Mahler/H. F. Merk: Ätiopathogenese und Klassifikation, in: *AWMF-S1-Leitlinie „Kontaktekzem“*, 2021, URL: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/013-055l\\_S1\\_Kontaktekzem\\_2021-11.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-055l_S1_Kontaktekzem_2021-11.pdf), Datum des letzten Zugriffs: 26.09.2024, S. 9-11.
- Wolf, R. M./K. E. Steele/L. A. Peterson/T. H. Magnuson/M. A. Schweitzer/G. W. Wong: Lower Circulating C1q/TNF-Related Protein-3 (CTRP3) Levels Are Associated with Obesity: A Cross-Sectional Study, in: *Yanqiao Zhang (Hrsg.), PLOS ONE*, Bd. 10, Nr. 7: e0133955, 2015, doi:10.1371/journal.pone.0133955, S. 1–11.
- Wölfing, B./C. Buechler/J. Weigert/M. Neumeier/C. Aslanidis/J. Schöelmerich/A. Schäffler: Effects of the New C1q/TNF-related Protein (CTRP-3) “Cartonectin” on the Adipocytic Secretion of Adipokines, in: *Obesity*, Bd. 16, Nr. 7, 2008, doi:10.1038/oby.2008.206, S. 1481–1486.
- Xiang, J./X. Gu/S. Qian/Z. Chen: Graded function of CD80 and CD86 in initiation of T-cell immune response and cardiac allograft survival, in: *Transplant International*, Bd. 21, Nr. 2, 2007, doi:10.1111/j.1432-2277.2007.00590.x, S. 163–168.
- Yoshimura, T./M. Takahashi: IFN- $\gamma$ -Mediated Survival Enables Human Neutrophils to Produce MCP-1/CCL2 in Response to Activation by TLR Ligands, in: *Journal of Immunology*, Bd. 179, Nr. 3, 2007, doi:10.4049/jimmunol.179.3.1942, S. 1942–1949.

- Yu, H./L. Lin/Z. Zhang/H. Zhang/H. Hu: Targeting NF-KB pathway for the Therapy of Diseases: Mechanism and Clinical study, in: Signal Transduction and Targeted Therapy, Bd. 5, Nr. 1, 2020, doi:10.1038/s41392-020-00312-6, S.1-23.
- Zeng, C./W. Wang/X. Yu/L. Yang/S. Chen/Y. Li: Pathways related to PMA-differentiated THP1 human monocytic leukemia cells revealed by RNA-Seq, in: Science China. Life Sciences/Science China. Life Sciences, Bd. 58, Nr. 12, 18.11.2015, doi:10.1007/s11427-015-4967-4, S. 1282–1287.
- Zhang, J./X. Lin/J. Xu/F. Tang/L. Tan: CTRP3 protects against uric acid-induced endothelial injury by inhibiting inflammation and oxidase stress in rats, in: Experimental Biology and Medicine, Bd. 247, Nr. 2, 2021, doi:10.1177/15353702211047183, S. 174–183.

## 10. Anhang

Die proinflammatorische Zytokinantwort der THP-1 und HUVEC Zellen sollte möglichst in einem sensitiven Bereich für einen potentiell antiinflammatorischen Effekt des CTRP3's liegen. Deshalb wurde für jedes Zytokin und Chemokin (IL-6, IL-8, MCP-1 & GM-CSF) zunächst eine LPS-Konzentration ermittelt, bei der die zugehörige Zytokinantwort der Zellen auf einem mittleren Niveau zwischen minimaler und maximaler Zytokinantwort lag. Dafür wurde mit LPS aus *E. coli* O111:B4 sowohl zeitabhängig (3 h, 6 h, 9 h, 24 h), als auch konzentrationsabhängig (0,01 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 1,5 µg/ml) stimuliert. Im Anschluss wurde via ELISA die Zytokinantwort der Zellen quantifiziert (siehe Abb. 27).

Die so ermittelten LPS-Konzentrationen wurden im Rahmen der CTRP3-Experimente für das jeweilig zu untersuchende Zytokin verwendet. Auf der folgenden Abbildung wurde exemplarisch die Ermittlung der IL-8 Positivkontrolle bei HUVEC's dargestellt.



**Abbildung 27: Konzentrationsermittlung der LPS-Positivkontrollen (n=3)**

Unterschiedliche HUVEC-Passagen (n=3) wurden mit LPS (0,01-1,5 µg/ml) für (A: 3 h; B 6 h, C 9 h, D 24 h) stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Ermittlung der IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand via ELISA-Verfahren. Darstellung: Mean + SEM. NK, Negativkontrolle.

Ermittelt wurde in diesem Fall eine LPS-Konzentration von 0,05 µg/ml.

Aus den Datenblättern der Hersteller hervorgehende CTRP3-Unterschiede:

In langwierigen Vorversuchen wurde im Rahmen der Doktorarbeit mit rekombinantem CTRP3 von insgesamt vier verschiedenen Herstellern (Abnova, R&D Systems, Origene, Molekulare Endokrinologie Gießen) gearbeitet (siehe Abb. 5). Lediglich das rekombinante CTRP3 vom Hersteller Abnova (Taiwan) zeigte *in vitro* die beschriebenen inhibitorischen Effekte. Möglicherweise spielten die unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen der verschiedenen Expressionssysteme im Herstellungsprozess eine Rolle für die Wirksamkeit von CTRP3 (Olzscha, 2019, Ramazi et al., 2021, Schütz et al., 2023). Abbildung 28 zeigt die aus den Datenblättern hervorgehenden Unterschiede im CTRP3-Herstellungsprozess der verschiedenen Anbieter.

	<u>Abnova:</u>								
Tagging:	GST-Tag N-terminal								
Host:	Wheat Germ (in vitro)								
Molekulargewicht:	53.4 kDa								
	<u>Origene:</u>								
Tagging:	C-Myc/DDK								
Host:	HEK293T (Human Embryonic Kidney-Zellen)								
Molekulargewicht:	35 kDa								
	<u>R&amp;D Systems:</u>								
N-terminal Sequence:	No results obtained.								
	Gln23 inferred from enzymetic pyroglutamate treatment revealing Asp24								
Host:	Mouse myeloma cell line								
Molekulargewicht:	24 kDa								

**Abbildung 28: Aus den Datenblättern der Hersteller Abnova, Origene und R&D Systems hervorgehende CTRP3-Unterschiede**

GST, Gluthation-S-Transferase. Gln, Glutamin. Asp, Asparaginsäure.

Berechtigung zur Verwendung der Abbildung 1:

SPRINGER NATURE LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Apr 02, 2024

---

---

This Agreement between Justus-Liebig-Universität Gießen, Experimentelle Dermatologie und Allergologie – Michael Wendel ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5760961359612
License date	Apr 02, 2024
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Springer eBook
Licensed Content Title	Allergisches Kontaktekzem
Licensed Content Author	Priv.-Doz. Dr. med. H. Ott
Licensed Content Date	Jan 1, 2014
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	non-commercial (non-profit)
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	no

Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title of new work	C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) als physiologischer Antagonist der allergischen Kontaktdermatitis (ACD)
Institution name	Justus-Liebig-Universität Gießen, Experimentelle Dermatologie und Allergologie
Expected presentation date	Jun 2024
Order reference number	1
Portions	Abbildung 10.1
	Michael Wendel Steinstraße 19
Requestor Location	Giessen, Hessen 35390 Germany Attn: Justus-Liebig-Universität Gießen, Experimentelle Dermatologie und Allergologie

Berechtigung zur Verwendung der Abbildungen 2 und 3:

JOHN WILEY AND SONS LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Apr 02, 2024

---

This Agreement between Justus-Liebig-Universität Gießen, Experimentelle Dermatologie und Allergologie -- Michael Wendel ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5760970911201
License date	Apr 02, 2024
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Contact Dermatitis
Licensed Content Title	New concepts in cutaneous allergy
Licensed Content Author	Stefan F. Martin
Licensed Content Date	Oct 28, 2014
Licensed Content Volume	72
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	9
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic

Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Title of new work	C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) als physiologischer Antagonist der allergischen Kontaktdermatitis (ACD)
Institution name	Justus-Liebig-Universität Gießen, Experimentelle Dermatologie und Allergologie
Expected presentation date	Jun 2024
Order reference number	2
Portions	Figure 1
Specific Languages	German
Requestor Location	Justus-Liebig-Universität Gießen, Experimentelle Dermatologie und Allergologie Steinstraße 19 Giessen, Hessen 35390 Germany Attn: Justus-Liebig-Universität Gießen, Experimentelle Dermatologie und Allergologie

## 11. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort/Datum

---

Unterschrift

## 12. Danksagung

Vorab möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Thilo Jakob für die Bereitstellung des Themas bedanken. Außerdem möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Thilo Jakob und Herrn Dr. med. Igor Hrgovic für die ausgezeichnete Betreuung der Doktorarbeit bedanken. Besonders die regelmäßigen Hilfestellungen während der wöchentlichen Labormeetings und die ständige Möglichkeit für Rückfragen waren eine enorme und nicht selbstverständliche Hilfe bei der Durchführung der Doktorarbeit.

Großer Dank gilt auch Frau Britta Dorn und Frau Tatjana Grasmik, die mich geduldig in den Laboralltag eingearbeitet und bei aufkommenden Fragen und Problemstellungen unterstützt haben. Zusätzlich möchte ich mich insbesondere bei Frau Britta Dorn für die hervorragende Planung, Durchführung und Koordination des *in vivo* Teils der Mausexperimente bedanken. Ohne ihre Unterstützung wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Vielen Dank auch an das gesamte Team der Molekularen Endokrinologie Gießen für die Bereitstellung von CTRP3 und für den kollegialen Austausch im Rahmen der CTRP3-Knockout Mausexperimente.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meiner gesamten Familie und meinen Freunden, die mir sowohl während des Studiums als auch während der Doktorarbeit immer unterstützend zur Seite standen.