

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zur Interaktion von leptomeningealen Zellen und  
Makrophagen bei der Induktion der Immunantwort im Rahmen  
einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae***



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Paul Beckenbauer

aus

Bremen

2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Uwe Ködel  
Zweites Gutachten: Prof. Dr. Helga Maria Schmetzer  
Drittes Gutachten: Priv. Doz. Dr. Stefan Kastenbauer  
Weiterer Gutachter: Prof. Dr. Johannes Hübner  
  
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann  
Tag der mündlichen Prüfung: 18. November 2025



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Eidesstattliche Versicherung

Beckenbauer, Paul

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Untersuchungen zur Interaktion von leptomeningealen Zellen und Makrophagen bei der  
Induktion der Immunantwort im Rahmen einer Infektion mit Streptococcus pneumoniae**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 12.12.2025

---

Ort, Datum

Paul Beckenbauer

---

Unterschrift Paul Beckenbauer

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung.....	3
Abstract (English) .....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1 Einleitung und Stand der Forschung .....	11
1.1 Hintergrund.....	11
1.2 Pathophysiologie.....	12
1.3 Die Rolle von Zytokinen bei bakteriellen Hirnhautentzündungen .....	14
1.4 Die Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion durch das NLRP3-Inflammasom .....	16
1.5 Der Stellenwert (lepto-)meningealer Zellen und Makrophagen in der Pathogenese der Pneumokokken-Meningitis.....	18
1.6 Die Interaktionen von peripheren Fibroblasten und Makrophagen.....	19
2 Fragestellung und Hypothesen .....	21
3 Material und Methoden .....	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Zellkulturmedien, Reagenzien, Chemikalien und Immunglobuline.....	22
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.3 Kits.....	24
3.1.4 Technische Geräte.....	24
3.1.5 Chemikalien und Immunglobuline .....	25
3.1.6 Software .....	26
3.1.7 Zellen .....	26
3.2 Verwendete Zellpopulationen.....	27
3.2.1 Ben-Men-1-Zelllinie .....	27
3.2.2 Primäre Meningeale Zellen (Human Meningeal Cells, HMC).....	27
3.2.3 Perizyten (Human Brain Vascular Pericytes, HBVP) .....	27
3.2.4 THP-1 Zelllinie .....	28
3.2.5 Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) .....	28
3.3 Verwendete Bakterien.....	28
3.4 Zellkultur .....	29
3.4.1 Direktes Ko-Kultur-System (Einkammer-System).....	29

3.4.2	Indirektes Ko-Kultur-System (Transwell-System).....	29
3.4.3	Konditioniertes Medium.....	29
3.5	Erhalt und Vorbereitung der Zellkulturen .....	30
3.6	Stimulationsprotokoll .....	31
3.6.1	Versuchsablauf in Ko-Kultur.....	31
3.6.2	Versuchsablauf mit konditioniertem Medium .....	32
3.6.3	Qualitative Untersuchungen des konditionierten Mediums.....	33
3.6.4	Versuche mit Humanen Meningealen Zellen (HMC).....	34
3.6.5	Versuche mit Humanen Perizyten (HBVP).....	34
3.6.6	Versuche mit peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC).....	35
3.7	Messmethoden .....	35
3.7.1	Enzyme-linked immunosorbent assay (Sandwich-ELISA) .....	35
3.7.2	Antibody-Array.....	36
3.7.3	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	38
3.8	Statistische Analyse .....	39
4	Ergebnisse.....	40
4.1	Untersuchungen zur Interaktion von Ben-Men-1-Zellen und THP-1-Makrophagen in Ko-Kultur .....	40
4.1.1	Ben-Men-1-Zellen setzen bei direkter und indirekter Ko-Kultur mit THP-1-Makrophagen mehr IL-6 frei als in Monokultur .....	40
4.1.2	Konditioniertes Makrophagenmedium bewirkt eine deutliche Verstärkung der IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen im Vergleich zur Monokultur.....	41
4.1.3	Die stimulatorische Wirkung von konditioniertem Makrophagenmedium kann durch physikalische Behandlung abgemildert werden.....	42
4.1.4	Konditioniertes Medium TLR2-, ASC- und NLRP3-defizienter THP-1-Makrophagen zeigte im Vergleich zu Überständen von WT-THP-1-Makrophagen eine deutlich geringere stimulatorische Wirkung .....	44
4.1.5	TLR2-, ASC- und NLRP3-defizierte Makrophagen produzieren weniger IL-1 $\beta$ als die vergleichbaren Wildtyp-Zellen .....	45
4.1.6	Die pharmakologische Behandlung von THP-1-Makrophagen mildert die stimulatorische Wirkung auf Ben-Men-1-Zellen.....	46
4.1.7	Die stimulatorische Wirkung konditionierten Makrophagenmediums wird durch IL-1-Rezeptor-Antagonisten und IL-1 $\beta$ -Antikörper blockiert .....	47

4.1.8	Die Modulation der Ben-Men-1-Zellen ist in der Frühphase der Infektion Pneumolysin-abhängig .....	48
4.1.9	Auch in direkter Ko-Kultur ist die Fibroblastenaktivierung von der IL-1 $\beta$ -Freisetzung der Makrophagen abhängig.....	51
4.1.10	PCR-Untersuchungen ausgewählter Faktoren in Ben-Men-1-Zellen....	52
4.1.11	Überblick über das Spektrum freigesetzter Botenstoffe von Ben-Men-1-Zellen nach einer Behandlung mit konditioniertem Makrophagenmedium .....	53
4.2	Untersuchungen zur Interaktion von Immunzellen und primären humanen meningealen Zellen (HMC) sowie zerebralen Perizyten (HBVP).....	55
4.2.1	Interaktionsverhalten von HMC und THP-1-Makrophagen.....	55
4.2.2	PCR-Untersuchungen selektiver Faktoren in HMC .....	58
4.2.3	Antibody-Array-Untersuchungen zur Zytokinfreisetzung von HMC ....	59
4.2.4	Ergänzende Analysen zur IL-8- und CCL2-Freisetzung aus HMC in Folge einer Stimulation mit konditioniertem Makrophagenmedium.....	61
4.3	Perizyten (Human Brain Vascular Pericytes, HBVP) sind zur IL-1 $\beta$ -abhängigen Produktion von IL-6 fähig.....	65
4.4	Auch periphere mononukleäre Zellen (PBMC) können die Reaktivität meningealer Zellen bei einer Exposition mit Pneumokokken modulieren.....	67
5	Diskussion .....	69
5.1	Die Reaktion meningealer Zellen und Makrophagen auf eine Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	70
5.2	Die Modulation der Aktivität meningealer Zellen durch Makrophagen .....	72
5.3	Die Rolle des IL-1 $\beta$ bei der Modulation meningealer Zellen durch Makrophagen .....	74
5.4	Die Wirkung von Pneumolysin im zeitlichen Verlauf einer Infektion.....	78
5.5	Limitationen.....	80
5.6	Ausblick .....	80
6	Zusammenfassung .....	82
7	Summary.....	86
8	Danksagung .....	91
	Literaturverzeichnis .....	92

## Abstract (English)

### Macrophages guide the immune response of meningeal cells to *Streptococcus pneumoniae* exposure through IL-1 $\beta$ secretion

P. Beckenbauer<sup>1</sup>, S. Dyckhoff-Shen<sup>1</sup>, B. Angele<sup>1</sup>, M. Klein<sup>1</sup>, S. Hammerschmidt<sup>2</sup>, H.-W. Pfister<sup>1</sup>, U. Koedel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurology, Klinikum Grosshadern, Ludwig-Maximilians-University, <sup>2</sup> Department of Molecular Genetics and Infection Biology, Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics, University of Greifswald – Greifswald (Germany)

**Background:** Pneumococcal meningitis remains a life-threatening disease with a high mortality. Unfavorable courses are commonly the result of intracranial complications caused by the inflammatory reaction to pneumococcal infection. There is still uncertainty about the cellular sensors of pneumococcal infection in the meninges. Recently, we showed that meningeal cells respond to pneumococcal infection by releasing cytokines and that this response is enhanced upon direct contact with macrophages. Here, we investigated the impact of macrophages on meningeal cells in response to pneumococcal infection in more detail.

**Material and methods:** Benign-meningothelioma cells (Ben-Men-1) or primary human meningeal cells (HMC) were co-cultured with macrophages differentiated from THP-1 cells (with or without having direct contact) or with macrophage-conditioned media. Their reaction to *S. pneumoniae* was assessed using proteome profiler arrays and ELISAs. In order to obtain information about potential messenger molecules, macrophage-conditioned media were heat-treated or centrifuged over molecular weight cut-off filters. Moreover, supernatants from gene-deficient THP-1 cells and selected pharmacological inhibitors were assessed for their influence on the cytokine release by meningeal cells.

**Results:** When Ben-Men-1 or HMC were co-cultured with human THP-1 macrophages, we observed a dramatic increase in the release of cytokines such as IL-6 or IL-8. This phenomenon was found in both direct and indirect co-culture systems. The addition of supernatants from *S. pneumoniae*-stimulated THP-1 macrophages alone triggered a massive release of cytokines by meningeal cells. Heating of the supernatants or their centrifugation over molecular weight cut-off filters demonstrated that the trigger factor(s) must be heat-labile and between 3 kDa and 50 kDa in size. Conditioned media of ASC and NLRP3 KO THP-1 cells as well as the pharmacological blockade of NLRP3, caspase-

1, and IL-1 $\beta$  signaling were associated with reduced immune responses of human meningeal cells, suggesting involvement of the cytokine IL-1 $\beta$  in the guidance of meningeal cells by macrophages.

**Conclusion:** Our study suggests that macrophages are crucial in directing the meningeal cell response to pneumococcal infection of the leptomeninges by releasing IL-1 $\beta$ , which is known as an important inflammation regulator in pneumococcal meningitis.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Englische Übersetzung</b>	<b>Deutsche Übersetzung</b>
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (PYCARD)	-
CCL	CC-Chemokin-Ligand	-
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand	-
CFU	Colony forming unit	Koloniebildende Einheit
DAMP	Damage-associated molecular pattern	Schaden-assoziierte molekulare Muster
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	-
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetal bovine serum	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor	Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
HBVP	Human Brain Vascular Pericytes	Humane Hirnzellen des perivaskulären Raumes
HMC	Human Meningeal Cells	Humane Meningeale Zellen
HRP	Horse Radish Peroxidase	Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin	Interleukin
kDa	Kilodalton	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase	Laktatdehydrogenase
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor	Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor
MenCGS	Mesangial Cell Growth Supplement	-

MenCM	Meningeal Cell Medium	-
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells	Nukleärer Faktor κB
NLR	Nod-like Receptor	Nod-like Rezeptor
NLRP3	NLR family pyrin domain containing protein 3	-
P/S	Penicillin/Streptomycin	Penicillin/Streptomycin
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerase Kettenreaktion
PGS	Pericyte Growth Supplement	-
PLL	Poly-L-Lysine	Poly-L-Lysin
PLY	Pneumolysin	Pneumolysin
PM	Pericyte Medium	-
PMA	Phorbol 12-myristate-13-acetate	Phorbol 12-myristat-13-acetat
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	-
THY	Todd-Hewitt Broth	Todd-Hewitt Bouillon
TLR	Toll-like Receptor	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor necrosis factor	Tumornekrosefaktor
WT	Wild type	Wildtyp

# **1 Einleitung und Stand der Forschung**

## **1.1 Hintergrund**

Die Meningitis ist ein lebensbedrohliches Krankheitsbild, dem eine Infektion des Subarachnoidalraumes zugrunde liegt (van de Beek et al., 2016). Sie stellt laut Global Burden of Disease (GBD)-Bericht mit einer Inzidenz von weltweit 2,5 Mio. Erkrankungen im Jahr 2019 eine seltene, jedoch schwerwiegende und folgenreiche Erkrankung dar, deren Ätiologie hauptsächlich auf bakterielle oder virale Erreger zurückzuführen ist (Collaborators, 2023).

In entwickelten Ländern sind Pneumokokken zu etwa 70% für die bakterielle Meningitis beim erwachsenen Menschen verantwortlich (Bijlsma et al., 2016). Durch Fortschritte in der Entwicklung von Impfstoffen und dem Aufkommen neuer therapeutischer Ansätze ist die Pneumokokken-Meningitis zwar mit einer sinkenden Mortalität, jedoch weiterhin hohen Morbidität verbunden (Buchholz et al., 2016; Collaborators, 2023).

Während näherungsweise 18% der Patienten an einer Pneumokokken-Meningitis versterben (Collaborators, 2023), leidet ein Großteil der überlebenden Menschen langfristig an neurologischen Folgeerscheinungen, darunter Hörverlust, fokalneurologischen Defiziten, kognitiven Einschränkungen und Epilepsie (Kloek et al., 2020; Lucas et al., 2016). Ursächlich für diese neurologischen Beeinträchtigungen ist die Entstehung intrakranieller Komplikationen im Verlauf der Hirnhautentzündung. Diese können sich unter anderem in Form von ischämischen Schlaganfällen, intrakraniellen Hämorrhagien, diffusen Hirnödemen, Hirnabszessen oder Hydrozephalus manifestieren (Kastenbauer & Pfister, 2003; Legouy et al., 2024; Pfister et al., 1993).

Die Entstehung der Komplikationen ist vornehmlich Folge einer überschießenden körpereigenen Entzündungsreaktion, gekennzeichnet durch eine starke Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in den Liquorraum (Fassbender et al., 1997; Koedel et al., 2010a; van de Beek et al., 2021). Zum Verständnis der daraus resultierenden Folgen bedarf es einer genaueren Betrachtung der zu Grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen.

## 1.2 Pathophysiologie

Pneumokokken besiedeln zunächst asymptomatisch die Mukosa des menschlichen Nasopharynx, wobei die Prävalenz geografisch variiert und in Europa bei über 60-Jährigen etwa 3–5 % beträgt, während sie bei jüngeren Menschen, insbesondere Säuglingen, mit bis zu 60 % deutlich höher liegt (Almeida et al., 2014; Almeida et al., 2020; Bosch et al., 2016; Flamaing et al., 2010). Es wird angenommen, dass die Bakterien durch hämatogene Streuung bei einer anhaltenden Bakterämie, durch kontinuierliche Ausbreitung von Infektionsherden oder über Gewebedefekte infolge von Traumata oder Operationen in den Subarachnoidalraum gelangen (Koedel et al., 2010b; Lin et al., 2014; van de Beek et al., 2021). Der genaue Eintrittsort der Pneumokokken in das ZNS ist dabei weiterhin unbekannt; bei der hämatogenen Aussaat gelten postkapilläre Venolen und Venen des Subarachnoidalraumes als wahrscheinlich (Iovino et al., 2013).

Nach transzytotischer Überquerung der Blut-Hirn-Schranke durch Bindung von Oberflächenmolekülen der Pneumokokken an spezifische Rezeptoren des Endothels (Cundell et al., 1995), finden die Bakterien optimale Bedingungen vor, sich zu vermehren (Mook-Kanamori et al., 2011; van de Beek et al., 2021). Eine Polysaccharidkapsel schützt sie vor Opsonisierung und Phagozytose und ermöglicht ihnen, das Komplementsystem zu umgehen (Hyams et al., 2010). Daneben ist die Immunabwehr im Liquorraum eingeschränkt, was hauptsächlich durch die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke bedingt ist (J. V. Forrester et al., 2018; Klein & Hunter, 2017). Vor Ort sind Bestandteile der angeborenen und erworbenen Immunität, wie etwa Faktoren des Komplementsystems und Immunglobuline nur in vergleichsweise geringer Zahl vorhanden (Dujardin et al., 1985; Koedel, Scheld, et al., 2002; Pachter et al., 2003; Scheld, 1984; Simberkoff et al., 1980; Stahel et al., 1997). So ist beispielsweise die Menge der Komplementfaktoren C1q, C3 und C4 um das 200-400-fache im Vergleich zum Serum vermindert (Dujardin et al., 1985).

Wenn Pneumokokken im Liquorraum über längere Zeit in einer stationären Phase verbleiben, durchlaufen sie autolytische Prozesse (Martner et al., 2009). Während der Autolyse kommt es zur Freisetzung subkapsulärer Komponenten, darunter Lipoteichonsäure, Peptidoglykane, Pneumolysin (PLY) und bakterielle DNA sowie RNA (Chekrouni et al., 2024; Gerber et al., 2003; Hirst et al., 2004; Kinsella et al., 2022; Koedel, Scheld, et al., 2002; Martner et al., 2008; Schneider et al., 1999; Stuertz et al., 1999; Tuomanen et al., 1985; Wall et al., 2012). Diese Bestandteile werden von

Mustererkennungsrezeptoren antigenpräsentierender Zellen erkannt, worunter verschiedene membrangebundene Toll-like-Rezeptoren (TLR's) und zytosolische Nod-like-Rezeptoren (NLR's) fallen (Malley et al., 2003; Mook-Kanamori et al., 2011; Opitz et al., 2004; Yoshimura et al., 1999). In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass für die Erkennung von Pneumokokken bei einer ZNS-Infektion insbesondere TLR2 und TLR13 relevant sind (Dyckhoff-Shen et al., 2024; Klein et al., 2008; van de Beek et al., 2016; van de Beek et al., 2021).

Die Aktivierung von TLR's und NLR's führt über eine intrazelluläre Kaskade zu einer von dem Transkriptionsfaktor Nuclear factor kappa B (NF-κB) abhängigen Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (T. Liu et al., 2017; Tsuchiya et al., 2007). Hierzu wurden in tierexperimentellen Untersuchungen zeitabhängig, insbesondere in der Frühphase auftretende inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  beschrieben (Barichello et al., 2010; Koedel, Scheld, et al., 2002; van Furth et al., 1996). IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  bewirken eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen des vaskulären Endothels, welche die Rekrutierung polymorphkerniger Leukozyten über die Blut-Hirn-Schranke in den Liquorraum fördern (Fassbender et al., 1997). Diese tragen durch ihre Produktion von Stickstoffmonoxid, reaktiven Sauerstoffspezies und Matrixmetalloproteasen zur umliegenden Gewebsschädigung und der Entstehung intrakranieller Komplikationen bei (Koedel et al., 1995; Koedel & Pfister, 1997; Leppert et al., 2000; Paul et al., 1998).

Die Destruktion zerebraler Gefäße im Rahmen der meningealen Inflammation scheint dabei hauptsächlich für die Schädigung des Gehirns verantwortlich zu sein, da der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke die Entstehung eines Hirnödems bewirkt (Engelen-Lee et al., 2016). Zudem führt die Verengung der Gefäßlumina durch entzündliche perivaskuläre Infiltrate sowie Vasospasmen zu Infarkten und Hämorrhagien (Engelen-Lee et al., 2016).

Die pathophysiologischen Abläufe verdeutlichen, dass die schweren Komplikationen einer Pneumokokken-Meningitis in erster Linie nicht auf eine direkte Schädigung durch das bakterielle Pathogen, sondern insbesondere auf eine überschießende Antwort des Immunsystems zurückzuführen sind. Hierbei spielen, wie oben beschrieben, Zytokine eine entscheidende Rolle, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

### **1.3 Die Rolle von Zytokinen bei bakteriellen Hirnhautentzündungen**

Zytokine sind Botenstoffe, die durch Regulation von immunologischen und inflammatorischen Prozessen an zahlreichen biologischen Vorgängen des menschlichen Organismus beteiligt sind (Dinarello, 2000, 2007).

Sie beinhalten die Interleukine, Chemokine, Interferone und viele weitere Signalmoleküle (Dinarello, 2007). Eine wichtige Stellung in der Immunantwort auf eine bakterielle Meningitis nehmen die Zytokine IL-6, C-X-C motif chemokine ligand (CXCL)-8 (IL-8), IL-10, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  ein (Kalchev et al., 2023; Leib & Tauber, 1999; Muller et al., 2021). Sie sind im Liquor von Patienten mit schwerer bakterieller Meningitis vermehrt nachweisbar (Kalchev et al., 2023; Perdomo-Celis et al., 2015).

IL-6 werden diverse wichtige biologische Eigenschaften zugeschrieben (Grebenciuova & VanHaerents, 2023; Kishimoto et al., 1992). Es bewirkt die Produktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber durch Hepatozyten (Andus et al., 1987; Castell et al., 1988; Gauldie et al., 1987) und dient als Differenzierungsfaktor für Immunzellen sowie als Wachstumsfaktor für Zellen des hämatopoetischen Systems (Miyaura et al., 1988; Shabo et al., 1988). Als Quelle des Zytokins gelten neben Monozyten bzw. Makrophagen auch Fibroblasten, Endothelzellen, B-Lymphozyten und viele weitere Zellpopulationen (Akira et al., 1993; Krauss et al., 2021; Linge et al., 2022; Nguyen et al., 2017; Podor et al., 1989; Wolvekamp & Marquet, 1990).

Im ZNS wird IL-6 von einer großen Anzahl an Zellen, darunter Neuronen, Astrozyten und Mikroglia produziert (Ertan et al., 2015; Gadiant & Otten, 1997; Marz et al., 1998; Sebire et al., 1993). Die Expression des Zytokins ist bei zahlreichen ZNS-Erkrankungen verändert, darunter Morbus Alzheimer (Lyra et al., 2021), Multipler Sklerose (Frei et al., 1991), Morbus Parkinson (Diaz et al., 2022) und Chorea Huntington (Eide et al., 2023). Ferner wurden schon vor vielen Jahren erhöhte Konzentrationen von IL-6 im Liquor von Patienten mit bakterieller Meningitis insbesondere in der Frühphase der Erkrankung gefunden (Houssiau et al., 1988; Waage et al., 1989).

IL-6 besitzt neben proinflammatorischen auch antiinflammatorische Eigenschaften (Gadiant & Patterson, 1999; Paul et al., 2003; Scheller et al., 2011). Der intravenöse Einsatz eines IL-6-Antikörpers führte in einem Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis nach 6 Stunden zu einer Verminderung der Leukozyten und des Proteingehalts im ZNS (Marby et al., 2001). Weiterhin zeigten IL-6-defiziente Mäuse nach intrathekaler Injektion von Bakterien eine deutlich reduzierte vaskuläre Permeabilität, ein geringeres

Hirnödem und verminderten intrakraniellen Druck im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen (Paul et al., 2003). Demgegenüber wiesen IL-6-defiziente Mäuse eine signifikante Erhöhung der Leukozytenzahl auf (Paul et al., 2003). Zudem führte IL-6 zu einer verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine, darunter IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Aderka et al., 1989; Schindler et al., 1990). Dies konnte in einem in-vivo-Modell der Pneumokokken-Pneumonie bestätigt werden, da bei IL-6-defizienten Mäusen nach einer pulmonalen Infektion mit Pneumokokken diverse proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine herunterreguliert wurden (van der Poll et al., 1997).

Dem Zytokin IL-1 $\beta$  werden hauptsächlich proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (Dinarello, 1998b). Als primäre Quelle des IL-1 $\beta$  gelten Monozyten und Gewebsmakrophagen, nicht jedoch Fibroblasten und Epithelzellen (Dinarello, 2009). Es ist bei vielen Erkrankungen entscheidend an der Entstehung lokaler und systemischer Entzündungsreaktionen beteiligt (Dinarello, 2009). So führte bereits die intrazisternale Injektion von rekombinantem IL-1 $\beta$  durch Invasion von neutrophilen Granulozyten in den Subarachnoidalraum und Erhöhung der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität zum klinischen Bild einer Meningitis bei Ratten (Quagliarello et al., 1991).

Die Signalwirkung des IL-1 $\beta$  wird über den zugehörigen Rezeptor IL-1R vermittelt (Dinarello, 2018). Zwijnenburg et al. (2003) untersuchten die Funktion von endogenem IL-1 in einem Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis und stellten fest, dass IL-1R-defiziente-Mäuse nach intranasaler Gabe von Pneumokokken eine beeinträchtigte Abwehrreaktion und ein geringeres Überleben zeigten. Hoegen et al. (2011) zeigten in einem Mausmodell, in dem eine Meningitis durch intrazisternale Bakterieninjektion ausgelöst wurde, dass die IL-1-Rezeptorblockade bei Mäusen zu einer Verminderung der meningeal Inflammation und Senkung des intrakraniellen Drucks führte. In diesen beiden Untersuchungen wurden die Mäuse nicht antimikrobiell behandelt (Hoegen et al., 2011; Zwijnenburg et al., 2003). Demgegenüber führte der Einsatz eines IL-1 $\beta$ -Antikörpers in einem kliniknahen Mausmodell mit Einsatz von Antibiotika zu keiner signifikanten Absenkung der Entzündungsreaktion im Liquor (Klein et al., 2019).

Chemokine bilden einen wichtigen Bestandteil der Homöostase des Immunsystems und sind für die Migration weißer Blutkörperchen relevant (Cardona et al., 2008; Hughes & Nibbs, 2018). IL-8 erweist sich dabei als wichtiger chemotaktischer Mediator in der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei der bakteriellen Meningitis (Dumont et al., 2000; Ostergaard et al., 2000; Spanaus et al., 1997; Woehrl et al., 2011). Nach Auslösen

einer Pneumokokken-Meningitis bei Hasen konnten Ostergaard et al. (2000) zeigen, dass die Behandlung mit einem IL-8-Antikörper zu einer erniedrigten neutrophilen Pleozytose im Liquor führte.

Ebenso von Bedeutung ist das Chemokin CC-Chemokin-Ligand (CCL) 2, auch bekannt als Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), dessen Expression bei bakteriellen Meningitiden erhöht ist (Kastenbauer et al., 2005; Moller et al., 2005; Spanaus et al., 1997). Es fungiert als potenter Botenstoff zur Rekrutierung von Monozyten und wird von den meisten Zellen des ZNS exprimiert, darunter Neuronen, Astrozyten und Mikroglia (Orchianian et al., 2024; Rock et al., 2006; Yao & Tsirka, 2014). Ferner wird CCL2 von Fibroblasten produziert (Yoshimura & Leonard, 1990). In einem Modell mit Meningozenellen konnte eine positive Korrelation zwischen der Menge an exprimiertem CCL2 und dem Grad der Makrophageninfiltration gefunden werden (Sato et al., 1995). Die genaue Wirkung des Chemokins auf Zellen des ZNS ist Gegenstand aktueller Forschung. Es wird angenommen, dass CCL2 einen kompromittierenden Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke hat (Yao & Tsirka, 2014).

Diverse Studien haben in der Vergangenheit die oben beschriebene Bedeutung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen herausstellen können (Dinarello et al., 2012). Im folgenden Abschnitt wird die Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion durch das NLRP3-Inflammasom näher beleuchtet.

## **1.4 Die Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion durch das NLRP3-Inflammasom**

Die Produktion des Zytokins IL-1 $\beta$  unterliegt unter anderem einer Steuerung durch das sogenannte NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3)-Inflammasom, auch bekannt als NALP3/cryopyrin/CIAS1 (Agostini et al., 2004; Bauernfeind et al., 2009; Paik et al., 2021). Dieses setzt sich aus dem Sensor NLRP3, dem Adapterprotein Apoptosis-Associated Speck-like Protein containing a CARD (ASC) und dem Enzym Caspase-1 zusammen (Agostini et al., 2004).

Inflammasome sind Multiproteinkomplexe des angeborenen Immunsystems, welche von Makrophagen zur Abwehr mikrobieller Erreger gebildet werden und die Immunantwort kontrollieren (Broz & Dixit, 2016; Franchi et al., 2012). Die Multiproteinkomplexe werden dazu benötigt, Caspase-1 zu aktivieren, welches die NF- $\kappa$ B-abhängig produzierten Vorstufen der IL-1-Familien-Zytokine, pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18, in ihre

aktive Form umwandelt (Barker et al., 2011). Das Adapterprotein ASC ist entscheidend an der Rekrutierung der Caspase-1 beteiligt, in dem es als Verknüpfungsstelle zwischen NLRP3 und Pro-Caspase-1 fungiert (Schroder et al., 2010; Srinivasula et al., 2002). Die Bildung des NLRP3-Inflammasoms setzt zwei Schritte voraus, die als Priming und Aktivierung bezeichnet werden (Kelley et al., 2019). Das Priming benennt die NF-κB abhängige Transkription von proIL-1 $\beta$  und Komponenten des NLRP3-Inflammasoms über die Erkennung von Pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMP's) und Schaden-assoziierten molekularen Mustern (DAMP's) durch TLR's und NLR's (Bauernfeind et al., 2009). Auch die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  selbst können durch Bindung an ihre Rezeptoren TNFR1/2 und IL-1R Teil des Priming-Prozesses sein (Franchi et al., 2009; Kuno & Matsushima, 1994). Um biologisch aktiv zu werden, muss proIL-1 $\beta$  nach der Synthese durch das Enzym Caspase-1 proteolytisch zu IL-1 $\beta$  gespalten werden (Black et al., 1988; Dinarello, 1998a; Thornberry et al., 1992). Dies geschieht in dem zweiten Schritt, der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, durch eine Reihe unterschiedlichster Stimuli, darunter bakterielle und virale PAMP's sowie körpereigene und -fremde DAMP's (Bauernfeind et al., 2009; Martinon et al., 2009; Swanson et al., 2019). Auch mikrobielle Toxine wie z.B. das von Pneumokokken produzierte Zytolysin PLY können zu einer Caspase-1 bzw. NLRP3-abhängigen Produktion von IL-1 $\beta$  beitragen (Karmakar et al., 2015; McNeela et al., 2010). Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der Pneumokokken-Meningitis konnte in Studien herausgestellt werden, in denen ASC- und NLRP3-defiziente Mäuse nach Infektion mit Pneumokokken eine verminderte Immunreaktion und einen besseren klinischen sowie histologischen Score gegenüber den Wildtyp-Tieren aufwiesen (Geldhoff et al., 2013; Hoegen et al., 2011). Der Einsatz eines pharmakologischen NLRP3-Inhibitors MCC950 entfaltete im Tiermodell neuroprotektive Wirkung, in dem es die Entzündungsreaktion milderte und Verhaltensdefizite der mit Pneumokokken infizierten Tiere reduzierte (Generoso et al., 2023).

Ungeachtet oben beschriebener Funktionen des NLRP3-Inflammasoms waren zu Beginn dieses Forschungsvorhabens noch Fragen zu der Beteiligung des Proteinkomplexes an der Interaktion von meningealen Zellen und Makrophagen klärungsbedürftig. Die bisher bekannten Daten zur Wechselwirkung der Zellen werden im nächsten Abschnitt dargestellt.

## **1.5 Der Stellenwert (lepto-)meningealer Zellen und Makrophagen in der Pathogenese der Pneumokokken-Meningitis**

Die Meningen beherbergen eine Vielzahl unterschiedlicher Zellpopulationen, darunter mehrheitlich Fibroblasten, im Folgenden „meningeale Zellen“ genannt (Derk et al., 2021). Meningeale Zellen bilden zusammen mit Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen die Blut-Hirn-Schranke und schaffen eine Barriere, die das ZNS vor schädigender Einwirkung schützt (Royer et al., 2013). Sie sind die Hauptquelle für Proteine der Basalmembran (DeSisto et al., 2020). Während die Rolle von Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten in der Pathogenese bakterieller Meningitiden überwiegend charakterisiert wurde, ist der Stellenwert meningealer Zellen bisher weitgehend unbekannt (Derk et al., 2021). Es wird angenommen, dass sie durch die frühe Produktion von Zytokinen und Chemokinen eine protektive Rolle in der angeborenen Immunreaktion auf Infektionen des Subarachnoidalraumes einnehmen (Christodoulides et al., 2002; Wells et al., 2001). Hardy et al. (2000) untersuchten erstmalig die Interaktion von meningealen Zellen und *Neisseria meningitidis* (Meningokokken). In ihren Untersuchungen zeigten die Autoren, dass Meningokokken bei Inkubation menschlichen Hirnparenchyms mit intakter Leptomeninx spezifisch an meningealen Zellen adhärierten (Hardy et al., 2000).

In einer anderen Untersuchung konnte beobachtet werden, dass bei Stimulation meningealer Zellen mit Meningokokken große Mengen an Zytokinen, darunter insbesondere das Zytokin IL-6, produziert werden (Christodoulides et al., 2002). Die bei bakteriellen Meningitiden ebenso relevanten Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  waren indes nicht messbar erhöht (Christodoulides et al., 2002). Fowler et al. (2004) berichteten über das Adhäsions- und Invasionsverhalten unterschiedlicher Pathogene zur Wirtszelle sowie über die Produktion ausgewählter Zytokine im zeitlichen Verlauf einer Infektion: Meningeale Zellen wurden in-vitro unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Bakterien ( $1 \cdot 10^1$  -  $1 \cdot 10^8$  Colony forming units/ml (CFU/ml)) ausgesetzt (Fowler et al., 2004). *Streptococcus pneumoniae* (SP) zeigte verglichen mit Erregern wie *Neisseria meningitidis* und *Escherichia coli* nur eine geringe Adhäsionstendenz und keine Invasion der Wirtszellen (Fowler et al., 2004). Dies gibt zu der Vermutung Anlass, dass humorale Pathomechanismen der Pneumokokken von größerer Bedeutung in der Beeinflussung der Wirtszelle sind als die direkte Adhärenz. Ihre Experimente zeigten ferner, dass eine Pneumokokkenkonzentration von  $\leq 10^8$  CFU/ml zu keiner signifikanten Produktion

proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, darunter IL-6, IL-8, CCL2, CCL5 und dem Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierenden Faktor (GM-CSF), von meningealen Zellen führte, die höchste Bakterienkonzentration jedoch einen signifikanten meningealen Zelluntergang auslöste (Fowler et al., 2004).

Makrophagen spielen, wie bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben, eine wichtige Rolle in der Beeinflussung der Immunreaktion bakterieller Meningitiden. In experimentellen Versuchen führte die Behandlung von monozytären Zellen mit kapsulären Bestandteilen von Pneumokokken zu einer gesteigerten Freisetzung von Zytokinen, darunter IL-1 und TNF- $\alpha$  (Heumann et al., 1994; Riesenfeld-Orn et al., 1989). Ebenso konnte in in-vivo-Versuchen die Relevanz von Monozyten bzw. Makrophagen in der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten herausgestellt werden (Zysk et al., 1997). Die systemische Gabe von Clodronat-Liposomen, die eine Elimination mononukleärer Blutzellen verursachte, ging mit einer verminderten Produktion von IL-1 $\beta$  und einem reduzierten Einstrom von Leukozyten in den Liquorraum einher (Zysk et al., 1997). Eine Verringerung meningealer und perivaskulärer Makrophagen durch eine intrathekale Gabe von Clodronat-Liposomen führte zudem in einem Rattenmodell der experimentellen Pneumokokken-Meningitis zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufs und höheren bakteriellen Konzentrationen im Liquor (Polfliet et al., 2001).

Trotz isolierter Betrachtung der Reaktionen beider Zellpopulationen auf eine Pneumokokkeninfektion bestehen bisher wenige Erkenntnisse zur wechselseitigen Interaktion von meningealen und monozytären Zellen bei der Pneumokokken-Meningitis. Im folgenden Kapitel sollen die bisherigen Erkenntnisse zum Interaktionsverhalten von Fibroblasten unterschiedlicher peripherer Gewebe mit Monozyten bzw. Makrophagen beleuchtet werden.

## **1.6 Die Interaktionen von peripheren Fibroblasten und Makrophagen**

In verschiedenen Krankheitsbildern, darunter insbesondere bei der Rheumatoide Arthritis, wurden humorale Makrophagen-Fibroblasteninteraktionen bereits untersucht (Blasioli et al., 2014; Chen et al., 1998; Watanabe et al., 2017).

Experimente von Chen et al. (1998) zeigten, dass Fibroblasten-artige Synoviozyten in Ko-Kultur mit monozytären U937-Zellen im Vergleich zur Monokultur die vierfache Menge des Zytokins IL-6 produzieren. Das beobachtete Phänomen konnte überdies mit primären Zellen, sog. peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), und synovialen

Fibroblasten reproduziert werden (Watanabe et al., 2017). Auch in Studien zu Fremdkörperreaktionen wurden ähnliche Beobachtungen verzeichnet (Holt et al., 2010; Lind et al., 1998). Holt et al. (2010) untersuchten die parakrinen und juxtakrinen Sekretionsmuster von Fibroblasten und sekundären Makrophagen in direkter und indirekter Ko-Kultur und stellten fest, dass bei gemeinsamer Kultivierung signifikant mehr IL-6 und CCL2 als in Monokultur zu messen war.

Während die Forschung zur Pneumokokken-Meningitis in den letzten Jahren intensiv zur Identifizierung molekularer Mechanismen der Immunaktivierung und -regulation beigetragen hat, sind die in diesen Prozessen beteiligten Zell-Zell-Interaktionen noch nicht ausreichend geklärt. Daher werfen sich die im Folgenden erläuterten Fragestellungen auf.

## 2 Fragestellung und Hypothesen

In ersten Untersuchungen konnte die Arbeitsgruppe Neuroinfektiologie der LMU zeigen, dass neben Immunzellen auch meningeale Zellen zu einer Immunantwort im Rahmen einer Pneumokokkeninfektion fähig sind (Ercegovac, 2024). Es wurde beobachtet, dass leptomeningeale Zellen eine Reihe proinflammatorischer Zytokine produzieren, insbesondere IL-6 und IL-8 (Ercegovac, 2024). Weiterführend zeigten Pilotversuche der Arbeitsgruppe, dass die Produktion dieser Zytokine durch Ben-Men-1-Meningeoma-Zellen entscheidend durch die Anwesenheit von Makrophagen (THP-1) gesteigert werden kann (Ercegovac, 2024).

In der vorgelegten Dissertation sollte der Fokus auf die Interaktion von meningealen Zellen mit Makrophagen bei einer Pneumokokkeninfektion gerichtet werden. Hierbei sollten folgende Fragestellungen adressiert werden:

1. Ist für die Modulation der meningealen Zellen durch Makrophagen ein direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig oder wird die verstärkte Aktivierung durch Botenstoffe über das Medium vermittelt?
2. Welche Botenstoffe, die die Makrophagen bei einer Pneumokokkeninfektion produzieren, sind für diesen Prozess verantwortlich?

Zur Beantwortung der Fragestellungen sollten Ko-Kultur-Systeme, Transwell-Systeme und konditioniertes Medium von Makrophagen verwendet werden. Zur Charakterisierung des „Verstärkungsmechanismus“ und Identifikation verantwortlicher Botenstoffe sollten Untersuchungen mit ausgewählten Gen-defizienten Zelllinien sowie selektiven pharmakologischen Hemmstoffen durchgeführt werden.

ELISA, RT-PCR und selektive Zytokin-Antikörper-Assays sollten zur Quantifizierung und Qualifizierung der produzierten Zytokine und Chemokine verwendet werden. Ferner sollte in Zusatzuntersuchungen überprüft werden, ob die mit Zelllinien erhobenen Befunde auf primäre humane Zellen (Meningeale Zellen, Peripherie mononukleäre Blutzellen) zu übertragen sind. Schließlich sollten erste Versuche zum Reaktionsvermögen weiterer Zellen des ZNS, namentlich Perizyten (HBVP), die Arbeit komplettieren.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Zellkulturmedien, Reagenzien, Chemikalien und Immunglobuline

<u>Material</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Accutase®-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (high glucose)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Endotoxin-freies Wasser	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Bovines Serum Albumin (FBS)	ScienCell Research Laboratories, San Diego, USA
Fetales Bovines Serum Albumin (FBS)	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MenCM – Meningeal Cell Medium	ScienCell Research Laboratories, San Diego, USA
Meningeal Cell Growth Supplement (MenCGS)	ScienCell Research Laboratories, San Diego, USA
MP Biomedicals™ Histopaque™ 1077-Lösung	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S)	ScienCell Research Laboratories, San Diego, USA
Pericyte Growth Supplement (PGS)	ScienCell Research Laboratories, San Diego, USA
Pericyte Medium (PM)	ScienCell Research Laboratories, San Diego, USA
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Poly-L-Lysin 1 mg/ml	ScienCell Research Laboratories, San Diego, USA
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Triton Lysis Buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblaue Lösung, 0,4%	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin Neutralization Solution (TNS)	ScienCell Research Laboratories, San Diego, USA
Trypsin-EDTA-Solution, 0,25%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA Solution, 0,05%	ScienCell Research Laboratories, San Diego, USA

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

<u>Material</u>	<u>Bezugsquelle</u>
24-Well Zellkulturplatte	Corning, Corning, USA
3kDa Filter Amicon® Ultra-0,5, Membrane Ultracel-3, PMNL 3 kD	Merck, Darmstadt, Deutschland
50kDa Filter Amicon® Ultra-0,5, Membrane Ultracel-50, PMNL 50 kD	Merck, Darmstadt, Deutschland
96-Well V-Profil Mikrotiterplatte	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
96-Well Zellkulturplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Menzel-Deckgläser 20×26 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Glas Pasteur Pipette	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl Arbeitsvolumen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 5ml und 10 ml Arbeitsvolumen	Corning, Corning, USA
Polycarbonat-Zellkultureinsätze in Multi-Well-Platten	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Verschlussfolie Mikrotiterplatte	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen 25cm <sup>2</sup> und 75cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Zellschaber	Falcon by Corning, Corning, USA
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Falcon by Corning, Corning, USA
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 3.1.3 Kits

<u>Material</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Aurum™ Total RNA Mini Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human CCL2/MCP-1 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human Cytokine Array C3	RayBiotech Life, Peachtree Corners, USA
Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
PrimePCR™-Primer (qHsaCED0043611, qHsaCED0002181, qHsaCID0007202, qHsaCID0013272, qHsaCID0022272, qHsaCED0044677, qHsaCIP0027424)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

### 3.1.4 Technische Geräte

<u>Material / Gerät</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Autoklav	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland

Einkanal-Mikroliterpipette 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 50-250 µl und 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektronische Pipettierhilfe Easypet 3	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mehrfachdispenser Multipette®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mehrkanal-Mikroliterpipette Transferpette® 5-50 µl und 20-200 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikroplatten-Reader Tristar LB 941	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskop Leitz DM IL	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrozentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Real-Time rapid PCR Thermocycler qTower3	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tube-Rack für Falcon Zentrifugenröhrchen	Brand, Wertheim, Deutschland
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge™ 8R	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge Hermle Z 360 K	Hermle, Gosheim, Deutschland

### 3.1.5 Chemikalien und Immunglobuline

<u>Substanz</u>	<u>CAS-Nummer / Hersteller</u>
Anti-hIL-1β-IgG	Invivogen, Deutschland

Caspase-1 und Caspase 4-Inhibitor VX-765, Belnacasan (C24H33ClN4O6)	273404-37-8
Dimethylsulfoxid (C2H6OS)	67-68-5
Human IL-1 Receptor-Antagonist	143090-92-0
Mouse IgG1 Control	Invivogen, Deutschland
NLRP3-Inhibitor, MCC950 (C20H23N2O5S · Na)	256373-96-3
Phorbol-12-myristat-13-acetat (C36H56O8)	16561-29-8

### 3.1.6 Software

GraphPad Prism Version 10.3.1	GraphPad Software, Inc, San Diego, USA
ImageJ	National Institutes of Health (NIH), USA
MikroWin 2000	Labsis Laborsysteme GmbH, Neunkirchen-Seelscheid, Deutschland

### 3.1.7 Zellen

Ben-Men-1	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland
HBVP	ScienCell Research Laboratories (über Zwischenhändler ProVitro, Berlin; #1200)
HMC	ScienCell Research Laboratories (über Zwischenhändler ProVitro, Berlin; #1400)
PBMC	Probanden, (Ethikvotum AZ 18-717)
THP-1	European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), Porton Down, Salisbury, Vereiniges Königreich

## **3.2 Verwendete Zellpopulationen**

### **3.2.1 Ben-Men-1-Zelllinie**

Die Ben-Men-1-Zelllinie wurde im Jahr 2005 erstmalig von Püttmann et al. beschrieben. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um durch retrovirale Transduktion mit humarer Telomerase Reverse Transkriptase immortalisierte, weitgehend differenzierte Meningeomzellen (Puttmann et al., 2005). Die Zellen stammen ursprünglich aus einem Tumorresektat eines meningotheelialen Meningeom (Grad I, WHO, #1238-03) und gelten als ein geeignetes Modell für Untersuchungen zum Verhalten gutartiger Meningome und meningealer Zellen (Puttmann et al., 2005). Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig bezogen (DSZM-Nr.: 599).

### **3.2.2 Primäre Meningeale Zellen (Human Meningeal Cells, HMC)**

Um zu überprüfen, ob die mit der Zelllinie Ben-Men-1 erhobenen Befunde auch für primäre meningeale Zellen des Menschen zutreffen, wurden ergänzende Experimente an primären meningealen Zellen durchgeführt. Die humanen meningealen Zellen (HMC) wurden von der Firma ScienCell (bzw. dessen deutschen Zwischenhändler ProVitro, Berlin; #1400) bezogen. Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um kommerziell erhältliche, primäre, aus der Leptomeninx isolierte Zellen, die gemäß den Herstellerangaben bis zu 15 Populationsverdopplungen pro kryokonserviertem Röhrchen ( $>5 \cdot 10^5$  Zellen/ml) durchlaufen können (<https://sciencellonline.com/PS/1400.pdf>). Unter Berücksichtigung der Herstellerprotokolle konnten in diesen Versuchen 5-7 Passagen (Subkultivierungen) erzielt werden, wobei zwei unterschiedliche Chargennummern der Zellen verwendet wurden.

### **3.2.3 Perizyten (Human Brain Vascular Pericytes, HBVP)**

Perizyten sind murale Zellen, die an der Außenwand von Kapillaren oder postkapillären Venolen zu finden sind und als integraler Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke gelten (Brown et al., 2019; Fu et al., 2023; Girolamo et al., 2022; Li & Fan, 2023). Der Zellpopulation wird eine protektive Funktion in der Immunabwehr gegenüber Pneumokokken zugeschrieben (Teske et al., 2023). Bei den verwendeten HBVP handelt es sich um kommerziell erhältliche, aus humanem Hirngewebe isolierte Perizyten, die

von der Firma ScienCell (bzw. dessen deutschen Zwischenhändler ProVitro, Berlin; #1200) erworben wurden. Unter den von ScienCell bereitgestellten Bedingungen sind sie für 15 Populationverdopplungen expandierbar.

### 3.2.4 THP-1 Zelllinie

Die THP-1-Zelllinie ist eine humane leukämische Zelllinie, die 1980 von Tsuchiya et al. beschrieben wurde. Die Tumorzellen wurden aus dem Blut eines pädiatrischen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie isoliert und wiesen bei Erstbeschreibung distinkte monozytische Marker auf (Tsuchiya et al., 1980). THP-1-Zellen werden schon seit längerer Zeit weltweit in der Forschung zur Untersuchung der Funktion humaner Monozyten und Makrophagen eingesetzt (Daigneault et al., 2010; M. A. Forrester et al., 2018; Mohd Yasin et al., 2022). Die Differenzierung der THP-1-Monozyten zu THP-1-Makrophagen kann über Phorbol 12-myristat-13-acetat (PMA), Vitamin D-3 oder den Makrophagenkolonien-stimulierenden Faktor (M-CSF) erfolgen (Chanput et al., 2014). WT-THP-1-Makrophagen und deren TLR2-, ASC- und NLRP3-defiziente Zellen wurden uns dankenswerterweise vom Gene Center Munich (AG Professor Dr. Veit Hornung) zur Verfügung gestellt bzw. von der Firma Invivogen bezogen.

### 3.2.5 Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)

Die mit THP-1-Makrophagen gewonnenen Erkenntnisse sollten mit Experimenten an peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) überprüft werden. Dazu wurden gesunden Probandinnen und Probanden mit Zustimmung der Ethikkommission (Ethikvotum AZ 18-717) Blutproben entnommen und daraus Immunzellen für anschließende Stimulationsversuche gewonnen.

## 3.3 Verwendete Bakterien

Für die Stimulationsversuche wurden *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) (SP)-Bakterien sowie eine isogene PLY-defiziente ( $\Delta$ PLY-Stamm) Mutante von D39 (D39  $\Delta$ PLY) von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt (Department of Molecular Genetics and Infection Biology, Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics, University of Greifswald – Greifswald, Germany) verwendet.

## **3.4 Zellkultur**

### **3.4.1 Direktes Ko-Kultur-System (Einkammer-System)**

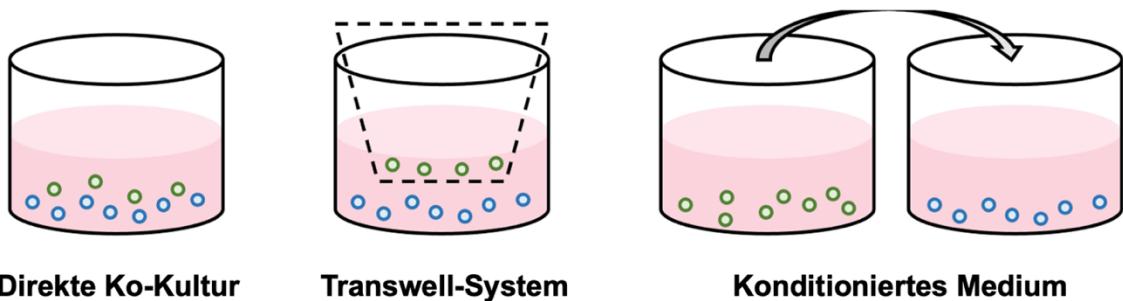
Im direkten Ko-Kultur-System sollen die gegenseitigen Wechselwirkungen von Zellpopulationen bzw. die Wirkung eines Zelltyps auf den anderen untersucht werden. Eine direkte Zell-Zell-Interaktion ist möglich. Im verwendeten Modell wurden 24-Well-Zellkulturplatten für die direkte Ko-Kultur verwendet. Der Versuchsablauf des verwendeten Modells wird in Kapitel 3.6.1 detailliert beschrieben.

### **3.4.2 Indirektes Ko-Kultur-System (Transwell-System)**

Das indirekte Ko-Kultur-System besitzt zwei unterschiedliche Kompartimente, in denen die Zellen getrennt durch einen Filter in gleichem Milieu gemeinsam kultiviert werden. Die Porengröße der Filter lässt nur einen begrenzten Austausch, insbesondere von löslichen Stoffen durch das Medium zu. Es wurden ebenfalls 24-Well-Zellkulturplatten verwendet und Polycarbonat-Zellkultureinsätze der Porengröße 3µm eingesetzt. Der Versuchsablauf des verwendeten Modells wird in Kapitel 3.6.1 detailliert beschrieben.

### **3.4.3 Konditioniertes Medium**

Konditioniertes Medium wurde verwendet, um die Auswirkung löslicher Komponenten eines Zellkulturüberstandes eines Zelltyps auf einen anderen Zelltyp zu untersuchen. Hierbei wurde ein Zelltyp in einem ersten Versuch mit Pneumokokken stimuliert und der Überstand nach Zentrifugation gewonnen. Im zweiten Teil wurde der Überstand in einem definierten Verhältnis zum Kulturmedium zur Stimulation der zweiten Zellpopulation eingesetzt. Die Versuchsanordnung sah eine Herstellung der Überstände im 24-Well-System vor; diese wurden anschließend für Stimulationsversuche in 96-Well-Zellkulturplatten verwendet. Der Versuchsablauf des verwendeten Modells wird in Kapitel 3.6.2 detailliert beschrieben.



**Direkte Ko-Kultur      Transwell-System      Konditioniertes Medium**

**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in 96-/24-Well-Zellkultur-Systemen.** Ben-Men-1-Zellen / HMC (blau) und THP-1-Makrophagen / PBMC (grün) wurden in drei unterschiedlichen Versuchsansätzen stimuliert und der Zellkulturerhalt zur weiteren Analyse herangezogen.

### 3.5 Erhalt und Vorbereitung der Zellkulturen

Ben-Men-1-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose), angereichert mit 10% fetalem bovinen Serum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S)-Lösung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator unter sterilen Bedingungen bebrütet und fortlaufend nach jeweils einer Woche gesplittet (passagiert). Zur Dissoziation der adhärenten Zellen wurden die Flaschen zweifach mit 10 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gespült und in 5 ml 0,05%-iger Trypsin-Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)-PBS-Lösung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen der Zellkulturflasche entnommen, mit 5 ml DMEM in einem 50 ml Falcon resuspendiert und eine Vitalitätsbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl Trypanblau-Lösung vermischt, 20 µl in eine Fuchs-Rosenthal Kammer verbracht und die Zellen unter einem Phasenkontrastmikroskop gezählt. Neben der Unterscheidung vitaler und nicht vitaler Zellen konnte somit eine Quantifizierung der Zellen vorgenommen werden.

Die Ermittlung der Zellzahl Z erfolgte anhand nachstehender Formel:

$$Z = (Z_a * V_f * 1000) / (F_a * \text{Kammertiefe [mm]})$$

Z = Anzahl Zellen pro ml Medium; Za = Anzahl gezählter Zellen;

Vf = Verdünnungsfaktor; Fa = ausgezählte Fläche [mm]

Anschließend wurde eine Konzentration von 0,6\*10<sup>5</sup> Zellen/ml Medium eingestellt und 25 ml in eine sterile 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Ein Mediumwechsel mit DMEM erfolgte jeweils ein Mal pro Woche freitags.

Ein Teil der Ben-Men-1-Zellen (0,6\*10<sup>5</sup> Zellen/ml) wurde zu Beginn einer Woche in Poly-L-Lysin (PLL)-beschichtete Zellkulturflaschen mit modifiziertem Meningeal Cell-

Medium (MenCM) mit 2% FBS, 1% Meningeal Cell Growth Supplement (MenCGS) und 1% P/S verbracht. Die Flaschen wurden zuvor mit 10 ml Endotoxin-freiem Wasser und 150 µl PLL gefüllt und eine Stunde lang bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Ein Mediumwechsel wurde ebenfalls einmal pro Woche freitags durchgeführt.

Die THP-1-Monozyten wurden zum Erhalt in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640-Medium, 10% FBS und 1% P/S bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bebrütet und zweimal pro Woche geteilt. Wegen fehlender Adhärenz wurden die Zellen lediglich zentrifugiert, mit neuem Medium versehen und anschließend in definierter Zellzahl von 0,4\*10<sup>5</sup> Zellen/ml (montags) und 4\*10<sup>5</sup> Zellen/ml (freitags) auf 10 ml RPMI-1640 in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät.

## 3.6 Stimulationsprotokoll

### 3.6.1 Versuchsablauf in Ko-Kultur

Der Teil der Ben-Men-1-Zellen, welcher zuvor eine Woche in MenCM mit 2% FBS, 1% MenCGS und 1% P/S kultiviert worden war, wurde zu Beginn der folgenden Woche in einer Konzentration von 3\*10<sup>5</sup> Zellen pro 500 µl Medium in PLL-beschichtete 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät und über 48 Stunden in MenCM, 2% FBS, 1% MenCGS und 1% P/S kultiviert. Gleichzeitig wurden THP-1-Monozyten in einer Anzahl von 1\*10<sup>7</sup> Zellen in 10 ml RPMI-1640, 10% FBS und 1% P/S in eine 10 ml Zellkulturflasche überführt und mit 1 µl/ml PMA zu adhärenen Makrophagen ausdifferenziert. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel mit PMA-freiem Medium gleicher Zusammensetzung vollzogen und nach weiteren 24 Stunden die Zellen zur Stimulation verwendet.

Am Stimulationstag wurde zunächst ein Mediumwechsel der Ben-Men-1-Zellen mit 700 µl MenCM, 1% FBS, 1% MenCGS und 1% P/S durchgeführt. Anschließend wurden die ausdifferenzierten THP-1-Makrophagen in der Zellkulturflasche mit 2,5 ml Accutase®-Lösung zur Zelldissoziation behandelt und in einer Anzahl von 3\*10<sup>4</sup> Zellen in die beschriebenen 24-Well-Zellkulturplatten mit Ben-Men-1-Zellen übertragen. Im direkten Ko-Kultur-System wurden die THP-1-Makrophagen direkt zu den Ben-Men-1-Zellen in das Well pipettiert. Bei Einsatz des Transwell-Systems wurden die Zellen in die Polycarbonat-Zellkultureinsätze eingebracht. Aus den verwendeten Zellmengen der zwei

Zellpopulationen ergab sich näherungsweise ein Verhältnis von 1:10 Makrophagen zu meningealen Zellen.

Beide Zellpopulationen wurden anschließend für 24 Stunden mit 20 µl P/S-lysierten Pneumokokken in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml oder dem Grundmedium der Pneumokokken Todd-Hewitt Bouillon (THY) als Kontrollsubstanz stimuliert. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die 24-Well-Zellkulturplatten zentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung der Zytokinproduktion herangezogen. Eine genauere Erläuterung der Messmethoden erfolgt in Kapitel 3.7.

### **3.6.2 Versuchsablauf mit konditioniertem Medium**

THP-1-Monozyten wurden zu Beginn einer Woche gesplittet, in einer Menge von  $5 \cdot 10^4$  Zellen pro 500 µl Medium (bestehend aus RPMI-1640, 10% FBS und 1% P/S) in 24-Well-Zellkulturplatten übertragen und zusätzlich zur Ausdifferenzierung mit 1 µl/ml Medium PMA behandelt. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel mit PMA-freiem Medium gleicher Zusammensetzung vollzogen und nach weiteren 24 Stunden die Zellen in 700 µl MenCM, 1% FBS, 1% MenCGS und 1% P/S mit 20 µl SP bzw. THY in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert. Anschließend wurde der Überstand gewonnen und aliquotiert bei -30°C in sterilen 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßern gelagert.

Ben-Men-1-Zellen wurden analog zum Ko-Kultur-Modell in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^4$  Zellen pro 200 µl Medium in PLL-beschichtete 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät und über 48 Stunden in MenCM, 2% FBS, 1% MenCGS und 1% P/S kultiviert. Am Stimulationstag wurde ein Mediumwechsel mit MenCM, 1% FBS, 1% MenCGS und 1% P/S vollzogen und die Ben-Men-1-Zellen mit 20 µl SP/THY in einer Konzentration von  $0,5 \cdot 10^7$  CFU/ml und/oder 20 µl Überstand SP/THY vorstimulierter THP-1-Makrophagen stimuliert. Die unterschiedlichen Konzentrationen ( $3 \cdot 10^7$  vs.  $0,5 \cdot 10^7$  CFU/ml) wurden gewählt, um das Zellzahl-zu-Bakterien-Verhältnis (MOI) zwischen dem 24-Well-System und dem 96-Well-System anzugeleichen und vergleichbare Infektionsbedingungen zu gewährleisten.

Nach Ablauf der 24 Stunden-Stimulation wurden die 96-Well-Zellkulturplatten zentrifugiert und der Überstand zur Untersuchung der Zytokinproduktion herangezogen. Neben WT-THP-1-Makrophagen wurden in den Untersuchungen Gen-defiziente THP-1-Makrophagen mit TLR2-, ASC- und NLRP3-Defizienzen verwendet.

### **3.6.3 Qualitative Untersuchungen des konditionierten Mediums**

#### **3.6.3.1 Erhitzen der Proben**

Der in der isolierten Stimulation der THP-1-Makrophagen gewonnene Überstand wurde in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß für 30 Minuten bei 60°C erhitzt und für die Stimulation der Ben-Men-1-Zellen verwendet. Diese Methode sollte eine Auskunft über die Thermostabilität der Botenstoffe im Überstand geben, die aus den Makrophagen freigesetzt werden und die Aktivität der meningealen Zellen steigern.

#### **3.6.3.2 Filtrierung der Proben**

Zur Größenanalyse der biologisch aktiven, sich im Überstand befindlichen Botenstoffe wurden die Proben in 0,5 ml Filtereinsätze der Molekülgröße 3 und 50 Kilodalton (kDa) pipettiert und daraufhin bei 14 g und 5°C für 10 Minuten zentrifugiert. Bei diesen Filtereinsätzen handelt es sich um Filter mit einer Zellulosemembran zur größenabhängigen Ultrafiltration biologischer Proben. Der in den Einsätzen verbliebene Überstand, der nicht durch die Membran filtriert wurde – also Moleküle mit einer Größe über 3 kDa bzw. unter 50 kDa enthielt – wurde bei 5 °C für 2 Minuten in umgekehrter Orientierung zentrifugiert, anschließend mit Stimulationsmedium auf das Ursprungsvolumen resuspendiert und zur Stimulation der Ben-Men-1-Zellen verwendet.

#### **3.6.3.3 Einsatz pharmakologischer Inhibitoren, Antikörper und Rezeptor-Antagonisten**

Zur Bekräftigung der Befunde aus den Versuchen mit den Überständen von ASC- und NLRP3-defizienten THP-1-Makrophagen wurden in ergänzenden Experimenten selektive pharmakologische Inhibitoren der Caspase-1 (VX-765) und des NLRP3-Inflammasoms (MCC950) verwendet. Die Inhibitoren wurden unmittelbar vor der Pneumokokken-Stimulation in einer Konzentration von 100 µmol/L (VX-765) sowie 10 µmol/L (MCC950) dem Medium von Wildtyp-THP-1-Makrophagen hinzugefügt. Die anschließend gewonnenen Überstände wurden weiter zur Stimulation von Ben-Men-1-Zellen, HMC und HBVP verwendet. Die erhobenen Befunde sollten ebenso durch den Einsatz eines IL-1 $\beta$ -Antikörpers und eines rekombinanten IL-1-Rezeptor-Antagonisten (Anakinra) erhärtet werden. Bei dem IL-1 $\beta$ -Antikörper (Anti-hIL-1 $\beta$ -IgG) handelt es sich um einen neutralisierenden monoklonalen Antikörper spezifisch für humanes IL-1 $\beta$ . Als

Kontrolle wurde ein Maus-Isotyp-Antikörper (Mouse IgG1 Control) verwendet. Beide kommerziell erworbenen Antikörper wurden in einer Konzentration von 25 µg/ml zur Stimulation von Ben-Men-1-Zellen, HMC und HBVP zusammen mit Überständen SP-stimulierter THP-1-Makrophagen eingesetzt. Der kommerziell erworbene humane IL-1-Rezeptor-Antagonist (hIL-1RA) ist ein Mitglied der IL-1-Zytokinfamilie und inhibiert die Aktivität von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Der IL-1-Rezeptor-Antagonist wurde in Endotoxin-freiem Wasser mit 0,1% FBS verdünnt. Als Kontrollsubstanz wurde Endotoxin-freies Wasser mit 0,1% FBS herangezogen. Antagonist und Kontrolle wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml in das Stimulationsmedium von Ben-Men-1-Zellen, HMC und HBVP zusammen mit Überständen SP-stimulierter THP-1-Makrophagen eingefügt.

### **3.6.4 Versuche mit Humanen Meningealen Zellen (HMC)**

Die kryokonservierten Zellen wurden nach Bereitstellung durch die Fa. ScienCell zunächst im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in eine PLL-beschichtete Zellkulturflasche mit 15 ml Medium verbracht. Die Zellkulturflaschen wurden über Nacht für 16 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, anschließend ein Mediumwechsel durchgeführt und die Konfluenz beurteilt. Ab einer Konfluenz von 70% wurden die Zellen täglich mit frischem Medium versiehen und ab einer Konfluenz von 90% passagiert bzw. für Versuche verwendet. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5 ml 0,05%-iger Trypsinlösung, sowie 5 ml PBS versiehen und 5 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension entnommen, in ein 50 ml Falcon mit 5 ml FBS verbracht und die Zellkulturflasche mit 10 ml Trypsin-Neutralization-Substance (TNS) gespült, um die verbliebenen Zellen zu entnehmen und das enthaltene Trypsin zu neutralisieren. Nachfolgend wurden die Zellen bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert, mit frischem MenCM-Medium mit 2% FBS, 1% MenCGS und 1% P/S resuspendiert und anschließend eine Bestimmung der Zellzahl durchgeführt. Das Stimulationsprotokoll sah einen identischen Versuchsaufbau wie bei den Ben-Men-1-Zellen vor. An dieser Stelle wird auf die vorherigen Abschnitte des Methodenteils verwiesen (3.6.2, 3.6.3.3).

### **3.6.5 Versuche mit Humanen Perizyten (HBVP)**

Die Handhabung der HBVP wurde gemäß den Herstellervorgaben analog zu den HMC durchgeführt. Die Zellen wurden anstelle von MenCM-Medium in PM-Medium

(Pericyte-Medium) mit 2% FBS, 1% PGS und 1% P/S kultiviert und in PM mit 1% FBS, 1% PGS und 1% P/S stimuliert. Es wird erneut auf die vorherigen Abschnitte des Methodenteils verwiesen (3.6.2, 3.6.3.3).

### **3.6.6 Versuche mit peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)**

Für die Isolierung der PBMC wurde zunächst 20 ml Histopaque®-1077, ein gebrauchsfertiges Medium bestehend aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat, vorbereitet und anschließend diese Lösung mit 20 ml Vollblut des Patienten überschichtet. Nach Zentrifugation der Probe bei 400 g für 30 Minuten wurde die trübe Interphase entnommen und mehrere Zentrifugations- und Waschschrifte mit PBS angeschlossen. Das gewonnene Zellpellet wurde in 5 ml MCM, 1% FBS, 1% MCGS und 1% P/S resuspendiert und die Zellen durch ihre morphologischen Charakteristika mittels Phasenkontrastmikroskop als mononukleäre Zellen identifiziert. Anschließend wurden die gewonnenen PBMC analog zu THP-1-Zellen für 24 Stunden mit P/S-lysierten SP und THY zur Kontrolle stimuliert.

## **3.7 Messmethoden**

### **3.7.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (Sandwich-ELISA)**

Für die Quantifizierung freigesetzter Zytokine wurde das ELISA-Verfahren gewählt. Es wurden ausschließlich Elisa-Kits des Herstellers R&D (Human IL-6 DuoSet ELISA, Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA, Human CCL2/MCP-1 DuoSet ELISA und ergänzend für alle ELISA-Varianten DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2; R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) verwendet.

Die verwendeten Elisa Test-Kits beruhten auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA. Das Protokoll des Herstellers sah vereinfacht folgende Schritte vor:

1. Beschichtung einer Photometerplatte mit einem „Capture Antibody“ und Inkubation für 24 Stunden bei Raumtemperatur
2. Hinzugabe der zu untersuchenden Proben und des Standards (in abfallender Konzentration), die eine Bindung mit dem „Capture Antibody“ eingehen
3. Markierung der Proben mittels „biotinyliertem Detection Antibody“
4. Auftragen der Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugate (HRP)

5. Hinzugabe eines farblosen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrates
6. Terminierung des Farbumschlages durch Stop-Lösung
7. Photometrische Messung und Quantifizierung der Proben mittels Eichkurve  
(Nachweisgrenze 15 pg/ml)

### **3.7.2 Antibody-Array**

Der Antibody-Array wurde verwendet, um einen besseren Überblick über freigesetzte Zytokine und Chemokine der Zelllinien und primären Zellen zu bekommen. Mit dieser semiquantitativen Nachweismethode kann eine Vielzahl von Proteinen gleichzeitig detektiert und mittels Chemolumineszenz-Signal dargestellt werden. Die Funktionsweise ähnelt dem des Sandwich-ELISA. Der Ablauf des Arrays gestaltete sich kurz dargestellt wie folgt (die genaue Beschreibung findet sich auf folgenden Internetseiten der Hersteller Raybiotech: <https://www.raybiotech.com/human-cytokine-array-c3-aah-cyt-3> und R&D Systems: <https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-xl-cytokine-array-kit Ary022b>):

1. Aufbringen des zu untersuchenden Zellkulturüberstandes auf die mit „Capture-Antibody“ belegten Nitrozellulosemembranen
2. Hinzugabe eines „Detection-Antibody“, der mit HRP konjugiert ist und eine Bindung mit der Probe eingeht
3. Auftragen eines Chemilumineszenz-Reagens, das ein Lichtsignal proportional zur Menge der gebildeten Antikörperkomplexe emittiert
4. Detektion der Intensität der Chemilumineszenz mittels UVP ChemiDoc-It Imaging System

Für die Ben-Men-1-Zellen wurde der Antibody-Array „RayBio® C-Series Human Cytokine Antibody Array 3 Kit“ der Firma Raybiotech und für die HMC der Antibody-Array „Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit“ der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) verwendet. Es wurden zwei unterschiedliche Antibody-Arrays verwendet, da sich bei dem Antibody-Array der Fa. RayBio® ein ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis durch unspezifische Signale für alle zu messenden Punkte auf der Membran ergab.

Nachfolgend sind zwei Übersichten über die untersuchten Substanzen der jeweiligen Antibody-Arrays dargestellt.

POS	POS	NEG	NEG	ENA-78 (CXCL5)	GCSF	GM-CSF	GRO a/b/g	GRO alpha (CXCL1)	I-309 (TCA- 3/CCL1)	IL-1 $\alpha$ (IL-1 F1)	IL-1 $\beta$ (IL-1 F2)
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8 (CXCL8)	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN-gamma
MCP-1 (CCL2)	MCP-2 (CCL8)	MCP-3 (CCL7)	M-CSF	MDC (CCL22)	MIG (CXCL9)	MIP-1 delta	RANTES (CCL5)	SCF	SDF-1	TARC (CCL17)	TGF beta
TNF- $\alpha$	TNF- $\beta$	EGF	IGF-1	Angio- genin	OSM	TPO	VEGF-A	PDGF-BB	Leptin	NEG	POS

**Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Antibody-Array „RayBio® C-Series Human Cytokine Antibody Array 3 Kit“ der Firma Raybiotech.** Ben-Men-1-Zellen wurden mit konditioniertem Medium SP-stimulierter THP-1-Makrophagen behandelt und der Überstand anschließend analysiert. POS: Positivkontrolle (Definierte Menge eines biotinylierten Antikörpers auf dem Array); NEG: Negativkontrolle.

POS				POS
MIF	IL-13	IL-1ra/ IL-1F3	CXCL11/ I-TAC	CCL1/ I-309
Serpin E1/ PAI-1	IL-16	IL-2	CXCL12/ SDF-1	CCL2/ MCP-1
TNF- $\alpha$	IL-17A	IL-4	G-CSF	MIP-1 $\alpha$ / MIP-1 $\beta$
TREM-1	IL-17E	IL-5	GM-CSF	CCL5/ RANTES
	IL-18/ IL-1F4	IL-6	ICAM-1/ CD54	CD40/ TNFSF5
	IL-21	IL-8	IFN- $\gamma$	C5/C5a
	IL-27	IL-10	IL-1 $\alpha$ / IL-1F1	CXCL1/ GRO $\alpha$
	IL-32 $\alpha$	IL-12 p70	IL-1 $\beta$ / IL-1F2	CXCL10/ IP-10
				POS

**Abbildung 3: Antikörperbelegung des Antibody-Array „Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit“ der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA).** HMC wurden mit konditioniertem Medium SP-stimulierter THP-1-Makrophagen behandelt und der Überstand anschließend analysiert. POS: Positivkontrolle.

### 3.7.3 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Im Folgenden sollte die Genexpression von meningealen Zellen und Perizyten untersucht werden. Es wurde sich hierbei der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion-(RT-PCR-)Methode bedient, um Auskunft über die Expression konstitutiver und induzierter Gene der Zellen zu erhalten. Als Primer wurden typische Fibroblastenmarker wie Fibronektin (FN1) und Kollagen (Col1A1) sowie die Wachstumsfaktoren Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor A und B (PDGFRA, PDGFRB) untersucht. Ebenso wurde die Expression des IL-1-Rezeptors (IL-1 R) und der Zytokine IL-6 und IL-1 auf mRNA-Ebene bestimmt.

Initial wurden meningeale Zellen (Ben-Men-1/HMC) sowie Perizyten mit THY- bzw. SP-konditioniertem Medium von THP-1-Makrophagen stimuliert. Nach Ablauf der Stimulation wurde der Überstand entnommen und die verbliebenen Zellen mittels Lysepuffer lysiert und bis zur Durchführung der RT-PCR-Untersuchung bei -80°C gelagert. Die RT-PCR-Untersuchung sah unter Berücksichtigung der einzelnen Herstellerangaben vereinfacht folgende Schritte vor (die genaue Beschreibung findet sich auf folgenden Internetseiten der Hersteller Biorad: <https://www.bio-rad.com/de-de/product/aurum-total-rna-mini-kit?ID=eb91e411-d011-4032-95e0-cdb29691d4d3>; <https://www.bio-rad.com/de-de/product/ascript-gdna-clear-cdna-synthesis-kit?ID=NUU8WD15>; <https://www.bio-rad.com/de-de/product/ssoadvanced-universal-sybr-green-supermix?ID=MH5H1EE8Z>; und Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/en/Q10210>):

1. **Probenvorbereitung:** Isolierung der RNA mittels Aurum™ Total RNA Mini Kit zur Überprüfung der Proben auf Reinheit und Integrität
2. **RNA-Quantifizierung:** Quantifizierung der RNA-Konzentration mittels Qubit™ RNA BR Assay Kit zur Bestimmung der genauen Menge RNA für die PCR
3. **cDNA-Synthese:** Umwandlung der RNA mit dem iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit in cDNA
4. **qPCR-Vorbereitung:** Präparation der qPCR-Mischung mit dem SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix und Hinzugabe der Primer (siehe hierzu Kapitel 3.1.3) und der cDNA
5. **Durchführung und Datenanalyse:** qPCR-Lauf nach festgelegtem Thermocycling-Protokoll (Denaturierung, Annealing, Elongation) mit dem Real-Time rapid PCR qTower und anschließende Datenanalyse durch Ct-Werte und

Amplifikationskurven sowie Bestimmung der Normalexpression in Relation zum Housekeeping-Gene (GAPDH)

### **3.8 Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism. Zur Prüfung der Varianzen wurde eine einfaktorielle univariate Varianzanalyse (one-way ANOVA, analysis of variance) durchgeführt. Zur Untersuchung der Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen wurde der Tukey post-hoc Test verwendet. Den statistischen Analysen wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  zugrunde gelegt. In den Abbildungen werden folgende Signifikanzwerte durch Sterne bzw. Buchstaben dargestellt: \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ , ns = nicht signifikant.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Untersuchungen zur Interaktion von Ben-Men-1-Zellen und THP-1-Makrophagen in Ko-Kultur**

#### **4.1.1 Ben-Men-1-Zellen setzen bei direkter und indirekter Ko-Kultur mit THP-1-Makrophagen mehr IL-6 frei als in Monokultur**

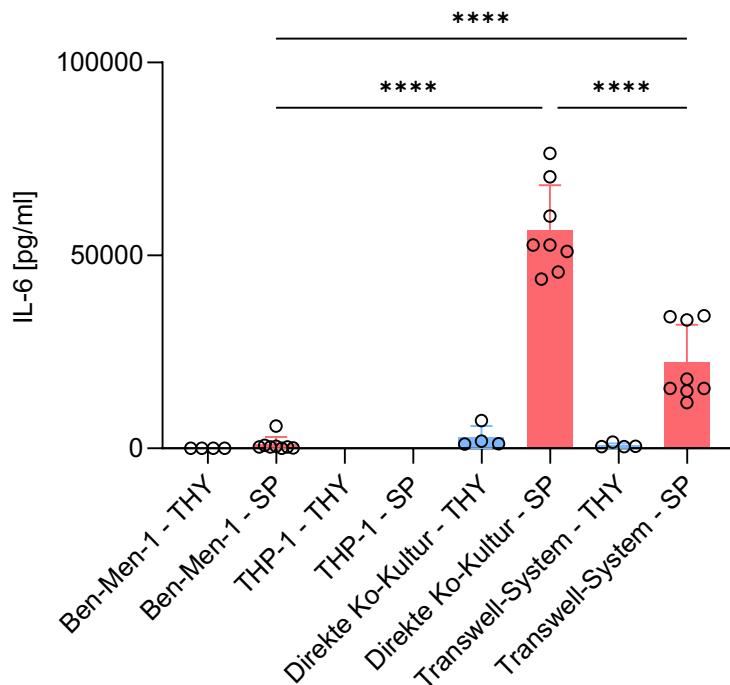
Zur Evaluierung des Einflusses von Makrophagen auf die Zytokinproduktion meningealer Zellen wurden initial Einkammer- und Mehrkammer-Systeme verwendet. WT-THP-1-Zellen wurden über 48 Stunden in Zellkulturflaschen mit PMA zu Makrophagen ausdifferenziert und parallel dazu Ben-Men-1-Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Daraufhin wurden beide Zellen entweder in Ko-Kultur- oder im Transwell-System über 24 Stunden mit Penicillin/Streptomycin (P/S)-lysierten *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) (SP)-Bakterien stimuliert oder dem Grundmedium der Pneumokokken (THY) als Kontrolle exponiert. Hierbei wurde Folgendes festgestellt: Die IL-6-Produktion der Ben-Men-1-Zellen und THP-1-Makrophagen war bereits unter Kontrollbedingungen durch Exposition mit THY in direkter Ko-Kultur ( $2808 \text{ pg/ml} \pm 2903 \text{ pg/ml}$ )<sup>1</sup>, aber auch in indirekter Ko-Kultur ( $693 \text{ pg/ml} \pm 584 \text{ pg/ml}$ ) signifikant höher als in der Monokultur von Ben-Men-1-Zellen ( $15 \text{ pg/ml} \pm 6 \text{ pg/ml}$ ). In Monokultur setzten SP-stimulierte Ben-Men-1-Zellen geringe Mengen IL-6 ( $1002 \text{ pg/ml} \pm 1915 \text{ pg/ml}$ )<sup>1</sup> frei, während im Zellkulturüberstand von THP-1-Makrophagen die IL-6-Werte stets unterhalb der Nachweigrenze von 10 pg/ml lagen. Die Produktion von IL-6 erhöhte sich hochsignifikant bei einer Stimulation mit Pneumokokken in direkter Ko-Kultur ( $56614 \text{ pg/ml} \pm 11596 \text{ pg/ml}$ ) und indirekter Ko-Kultur ( $22168 \text{ pg/ml} \pm 9861 \text{ pg/ml}$ ).

Die Versuche zeigten, dass die Ko-Kultur von Ben-Men-1-Zellen und THP-1-Makrophagen zu einer signifikant ( $p < 0,0001$ ) höheren IL-6-Freisetzung gegenüber der Stimulation der meningealen Zellen in Monokultur führt. Ferner wurde beobachtet, dass für die gesteigerte IL-6-Freisetzung kein direkter Kontakt der Zellen nötig ist, auch wenn

---

<sup>1</sup> Höhe der Standardabweichung bedingt durch einen Messwert, der sich deutlich von den restlichen Werten unterscheidet und außerhalb des 99%-igen Konfidenzintervalls des Mittelwertes liegt

die Zytokinproduktion im Transwell-System geringere Niveaus erreichte als in der Ko-Kultur (**Abbildung 4**).



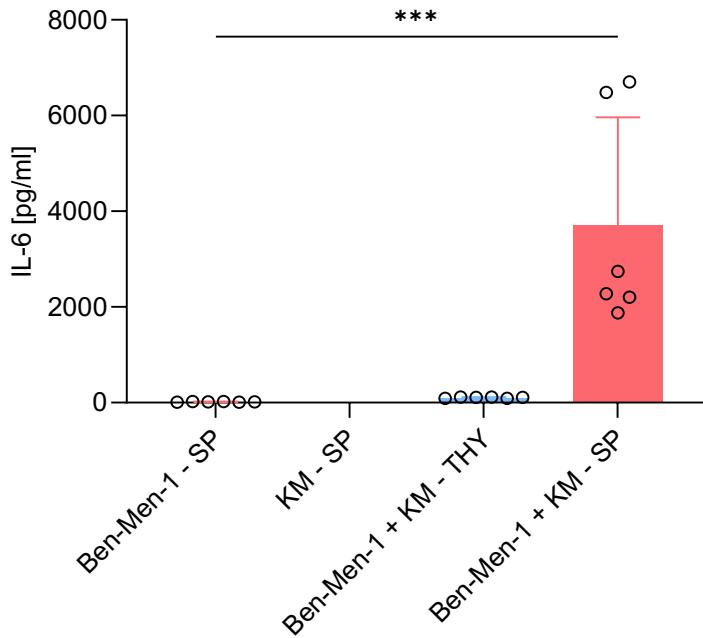
**Abbildung 4: IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen im direkten Ko-Kultur- und Transwell-System.** Ben-Men-1-Zellen und THP-1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert. Als Kontrolle wurde THY verwendet. Im Transwell-System wurden Ben-Men-1-Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten kultiviert und am Stimulationstag THP-1-Makrophagen in Filtereinsätze (Inserts) pipettiert. Die IL-6 Werte befanden sich bei alleiniger Stimulation der THP-1-Makrophagen unterhalb der Nachweisgrenze von 10 pg/ml. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

#### 4.1.2 Konditioniertes Makrophagenmedium bewirkt eine deutliche Verstärkung der IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen im Vergleich zur Monokultur

Die Ergebnisse der Ko-Kultur-Versuche gaben Grund zur Annahme, dass der modulatorische Effekt der THP-1-Makrophagen auf die Ben-Men-1-Zellen durch lösliche, von Makrophagen freigesetzte Botenstoffe vermittelt wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Überstände von THP-1-Makrophagen-Monokulturen generiert. Diese Überstände wurden im nächsten Schritt zur Stimulation der Ben-Men-1-Zellen verwendet.

Der Zellkulturüberstand SP-stimulierter THP-1-Makrophagen führte zu einer signifikanten ( $p < 0,001$ ) Erhöhung der IL-6-Produktion durch Ben-Men-1-Zellen im Vergleich zur Stimulation von Ben-Men-1-Zellen mit SP unter Monokulturbedingungen.

Auch die Stimulation mit dem Überstand THY-exponierter Makrophagen induzierte bei Ben-Men-1-Zellen eine messbare, allerdings nur geringe IL-6-Produktion (**Abbildung 5**).



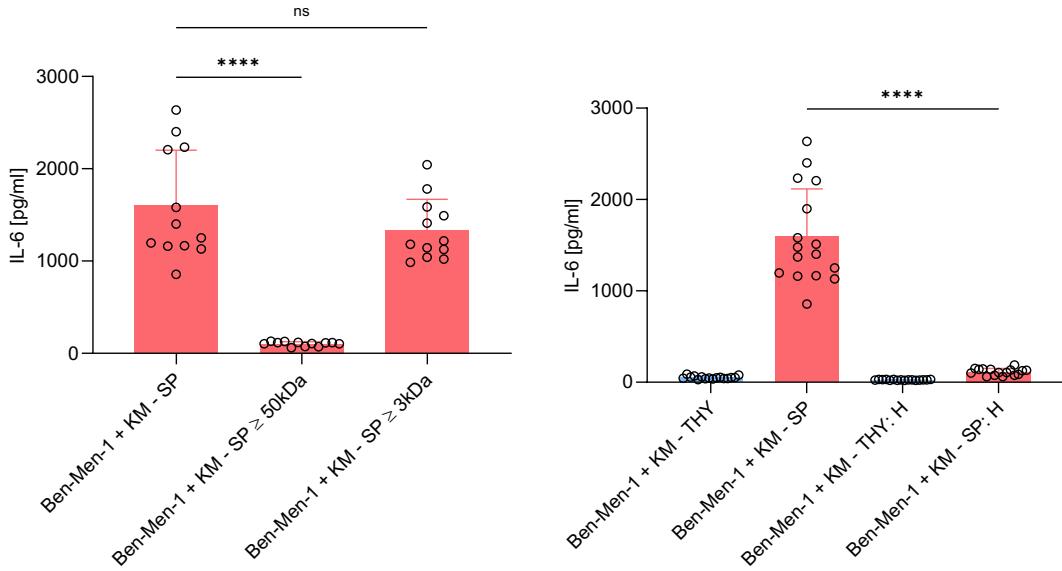
**Abbildung 5: IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen nach einer Behandlung mit Überständen (KM) THY-exponierter und SP-stimulierter THP-1-Makrophagen.** THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand zur Stimulation von Ben-Men-1-Zellen ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Als Kontrolle dienten Ben-Men-1-Zellen, die mit SP in einer Konzentration von  $0,5 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert wurden (zur genauen Erläuterung s. Kapitel 3.6.2). Der IL-6 Gehalt des Überstandes vorstimulierter THP-1-Makrophagen (KM - SP) lag unterhalb der Nachweisgrenze von 10 pg/ml. \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### 4.1.3 Die stimulatorische Wirkung von konditioniertem Makrophagenmedium kann durch physikalische Behandlung abgemildert werden

Zur weiteren Analyse der von THP-1-Makrophagen freigesetzten Botenstoffe wurden die Zellkulturüberstände von THP-1-Makrophagen einerseits thermisch behandelt, andererseits mit Hilfe spezieller Molekularfilter und Ultrazentrifugation in Fraktionen aufgetrennt, die entweder Proteine mit einer Molekülmasse  $\geq 3\text{kDa}$  oder  $\geq 50\text{kDa}$  enthielten.

Dabei zeigte sich eine signifikante ( $p < 0,0001$ ) Reduktion der IL-6-Freisetzung aus Ben-Men-1-Zellen nach einer Stimulation mit Überständen, die ausschließlich Proteine mit

einer Molekülmasse  $\geq$  50kDa enthielten, im Vergleich zu den unbehandelten Überständen. Im Gegensatz dazu glichen die gemessenen Zytokinwerte bei Einsatz von 3kDa Molekülfilters denjenen der Kontrollgruppe. Nach thermischer Behandlung des Überstandes verringerte sich die IL-6-Produktion der Ben-Men-1-Zellen signifikant ( $p < 0,0001$ ). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass in den Überständen SP-stimulierter THP-1-Makrophagen ein oder mehrere hitzelabile Moleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 3kDa und 50kDa enthalten sind, die die Ben-Men-1-Zellen zur Produktion von IL-6 anregen (**Abbildung 6**).

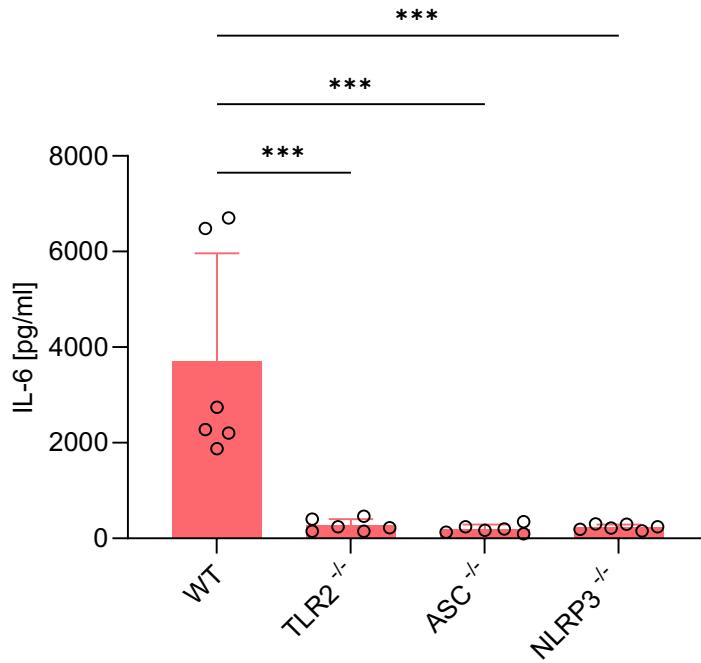


**Abbildung 6: IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen nach Einsatz physikalisch behandelter Überstände (KM) THY-exponierter und SP-stimulierter THP-1-Makrophagen.** THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand zur Stimulation von Ben-Men-1-Zellen ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Links: Verwendung von SP-Überständen, die zuvor über Molekülmasse ( $\geq 50\text{kDa}$  bzw.  $3\text{kDa}$ ) zentrifugiert wurden. Rechts: Erhitzen der Überstände bei  $60^\circ\text{C}$  für 30 Minuten (H=Hitze) vor Stimulation der Ben-Men-1 Zellen. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , ns = nicht signifikant.

#### 4.1.4 Konditioniertes Medium TLR2-, ASC- und NLRP3-defizienter THP-1-Makrophagen zeigte im Vergleich zu Überständen von WT-THP-1-Makrophagen eine deutlich geringere stimulatorische Wirkung

Zur weiteren Charakterisierung der Botenstoffe wurden ausgewählte Gen-defiziente THP-1-Makrophagen herangezogen. Der Versuchsaufbau sah erneut die Herstellung von Überständen stimulierter THP-1-Makrophagen und deren anschließenden Einsatz bei Stimulationen von Ben-Men-1-Zellen vor.

Die Zugabe von Zellkulturerüberständen SP-stimulierter WT-THP-1-Makrophagen induzierte eine starke IL-6-Freisetzung aus Ben-Men-1-Zellen. Im Gegensatz dazu lösten Überstände SP-stimulierter TLR2-, ASC- und NLRP3-defizienter THP-1-Makrophagen eine hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) geringere IL-6-Produktion bei den Ben-Men-1-Zellen aus (Abbildung 7). Ausgehend von diesen Befunden wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei dem gesuchten Botenstoff im Überstand stimulierter Makrophagen um das Zytokin IL-1 $\beta$  handeln könnte.

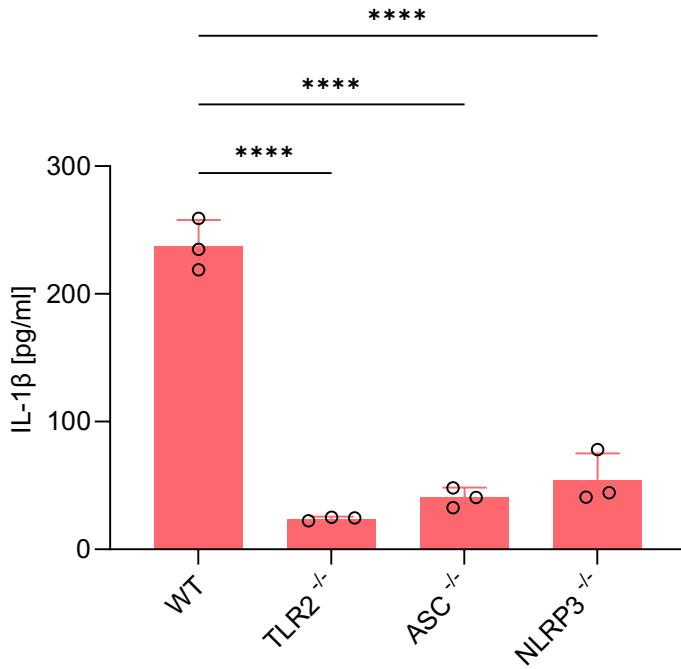


**Abbildung 7: IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen nach Exposition mit Überständen SP-stimulierter WT- bzw. Gen-defizienter THP-1-Makrophagen.** WT-/TLR2<sup>-/-</sup>/ASC<sup>-/-</sup>/NLRP3<sup>-/-</sup>-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand zur Stimulation von Ben-Men-1-Zellen ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### 4.1.5 TLR2-, ASC- und NLRP3-defizierte Makrophagen produzieren weniger IL-1 $\beta$ als die vergleichbaren Wildtyp-Zellen

Zur Erhärtung der Hypothese, dass es sich bei dem gesuchten Botenstoff um das Zytokin IL-1 $\beta$  handeln könnte, wurde IL-1 $\beta$  anschließend im Überstand von THP-1-Makrophagen mittels ELISA quantifiziert.

WT-THP-1-Makrophagen und die bereits benannten Gen-defizienten Zellen (TLR2<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup>) wurden für 24 Stunden mit SP stimuliert bzw. THY exponiert und anschließend die Konzentration des Zytokins IL-1 $\beta$  gemessen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zytokinfreisetzung bei den Gen-defizienten Zellen gegenüber dem Wildtyp (**Abbildung 8**).

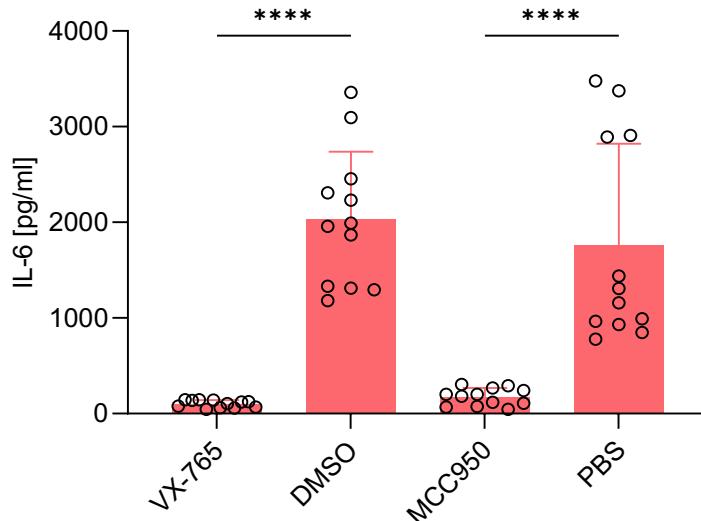


**Abbildung 8: IL-1 $\beta$ -Freisetzung aus WT- bzw. Gen-defizienten THP-1-Makrophagen.** WT-/TLR2 $^{-/-}$ -/ASC $^{-/-}$ -/NLRP3 $^{-/-}$ -THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und die IL-1 $\beta$ -Produktion im Überstand bestimmt. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

#### 4.1.6 Die pharmakologische Behandlung von THP-1-Makrophagen mildert die stimulatorische Wirkung auf Ben-Men-1-Zellen

In weiteren Versuchsreihen wurden in der Folge ausgewählte pharmakologische Inhibitoren (VX-765 und MCC950) verwendet. VX-765 gilt als potenter Caspase-1-Inhibitor, der die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und IL-18 vermindert (Stack et al., 2005; Wannamaker et al., 2007). MCC950 blockiert selektiv das NLRP3-Inflammasom, das zur Freisetzung von Zytokinen der IL-1-Familie beitragen kann (Coll et al., 2015).

Die Versuche zeigten, dass die Überstände, die von pharmakologisch behandelten, SP-stimulierten WT-THP-1-Makrophagen gewonnen wurden, zu einer signifikant ( $p < 0,0001$ ) verminderten IL-6-Freisetzung aus Ben-Men-1-Zellen führten als die korrespondierenden Kontrollüberstände (DMSO und PBS = Vehikel der Hemmstoffe) (Abbildung 9).



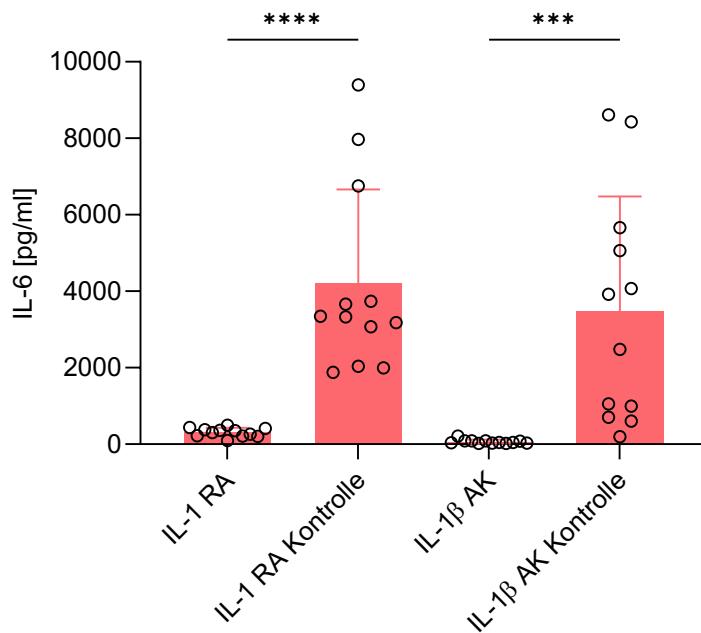
**Abbildung 9: IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen nach Einsatz pharmakologisch behandelter Überstände von THP-1-Makrophagen.** WT-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultursystem mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand zur Stimulation von Ben-Men-1-Zellen ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Vor Stimulation der THP-1-Makrophagen mit SP wurden den Überständen die Inhibitoren VX-765 und MCC950 hinzugegeben. DMSO wurde als Kontrolle für VX-765, PBS als Kontrolle für MCC950 verwendet. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\*\* =  $p < 0,0001$ .

#### 4.1.7 Die stimulatorische Wirkung konditionierten Makrophagenmediums wird durch IL-1-Rezeptor-Antagonisten und IL-1 $\beta$ -Antikörper blockiert

Zur weiteren Verifizierung der Hypothese, dass es sich bei dem gesuchten Botenstoff um das Zytokin IL-1 $\beta$  handelt, wurden in Folgeexperimenten Versuche mit einem IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1 RA), auch bekannt unter dem Namen Anakinra, sowie einem neutralisierenden monoklonalen IL-1 $\beta$ -Antikörper durchgeführt. Wie in einer Übersichtsarbeit dargelegt, wird Anakinra, ein Vertreter aus der Gruppe der Biologika, bereits seit längerer Zeit zur Behandlung von Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Gicht und einer Reihe seltener autoimmunologischer Erkrankungen eingesetzt (Cavalli & Dinarello, 2018). Als rekombinante Variante des natürlichen IL-1 RA hemmt es die Wirkung sowohl von IL-1 $\alpha$  als auch von IL-1 $\beta$  (Dinarello et al., 2012).

Ben-Men-1-Zellen wurden mit konditioniertem Medium SP-stimulierter THP-1-Makrophagen versehen und beide Substanzen (IL-1 RA und IL-1 $\beta$  AK) respektive ihre jeweiligen Kontrollsubstanzen Endotoxin-freies Wasser mit 0,1% FBS für IL-1 RA (IL-1 RA Kontrolle) und ein entsprechender Maus-IgG1-Isotyp-Kontrollantikörper für IL-1 $\beta$  AK (IL-1 $\beta$  AK Kontrolle) den Überständen hinzugefügt.

Im Vergleich zu den Kontrollsubstanzen bewirkten IL-1 RA und IL-1 $\beta$  AK eine signifikante ( $p < 0,0001$  bzw.  $p < 0,001$ ) Verringerung der IL-6-Freisetzung aus Ben-Men-1-Zellen. In der Zusammenschau zeigten die Versuchsreihen, dass IL-1 $\beta$  als das Zytokin fungiert, das in Ben-Men-1-Zellen die IL-6-Produktion anregt (**Abbildung 10**).



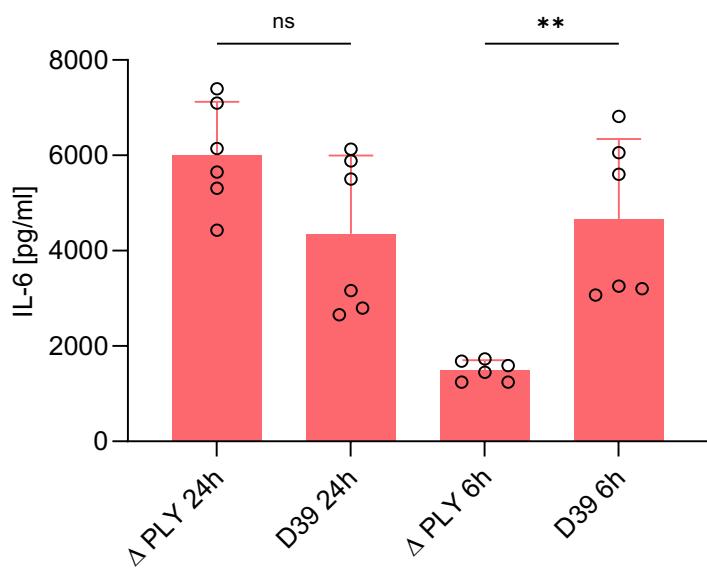
**Abbildung 10: IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen nach Verwendung von Überständen SP-stimulierter THP-1-Makrophagen unter Einsatz eines IL-1-Rezeptor-Antagonisten und IL-1 $\beta$ -Antikörpers.** WT-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand zur Stimulation von Ben-Men-1-Zellen ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Vor der Stimulation der Ben-Men-1-Zellen wurde ein IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1 RA) bzw. die Kontrollsubstanz Endotoxinfreies Wasser mit 0,1% FBS (IL-1 RA Kontrolle) oder ein IL-1 $\beta$ -Antikörper (IL-1 $\beta$  AK) bzw. dessen Kontrollsubstanz, ein entsprechender Maus-IgG1-Isotyp-Kontrollantikörper (IL-1 $\beta$  AK Kontrolle) den Überständen hinzugefügt. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### 4.1.8 Die Modulation der Ben-Men-1-Zellen ist in der Frühphase der Infektion Pneumolysin-abhängig

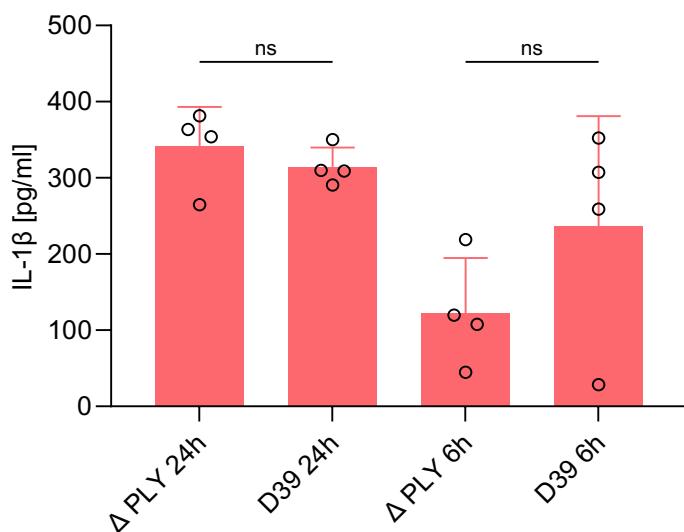
Pneumolysin (PLY) gilt als wichtiger Virulenzfaktor der Pneumokokken (Nishimoto et al., 2020; Orihuela et al., 2004; Pereira et al., 2022). Das porenbildende bakterielle Proteintoxin PLY gehört zur Gruppe der Cholesterol-abhängigen membranperforierenden Zytolysine (Baba et al., 2001; Vogege et al., 2019). In-vitro-Versuche zeigten, dass PLY eine Schädigung der Endothelzellfunktion bewirkt und somit

zur Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke beiträgt (Zysk et al., 2001). Ebenso ist bekannt, dass das bakterielle Toxin eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auslösen kann (McNeela et al., 2010; Witzenrath et al., 2011). Anhand eines Vergleichs der stimulatorischen Aktivitäten von SP D39 mit dessen isogener, PLY-defizienter Mutante SP D39 $\Delta$ PLY sollte die Relevanz von PLY in der IL-1 $\beta$ -vermittelten Aktivierung der IL-6-Produktion meningealer Zellen herausgearbeitet werden.

Nach Stimulation der Ben-Men-1-Zellen mit Überständen von THP-1-Makrophagen, die über 24 Stunden P/S-lysierten SP D39 $\Delta$ PLY respektive dem Wildtypstamm SP D39 ausgesetzt waren, war kein signifikanter Unterschied in der IL-6-Menge zwischen den Pneumokokkenstämmen nachweisbar. Verkürzte man die Expositionszeit der THP-1-Makrophagen jedoch von 24 auf 6 Stunden, wurden signifikante Unterschiede in der Zytokinproduktion der Ben-Men-1-Zellen sichtbar: die PLY-Defizienz war mit einer signifikant geringeren IL-6-Freisetzung aus Ben-Men-1-Zellen vergesellschaftet (**Abbildung 11**). In zusätzlichen Analysen wurden die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in den Überständen der THP-1-Makrophagen gemessen. Analog zu den IL-6-Befunden ging die Exposition mit PLY-defizienten Bakterien bei kürzer Stimulationsdauer mit niedrigeren IL-1 $\beta$ -Spiegeln als bei einer Stimulation mit dem entsprechenden Wildtypstamm einher; dieser Unterschied war jedoch bei einer langen Stimulationsdauer von 24 Stunden nicht mehr vorhanden (**Abbildung 12**).



**Abbildung 11: IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen nach einer Behandlung mit Überständen SP D39- bzw. SP D39ΔPLY-stimulierter THP-1-Makrophagen im zeitlichen Verlauf einer Infektion.** WT-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System mit dem Wildtypstamm SP Serotyp 2 (D39, Kontrolle) bzw. Pneumolysin-( $\Delta$ PLY)-defizienten Bakterien in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml über eine Dauer von 24 bzw. 6 Stunden stimuliert und der Überstand zur Stimulation von Ben-Men-1-Zellen ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\* =  $p < 0,01$ , ns = nicht signifikant.



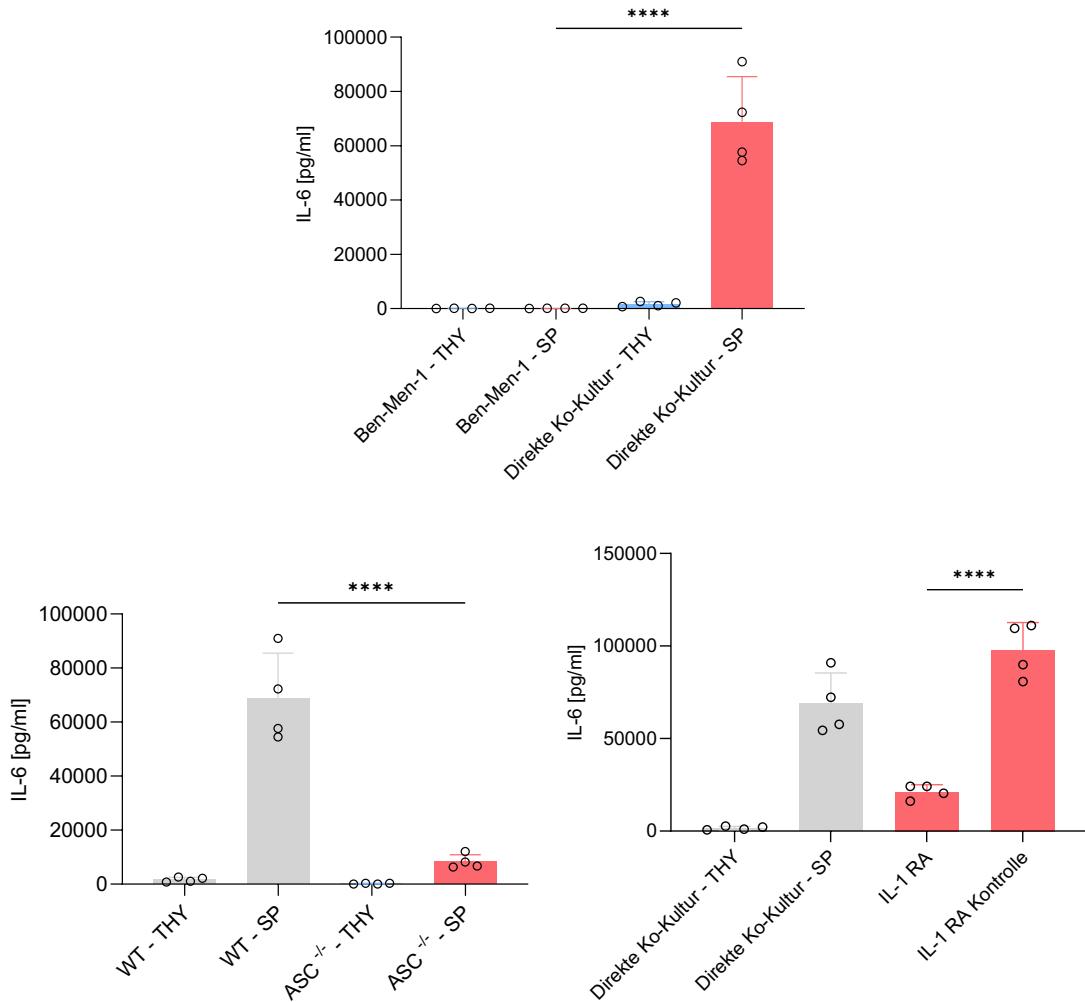
**Abbildung 12: IL-1 $\beta$ -Produktion SP D39- bzw. SP D39ΔPLY-stimulierter THP-1-Makrophagen im zeitlichen Verlauf einer Infektion.** WT-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System mit SP Serotyp 2 (D39, Kontrolle) bzw. Pneumolysin-( $\Delta$ PLY)-defizienten Bakterien in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml über eine Dauer von 24 bzw. 6 Stunden stimuliert. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. ns = nicht signifikant.

#### **4.1.9 Auch in direkter Ko-Kultur ist die Fibroblastenaktivierung von der IL-1 $\beta$ -Freisetzung der Makrophagen abhängig**

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus den Versuchen mit Zellkulturüberständen wurden Ben-Men-1-Zellen und THP-1-Makrophagen in der Folge wieder direkt ko-kultiviert. Es sollte dabei untersucht werden, ob die IL-6-Freisetzung von Ben-Men-1-Zellen auch in direkter Ko-Kultur einem IL-1 $\beta$ -abhängigen Mechanismus unterliegt.

Die IL-6-Produktion war in der direkten Ko-Kultur signifikant ( $p < 0,0001$ ; um das 600-fache) gegenüber der Monokultur erhöht (Ben-Men-1 SP: 111 pg/ml  $\pm$  28 pg/ml; Ko-Kultur SP: 68838 pg/ml  $\pm$  16650 pg/ml; n=4). Die Verwendung von ASC<sup>-/-</sup>-THP-1-Makrophagen ging in der Ko-Kultur mit Ben-Men-1-Zellen mit einer 8-fachen Reduktion der IL-6-Ausschüttung im Vergleich zu WT-THP-1-Makrophagen einher (8301 pg/ml  $\pm$  2618 pg/ml;  $p < 0,0001$ ). Die Applikation eines IL-1 RA zeigte ebenso eine signifikante Reduktion (8301 pg/ml  $\pm$  2618 pg/ml;  $p < 0,0001$ ) der Menge an freigesetztem IL-6 (**Abbildung 13**).

Dies bekräftigt die oben aufgestellte Hypothese, dass auch in direkter Ko-Kultur eine IL-1 $\beta$ -vermittelte IL-6-Produktion der Ben-Men-1-Zellen vorliegt.

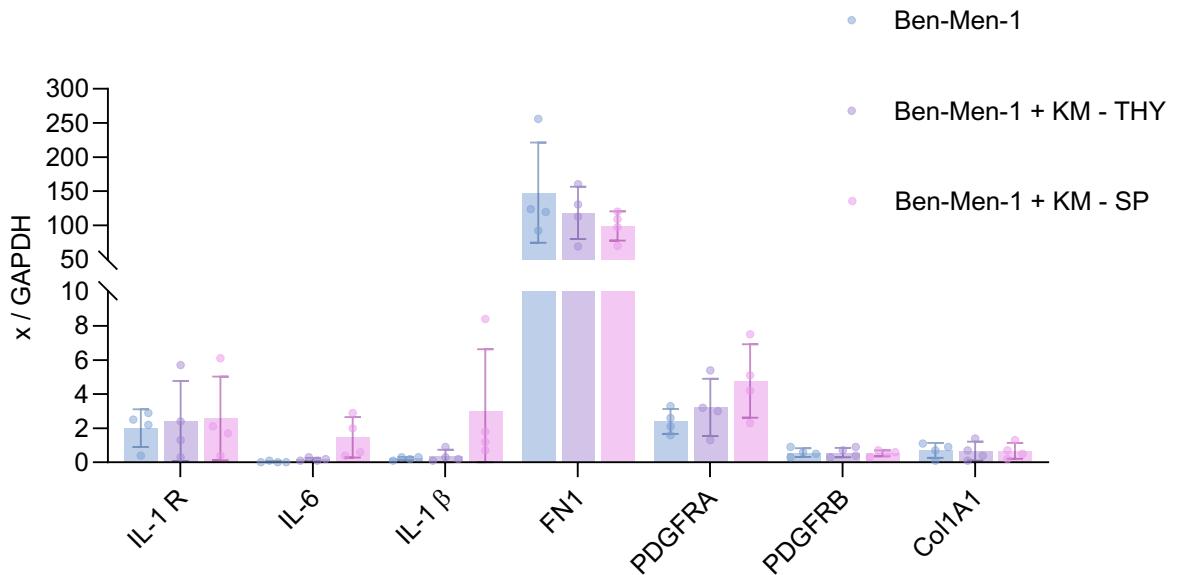


**Abbildung 13: IL-6-Freisetzung von Ben-Men-1-Zellen in direkter Ko-Kultur unter Einsatz von ASC-defizienten Makrophagen und eines IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1 RA).** Oben: Ben-Men-1-Zellen wurden analog zu Kapitel 4.1.1 in direkter Ko-Kultur mit THP-1-Makrophagen in 24-Well-Zellkulturplatten kultiviert und anschließend über 24 Stunden mit SP stimuliert bzw. THY exponiert. Unten links: Zur Überprüfung eines Inflammasom-abhängigen Prozesses wurden Ben-Men-1-Zellen mit WT- bzw. ASC<sup>-/-</sup>-THP-1-Makrophagen direkt ko-kultiviert und anschließend stimuliert. Unten rechts: Einsatz eines IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1 RA) bzw. dessen Kontrollsubstanz Endotoxinfreies Wasser mit 0,1% FBS (IL-1 RA Kontrolle) bei Stimulation von Ben-Men-1-Zellen in direkter Ko-Kultur mit WT-THP-1-Makrophagen. Graue Balken: Daten bereits gezeigt. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\*\* = p < 0,0001.

#### 4.1.10 PCR-Untersuchungen ausgewählter Faktoren in Ben-Men-1-Zellen

Ergänzend zu den oben beschriebenen ELISA-Bestimmungen wurde die Expression ausgewählter Zytokine und Fibroblastenmarker, darunter IL-1 $\beta$ , IL-1-Rezeptor (IL-1 R), IL-6, Fibronectin (FN1), PDGF-Rezeptor  $\alpha$  (PDGFRA), und PDGF-Rezeptor  $\beta$  (PDGFRB) in Ben-Men-1-Zellen untersucht. Nach einer Behandlung mit Überständen SP-stimulierter bzw. THY-exponierter THP-1-Makrophagen zeigte sich eine Induktion

der IL-6-, IL-1 $\beta$ - und PDGFRA-mRNA-Expression. Keine Änderungen fanden sich bei der Expression von IL-1R, FN1, PDGFRB und Col1A1 (**Abbildung 14**).

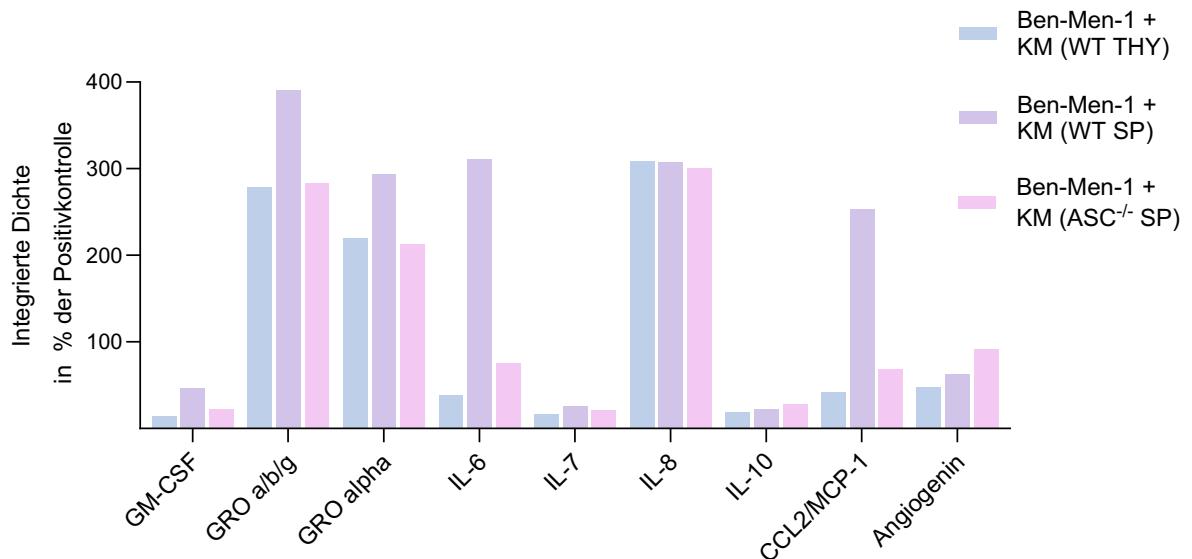


**Abbildung 14: Analyse der mRNA-Expression ausgewählter Zytokine und Fibroblastenmarker von Ben-Men-1-Zellen, die mit konditioniertem Medium stimulierter THP-1-Makrophagen behandelt wurden.** Nach Behandlung der Ben-Men-1-Zellen mit konditioniertem Medium (KM) THY-exponierter bzw. SP-stimulierter WT-THP-1-Makrophagen wurde der Überstand auf IL-1-Rezeptor (IL-1R), IL-6, IL-1 $\beta$ , Fibronectin (FN1), PDGF-Rezeptor  $\alpha$  (PDGFRA), PDGF-Rezeptor  $\beta$  (PDGFRB) und Kollagen I (Col1A1) untersucht. Als Kontrolle wurden unstimulierte Ben-Men-1-Zellen verwendet. Die Expression wird im Verhältnis zum Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; x den Faktor 1000) angegeben.

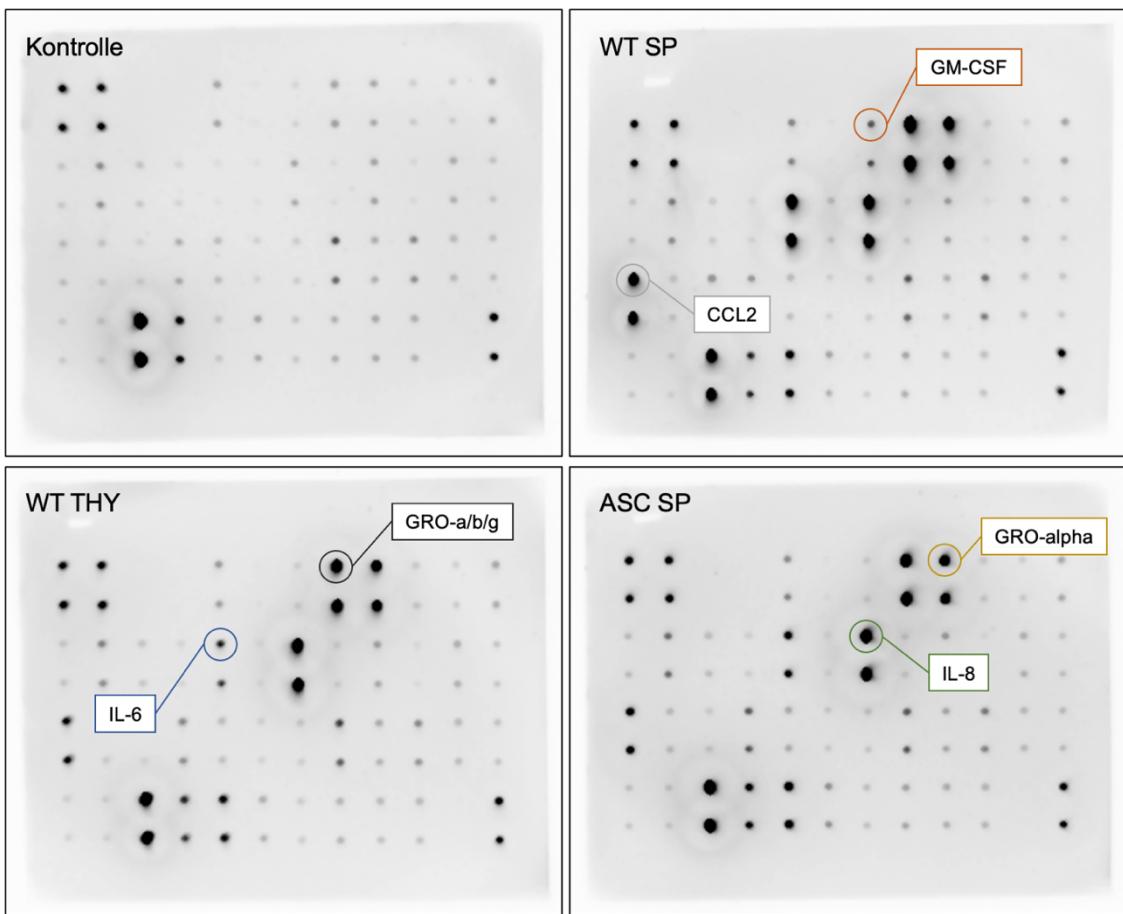
#### 4.1.11 Überblick über das Spektrum freigesetzter Botenstoffe von Ben-Men-1-Zellen nach einer Behandlung mit konditioniertem Makrophagenmedium

Um einen besseren Einblick in die Faktoren zu erhalten, die meningeale Zellen nach einer Exposition mit Pneumokokken freisetzen können, wurden in der Folge Ben-Men-1-Zellen mit Überständen WT THY-exponierter, ASC $^{-/-}$  SP-stimulierter oder WT SP-stimulierter THP-1-Makrophagen behandelt. Die gewonnenen Überstände wurden anschließend verwendet, um die Zytokin- und Chemokinproduktion von 42 Faktoren mittels eines kommerziell erhältlichen Antibody-Arrays semiquantitativ zu ermitteln. Für den Versuch wurden insgesamt drei Gruppen und eine Kontrolle (Blank) gewählt, die lediglich das Stimulationsmedium der Ben-Men-1-Zellen (MenCM, 1% FBS, 1% MCGS und 1% P/S) enthielt.

Im Vergleich zur Exposition von Ben-Men-1-Zellen mit Überständen THY-exponierter WT-THP-1-Makrophagen (WT THY) führte die Stimulation mit Überständen SP-stimulierter WT-THP-1-Makrophagen (WT SP) zu einer deutlich erhöhten Freisetzung von IL-6 und CCL2 in den Überstand. Ferner nahm die Expression des Differenzierungsfaktors GM-CSF erkennbar zu. Diese Veränderungen waren bei ASC<sup>-/-</sup>-THP-1-Makrophagen schwächer ausgeprägt als bei WT-THP-1-Makrophagen. Die Expression der Zytokine IL-7 und IL-10 sowie des Angiogenesefaktors Angiogenin unterschied sich zwischen den untersuchten Gruppen nicht. Die Chemilumineszenzsignale für das Zytokin IL-8 und die Chemokine GRO a/b/g sowie GRO alpha befanden sich bereits bei der ersten Aufnahme im Bereich der oberen Nachweisgrenze und waren daher nicht beurteilbar (**Abbildung 15**).



**Abbildung 15:** Antibody-Array-Untersuchungen zur Zytokin- und Chemokinsekretion ausgewählter Faktoren von Ben-Men-1-Zellen nach Behandlung mit konditioniertem Medium (KM) stimulierter THP-1 Makrophagen. Nach Behandlung der Ben-Men-1-Zellen mit konditioniertem Medium (KM) WT THY-exponierter, ASC<sup>-/-</sup> SP-stimulierter und WT SP-stimulierter THP-1-Makrophagen wurde der Überstand auf die Faktoren GM-CSF, GRO a/b/g, GRO alpha, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, CCL2/MCP-1 und Angiogenin untersucht. Jeweils dargestellt ist die integrierte Dichte (ID) des Chemilumineszenzsignals in % der Positivkontrolle.



**Abbildung 16: Antibody-Array der Überstände von Ben-Men-1-Zellen, die mit konditioniertem Medium von THP-1-Makrophagen stimuliert wurden.** Oben links: Kontrolle (Blank) mit Medium bestehend aus MenCM, 1% FBS, 1% MCGS, 1% P/S. Unten links: Expression ausgewählter Faktoren von Ben-Men-1-Zellen, die mit konditioniertem Medium THY-exponierter WT-THP-1-Makrophagen behandelt wurden. Oben rechts: Expression ausgewählter Faktoren von Ben-Men-1-Zellen, die mit konditioniertem Medium SP-stimulierter WT-THP-1-Makrophagen behandelt wurden. Unten rechts: Expression ausgewählter Faktoren von Ben-Men-1-Zellen, die mit konditioniertem Medium SP-stimulierter  $ASC^{-/-}$ -THP-1-Makrophagen behandelt wurden. Hervorgehoben sind die Chemilumineszenzsignale der Zytokine und Chemokine, die in den vier Gruppen unterschiedlich exprimiert wurden. Eine Übersicht über die Belegung des Antibody-Array findet sich in Kapitel 3.7.2.

## 4.2 Untersuchungen zur Interaktion von Immunzellen und primären humanen meningealen Zellen (HMC) sowie zerebralen Perizyten (HBVP)

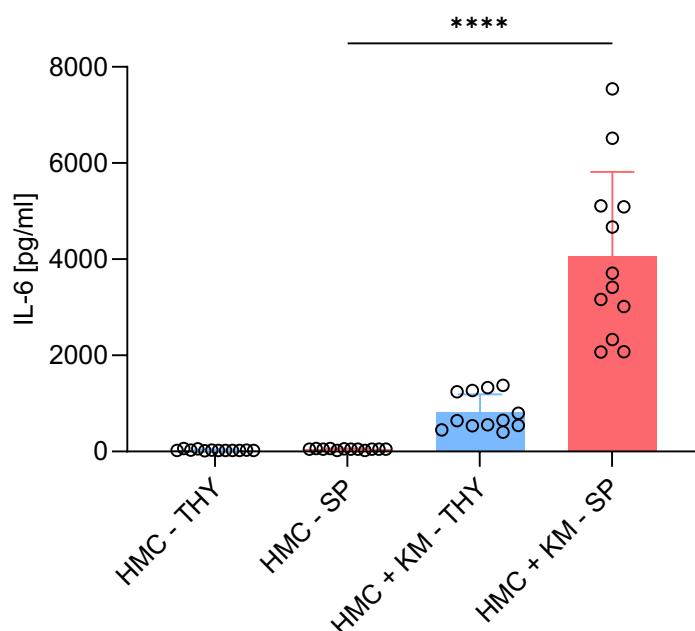
### 4.2.1 Interaktionsverhalten von HMC und THP-1-Makrophagen

Um zu überprüfen, ob die Befunde, die mit Ben-Men-1-Zellen erhoben worden waren, auf primäre meningeale Zellen zu übertragen sind, wurden die mit konditioniertem

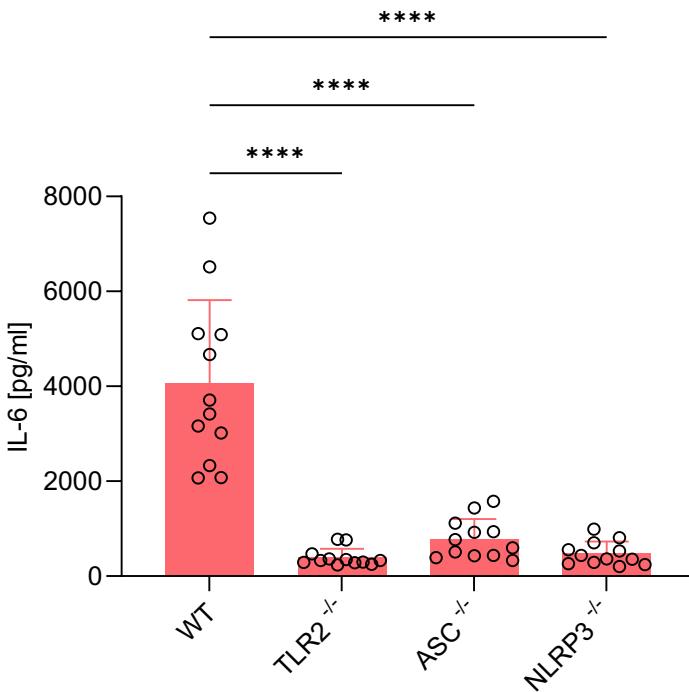
Medium durchgeführten Versuche mit primären, kommerziell erhältlichen HMC wiederholt.

Wie bei den Ben-Men-1-Zellen beobachtet, führte eine Exposition der HMC mit Überständen SP-stimulierter THP-1-Makrophagen zu einer hochsignifikanten Steigerung ( $p < 0,0001$ ) der IL-6-Produktion im Vergleich zu einer Stimulation von HMC-Monokulturen (**Abbildung 17**).

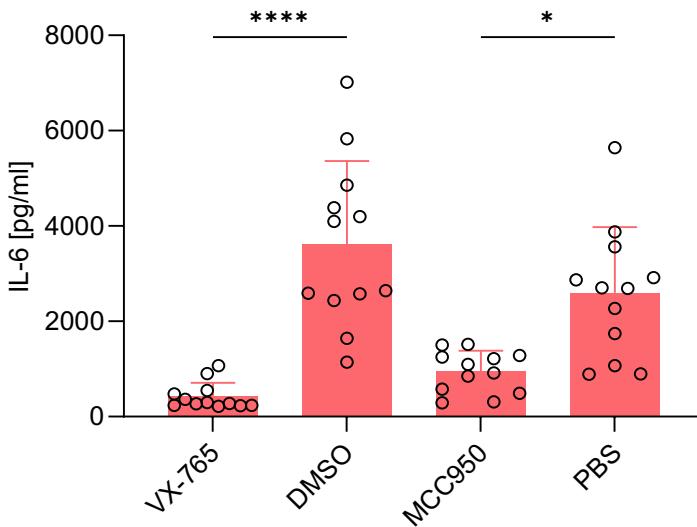
In weiteren Versuchsreihen wurden HMC mit konditioniertem Medium von Gen-defizienten THP-1-Makrophagen stimuliert. Analog zur Ben-Men-1-Zelllinie wurde eine signifikante Reduktion ( $p < 0,0001$ ) der Zytokinproduktion bei Exposition mit Überständen von TLR2<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> THP-1-Makrophagen im Vergleich zu denen von WT-Makrophagen beobachtet (**Abbildung 18**). Überdies wurden in ergänzenden Versuchsreihen selektive pharmakologische Inhibitoren (VX-765 und MCC950) (**Abbildung 19**) sowie ein IL-1 RA und ein funktionsblockierender IL-1 $\beta$  AK eingesetzt (**Abbildung 20**). Wie bei den Ben-Men-1-Zellen zeigten sich auch bei den HMC-Experimenten signifikante Unterschiede ( $p < 0,0001$  bzw.  $p < 0,05$ ) zwischen den jeweiligen Hemmstoffen und den Kontrollsubstanzen.



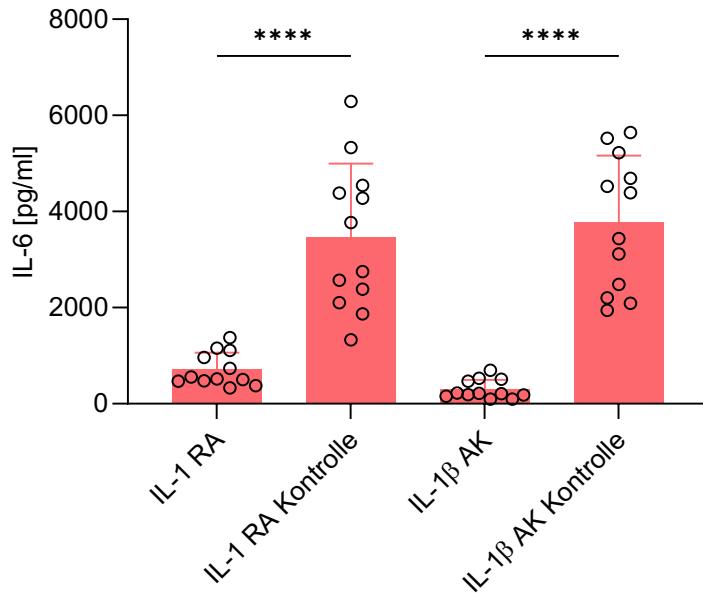
**Abbildung 17: IL-6-Produktion von HMC nach einer Exposition mit konditioniertem Medium (KM) von THP-1-Makrophagen.** WT-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden THY exponiert bzw. mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand zur Stimulation von HMC ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Als Kontrolle dienten HMC, die mit SP in einer Konzentration von  $0,5 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert wurden. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .



**Abbildung 18: IL-6-Produktion von HMC nach Exposition mit Überständen SP-stimulierter WT- bzw. Gen-defizienter THP-1-Makrophagen.** WT-/TLR2<sup>-/-</sup>/ASC<sup>-/-</sup>/NLRP3<sup>-/-</sup>-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand zur Stimulation von HMC ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .



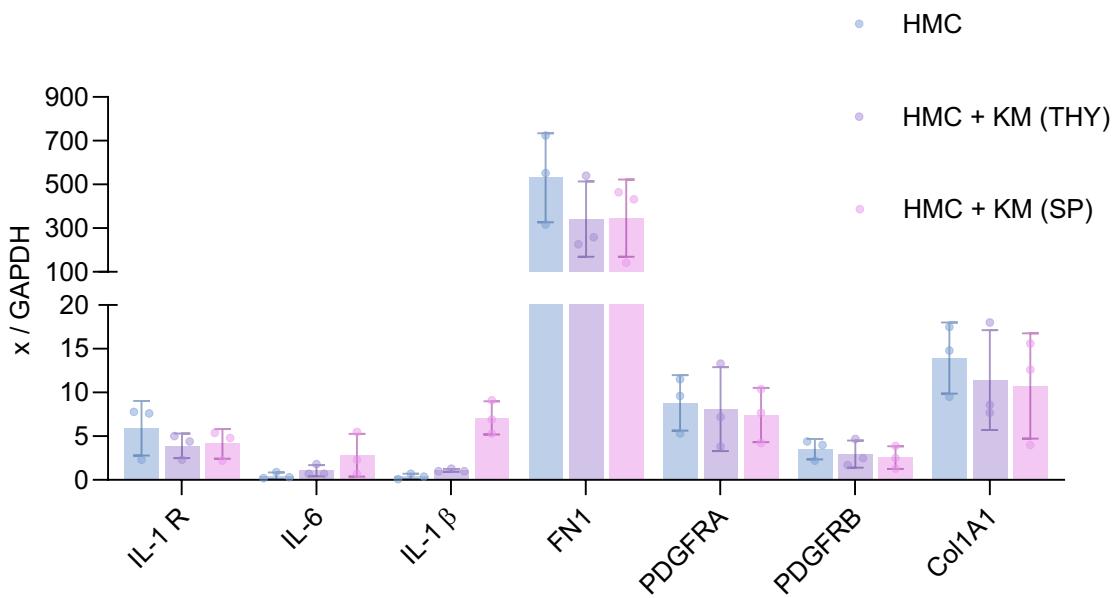
**Abbildung 19: IL-6-Produktion von HMC nach Einsatz pharmakologisch behandelter Überstände von THP-1-Makrophagen.** WT-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand zur Stimulation von HMC ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Vor Stimulation der THP-1-Makrophagen wurden den Überständen die Inhibitoren VX-765 und MCC950 hinzugegeben. DMSO wurde als Kontrolle für VX-765, PBS als Kontrolle für MCC950 verwendet. HMC wurden anschließend mit den gewonnenen Überständen stimuliert. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , \* =  $p < 0,05$ .



**Abbildung 20: Auswirkung einer Behandlung von HMC mit Überständen SP-stimulierter THP-1-Makrophagen mit einem IL-1-Rezeptor-Antagonist oder IL-1 $\beta$ -Antikörper.** WT-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden mit SP in einer Konzentration von  $3*10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand zur Stimulation von HMC ( $n=5*10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Zur Stimulation der HMC wurde ein IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1 RA) bzw. dessen Kontrollsubstanz Endotoxin-freies Wasser mit 0,1% FBS (IL-1 RA Kontrolle) oder ein IL-1 $\beta$ -Antikörper (IL-1 $\beta$  AK) bzw. dessen Kontrollsubstanz Maus-IgG1-Isotyp-Kontrollantikörper (IL-1 $\beta$  AK Kontrolle) beigefügt. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\*\* =  $p < 0,0001$ .

#### 4.2.2 PCR-Untersuchungen selektiver Faktoren in HMC

Analog zu den RT-PCR-Versuchen mit Ben-Men-1-Zellen wurde die Expression selektiver Zytokine und Fibroblastenmarker in HMC analysiert. Wie schon bei den Untersuchungen an Ben-Men-1-Zellen beobachtet, führte die Behandlung der HMC mit Überständen THY- und SP-stimulierter THP-1-Makrophagen sowie dem Kontrollmedium zu keinen Unterschieden in den Expressionsniveaus der Wachstumsfaktoren PDGFRA und PDGFRB, des Glykoproteins FN1, des Kollagens Col1A1 sowie des IL1-Rezeptors. Wie bereits in vorherigen Untersuchungen an Ben-Men-1-Zellen konnte auch hier eine erhöhte mRNA-Expression der Zytokine IL-6 und IL-1 $\beta$  bei einer Simulation mit SP-konditioniertem Medium von WT-THP-1-Makrophagen gegenüber beiden Vergleichsgruppen gezeigt werden (Abbildung 21).



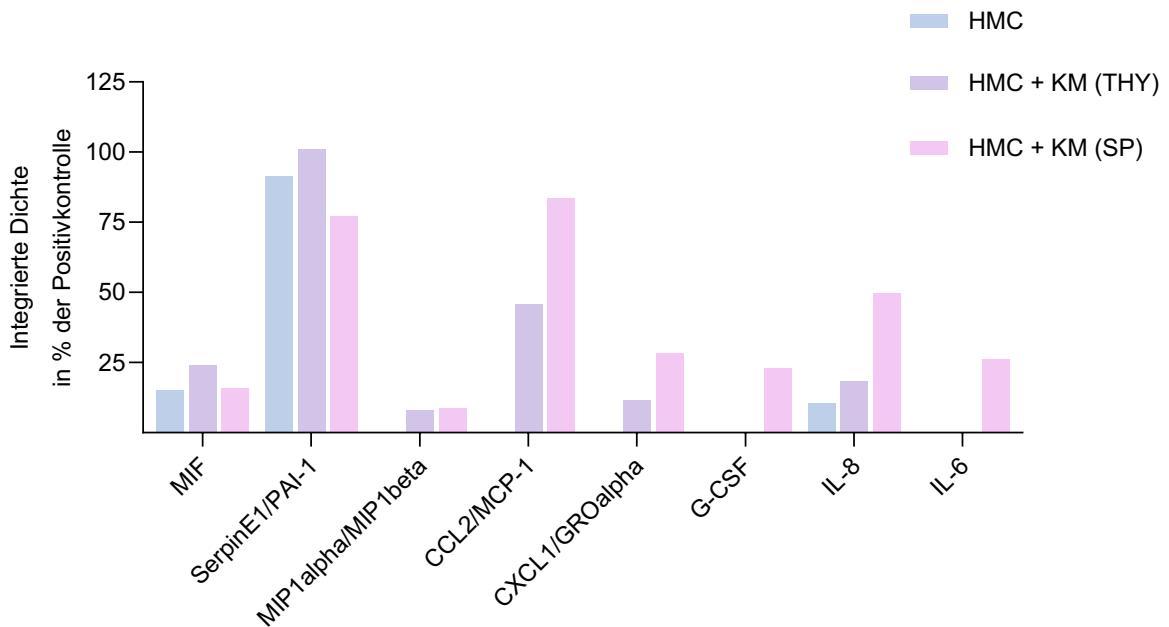
**Abbildung 21: Analyse der mRNA-Expression ausgewählter Faktoren in HMC.** WT-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden THY exponiert oder mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand (KM) zur Stimulation von HMC ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Als Kontrolle wurde unstimulierte HMC verwendet. Es wurde die Expression von IL-1-Rezeptor (IL-1R), IL-6, IL-1 $\beta$ , Fibronectin (FN1), PDGF-Rezeptor  $\alpha$  (PDGFRA), PDGF-Rezeptor  $\beta$  (PDGFRB) und Kollagen (Col1A1) untersucht. Die Expression wird im Verhältnis zum Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; x den Faktor 1000) angegeben.

#### 4.2.3 Antibody-Array-Untersuchungen zur Zytokinfreisetzung von HMC

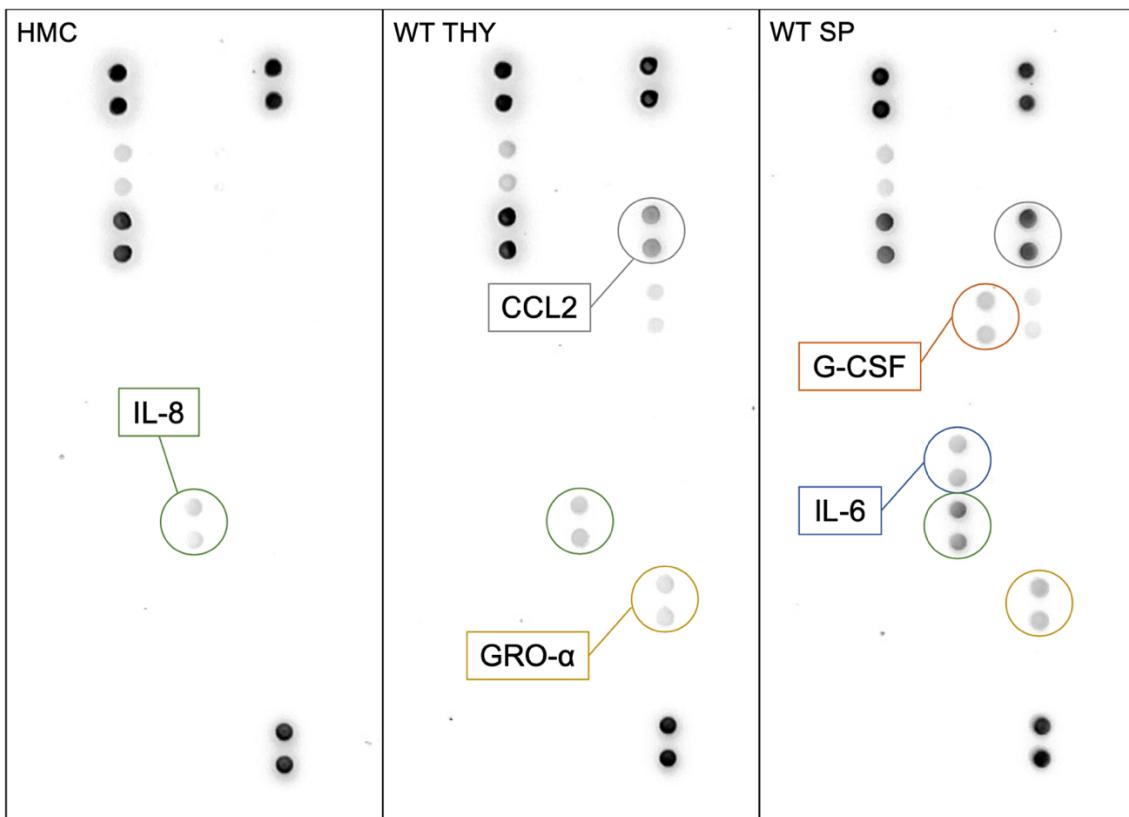
Analog zu den Experimenten an Ben-Men-1-Zellen wurde bei HMC ein kommerziell erorbener Antibody-Array verwendet, um das Spektrum der freigesetzten Zytokine und Chemokine genauer zu charakterisieren. Für die Untersuchungen wurden drei Gruppen und ein sogenannter Blank mit dem Stimulationsgrundmedium (MenCM, 1% FBS, 1% MCGS und 1% P/S) eingesetzt. Die drei Gruppen umfassten Überstände unstimulierter HMC sowie von HMC, die THY- oder SP-konditioniertem Medium von THP-1-Makrophagen ausgesetzt worden waren.

HMC exprimierten konstitutiv die Proteine Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (Serpine1/PAI-1) und IL-8. In Gegenwart von THY-konditioniertem Medium konnte überdies eine Freisetzung von CCL4, auch bekannt als Macrophage inflammatory protein-alpha und beta (MIP1 alpha/MIP1 beta) sowie des Chemokins CXCL1/GRO alpha beobachtet werden. Eine Exposition mit SP-

konditioniertem Medium resultierte in einer im Vergleich zu THY-konditioniertem Medium erhöhten Produktion der Faktoren CCL2, CXCL1/GRO alpha, G-CSF, IL-8 und IL-6 (**Abbildung 22**). Beim Vergleich der HMC-Befunde mit denen der Ben-Men-1-Zellen (**Abbildung 15**) zeigte sich, dass beide Zellpopulationen nach einer Stimulation mit konditioniertem Makrophagenmedium vermehrt CCL2, IL-6 und CXCL1/GRO alpha freisetzen. Im Vergleich zu Ben-Men-1-Zellen fand sich bei HMC zusätzlich eine erhöhte Produktion von IL-8 und G-CSF. In diesem Kontext muss allerdings daraufhin gewiesen werden, dass für die Analysen der Überstände von Ben-Men-1-Zellen und HMC unterschiedliche Proteinarrays verwendet wurden. Es ist daher möglich, dass die beobachteten Differenzen zumindest teilweise auf technische Unterschiede zwischen den Arrays zurückzuführen sind, beispielsweise aufgrund unterschiedlicher Sensitivitäten für einzelne Zytokine. Bei Verwendung des Raybiotech-Arrays wurde ein hohes Hintergrundrauschen und für einzelne Faktoren bereits bei den Kontrollen ein positives Signal im Bereich der oberen Nachweisgrenze beobachtet. Folglich war es unmöglich, bei diesen Faktoren eine weitere Zunahme durch die Stimulationen zu beobachten, weshalb für die Untersuchungen der HMC-Überstände ein Antibody-Array eines anderen Herstellers verwendet wurde.



**Abbildung 22: Zentrale Befunde eines Antibody-Arrays, bei dem Überstände von HMC analysiert wurden.** HMC wurden mit konditioniertem Medium THY-exponierter und SP-stimulierter THP-1-Makrophagen behandelt und der Überstand anschließend auf die Expression der Faktoren MIF, SerpinE1/PAI-1, MIP1 alpha, CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO alpha, G-CSF, IL-8 sowie IL-6 untersucht. Dargestellt ist die integrierte Dichte (ID) der Chemilumineszenzwerte in Prozent der Positivkontrolle. Nach Messung des emittierten Chemilumineszenzsignals wurden gemittelte Negativkontrollen subtrahiert und in Bezug zur Positivkontrolle gesetzt.



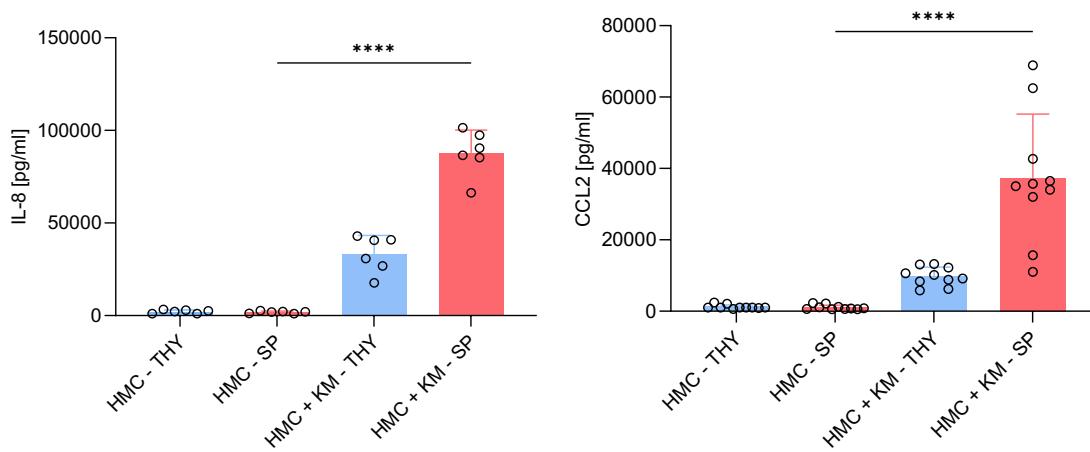
**Abbildung 23:** Chemilumineszenzbilder der Antibody-Array-Membranen unterschiedlicher, gesammelter HMC-Überstände. Links: Überstände unstimulierter HMC (basale Zytokinfreisetzung aus HMC). Mitte: Gesammelte Überstände von HMC, die mit konditioniertem Medium THY-exponierter THP-1-Makrophagen behandelt wurden. Rechts: Gesammelte Überstände von HMC, die mit konditioniertem Medium SP-stimulierter THP-1-Makrophagen stimuliert wurden. Hervorgehoben sind die Chemilumineszenzsignale der Zytokine und Chemokine, die in den drei Gruppen unterschiedlich exprimiert wurden. Eine Übersicht über die Belegung des Antibody-Array findet sich in Kapitel 3.7.2.

#### 4.2.4 Ergänzende Analysen zur IL-8- und CCL2-Freisetzung aus HMC in Folge einer Stimulation mit konditioniertem Makrophagenmedium

Bei den Antibody-Array-Analysen wurden, abgesehen von IL-6, das stets als Markerprotein verwendet wurde, Unterschiede in der Expression der Chemokine IL-8 und CCL2 beobachtet. Zur Überprüfung bzw. Bestätigung der semiquantitativen Array-Befunde wurden in der Folge zusätzliche ELISA-Analysen an Zellkulturüberständen von HMC durchgeführt.

Wie in **Abbildung 24** dargestellt, führte die Stimulation der HMC mit konditioniertem Medium SP-stimulierter WT-THP-1-Makrophagen zu einer signifikant ( $p < 0,0001$ ) erhöhten Freisetzung von IL-8 und CCL2. Die Konzentrationen von IL-8 und CCL2 waren in Überständen von HMC, die mit SP-konditioniertem Makrophagenmedium

stimuliert wurden, um das 50-fache (IL-8) bzw. 35-fache (CCL2) höher als in Überständen von HMC, die unter Monokulturbedingungen Pneumokokken ausgesetzt wurden (**Abbildung 24**). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass im konditionierten Makrophagenmedium bereits geringe Konzentrationen von IL-8, nicht aber von CCL2 nachzuweisen waren. Die entsprechende Messwerte sind in der Fußnote<sup>2</sup> zu finden.

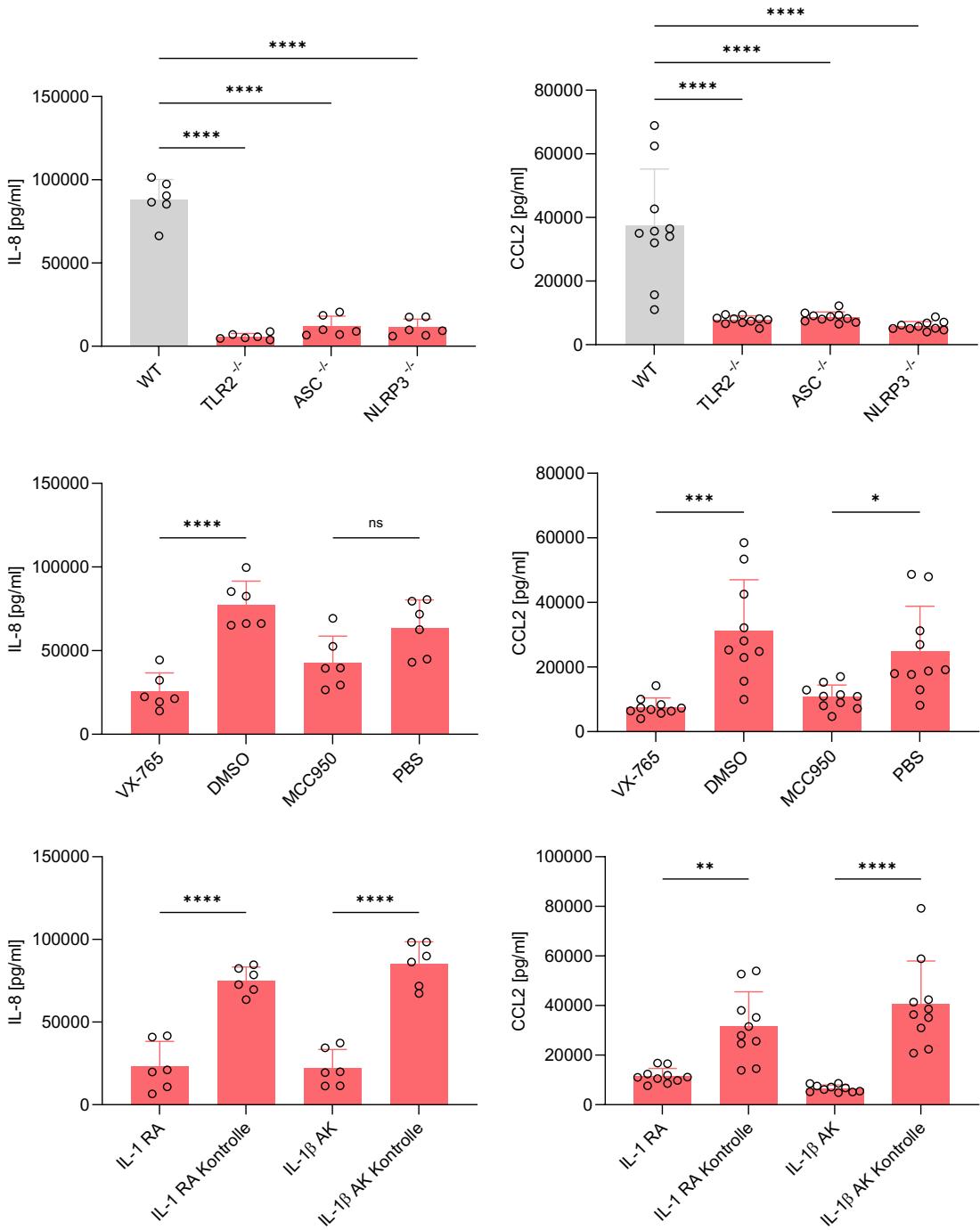


**Abbildung 24: IL-8- und CCL2-Produktion von HMC nach einer Behandlung mit konditioniertem Medium (KM) von THP-1-Makrophagen.** WT-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultursystem über 24 Stunden mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand zur Stimulation von HMC ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Als Kontrolle dienten HMC, die THY exponiert bzw. mit SP in einer Konzentration von  $0,5 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert wurden (erste beiden Balken). Der CCL2-Gehalt des Überstandes vorstimulierter THP-1-Makrophagen (KM - SP) lag unterhalb der Nachweisgrenze von 10 pg/ml. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Effekte des konditionierten Mediums Gen-defizienter THP-1-Makrophagen und des konditionierten Mediums von WT-THP-1-Makrophagen auf HMC verglichen. Nach einer Exposition mit konditioniertem Medium TLR2<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> sowie NLRP3<sup>-/-</sup>-Makrophagen wurden im HMC-Überstand signifikant ( $p < 0,0001$ ) niedrigere IL-8 und CCL2-Werte nachgewiesen als nach einer Exposition mit entsprechendem Medium von WT-THP-1-Makrophagen. Stimulierte man HMC mit

<sup>2</sup> Daten nicht dargestellt: In konditioniertem Medium von THP-1-Makrophagen konnte sowohl nach THY- als auch nach SP-Stimulation eine IL-8 Freisetzung beobachtet werden, wobei der Unterschied beider Gruppen nicht signifikant war (THP-1 WT THY:  $594 \text{ pg/ml} \pm 194 \text{ pg/ml}$ ; THP-1 WT SP:  $412 \text{ pg/ml} \pm 102 \text{ pg/ml}$ ;  $n=6$ ). TLR2-defiziente Makrophagen zeigten nach SP-Stimulation 10-fach niedrigere basale IL-8-Niveaus als die übrigen Gen-defizienten Zellen (THP-1 TLR2<sup>-/-</sup>:  $40 \text{ pg/ml} \pm 13 \text{ pg/ml}$ , THP-1 ASC<sup>-/-</sup>:  $423 \text{ pg/ml} \pm 170 \text{ pg/ml}$  und THP-1 NLRP3<sup>-/-</sup>:  $532 \text{ pg/ml} \pm 205 \text{ pg/ml}$ ;  $n=6$ ). Eine Freisetzung des Chemokins CCL2 konnte für WT- und Gen-defiziente THP-1-Makrophagen nicht nachgewiesen werden; alle Werte lagen unterhalb der Nachweisgrenze von 10 pg/ml.

konditioniertem Makrophagen-Medium VX-765- oder MCC950-behandelter THP-1-Makrophagen, konnte bei Einsatz von VX-765 eine signifikante Reduktion der IL-8- und der CCL2-Werte ( $p < 0,001$ ), bei MCC950 nur der CCL2-Werte im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Kontrollgruppen beobachtet werden. Eine Behandlung von HMC, die mit konditioniertem Makrophagenmedium stimuliert wurden, mit einem IL-1 RA oder einem IL-1 $\beta$  AK ging mit signifikant niedrigeren IL-8-und CCL2-Werten im Zellkulturüberstand als in den entsprechenden Kontrollgruppen einher ( $p < 0,01$  und  $p < 0,0001$ ) (**Abbildung 25**).



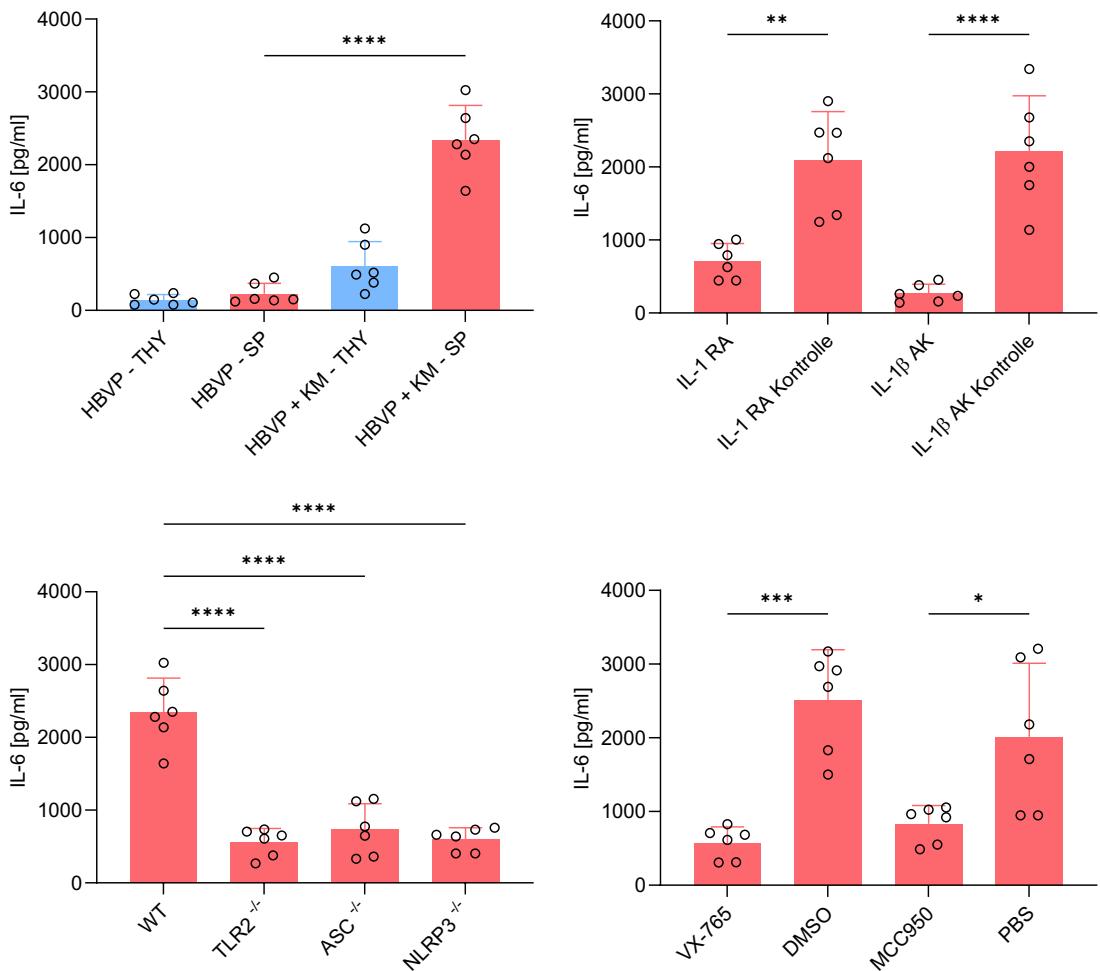
**Abbildung 25: IL-8 und CCL2-Produktion von HMC nach einer Exposition mit konditioniertem Medium von THP-1-Makrophagen.** WT-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand zur Stimulation von HMC ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Obere Reihe: Stimulatorische Aktivität von Überständen  $TLR2^{-/-}$ -,  $ASC^{-/-}$ - und  $NLRP3^{-/-}$ -THP-1-Makrophagen im Vergleich zu dem von WT-THP-1-Makrophagen. Mittlere Reihe: Effekte von konditioniertem Medium von WT-THP-1-Makrophagen, die entweder mit VX-765 oder MCC950 behandelt wurden. Untere Reihe: Effekt eines IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1 RA) bzw. dessen Kontrollsubstanz Endotoxinfreies Wasser mit 0,1% FBS (IL-1 RA Kontrolle) oder eines IL-1 $\beta$ -Antikörpers (IL-1 $\beta$  AK) bzw. dessen Kontrollsubstanz, ein entsprechender Maus-IgG1-Isotyp-Kontrollantikörper (IL-1 $\beta$  AK Kontrolle). Die Befunde einer alleinigen Stimulation von THP-1-Makrophagen sind in Fußnote 2 beschrieben. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ , ns = nicht signifikant.

#### **4.3 Perizyten (Human Brain Vascular Pericytes, HBVP) sind zur IL-1 $\beta$ -abhängigen Produktion von IL-6 fähig**

In ergänzenden Versuchsreihen sollte überprüft werden, ob die Befunde, die bei meningealen Zellen erhoben wurden, auf andere murale Zellpopulationen des ZNS übertragen werden können. Dafür wurden Versuche mit kommerziell erhältlichen primären humanen zerebralen Perizyten (HBVP) und konditioniertem Makrophagen-Medium durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe wurden bereits in einer gemeinsamen Publikation unserer Arbeitsgruppe veröffentlicht (Teske et al., 2023).

Wie in **Abbildung 26** dargestellt, waren die Ergebnisse, die Analysen von HBVP-Kulturen lieferten, mit den Resultaten bei meningealen Zellen vergleichbar: Nach einer Stimulation mit SP-konditioniertem Makrophagenmedium setzten HBVP signifikant mehr IL-6 frei als in entsprechenden Monokulturversuchen ( $p < 0,0001$ ) (Teske et al., 2023). Diese Freisetzung erreichte in etwa die Hälfte der IL-6-Menge, die bei der Stimulation von HMC beobachtet wurde (Teske et al., 2023).

Ebenso fanden sich nach einer Exposition von HBVP mit konditioniertem Medium SP-stimulierter TLR2 $^{-/-}$ , ASC $^{-/-}$  und NLRP3 $^{-/-}$ -THP-1-Makrophagen signifikant niedrigere IL-6-Werte als bei entsprechenden Experimenten mit konditionierten Medium von WT-THP-1-Makrophagen ( $p < 0,0001$ ) (Teske et al., 2023). Ferner ging eine Behandlung mit dem Caspase-1 Inhibitor VX-765 oder dem NLRP3-Hemmstoff MCC950 mit einer signifikanten Reduktion der IL-6-Produktion durch HBVP nach einer Stimulation mit konditioniertem Medium von WT-THP-1-Makrophagen einher ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,05$ ) (Teske et al., 2023) (**Abbildung 26**).

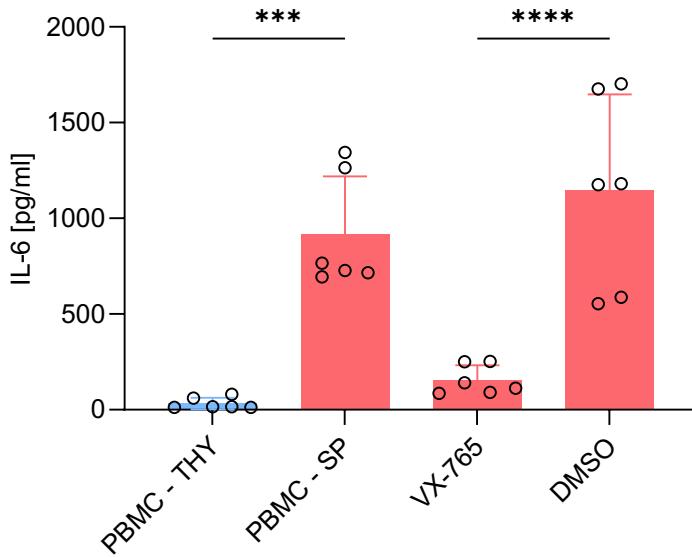


**Abbildung 26: IL-6-Freisetzung aus primären, humanen Perizyten (HBVP) nach einer Exposition mit konditioniertem Medium (KM) von THP-1-Makrophagen.** WT-THP-1-Makrophagen wurden im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert und der Überstand zur Stimulation von HMC ( $n=5 \cdot 10^4$  Zellen) in 96-Well-Zellkulturplatten herangezogen. Oben links: Effekt von konditioniertem Medium (KM) von THP-1-Makrophagen auf die IL-6-Produktion von HBVP im Vergleich zur entsprechenden Stimulation unter Monokulturbedingungen. Unten links: Stimulation von HBVP mit konditioniertem Medium SP-stimulierter, TLR2-, ASC- und NLRP3-defizienter THP-1-Makrophagen im Vergleich zu WT-THP-1-Makrophagen. Oben rechts: Effekt eines IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1 RA) und eines IL-1 $\beta$ -Antikörpers (IL-1 $\beta$  AK) im Vergleich zu den jeweiligen Lösungsmitteln Endotoxin-freies Wasser mit 0,1% FBS (IL-1 RA Kontrolle) sowie Maus-IgG1-Kontrollantikörper (IL-1 $\beta$  AK Kontrolle) auf die IL-6-Produktion von HBVP nach einer Exposition mit konditioniertem WT-THP-1-Makrophagenmedium. Unten rechts: Effekt der pharmakologischen Inhibitoren VX-765 und MCC950 auf die durch konditioniertes Medium von WT-THP-1-Makrophagen getriggerte IL-6-Freisetzung aus HBVP. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ .

#### **4.4 Auch periphere mononukleäre Zellen (PBMC) können die Reaktivität meningealer Zellen bei einer Exposition mit Pneumokokken modulieren**

Die bisher vorgestellten Befunde wurden ausschließlich mit konditioniertem Medium von THP-1-Makrophagen erhoben. In einer abschließenden Versuchsreihe sollte überprüft werden, ob auch primäre humane Immunzellen die Aktivität meningealer Zellen durch eine Freisetzung von IL-1 $\beta$  in Folge einer Pneumokokken-Exposition beeinflussen können. Bei diesen Experimenten wurden periphere mononukleären Blutzellen (PBMC) eingesetzt. Diese wurden aus Blutproben dreier verschiedener Probanden isoliert. Konditioniertes Medium wurde entsprechend des bei THP-1-Makrophagen verwendeten Versuchsaufbaus hergestellt.

Nach einer Stimulation mit SP-konditioniertem PBMC-Medium setzten Ben-Men-1-Zellen signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr IL-6 frei als nach einer Exposition mit THY-konditioniertem Medium. Durch eine Behandlung mit dem Caspase-1-Inhibitor VX-765 konnte dieser starke Anstieg der Zytokinproduktion signifikant vermindert werden ( $p < 0,0001$ ). Diese Befunde deuten auf eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms bei der ausgeprägten IL-6-Freisetzung aus Ben-Men-1-Zellen nach einer Stimulation mit konditionierten PBMC-Medium hin (**Abbildung 27**) und lassen vermuten, dass PBMC, analog zu THP-1-Makrophagen, über einen NLRP3-/Caspase-1-/IL-1 $\beta$ -abhängigen Prozess Ben-Men-1-Zellen zur IL-6-Produktion anregen können.



**Abbildung 27: IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen bei einer Exposition mit konditioniertem Medium peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC).** Nach Entnahme der Blutproben und Isolation der PBMC wurden die Immunzellen im 24-Well-Zellkultur-System über 24 Stunden THY exponiert oder mit SP in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml stimuliert. In ausgewählten Versuchsgruppen wurden PBMC mit dem Caspase-1 Inhibitor VX-765 oder dessen Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Überstände gewonnen und zur Stimulation von Ben-Men-1-Zellen verwendet. Die Nachweisgrenze betrug 10 pg/ml. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## 5 Diskussion

In dieser Dissertation sollte untersucht werden, wie Makrophagen die Reaktion humaner meningealer Zellen auf eine Exposition mit Pneumokokken modulieren. Die Untersuchungen wurden in direkten und indirekten Ko-Kultur-Systemen durchgeführt. Den wissenschaftlichen Hintergrund bildeten frühere Studien unserer Arbeitsgruppe, bei denen beobachtet wurde, dass eine meningeale Zelllinie, namentlich Ben-Men-1, in direkter Ko-Kultur mit THP-1-Makrophagen bei einer Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* signifikant mehr Interleukin (IL)-6 als in Monokultur produziert (Ercegovac, 2024).

Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob für diesen Effekt ein direkter Kontakt der beiden Zellpopulationen vonnöten ist oder ob Makrophagen bei einem Kontakt mit Pneumokokken bestimmte Botenstoffe freisetzen, die die Aktivität der meningealen Zellen, wie z.B. die IL-6-Produktion, entscheidend beeinflussen. Im letztgenannten Falle, also bei einer Modulation der Zytokinproduktion im Modell der indirekten Ko-Kultur von meningealen Zellen und Makrophagen, sollten die verantwortlichen Botenstoffe identifiziert werden.

In mehreren Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass die verstärkte IL-6-Produktion durch meningeale Zellen sowohl bei einem direkten als auch indirekten Kontakt mit Makrophagen nachweisbar war. Allein die Zugabe von konditioniertem Makrophagen-Medium reichte aus, um eine starke Zytokinfreisetzung aus meningealen Zellen auszulösen. Diese Daten belegten, dass lösliche Mediatoren die Modulation meningealer Zellen durch Makrophagen vermitteln. In weiteren Untersuchungen konnte das von Makrophagen freigesetzte Zytokin IL-1 $\beta$  als Mediator dieses Effekts identifiziert werden. Die Befunde, die in Zellkultur-Modellen von Ben-Men-1- und THP-1-Zellen erhoben wurden, konnten mit primären humanen meningealen Zellen und humanen PBMC, die aus Blutproben von Probanden gewonnen wurden, nachvollzogen werden. Ebenso konnte in einer abschließenden Versuchsreihe gezeigt werden, dass sich murale Zellen, hier humane zerebrale Perizyten, in unserem Versuchsaufbau ähnlich wie meningeale Zellen verhielten (Teske et al., 2023).

Im Folgenden sollen die Befunde zur Reaktion meningealer Zellen und Makrophagen auf eine Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*, zur Modulation der Aktivität meningealer Zellen durch Makrophagen, der Rolle des IL-1 $\beta$  bei diesem Phänomen sowie der Wirkung

von Pneumolysin (PLY) im zeitlichen Verlauf einer Infektion vor dem Hintergrund der bekannten Daten der wissenschaftlichen Literatur diskutiert werden.

## **5.1 Die Reaktion meningealer Zellen und Makrophagen auf eine Infektion mit *Streptococcus pneumoniae***

Meningeale Zellen sind zur Produktion von Zytokinen fähig. Frühere Zellkulturstudien konnten zeigen, dass Meningitis-auslösende Bakterien meningeale Zellen zur Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Zytokine und Chemokine anregen können (Christodoulides et al., 2002; Fowler et al., 2004; Fowler et al., 2006; Wells et al., 2001). So berichtete die Arbeitsgruppe von Christodoulides im Jahr 2002, dass die Stimulation humaner Menigeomzellen mit *Neisseria meningitidis* des Serotyps MC58 zur Produktion großer Mengen des Zytokins IL-6 führt. Ähnliche Ergebnisse berichteten Fowler et al. (2004) in ihren Untersuchungen an humanen Menigeomzellen. Sie zeigten, dass *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae* die Freisetzung von IL-6, IL-8, CCL2 und CCL5 aus diesen Zellen induzieren (Fowler et al., 2004). Im Gegensatz dazu führte die Stimulation der Menigeomzellen mit lebenden *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) in einer Konzentration von  $10^2$  bis  $10^8$  CFU/ml zu keiner signifikanten Produktion dieser Zytokine und Chemokine (Fowler et al., 2004). Zudem erwiesen sich hohe Pneumokokkenkonzentrationen – anders als *N. meningitidis* oder *H. influenzae* – als zytotoxisch für die untersuchten meningealen Zellen (Fowler et al., 2004).

Im Gegensatz zu den Befunden von Fowler et al. (2004) wurde in den vorliegenden Untersuchungen eine signifikante, wenn auch vergleichsweise geringe Freisetzung des Zytokins IL-6 bei einer Stimulation von Ben-Men-1-Zellen in Monokultur mit  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml Pneumokokken beobachtet. Vergleichbar mit der Studie von Fowler et al. (2004) wurden in den Experimenten der vorgelegten Arbeit Menigeomzellen sowie Bakterien des Laborstammes *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) verwendet. Während die Arbeitsgruppe von Fowler et al. (2004) die Zellen aus frisch gewonnenen Patientenmaterial isolierten und kultivierten, wurde für diese Untersuchungen mit Ben-Men-1-Zellen eine etablierte, gut charakterisierte Menigeomzelllinie herangezogen (Puttmann et al., 2005). Zudem wurde für die Stimulationen MCM-Medium mit 1% MCGS und 1% FBS verwendet, während Fowler et al. mit DMEM-Glutamax-Medium mit 0.1% FBS arbeiteten (Fowler et al., 2004).

Mögliche Erklärungen für die divergenten Befunde zwischen der vorgelegten Studie und der von Fowler et al. (2004) könnten folgende sein: Die Arbeitsgruppe von Fowler et al. stimulierte die meningealen Zellen mit den bakteriellen Konzentrationen  $1 \cdot 10^2$ ,  $1 \cdot 10^4$ ,  $1 \cdot 10^6$  und  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml, während in diesem Forschungsvorhaben  $3 \cdot 10^7$  CFU/ml Bakterien eingesetzt wurden. Diese Konzentration zeigte in früheren Analysen unserer Arbeitsgruppe einen signifikanten stimulatorischen, aber nur einen geringen zytotoxischen Effekt auf Ben-Men-1-Zellen (Ercegovac, 2024). Eine Konzentration von  $1 \cdot 10^7$  CFU/ml Bakterien wirkte in dem Ansatz weder stimulatorisch noch zytotoxisch, während eine Konzentration von  $8 \cdot 10^7$  CFU/ml fast ausschließlich zytotoxische Wirkung zeigte (Ercegovac, 2024). Diese Befunde sprechen dafür, dass nur in einem engen bakteriellen Konzentrationsbereich eine stimulatorische Wirkung auf Ben-Men-1-Zellen beobachtet werden kann.

Ferner muss erwähnt werden, dass die Arbeitsgruppe von Fowler et al. (2004) mit lebenden Bakterien arbeitete, während in den vorgelegten Experimenten Antibiotikalysierte Pneumokokken verwendet wurden. Die Lyse sollte garantieren, dass die Bakterienkonzentrationen bei den Stimulationen in unterschiedlichen Zellkultur-Systemen vergleichbar sind; mögliche Effekte der Zellkultur-Systeme auf das bakterielle Wachstum wären infolge des Einsatzes bereits lysierter Bakterien ohne Bedeutung. Ein weiterer Effekt der Lyse ist die damit einhergehende Freisetzung großer PAMP-Mengen, wie z.B. des Toxins PLY oder von Lipoproteinen der Zellmembran (Spreer et al., 2003; Stucki et al., 2007). Dadurch könnte die stimulatorische Wirkung der lysierten Bakterien größer sein als die der entsprechenden Menge an lebenden Bakterien.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Befunde könnte sein, dass sich lebende Bakterien während der Stimulationsdauer im Zellkulturmedium stark vermehren. Dies könnte zu einem erheblichen Anstieg der Bakterienzahl führen, was wiederum mit einem hohen Verbrauch an Nährstoffen einhergeht. Der daraus resultierende Nährstoffmangel könnte die meningealen Zellen indirekt schädigen und so zu deren Absterben beitragen. Dieser Zelluntergang könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, warum in der Studie von Fowler et al. (2004) keine Zytokinfreisetzung nachweisbar war.

Im Gegensatz zu meningealen Zellen konnte in Zellkulturüberstanden von in Monokultur stimulierten THP-1-Makrophagen in den vorgelegten Untersuchungen kein IL-6 detektiert werden; alle Messwerte lagen unterhalb der Nachweigrenze von 10 pg/ml. Diese Ergebnisse widersprechen früheren Untersuchungen zu THP-1-Monozyten, die

nach Stimulation mit Pneumokokken eine Produktion von IL-6 beobachteten (Cauwels et al., 1997; Nagai et al., 2018; Ren et al., 2019). Die Differenzen könnten sich einerseits durch den Einsatz unterschiedlicher Pneumokokkenpräparationen, d.h. lebender Pneumokokken bzw. P/S-lysierte Pneumokokken, und Pneumokokkenstämme, andererseits durch die Verwendung verschiedener Differenzierungsprotokolle für die THP-1-Zelllinie erklären (Liu et al., 2023; Mohd Yasin et al., 2022; Pinto et al., 2021).

## **5.2 Die Modulation der Aktivität meningealer Zellen durch Makrophagen**

Es ist bekannt, dass verschiedene Subpopulationen von peripheren Fibroblasten in Ko-Kultur mit Makrophagen bzw. Monozyten verstärkt proinflammatorische Zytokine produzieren (Chen et al., 1998; Holt et al., 2010; Lind et al., 1998; Ma et al., 2012; Watanabe et al., 2017). Dagegen liegen bisher keine Erkenntnisse über das Interaktionsverhalten von meningealen Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen vor. In der vorliegenden Studie wurde erstmalig die Modulation der Zytokinproduktion meningealer Zellen durch Makrophagen bzw. Monozyten genauer analysiert.

In zellkulturellen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass eine Ko-Kultivierung muriner peritonealer Makrophagen mit kardialen Fibroblasten zu einer mehr als zehnfach höheren IL-6-Produktion als die jeweiligen Monokulturen führte (Ma et al., 2012). Wurden anstelle von Wildtyp (WT)-Fibroblasten IL-6-defiziente Zellen verwendet, war der Anstieg der IL-6-Expression nicht nachweisbar, während die Ko-Kultivierung von IL-6-defizienten Makrophagen mit WT-Fibroblasten mit einer IL-6-Expression einherging, die derjenigen bei ausschließlicher Ko-Kultur beider WT-Zellen ähnelte (Ma et al., 2012). Diese Befunde sprechen dafür, dass IL-6 vorwiegend von Fibroblasten gebildet und diese Aktivität der Fibroblasten durch benachbarte Makrophagen moduliert wird. Dieser Befund wird durch in-vitro-Untersuchungen zur Zytokinregulation bei der rheumatoïden Arthritis gestützt, bei denen eine Ko-Kultivierung synovialer Fibroblasten mit zu Monozyten ausdifferenzierten U937-Zellen auch ohne zusätzliche Stimulation mit einer im Vergleich zur Fibroblasten-Monokultur signifikant erhöhten IL-6-Produktion einherging (Chen et al., 1998). Andere Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  konnten weder in den Überständen der Ko-Kulturen noch der Fibroblasten-Monokulturen nachgewiesen werden (Chen et al., 1998). Im Gegensatz dazu berichteten Watanabe et al. (2017), dass eine Ko-Kultivierung synovialer Fibroblasten mit CD14-positiven PBMC zu einer

vermehrten Expression von IL-6, aber auch IL-1 $\beta$  und IL-8 führte. Entsprechend dieser Studie konnte in den vorgelegten Untersuchungen gezeigt werden, dass meningeale Fibroblasten, in diesem Fall HMC, in Ko-Kultur mit THP-1-Makrophagen bereits unter Kontrollbedingungen signifikant höhere Konzentrationen des Zytokins IL-6, aber auch weiterer Faktoren wie IL-8 oder CCL2 als die entsprechenden Monokulturen in den Zellkulturüberstand freisetzen. Kurz zusammengefasst lässt sich aus den hier beschriebenen Befunden die Hypothese ableiten, dass Makrophagen den Grundaktivitätszustand von Fibroblasten verändern können, vermehrt Zytokine wie IL-6 zu produzieren.

In den genannten Studien zu den Interaktionen von Makrophagen und Fibroblasten fanden ausschließlich direkte Ko-Kultur-Modelle Anwendung, die keine Rückschlüsse auf die Mechanismen der Kommunikation zwischen den Zellen erlauben. Lind et al. (1998) berichteten erstmals Befunde aus einem indirekten Ko-Kultur-Modell: Wurden humane dermale Fibroblasten und Makrophagen in getrennten Kompartimenten mittels Polycarbonat-Membraneinsätzen kultiviert, zeigte sich bei einem Makrophagen-Fibroblasten-Verhältnis von 1:2 eine vierfache und bei einem Verhältnis von 5:1 eine etwa zehnfache Steigerung der IL-6-Produktion im Vergleich zur Fibroblasten-Monokultur (Lind et al., 1998). Auch mit konditioniertem Makrophagen-Medium wurde bereits in der Vergangenheit gearbeitet (Holt et al., 2010). Die Arbeitsgruppe um Holt et al. konnte zeigen, dass die Anzucht von NIH3T3-Fibroblasten in konditioniertem Makrophagenmedium von RAW 264.7-Zellen mit einer signifikanten Hochregulierung der Zytokine IL-6, TNF, CCL2, CCL3 und CCL4 einherging (Holt et al., 2010).

Die Befunde dieser Studien stimmen mit den hier vorgelegten Beobachtungen überein und lassen vermuten, dass die Modulation der Aktivität der Fibroblasten durch Makrophagen vorwiegend über lösliche Botenstoffe vermittelt wird. Der Befund, dass die stimulatorische Wirkung bei direktem Kontakt zwischen Fibroblasten und Makrophagen stärker ausgeprägt ist als in einer indirekten Ko-Kultur, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellkommunikation bei Verwendung von Filtersystemen weniger effizient verläuft. Dies könnte zum einen daran liegen, dass nur ein Teil der freigesetzten Botenstoffe mit den Fibroblasten interagiert, während der übrige Anteil im oberen Kompartiment verbleibt und nicht durch die Filtermembran zu den Fibroblasten gelangt. Zum anderen ist es möglich, dass Botenstoffe im konditionierten Medium vor

der Verwendung in den Ko-Kulturversuchen zum Teil neutralisiert oder gar abgebaut werden.

Ko-Kultur-Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten ferner, dass die Produktion von Zytokinen wie IL-6 von Fibroblasten sowie Endothelzellen bei gemeinsamer Kultivierung mit Makrophagen durch exogene Stimuli, wie phagozytierbare Partikel, Lipopolysaccharide sowie Bakterien (*Streptococcus suis*), weiter signifikant gesteigert werden kann (Lind et al., 1998; Tanabe & Grenier, 2009; Yang et al., 2023). In Übereinstimmung mit diesen Studien wurde beobachtet, dass sowohl im direkten als auch im indirekten Ko-Kultur-Modell die Stimulation mit Pneumokokken zu einer weiteren, deutlichen Steigerung der Zytokinproduktion durch meningeale Fibroblasten führte (Referenzwerte s. Kapitel 4.1.1). Gleiche Befunde lieferten Experimente mit konditionierten Medien, da die Behandlung meningealer Fibroblasten mit Überstanden bakteriell stimulierter Makrophagen eine beträchtliche Erhöhung der IL-6-Produktion im Vergleich zu entsprechenden Kontrollmedien bewirkte. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass Makrophagen die Präsenz von Pneumokokken detektieren, in der Folge aktiviert werden und Botenstoffe freisetzen, die wiederum die Zytokinproduktion meningealer Zellen in der Nachbarschaft steigern können.

### **5.3 Die Rolle des IL-1 $\beta$ bei der Modulation meningealer Zellen durch Makrophagen**

Frühere Studien haben gezeigt, dass meningeale Zellen das Zytokin IL-6 produzieren können, wenn sie mit Zytokinen, darunter IL-1 $\beta$  und IL-4, stimuliert werden (Boyle-Walsh et al., 1994; Wieseler-Frank et al., 2007; Wu et al., 2005). Das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  gilt überdies als potenter Induktor der IL-6-Produktion in verschiedenen peripheren Fibroblasten-Subpopulationen (Content et al., 1985; Kitanaka et al., 2019; Ogura et al., 2002; Van Damme et al., 1987).

In Untersuchungen an verschiedenen Meningo-Zelllinien beobachteten Boyle-Walsh et al. (1994), dass eine Stimulation mit IL-1 $\beta$  die IL-6-Produktion dieser Zellen um das 10-fache steigern kann. Diese Befunde werden von den Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe von Shimodaira et al. (2018) bestätigt. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Expression von Osteopontin (OPN) in einem Ko-Kultur-Modell von primären Fibroblasten der Lunge (NHLF) und THP-1-Makrophagen. Dabei stellten sie fest, dass eine Stimulation mit IL-1 $\beta$  zu einer vermehrten Expression von IL-6 und konsekutiv zur

Hochregulierung der Osteopontin-Produktion in den Fibroblasten führte (Shimodaira et al., 2018).

Aufgrund dieser Befunde ergab sich die Fragestellung, ob IL-1 $\beta$  für die Modulation der Aktivität meningealer Zellen verantwortlich sein könnte und welche Signalwege die IL-1 $\beta$ -Freisetzung von Makrophagen bei einer Exposition mit Pneumokokken regulieren. Untersuchungen zur thermischen Stabilität von IL-1 $\beta$  in wässrigen Lösungen bei Temperaturen zwischen 5 °C und 60 °C zeigten, dass Temperaturen über 39 °C eine funktionelle Inaktivierung und Degradation von IL-1 $\beta$  verursachen (Gu et al., 1991). Die molekulare Masse von IL-1 $\beta$  wurde erstmals in den 1980er Jahren von Auron et al. (1984) bestimmt. Die Arbeitsgruppe identifizierte und charakterisierte die cDNA für das humane IL-1 $\beta$ -Vorläuferprotein, das eine Molekülmasse von etwa 31 kDa aufweist, während die aktive, proteolytisch gespaltene Form von IL-1 $\beta$  eine Molekülmasse von ungefähr 17 kDa besitzt (Auron et al., 1984). Die vorgelegten Untersuchungen zur Thermostabilität und Größeneingrenzung an konditionierten Medien zeigten, dass die Botenstoffe, die von Makrophagen freigesetzt werden und die Aktivitätsänderung meningealer Zellen vermitteln, hitzelabil sind und eine Größe zwischen 3 kDa und 50 kDa aufweisen. Diese Daten stützen die Hypothese, dass ein oder mehrere Zytokine für dieses Phänomen verantwortlich sind.

Toll-like-Rezeptoren (TLR's) spielen eine zentrale Rolle bei der Erkennung mikrobieller Pathogene, wobei TLR2 entscheidend für die spezifische Erkennung von Lipoproteinen Gram-positiver Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae* ist, was zur Aktivierung des NF-κB-Signalwegs und in der Folge zur Produktion entzündungsfördernder Zytokine führt, die bei der Steuerung der Immunabwehr eine bedeutende Rolle spielen (Tomlinson et al., 2014). In früheren Studien konnte von unserer Arbeitsgruppe, aber auch von anderen Arbeitsgruppen im Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis gezeigt werden, dass eine TLR2-Defizienz in einer verminderten Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  resultierte (Klein et al., 2008; Koedel et al., 2003; Too et al., 2019). Weiterhin wiesen TLR2-defiziente Mäuse im Krankheitsmodell der Pneumokokken-Meningitis ein schlechteres klinisches Ergebnis als WT-Mäuse auf, bedingt durch eine höhere Bakterienlast und schwerere intrakranielle Komplikationen (Bohland et al., 2016; Echchannaoui et al., 2002; Koedel et al., 2003). In den vorliegenden Untersuchungen konnte in Einklang mit der Literatur eine verminderte IL-1 $\beta$ -Produktion TLR2-defizienter gegenüber WT-THP-1-Makrophagen bei Stimulation mit Pneumokokken

beobachtet werden. Ebenso wurde bei TLR2-defizienten Makrophagen festgestellt, dass die Verminderung der IL-1 $\beta$ -Freisetzung mit einer reduzierten Aktivierung meningealer Zellen, d.h. einer geringeren Zytokinproduktion, einherging. Die Befunde ließen eine zentrale Rolle von TLR2 in der Erkennung des Pathogens *Streptococcus pneumoniae* durch THP-1-Makrophagen und in der nachfolgenden Aktivierung meningealer Zellen vermuten. Im Weiteren sollten deshalb die molekulare Prozesse identifiziert werden, die der TLR2-vermittelten IL-1 $\beta$ -Produktion in Makrophagen und der damit assoziierten Modulation der meningealen Zellaktivität zugrunde liegen.

Die Freisetzung des Zytokins IL-1 $\beta$  durch Immunzellen erfolgt in einem zweistufigen Prozess: Nach der Erkennung des Pathogens durch TLR's (z.B. TLR2), die eine NF- $\kappa$ B-abhängige Synthese des IL-1 $\beta$ -Vorläufers pro-IL-1 $\beta$  auslösen, sind Multiproteinkomplexe, bei bakteriellen Infektionen häufig das NOD-, LRR- und pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3)-Inflammasom mit dem zugehörigen Adapterprotein Apoptosis-Associated Speck-like Protein containing a CARD (ASC), entscheidend für die Prozessierung und Aktivierung des Vorläuferproteins durch Caspase (Bauernfeind et al., 2009; Kelley et al., 2019; Ta & Vanaja, 2021). Sowohl die genetische Depletion als auch die pharmakologische Blockade von Caspase-1 wurde in Versuchen unserer Arbeitsgruppe mit einer verminderten Produktion von IL-1 $\beta$ , einer geringeren Entzündungsreaktion sowie einem günstigeren Verlauf einer experimentellen Pneumokokken-Meningitis in Verbindung gebracht (Koedel, Winkler, et al., 2002).

Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der Aktivierung der Caspase-1 war Gegenstand zahlreicher Studien zu invasiven Pneumokokken-Erkrankungen, die unterschiedliche, teils widersprüchliche Ergebnisse lieferten (Franchi et al., 2012; Surabhi et al., 2020). Während Untersuchungen zur Pneumokokken-Infektion des Respirationstraktes eine höhere Mortalität bei ASC- und NLRP3-defizienten Mäusen beobachteten und somit eine protektive Rolle des NLRP3-Inflammasom demonstrierten (Fang et al., 2011; McNeela et al., 2010; Witzenrath et al., 2011), berichteten andere Studien in Tiermodellen der Pneumokokken-Pneumonie (van Lieshout et al., 2018) und der Pneumokokken-Meningitis (Hoegen et al., 2011) gegenteilige Ergebnisse: Im Gegensatz zu den oben genannten Publikationen berichteten van Lieshout et al. (2018) von einer verbesserten Infektabwehr, einer eingeschränkten bakteriellen Dissemination sowie reduzierten Letalität von NLRP3- und ASC-defizienten Mäusen im Vergleich zu entsprechenden WT-Kontrollen in einem murinen Modell einer letalen Pneumokokken-Pneumonie.

Ebenso zeigten Hoegen et al. (2011) in einem Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis, dass das Fehlen von Komponenten von NLRP3 und ASC mit einem günstigeren klinischen Verlauf und geringeren neuropathologischen Veränderungen im Vergleich zu den entsprechenden WT-Tieren verbunden war (Hoegen et al., 2011). In der Studie wurde zudem durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren demonstriert, dass die pathologischen Veränderungen, die von ASC und NLRP3 vermittelt werden, auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und IL-18 zurückzuführen sind (Hoegen et al., 2011). Diese Beobachtung wird durch mehrere andere Publikationen gestützt, die bei ASC- bzw. NLRP3-Defizienzen in murinen Makrophagen eine Verminderung der IL-1 $\beta$ -Produktion und Freisetzung nachwiesen (Fang et al., 2011; Kim et al., 2015; McNeela et al., 2010). In Übereinstimmung mit den genannten Studien konnte in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass (a) NLRP3- und ASC-defizierte THP-1-Makrophagen bei einer Stimulation mit Pneumokokken keine bzw. nur minimale Mengen an IL-1 $\beta$  freisetzen, (b) eine Behandlung mit Caspase-1- oder NLRP3-Hemmstoffen (VX-765 und MCC950) ebenfalls zu einer dramatischen Reduktion der Pneumokokken-induzierten IL-1 $\beta$ -Produktion führt und (c) der Einsatz von Zellkulturüberständen dieser Gen-defizienten- bzw. Inhibitor-behandelten THP-1-Makrophagen mit einer deutlich reduzierten Zytokin- bzw. Chemokinproduktion von meningealen Zellen im Ko-Kultur-Modell einhergeht. Um diesen Befund zu untermauern, wurden weitere Versuchsreihen mit einem IL-1-Rezeptor-Antagonisten (Anakinra) und einem funktionsblockierenden IL-1 $\beta$ -Antikörper im indirekten Ko-Kultur-Ansatz durchgeführt. Durch beide Inhibitionsstrategien konnte die meningeale IL-6-Produktion deutlich vermindert werden.

Zusammengefasst belegen die vorgelegten Daten, dass das von Makrophagen generierte IL-1 $\beta$  hauptverantwortlich für die Modulation der Reaktion meningealer Zellen auf eine Pneumokokken-Stimulation ist. Diese Beobachtung steht, wie zuvor beschrieben, in Einklang mit den Ergebnissen früherer Analysen in Zellkultur-Modellen peripherer Fibroblasten unter Verwendung verschiedener Stimuli. Überdies konnte in weiteren Versuchsreihen an zerebralen Perizyten demonstriert werden, dass der Mechanismus einer IL-1 $\beta$ -abhängigen Aktivitätssteigerung kein Phänomen ist, das speziell für meningeale Zellen, sondern auch für andere murale Zellen des ZNS gilt (Teske et al., 2023).

Die Blockade der Wirkung des IL-1-Rezeptors sowie von löslichem IL-1 $\beta$  könnte ein vielversprechender Ansatz sein, um die schädigende Wirkung des Zytokins und die

gravierenden Folgen für den Organismus abzumildern. Zwijnenburg et al. argumentierten allerdings, dass lokal produziertes IL-1 $\beta$  bei der Meningitis eine entscheidende Funktion für die Immunabwehr des Wirts gegen Pneumokokken erfüllt, was sie mit ihrer Beobachtung einer verminderten bakteriellen Eliminierung und Überlebensrate bei IL-1-Rezeptor-defizienten Versuchstieren begründeten (Zwijnenburg et al., 2003). Im Gegensatz dazu beobachteten Hoegen et al. (2011) eine signifikante Reduktion der Entzündungsreaktion und der neuropathologischen Veränderungen sowie eine Verbesserung des klinischen Verlaufs bei einer Behandlung mit dem IL-1-Rezeptor-Antagonisten Anakinra im Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis (Hoegen et al., 2011). Ähnliche Befunde wurden von der Arbeitsgruppe von Barichello et al. (2015) erhoben, da eine Antagonisierung des IL-1-Rezeptors in der frühen Phase einer Pneumokokken-Meningitis mit einer antiinflammatorischen Wirkung und einer Reduktion von Gedächtnisstörungen einherging. Die hier präsentierten Daten könnten Einblicke in den Mechanismus der in den beiden letztgenannten Studien beschriebenen protektiven Wirkung der IL-1R-Antagonisierung liefern, da die in-vivo-Blockade des IL-1-Signalwegs die aktivierende Wirkung der Makrophagen auf andere Zellpopulationen des ZNS (z.B. meningeale Zellen) abdämpfen und dadurch zu einer Reduktion der Expression von Zytokinen wie IL-6 führen könnte. Dieser antiinflammatorische Effekt könnte wiederum der Entwicklung neuropathologischer Veränderungen, wie beispielsweise der Entstehung eines Hirnödems und des Anstiegs des intrakraniellen Drucks, entgegenwirken und so das klinische Ergebnis verbessern (Paul et al., 2003).

## 5.4 Die Wirkung von Pneumolysin im zeitlichen Verlauf einer Infektion

Von früheren Untersuchungen war bekannt, dass das Pneumokokken-Toxin Pneumolysin (PLY) eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auslösen kann (Harvey et al., 2014; Karmakar et al., 2015; Kim et al., 2015; McNeela et al., 2010; Witzenrath et al., 2011). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit in den entsprechenden Versuchsreihen mit Hilfe eines Vergleiches der Wirkung von PLY-exprimierenden und -defizienten Pneumokokken bestätigt werden. So wiesen Überstände von THP-1-Makrophagen, die für eine Dauer von 6 Stunden mit PLY-defizienten Pneumokokken stimuliert wurden, niedrigere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen und folglich eine geringere stimulatorische Wirkung auf meningeale Zellen auf als entsprechende Überstände des isogenen, PLY-exprimierenden Wildtypstamms. Allerdings wurde auch beobachtet, dass dieser

Wirkungsunterschied bei Überständen von THP-1-Makrophagen, die für eine Dauer von 24 Stunden mit den oben genannten Pneumokokkenstämmen exponiert wurden, nicht mehr nachweisbar war. Parallel dazu fanden sich in den Überständen, die nach 24-stündiger Pneumokokken-Exposition gewonnen wurden, im Gegensatz zur 6-stündigen Stimulation, keine signifikanten Unterschiede in den IL-1 $\beta$ -Werten zwischen den beiden Pneumokokkenstämmen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Rolle von PLY bei der Pneumokokken-induzierten Inflammasomaktivierung im Stimulationsverlauf abnimmt und andere bakterielle Faktoren für die IL-1 $\beta$ -Produktion an Bedeutung gewinnen. Erst kürzlich wurde berichtet, dass von Pneumokokken-produziertes Wasserstoffperoxid zur NLRP3-Inflammasomaktivierung und konsekutiven IL-1 $\beta$ -Freisetzung aus epithelialen Zellen beitragen kann (Surabhi et al., 2022). Auf die Bedeutung von oxidativem Stress für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms hatten bereits frühere Studien hingewiesen. Allerdings lag der Fokus bei diesen Arbeiten stets auf endogenem Stress, der durch vom Wirtsorganismus produzierte, reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst wurde (Bai et al., 2018; Bordt & Polster, 2014; Chen et al., 2015; Kim et al., 2021; X. Liu et al., 2017; Nunes et al., 2018; Wang et al., 2019). Ein alternativer Erklärungsansatz wäre, dass PLY entscheidend zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und IL-1 $\beta$ -Produktion beiträgt, aber auch einen ausgeprägten Zelluntergang der Makrophagen verursacht (Bewley et al., 2014). Dadurch nähme die Anzahl der Makrophagen so weit ab, dass im Zeitintervall von 6 Stunden bis 24 Stunden nach der Stimulation mit PLY-exprimierenden Bakterien kein weiterer Anstieg der IL-1 $\beta$ -Werte im Überstand mehr beobachtet werden kann. In Abwesenheit von PLY könnten die Makrophagen ebenfalls IL-1 $\beta$  produzieren, wenn auch nur in einem begrenzten Umfang. Aufgrund des fehlenden zytotoxischen Effekts von PLY bliebe die Makrophagen-Population jedoch erhalten und könnte weiterhin – wenn auch nur geringer Menge – IL-1 $\beta$  bilden. Dadurch würden sich die IL-1 $\beta$ -Spiegel in den Überständen mit zunehmender Zeit denen annähern, die von THP-1-Makrophagen stammen, die mit PLY-exprimierenden Bakterien stimuliert wurden. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten weitere Versuchsreihen durchgeführt werden, in denen die Zellzahl der Makrophagen ebenso wie die Halbwertszeiten von PLY und IL-1 $\beta$  in den Zellkultur-Modellen analysiert wird.

## **5.5 Limitationen**

Die in diesem Forschungsvorhaben erhobenen Erkenntnisse weisen einige Limitationen auf.

Zunächst muss angemerkt werden, dass es sich bei den Untersuchungen um Analysen in in-vitro-Modellen handelt, die die in-vivo-Situation nur unvollständig nachbilden können. Da die Pathophysiologie der Pneumokokken-Meningitis von vielen unterschiedlichen Zellpopulationen beeinflusst wird, ist die Aussagekraft der Modulation von Makrophagen auf meningeale Zellen unter dieser Limitation zu betrachten. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die Versuche mit Zellkulturmedien und nicht mit Liquor cerebrospinalis durchgeführt wurden, was die Aussagekraft der Befunde möglicherweise einschränken könnte.

Ferner ist zu beachten, dass keine Untersuchungen mit primären humanen meningealen Makrophagen erfolgten, allerdings mit PBMC von freiwilligen Probanden. Die Experimente demonstrierten, dass PBMC auf eine Exposition mit Pneumokokken, ebenso wie THP-1-Makrophagen, mit einer IL-1 $\beta$ -Produktion reagieren und folglich die Aktivität der meningealen Zellen modulieren können. Diese Befunde sprechen dafür, dass die Beobachtungen auf alle Zellpopulationen übertragbar sein dürften, die in Gegenwart von Pneumokokken das Zytokin IL-1 $\beta$  freisetzen.

Auch könnte durch die Antibiotika-vermittelte Lyse der Pneumokokken der Stimulus auf die Zellen im Modell größer sein als bei einer kontinuierlichen Infektion des Subarachnoidalraumes mit lebenden Bakterien.

Weitere Studien zu der IL-1 $\beta$ -vermittelten Steuerung von meningealen Zellen sollten im Tiermodell durchgeführt werden, um Aufschluss über die klinische Bedeutung des untersuchten Phänomens zu erhalten.

## **5.6 Ausblick**

In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass Makrophagen einen modulatorischen Einfluss auf meningeale Zellen und Perizyten im Rahmen einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* ausüben. Die erhobenen Daten lassen Grund zur Annahme, dass Interaktionen von verschiedenen Zellpopulationen in der Pathophysiologie der Pneumokokken-Meningitis eine entscheidende Bedeutung zukommen.

In Zukunft sollten die in dieser Arbeit erhobenen Befunde aus der Zellkultur auf das Tiermodell übertragen werden, um insbesondere die Dynamik der Interaktionen genauer zu betrachten.

Der klinischen Anwendung von Inhibitoren des NLRP3-Inflammasoms oder IL-1-Rezeptor-Antagonisten sowie IL-1 $\beta$ -Antikörpern könnte bei der Behandlung der Pneumokokken-Meningitis in Zukunft ein großer Stellenwert zukommen. Auf ihre protektive Wirkung wiesen bereits tierexperimentelle Studien in Tiermodellen der Pneumokokken-Meningitis hin (Barichello et al., 2015; Hoegen et al., 2011). Weitere experimentelle Studien, die die klinische Situation präzise replizieren, wären zweifellos von Nutzen, bevor eine Translation in die klinische Anwendung in Betracht gezogen werden kann.

## 6 Zusammenfassung

In ersten Untersuchungen zur Interaktion von meningealen Zellen und Makrophagen stellte unsere Arbeitsgruppe fest, dass Ben-Men-1-Zellen in Ko-Kultur mit THP-1-Makrophagen bei einer Stimulation mit dem Bakterium *Streptococcus pneumoniae* signifikant höhere Interleukin (IL)-6-Mengen in den Zellkulturüberstand abgeben als in Monokultur (Ercegovac, 2024). Hingegen konnte in dem Versuchsaufbau keine IL-6-Produktion von THP-1-Makrophagen festgestellt werden (Ercegovac, 2024).

In der vorliegenden Dissertationsarbeit sollten die Mechanismen der verstärkten IL-6-Freisetzung genauer charakterisiert und ihre Übertragbarkeit auf primäre humane meningeale Zellen geprüft werden.

Mit den vorgelegten zellkulturellen Untersuchungen konnte erstmalig gezeigt werden, dass THP-1-Makrophagen, aber auch periphere mononukleäre Blutzellen, die Immunreaktion meningealer Zellen auf eine Pneumokokken-Exposition signifikant beeinflussen. Überdies konnte demonstriert werden, dass dieser Effekt durch das aus Immunzellen freigesetzte, proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  vermittelt wird. Diese Aussagen basieren auf den Ergebnissen folgender Experimente:

1. Zellen der Linie Ben-Men-1, die ursprünglich aus meningotheilialen Meningeomzellen isoliert wurden, wurden für 24 Stunden in direkter und indirekter Ko-Kultur mit zu Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen unter Verwendung von Antibiotika-lysierten *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39)-Bakterien stimuliert. Ben-Men-1-Zellen wurden dabei auf Poly-L-Lysin-beschichteten Zellkulturoberflächen in speziellem meningealem Wachstumsmedium kultiviert. Aus ersten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, in denen die Expression mehrerer Oberflächenmarker wie Fibronectin verglichen wurde, war bekannt, dass diese Kultivierungstechnik eine phänotypische Angleichung der Ben-Men-1-Zellen an primäre meningeale Zellen bewirkt (Ercegovac, 2024). Am Ende der Stimulation wurde der Zellkulturüberstand entnommen und die Zytokinproduktion mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass die vermehrte IL-6-Freisetzung aus Ben-Men-1-Zellen keine direkte Interaktion von Makrophagen und meningealen Zellen erfordert. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass dieser Effekt von Botenstoffen vermittelt wird, die von den Makrophagen in den Überstand freigesetzt werden. Durch Versuche mit konditioniertem Medium konnte die Hypothese bestätigt werden: Exponierte man Ben-

Men-1-Zellen mit Überständen, die von THP-1-Makrophagen nach einer Pneumokokken-Exposition gewonnen worden waren, konnte eine signifikant höhere IL-6-Produktion bei den Ben-Men-1-Zellen beobachtet werden.

2. Um einen ersten Einblick in die biochemischen Eigenschaften der verantwortlichen Botenstoffe zu bekommen, wurde in weiteren Versuchsreihen konditioniertes Medium herangezogen, das vorab entweder thermisch (Erwärmung auf 60°C für 30 min) behandelt oder über Molekularfilter (< 3kDa und < 50kDa) zentrifugiert worden war. Diesen Experimenten konnte entnommen werden, dass das gesuchte Molekül hitzelabil ist und ein Molekülmasse zwischen 3 und 50kDa aufweist. Aufgrund dieser Befunde wurde angenommen, dass es sich bei dem untersuchten Botenstoff um ein oder mehrere Proteine, vermutlich um ein Zytokin oder Zytokine, handeln könnte.

3. Durch den Einsatz Gen-defizienter THP-1-Makrophagen konnte gezeigt werden, dass für die Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* und die Modulation der Aktivität meningealer Zellen, gemessen an der gesteigerten IL-6-Produktion, der Mustererkennungsrezeptor Toll-like-Rezeptor (TLR) 2, das NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3)-Inflammasom und das zugehörige Adapterprotein Apoptosis-Associated Speck-like Protein containing a CARD (ASC) von entscheidender Bedeutung sind: Überstände stimulierter THP-1-Makrophagen, die eine TLR2-, ASC- oder NLRP3-Defizienz aufwiesen, induzierten eine im Vergleich zu Überständen von Wildtyp (WT)-THP-1-Makrophagen hochsignifikant reduzierte Freisetzung von IL-6 aus Ben-Men-1-Zellen. Diese Daten deuteten darauf hin, dass es sich bei dem gesuchten Botenstoff um ein Produkt des NLRP3-Inflammasoms, wie z.B. das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$ , handeln könnte.

4. Zur Validierung dieser Hypothese wurden in weiteren Versuchsreihen zunächst selektive pharmakologische Inhibitoren von Caspase-1 (VX-765) und NLRP3 (MCC950) verwendet. Der Überstand pharmakologisch behandelter WT-THP-1-Makrophagen wies eine geringere stimulatorische Wirkung auf Ben-Men-1-Zellen auf als der Überstand von THP-1-Makrophagen, die mit den entsprechenden Kontrollsubstanzen behandelt wurden. In weiteren Versuchsreihen wurden ein IL-1-Rezeptor-Antagonist und ein funktionsblockierender anti-IL-1 $\beta$ -Antikörper eingesetzt. Wie bei MCC950 und VX-765 führte die Behandlung mit diesen Substanzen zu einer signifikanten Verminderung der Zytokinproduktion bei den Ben-Men-1-Zellen. Diese Befunde stützten die Hypothese,

dass die Modulation der Aktivität von Ben-Men-1-Zellen durch das Zytokin IL-1 $\beta$  vermittelt wird.

5. In zusätzlichen Untersuchungen im direkten Ko-Kultur-Modell, bei denen zum einen Ben-Men-1-Zellen zusammen mit WT- bzw. den oben genannten Gen-defizienten THP-1-Makrophagen kultiviert wurden, zum anderen Ben-Men-1-Zellen und WT-THP-1-Makrophagen in Ko-Kultur mit dem genannten IL-1-Rezeptor-Antagonist behandelt wurden, konnte demonstriert werden, dass die Befunde aus dem indirekten Ko-Kultursystem mit konditioniertem Medium auch im direkten Ko-Kultur-Modell gültig sind. So gingen sowohl die Ko-Kulturen mit Gen-defizienten THP-1-Makrophagen als auch die Behandlung mit einem IL-1-Rezeptor-Antagonisten mit einer signifikanten Reduktion der IL-6-Menge in den Zellkulturüberständen einher. Diese Befunde unterstrichen die herausragende Rolle von IL-1 $\beta$  bei der Modulation der Ben-Men-1-Zellaktivität im Rahmen einer Pneumokokken-Exposition.

6. Komplettierend wurden vergleichende Untersuchungen mit Pneumolysin-exprimierenden und -defizienten Pneumokokken angeschlossen: Diese Experimente zeigten, dass die oben beschriebenen Effekte, zumindest in der Akutphase der Infektion mit Pneumokokken, von der Gegenwart von Pneumolysin als möglichem NLRP3-Inflammasom-Aktivator abhängig sind.

7. Um zu überprüfen, ob die mit der Ben-Men-1-Zelllinie erhobenen Ergebnisse auch auf primäre humane meningeale Zellen übertragbar sind, wurden in der Folge Stimulationsversuche mit konditioniertem Medium von THP-1-Makrophagen bei diesen primären Zellen durchgeführt. Zudem wurden in einer weiteren Versuchsreihe anstelle der THP-1-Makrophagen periphere mononukleäre Blutzellen mit Pneumokokken behandelt und deren Überstand zur Stimulation von Ben-Men-1-Zellen verwendet. Diese Versuchsreihen zeigten, dass sich primäre humane meningeale Zellen ähnlich wie die initial verwendeten Ben-Men-1-Zellen verhielten. Ebenso wirkten die Überstände peripherer mononukleärer Blutzellen vergleichbar stimulatorisch auf meningeale Zellen wie die Überstände der THP-1-Makrophagen.

8. Zur Charakterisierung des Zytokin-Spektrums, das von Ben-Men-1-Zellen und humanen meningealen Zellen nach einer Exposition mit konditioniertem Makrophagen-Medium freigesetzt wird, wurden Analysen entsprechender Zellkulturüberstände mit Hilfe kommerzieller Zytokin-Antikörper-Arrays durchgeführt. Diese Untersuchungen

deuteten darauf hin, dass Ben-Men-1-Zellen neben IL-6 vermehrt das Chemokin CC-Chemokin-Ligand (CCL) 2 und den Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierenden Faktor (GM-CSF) produzieren, während humane meningeale Zellen - zusätzlich zu IL-6 - größere Mengen an CCL2, C-X-C Motif Chemokine Ligand (CXCL) 1, IL-8 sowie den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) als die entsprechenden Kontrollgruppen in den Überstand freisetzen. Zur Validierung dieser Beobachtungen wurden im Anschluss die Proben mit CCL2- und IL-8-ELISA-Kits untersucht. Die ELISA-Messungen bestätigten die Proteinarray-Befunde und stützen die Annahme, dass die Makrophagen nicht ausschließlich die IL-6-Produktion der meningealen Zellen, sondern auch die Produktion weiterer Zytokine und Chemokine regulieren.

9. In abschließenden Versuchsreihen wurde der Frage nachgegangen, ob Makrophagen auch auf die Aktivität anderer Zellpopulationen des leptomeningealen Raumes einen modulatorischen Effekt ausüben können. Für diese Versuche wurden murale Zellen in Form von primären humanen Perizyten verwendet. Die Untersuchungen demonstrierten, dass auch die Aktivität der Perizyten, ähnlich wie die der meningealen Zellen, durch das von Makrophagen freigesetzte IL-1 $\beta$  signifikant gesteigert wird.

Die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit legen in der Gesamtheit nahe, dass meningeale Zellen bei der Erkennung der Pneumokokken gegenüber den Makrophagen eine untergeordnete Rolle spielen. Sie implizieren jedoch, dass die meningealen Zellen nach Erkennung des Pathogens durch Makrophagen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr durch Produktion zahlreicher Zytokine und Chemokine einnehmen. Damit scheinen sie entscheidend zur Entstehung der ausgeprägten Entzündungsreaktion im leptomeningealen Raum beizutragen.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse sprechen dafür, dass in Zukunft ein besonderes Augenmerk auf die Interaktionen unterschiedlicher Zellpopulationen in der weiteren Erforschung der Pneumokokken-Meningitis gerichtet werden sollte.

Die zentralen Befunde der vorgelegten zellkulturellen Versuche sollen in **Abbildung 28** anschaulich gemacht werden.

## 7 Summary

Initial studies on the interaction of meningeal cells and macrophages performed by our research group have shown that Ben-Men-1 cells, when co-cultured with macrophages, release significantly higher amounts of IL-6 into the cell culture supernatant when stimulated with the bacterium *Streptococcus pneumoniae* than in monoculture (Ercegovac, 2024). However, no IL-6 production of macrophages could be detected in the experimental setup (Ercegovac, 2024).

The aim of this dissertation was to characterize the mechanisms underlying enhanced IL-6-production in more detail and to evaluate their transferability to primary human meningeal cells.

The cell culture studies presented here were the first to show, that THP-1 macrophages as well as peripheral blood mononuclear cells significantly influence the immune response of meningeal cells upon exposure to pneumococci. Furthermore, it was demonstrated that this effect is mediated by the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$ , released from immune cells. These conclusions are based on the results of the following experiments:

1. Ben-Men-1 cells, originally isolated from meningotheelial meningioma-cells, were stimulated for 24 hours in direct and indirect co-culture with THP-1 cells differentiated into macrophages using antibiotic-lyzed *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 (D39) bacteria. Ben-Men-1 cells were cultivated on poly-L-lysine-coated cell culture surfaces in special meningeal growth medium. Previous studies by our research group demonstrated that this cultivation technique causes a phenotypic alignment of Ben-Men-1 cells with primary meningeal cells, based on the expression of established fibroblast markers like fibronectin (Ercegovac, 2024). Following stimulation, the cell culture supernatants were collected, and cytokine production was quantified using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). These experiments showed that the increased release of IL-6 from Ben-Men-1 cells does not require direct interaction between macrophages and meningeal cells. This led to the hypothesis that this effect is mediated by soluble messenger molecules released into the supernatants by macrophages. The hypothesis was confirmed by experiments using conditioned media: exposure of Ben-Men-1 cells to supernatants from THP-1 macrophages exposed to pneumococci resulted in a significantly higher production of IL-6 from Ben-Men-1.

2. In order to gain an initial insight into the biochemical properties of the responsible messenger molecules, conditioned media was either subjected to heat treatment (heated to 60°C for 30 min) or ultrafiltration through molecular filters (< 3kDa and < 50kDa). These experiments revealed that the molecule in question is heat-sensitive and has a molecular weight between 3 and 50kDa. Based on the findings, it was assumed that the messenger substance is a protein, presumably a cytokine (or cytokines).
3. By using gene-deficient THP-1 macrophages, it was shown that the pattern recognition receptor toll-like receptor (TLR) 2, NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome, and its associated adapter-protein apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) are crucial for the recognition of *Streptococcus pneumoniae* and the modulation of meningeal cell activity, as indicated by increased production of IL-6. Supernatants from stimulated THP-1 macrophages that exhibit TLR2, ASC or NLRP3 deficiencies induced a significantly lower release of IL-6 from Ben-Men-1 cells compared to supernatants of wild type (WT) THP-1 macrophages. These findings suggested that the molecule in question could be a product of the NLRP3 inflammasome, such as the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$ .
4. To validate this hypothesis, further experiments were conducted using selective pharmacological inhibitors of caspase-1 (VX-765) and NLRP3 (MCC950). Supernatants from pharmacologically treated WT THP-1 macrophages showed a lower stimulatory effect on Ben-Men-1 cells than supernatants from macrophages treated with the corresponding control substances. Additional experiments using an IL-1 receptor antagonist and a function-blocking antibody of IL-1 $\beta$  showed that treatment with these substances also led to significant reduction in cytokine production from Ben-Men-1 cells. These findings confirm the hypothesis that IL-1 $\beta$  is crucial for the modulation of Ben-Men-1 activity.
5. In additional experiments using the direct co-culture model, in which Ben-Men-1 cells were co-cultured either with WT or the above-mentioned gene-deficient THP-1 macrophages, or with WT THP-1 macrophages treated with the mentioned IL-1 receptor antagonist, it was demonstrated that the findings from the indirect co-culture model with conditioned media are also valid in the direct co-culture model. Both co-culture with gene-deficient THP-1 macrophages and the treatment with an IL-1 receptor antagonist were associated with a significant reduction of IL-6 in the cell culture supernatants. These

findings emphasized the crucial role of IL-1 $\beta$  in the modulation of Ben-Men-1 activity during exposure to pneumococci.

6. Complementary experiments compared pneumolysin-expressing and pneumolysin-deficient pneumococcal strains. These experiments showed that, at least in the acute phase of pneumococcal stimulation, the above-described effects depend on the presence of pneumolysin as a possible activator of the NLRP3 inflammasome.

7. To verify whether the results obtained with Ben-Men-1 cells are applicable to primary human meningeal cells, stimulation experiments with conditioned media from THP-1 macrophages were subsequently conducted. Additionally, in separate series of experiments, instead of THP-1 macrophages, peripheral blood mononuclear cells were exposed to pneumococci, and their supernatants were used to stimulate Ben-Men-1 cells. These experiments revealed that primary human meningeal cells exhibit a similar response to that of Ben-Men-1 cells. Moreover, supernatants from peripheral blood mononuclear cells induced a comparable stimulatory effect on meningeal cells as those from THP-1 macrophages.

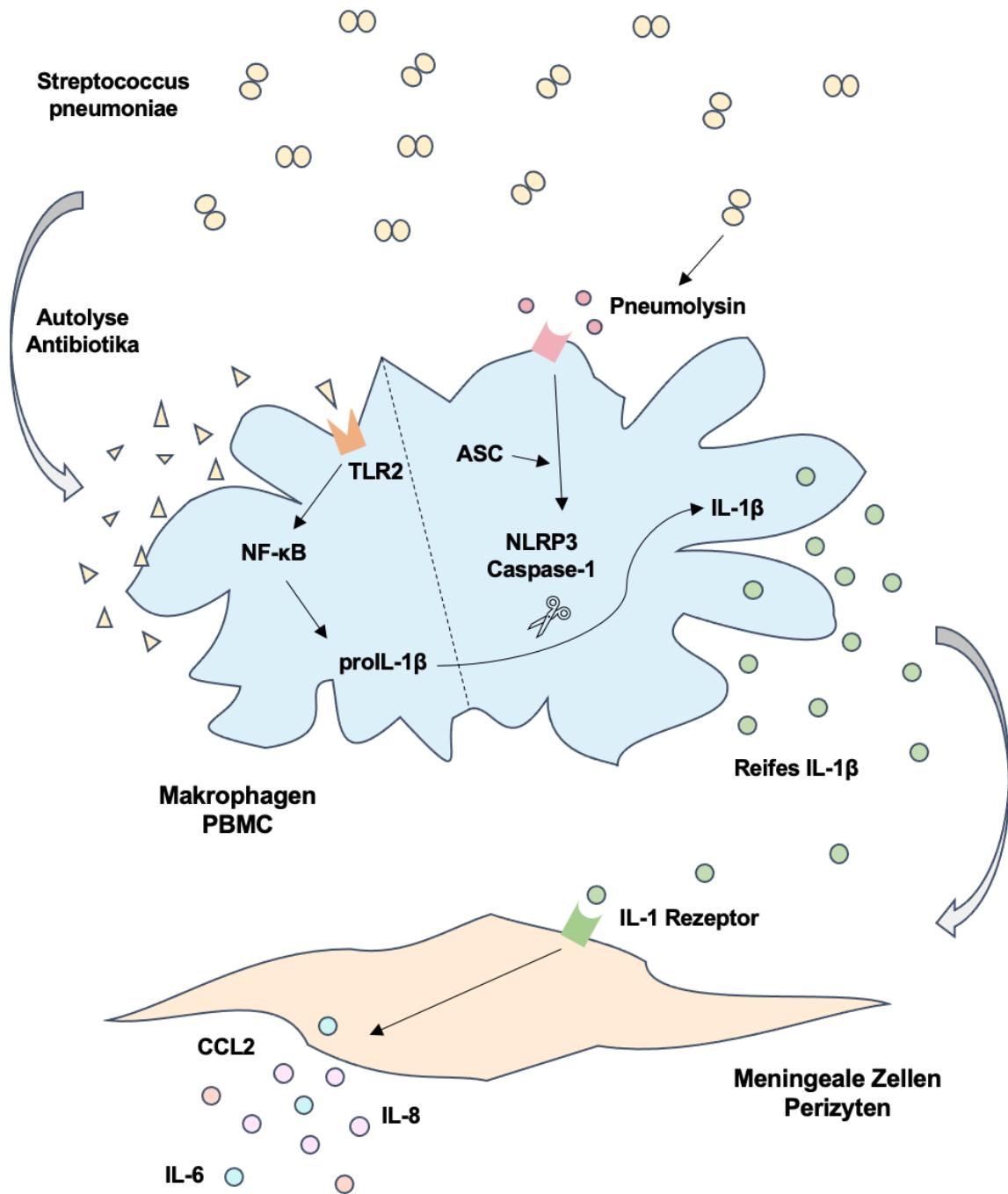
8. To characterize the cytokine spectrum released from Ben-Men-1 cells and human meningeal cells after exposure to conditioned media from macrophages, analyses of the corresponding cell culture supernatants were performed using commercial cytokine antibody arrays. These analyses suggested that Ben-Men-1 cells produce increased amounts of the CC-chemokine ligand (CCL) 2 and the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in addition to IL-6, while human meningeal cells release increased amounts of CCL2, the (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), IL-8, as well as the granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) into the supernatant as compared to the respective controls. These observations were validated using ELISA for CCL2 and IL-8. The ELISA measurements confirm the results of the protein array and support the assumption that macrophages not only regulate the IL-6 production of meningeal cells, but also the production of additional cytokines and chemokines.

9. In final experiments, the question was addressed whether macrophages also exert a modulatory effect on the activity of other cell populations of the leptomeningeal space. For these experiments, mural cells were used in the form of primary human pericytes. These investigations demonstrated that also the activity of pericytes, similar to that of meningeal cells, is significantly enhanced by IL-1 $\beta$  released by macrophages.

The results of this dissertation indicate that, overall, meningeal cells play a subordinate role in the recognition of pneumococci compared to macrophages. However, they imply that meningeal cells, after recognizing the pathogen through macrophages, play an important role in the immune response by producing numerous cytokines and chemokines. Thus, they appear to be crucial in contributing to the development of the pronounced inflammatory reaction in the leptomeningeal space.

The findings obtained here suggest that, in future research on pneumococcal meningitis, special attention should be given to the interactions between different cell populations.

The key findings of the presented cell culture experiments are illustrated in the following figure (**Figure 28**).



**Abbildung 28:** Graphische Darstellung der Interaktion von Makrophagen und meningealen Zellen bzw. Perizyten bei der Aktivierung der Immunreaktion auf eine Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*. Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis.

**Figure 28:** Graphical representation of the interaction between macrophages and meningeal cells or pericytes in the activation of the immune response to an infection with *Streptococcus pneumoniae*. For abbreviations, see the list of abbreviations.

## **8 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen größten Dank aussprechen, die mich im Verlauf der Forschungsarbeit und der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Ködel für die Überlassung des Themas der Dissertation, die herausragende Betreuung, das freundliche Arbeitsverhältnis und die außerordentliche Bereitschaft, stets für die Beantwortung aufkommender Fragen bereit zu stehen.

Ferner möchte ich mich bei Frau Barbara Angele für die exzellente Einarbeitung in die Labormethoden und die unermüdliche Geduld bedanken. Außerdem danke ich ihr für die Durchführung der PCR-Untersuchungen der von mir bereitgestellten Proben.

Ein großer Dank gilt ebenso Frau Prof. Dr. Helga Schmetzer und Herrn Prof. Dr. Matthias Klein für die Beratung während des Promotionsvorhabens.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Walter Pfister für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe Neuroinfektiologie und dem gesamten Team für die angenehme Atmosphäre.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Sven Hammerschmidt von der Abteilung für Molekulare Genetik und Infektionsbiologie der Universität Greifswald für die Bereitstellung der Bakterien.

Meiner Familie danke ich insbesondere für die viele Ermutigung und zahlreichen Zusprüche sowie die selbstlose Unterstützung während des gesamten Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation.

## Literaturverzeichnis

- Aderka, D., Le, J. M., & Vilcek, J. (1989). IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol*, 143(11), 3517-3523. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2584704>
- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M. F., Hawkins, P. N., & Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*, 20(3), 319-325. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(04\)00046-9](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(04)00046-9)
- Akira, S., Taga, T., & Kishimoto, T. (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*, 54, 1-78. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60532-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60532-5)
- Almeida, S. T., Nunes, S., Santos Paulo, A. C., Valadares, I., Martins, S., Breia, F., Brito-Avo, A., Morais, A., de Lencastre, H., & Sa-Leao, R. (2014). Low prevalence of pneumococcal carriage and high serotype and genotype diversity among adults over 60 years of age living in Portugal. *PLoS One*, 9(3), e90974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090974>
- Almeida, S. T., Pedro, T., Paulo, A. C., de Lencastre, H., & Sa-Leao, R. (2020). Re-evaluation of *Streptococcus pneumoniae* carriage in Portuguese elderly by qPCR increases carriage estimates and unveils an expanded pool of serotypes. *Sci Rep*, 10(1), 8373. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65399-x>
- Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Northoff, H., Ganter, U., Bauer, J., Kishimoto, T., & Heinrich, P. C. (1987). Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett*, 221(1), 18-22. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80344-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80344-7)
- Auron, P. E., Webb, A. C., Rosenwasser, L. J., Mucci, S. F., Rich, A., Wolff, S. M., & Dinarello, C. A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(24), 7907-7911. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.7907>
- Baba, H., Kawamura, I., Kohda, C., Nomura, T., Ito, Y., Kimoto, T., Watanabe, I., Ichiyama, S., & Mitsuyama, M. (2001). Essential role of domain 4 of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in cytolytic activity as determined by truncated

proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 281(1), 37-44.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4297>

Bai, H., Yang, B., Yu, W., Xiao, Y., Yu, D., & Zhang, Q. (2018). Cathepsin B links oxidative stress to the activation of NLRP3 inflammasome. *Exp Cell Res*, 362(1), 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.11.015>

Barichello, T., dos Santos, I., Savi, G. D., Simoes, L. R., Silvestre, T., Comim, C. M., Sachs, D., Teixeira, M. M., Teixeira, A. L., & Quevedo, J. (2010). TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by Streptococcus pneumoniae. *J Neuroimmunol*, 221(1-2), 42-45.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.02.009>

Barichello, T., Generoso, J. S., Simoes, L. R., Sharin, V. G., Ceretta, R. A., Dominguini, D., Comim, C. M., Vilela, M. C., Teixeira, A. L., & Quevedo, J. (2015). Interleukin-1beta Receptor Antagonism Prevents Cognitive Impairment Following Experimental Bacterial Meningitis. *Curr Neurovasc Res*, 12(3), 253-261. <https://doi.org/10.2174/1567202612666150605122200>

Barker, B. R., Taxman, D. J., & Ting, J. P. (2011). Cross-regulation between the IL-1beta/IL-18 processing inflammasome and other inflammatory cytokines. *Curr Opin Immunol*, 23(5), 591-597. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.07.005>

Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B. G., Fitzgerald, K. A., Hornung, V., & Latz, E. (2009). Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*, 183(2), 787-791.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>

Bewley, M. A., Naughton, M., Preston, J., Mitchell, A., Holmes, A., Marriott, H. M., Read, R. C., Mitchell, T. J., Whyte, M. K., & Dockrell, D. H. (2014). Pneumolysin activates macrophage lysosomal membrane permeabilization and executes apoptosis by distinct mechanisms without membrane pore formation. *mBio*, 5(5), e01710-01714. <https://doi.org/10.1128/mBio.01710-14>

Bijlsma, M. W., Brouwer, M. C., Kasanmoentalib, E. S., Kloek, A. T., Lucas, M. J., Tanck, M. W., van der Ende, A., & van de Beek, D. (2016). Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006-14: a prospective cohort

- study. *Lancet Infect Dis*, 16(3), 339-347. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00430-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00430-2)
- Black, R. A., Kronheim, S. R., Cantrell, M., Deeley, M. C., March, C. J., Prickett, K. S., Wignall, J., Conlon, P. J., Cosman, D., Hopp, T. P., & et al. (1988). Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *J Biol Chem*, 263(19), 9437-9442. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3288634>
- Blasioli, D. J., Matthews, G. L., & Kaplan, D. L. (2014). The degradation of chondrogenic pellets using cocultures of synovial fibroblasts and U937 cells. *Biomaterials*, 35(4), 1185-1191. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.050>
- Bohland, M., Kress, E., Stope, M. B., Pufe, T., Tauber, S. C., & Brandenburg, L. O. (2016). Lack of Toll-like receptor 2 results in higher mortality of bacterial meningitis by impaired host resistance. *J Neuroimmunol*, 299, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.09.003>
- Bordt, E. A., & Polster, B. M. (2014). NADPH oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in proinflammatory microglial activation: a bipartisan affair? *Free Radic Biol Med*, 76, 34-46. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.033>
- Bosch, A., van Houten, M. A., Bruin, J. P., Wijmenga-Monsuur, A. J., Trzcinski, K., Bogaert, D., Rots, N. Y., & Sanders, E. A. M. (2016). Nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae and other bacteria in the 7th year after implementation of the pneumococcal conjugate vaccine in the Netherlands. *Vaccine*, 34(4), 531-539. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.11.060>
- Boyle-Walsh, E., Hashim, I. A., Speirs, V., Fraser, W. D., & White, M. C. (1994). Interleukin-6 (IL-6) production and cell growth of cultured human meningiomas:-interactions with interleukin-1 beta (IL-1 beta) and interleukin-4 (IL-4) in vitro. *Neurosci Lett*, 170(1), 129-132. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90256-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90256-9)
- Brown, L. S., Foster, C. G., Courtney, J. M., King, N. E., Howells, D. W., & Sutherland, B. A. (2019). Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Front Cell Neurosci*, 13, 282. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00282>
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*, 16(7), 407-420. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>

- Buchholz, G., Koedel, U., Pfister, H. W., Kastenbauer, S., & Klein, M. (2016). Dramatic reduction of mortality in pneumococcal meningitis. *Crit Care*, 20(1), 312. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1498-8>
- Cardona, A. E., Li, M., Liu, L., Savarin, C., & Ransohoff, R. M. (2008). Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *J Leukoc Biol*, 84(3), 587-594. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107763>
- Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Hirano, T., Kishimoto, T., & Heinrich, P. C. (1988). Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett*, 232(2), 347-350. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80766-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80766-x)
- Cauwels, A., Wan, E., Leismann, M., & Tuomanen, E. (1997). Coexistence of CD14-dependent and independent pathways for stimulation of human monocytes by gram-positive bacteria. *Infect Immun*, 65(8), 3255-3260. <https://doi.org/10.1128/iai.65.8.3255-3260.1997>
- Cavalli, G., & Dinarello, C. A. (2018). Anakinra Therapy for Non-cancer Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol*, 9, 1157. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01157>
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wicher, H. J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*, 23(1), 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Chekrouni, N., van Soest, T. M., da Cruz Campos, A. C., Brouwer, M. C., & van de Beek, D. (2024). Bacterial load in cerebrospinal fluid predicts unfavourable outcome in pneumococcal meningitis: a prospective nationwide cohort study. *Clin Microbiol Infect*, 30(6), 772-778. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2024.03.012>
- Chen, L., Na, R., Boldt, E., & Ran, Q. (2015). NLRP3 inflammasome activation by mitochondrial reactive oxygen species plays a key role in long-term cognitive impairment induced by paraquat exposure. *Neurobiol Aging*, 36(9), 2533-2543. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.018>
- Chen, V., Croft, D., Purkis, P., & Kramer, I. M. (1998). Co-culture of synovial fibroblasts and differentiated U937 cells is sufficient for high interleukin-6 but not interleukin-1beta or tumour necrosis factor-alpha release. *Br J Rheumatol*, 37(2), 148-156. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/37.2.148>
- Christodoulides, M., Makepeace, B. L., Partridge, K. A., Kaur, D., Fowler, M. I., Weller, R. O., & Heckels, J. E. (2002). Interaction of Neisseria meningitidis with human

meningeal cells induces the secretion of a distinct group of chemotactic, proinflammatory, and growth-factor cytokines. *Infect Immun*, 70(8), 4035-4044. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4035-4044.2002>

Coll, R. C., Robertson, A. A., Chae, J. J., Higgins, S. C., Munoz-Planillo, R., Inserra, M. C., Vetter, I., Dungan, L. S., Monks, B. G., Stutz, A., Croker, D. E., Butler, M. S., Haneklaus, M., Sutton, C. E., Nunez, G., Latz, E., Kastner, D. L., Mills, K. H., Masters, S. L., . . . O'Neill, L. A. (2015). A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med*, 21(3), 248-255. <https://doi.org/10.1038/nm.3806>

Collaborators, G. B. D. M. A. R. (2023). Global, regional, and national burden of meningitis and its aetiologies, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol*, 22(8), 685-711. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(23\)00195-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(23)00195-3)

Content, J., De Wit, L., Poupart, P., Opdenakker, G., Van Damme, J., & Billiau, A. (1985). Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leukocyte-derived factor. *Eur J Biochem*, 152(2), 253-257. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09191.x>

Cundell, D. R., Gerard, N. P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., & Tuomanen, E. I. (1995). Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, 377(6548), 435-438. <https://doi.org/10.1038/377435a0>

Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 5(1), e8668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>

Derk, J., Jones, H. E., Como, C., Pawlikowski, B., & Siegenthaler, J. A. (2021). Living on the Edge of the CNS: Meninges Cell Diversity in Health and Disease. *Front Cell Neurosci*, 15, 703944. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.703944>

DeSisto, J., O'Rourke, R., Jones, H. E., Pawlikowski, B., Malek, A. D., Bonney, S., Guimiot, F., Jones, K. L., & Siegenthaler, J. A. (2020). Single-Cell Transcriptomic Analyses of the Developing Meninges Reveal Meningeal Fibroblast Diversity and Function. *Dev Cell*, 54(1), 43-59 e44. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.009>

- Diaz, K., Kohut, M. L., Russell, D. W., & Stegemoller, E. L. (2022). Peripheral inflammatory cytokines and motor symptoms in persons with Parkinson's disease. *Brain Behav Immun Health*, 21, 100442. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2022.100442>
- Dinarello, C. A. (1998a). Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci*, 856, 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08307.x>
- Dinarello, C. A. (1998b). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*, 16(5-6), 457-499. <https://doi.org/10.3109/08830189809043005>
- Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2), 503-508. <https://doi.org/10.1378/chest.118.2.503>
- Dinarello, C. A. (2007). Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*, 37 Suppl 1(Suppl 1), S34-45. <https://doi.org/10.1002/eji.200737772>
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, 27, 519-550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*, 281(1), 8-27. <https://doi.org/10.1111/imr.12621>
- Dinarello, C. A., Simon, A., & van der Meer, J. W. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 11(8), 633-652. <https://doi.org/10.1038/nrd3800>
- Dujardin, B. C., Driedijk, P. C., Ruijters, A. F., & Out, T. A. (1985). The determination of the complement components C1q, C4 and C3 in serum and cerebrospinal fluid by radioimmunoassay. *J Immunol Methods*, 80(2), 227-237. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(85\)90024-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(85)90024-9)
- Dumont, R. A., Car, B. D., Voitenok, N. N., Junker, U., Moser, B., Zak, O., & O'Reilly, T. (2000). Systemic neutralization of interleukin-8 markedly reduces neutrophilic pleocytosis during experimental lipopolysaccharide-induced meningitis in rabbits. *Infect Immun*, 68(10), 5756-5763. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5756-5763.2000>
- Dyckhoff-Shen, S., Masouris, I., Islam, H., Hammerschmidt, S., Angele, B., Marathe, V., Buer, J., Volk, S., Pfister, H. W., Klein, M., Koedel, U., & Kirschning, C. J.

- (2024). Combining antibiotic with anti-TLR2/TLR13 therapy prevents brain pathology in pneumococcal meningitis. *JCI Insight*, 9(6). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.165737>
- Echchannaoui, H., Frei, K., Schnell, C., Leib, S. L., Zimmerli, W., & Landmann, R. (2002). Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis*, 186(6), 798-806. <https://doi.org/10.1086/342845>
- Eide, S., Misztal, M., & Feng, Z. P. (2023). Interleukin-6 as a marker of Huntington's disease progression: Systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun Health*, 30, 100635. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2023.100635>
- Engelen-Lee, J. Y., Brouwer, M. C., Aronica, E., & van de Beek, D. (2016). Pneumococcal meningitis: clinical-pathological correlations (MeninGene-Path). *Acta Neuropathol Commun*, 4, 26. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0297-4>
- Ercegovac, L. (2024). Zellkulturelle Untersuchungen zur Rolle meningealer Fibroblasten bei der Pathogenerkennung und Immunaktivierung im Leptomeningealraum. In *Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät*.
- Erta, M., Giralt, M., Esposito, F. L., Fernandez-Gayol, O., & Hidalgo, J. (2015). Astrocytic IL-6 mediates locomotor activity, exploration, anxiety, learning and social behavior. *Horm Behav*, 73, 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.06.016>
- Fang, R., Tsuchiya, K., Kawamura, I., Shen, Y., Hara, H., Sakai, S., Yamamoto, T., Fernandes-Alnemri, T., Yang, R., Hernandez-Cuellar, E., Dewamitta, S. R., Xu, Y., Qu, H., Alnemri, E. S., & Mitsuyama, M. (2011). Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol*, 187(9), 4890-4899. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100381>
- Fassbender, K., Schminke, U., Ries, S., Ragoschke, A., Kischka, U., Fatar, M., & Hennerici, M. (1997). Endothelial-derived adhesion molecules in bacterial meningitis: association to cytokine release and intrathecal leukocyte-recruitment. *J Neuroimmunol*, 74(1-2), 130-134. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(96\)00214-7](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(96)00214-7)

- Flamaing, J., Peetermans, W. E., Vandeven, J., & Verhaegen, J. (2010). Pneumococcal colonization in older persons in a nonoutbreak setting. *J Am Geriatr Soc*, 58(2), 396-398. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2009.02700.x>
- Forrester, J. V., McMenamin, P. G., & Dando, S. J. (2018). CNS infection and immune privilege. *Nat Rev Neurosci*, 19(11), 655-671. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0070-8>
- Forrester, M. A., Wassall, H. J., Hall, L. S., Cao, H., Wilson, H. M., Barker, R. N., & Vickers, M. A. (2018). Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell Immunol*, 332, 58-76. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.008>
- Fowler, M. I., Weller, R. O., Heckels, J. E., & Christodoulides, M. (2004). Different meningitis-causing bacteria induce distinct inflammatory responses on interaction with cells of the human meninges. *Cell Microbiol*, 6(6), 555-567. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00382.x>
- Fowler, M. I., Yin, K. Y., Humphries, H. E., Heckels, J. E., & Christodoulides, M. (2006). Comparison of the inflammatory responses of human meningeal cells following challenge with *Neisseria lactamica* and with *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 74(11), 6467-6478. <https://doi.org/10.1128/IAI.00644-06>
- Franchi, L., Eigenbrod, T., & Nunez, G. (2009). Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol*, 183(2), 792-796. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900173>
- Franchi, L., Munoz-Planillo, R., & Nunez, G. (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol*, 13(4), 325-332. <https://doi.org/10.1038/ni.2231>
- Frei, K., Fredrikson, S., Fontana, A., & Link, H. (1991). Interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 31(2), 147-153. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(91\)90020-8](https://doi.org/10.1016/0165-5728(91)90020-8)
- Fu, J., Liang, H., Yuan, P., Wei, Z., & Zhong, P. (2023). Brain pericyte biology: from physiopathological mechanisms to potential therapeutic applications in ischemic stroke. *Front Cell Neurosci*, 17, 1267785. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1267785>

- Gradient, R. A., & Otten, U. H. (1997). Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol*, 52(5), 379-390. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(97\)00021-x](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(97)00021-x)
- Gradient, R. A., & Patterson, P. H. (1999). Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells*, 17(3), 127-137. <https://doi.org/10.1002/stem.170127>
- Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., & Baumann, H. (1987). Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(20), 7251-7255. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.20.7251>
- Geldhoff, M., Mook-Kanamori, B. B., Brouwer, M. C., Troost, D., Leemans, J. C., Flavell, R. A., Van der Ende, A., Van der Poll, T., & Van de Beek, D. (2013). Inflammasome activation mediates inflammation and outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *BMC Infect Dis*, 13, 358. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-358>
- Generoso, J. S., Faller, C. J., Collodel, A., Catalao, C. H. R., Dominguini, D., Petronilho, F., Barichello, T., & Giridharan, V. V. (2023). NLRP3 Activation Contributes to Memory Impairment in an Experimental Model of Pneumococcal Meningitis. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03549-8>
- Gerber, J., Pohl, K., Sander, V., Bunkowski, S., & Nau, R. (2003). Rifampin followed by ceftriaxone for experimental meningitis decreases lipoteichoic acid concentrations in cerebrospinal fluid and reduces neuronal damage in comparison to ceftriaxone alone. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(4), 1313-1317. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1313-1317.2003>
- Girolamo, F., Errede, M., Bizzoca, A., Virgintino, D., & Ribatti, D. (2022). Central Nervous System Pericytes Contribute to Health and Disease. *Cells*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/cells11101707>
- Grebenciucova, E., & VanHaerents, S. (2023). Interleukin 6: at the interface of human health and disease. *Front Immunol*, 14, 1255533. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1255533>
- Gu, L. C., Erdos, E. A., Chiang, H. S., Calderwood, T., Tsai, K., Visor, G. C., Duffy, J., Hsu, W. C., & Foster, L. C. (1991). Stability of interleukin 1 beta (IL-1 beta) in

- aqueous solution: analytical methods, kinetics, products, and solution formulation implications. *Pharm Res*, 8(4), 485-490. <https://doi.org/10.1023/a:1015851228163>
- Hardy, S. J., Christodoulides, M., Weller, R. O., & Heckels, J. E. (2000). Interactions of *Neisseria meningitidis* with cells of the human meninges. *Mol Microbiol*, 36(4), 817-829. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01923.x>
- Harvey, R. M., Hughes, C. E., Paton, A. W., Trappetti, C., Tweten, R. K., & Paton, J. C. (2014). The impact of pneumolysin on the macrophage response to *Streptococcus pneumoniae* is strain-dependent. *PLoS One*, 9(8), e103625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103625>
- Heumann, D., Barras, C., Severin, A., Glauser, M. P., & Tomasz, A. (1994). Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun*, 62(7), 2715-2721. <https://doi.org/10.1128/iai.62.7.2715-2721.1994>
- Hirst, R. A., Kadioglu, A., O'Callaghan, C., & Andrew, P. W. (2004). The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol*, 138(2), 195-201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02611.x>
- Hoegen, T., Tremel, N., Klein, M., Angele, B., Wagner, H., Kirschning, C., Pfister, H. W., Fontana, A., Hammerschmidt, S., & Koedel, U. (2011). The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. *J Immunol*, 187(10), 5440-5451. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100790>
- Holt, D. J., Chamberlain, L. M., & Grainger, D. W. (2010). Cell-cell signaling in co-cultures of macrophages and fibroblasts. *Biomaterials*, 31(36), 9382-9394. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.101>
- Houssiau, F. A., Bukasa, K., Sindic, C. J., Van Damme, J., & Van Snick, J. (1988). Elevated levels of the 26K human hybridoma growth factor (interleukin 6) in cerebrospinal fluid of patients with acute infection of the central nervous system. *Clin Exp Immunol*, 71(2), 320-323. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3349651>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1541434/pdf/clinexpimmunol00101-0116.pdf>

- Hughes, C. E., & Nibbs, R. J. B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J*, 285(16), 2944-2971. <https://doi.org/10.1111/febs.14466>
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J. M., Bax, K., & Brown, J. S. (2010). The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun*, 78(2), 704-715. <https://doi.org/10.1128/IAI.00881-09>
- Iovino, F., Orihuela, C. J., Moorlag, H. E., Molema, G., & Bijlsma, J. J. (2013). Interactions between blood-borne *Streptococcus pneumoniae* and the blood-brain barrier preceding meningitis. *PLoS One*, 8(7), e68408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068408>
- Kalchev, Y., Argirova, P., Boev, I., Yaneva, A., Vatev, N., Stoycheva, M., & Murdjeva, M. (2023). Cytokine profile in patients with acute bacterial meningitis. *Cytokine*, 170, 156315. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2023.156315>
- Karmakar, M., Katsnelson, M., Malak, H. A., Greene, N. G., Howell, S. J., Hise, A. G., Camilli, A., Kadioglu, A., Dubyak, G. R., & Pearlman, E. (2015). Neutrophil IL-1beta processing induced by pneumolysin is mediated by the NLRP3/ASC inflammasome and caspase-1 activation and is dependent on K<sup>+</sup> efflux. *J Immunol*, 194(4), 1763-1775. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401624>
- Kastenbauer, S., Angele, B., Sporer, B., Pfister, H. W., & Koedel, U. (2005). Patterns of protein expression in infectious meningitis: a cerebrospinal fluid protein array analysis. *J Neuroimmunol*, 164(1-2), 134-139. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.03.009>
- Kastenbauer, S., & Pfister, H. W. (2003). Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain*, 126(Pt 5), 1015-1025. <https://doi.org/10.1093/brain/awg113>
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Kim, H., Hong, J. Y., Jeon, W. J., Lee, J., Baek, S. H., & Ha, I. H. (2021). Lycopus lucidus Turcz Exerts Neuroprotective Effects Against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Neuroinflammation by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation in Cortical Neurons. *J Inflamm Res*, 14, 1759-1773. <https://doi.org/10.2147/JIR.S305031>

- Kim, J. Y., Paton, J. C., Briles, D. E., Rhee, D. K., & Pyo, S. (2015). *Streptococcus pneumoniae* induces pyroptosis through the regulation of autophagy in murine microglia. *Oncotarget*, 6(42), 44161-44178. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6592>
- Kinsella, C. M., Edridge, A. W. D., van Zeggeren, I. E., Deijs, M., van de Beek, D., Brouwer, M. C., & van der Hoek, L. (2022). Bacterial ribosomal RNA detection in cerebrospinal fluid using a viromics approach. *Fluids Barriers CNS*, 19(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00400-5>
- Kishimoto, T., Akira, S., & Taga, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*, 258(5082), 593-597. <https://doi.org/10.1126/science.1411569>
- Kitanaka, N., Nakano, R., Sugiura, K., Kitanaka, T., Namba, S., Konno, T., Nakayama, T., & Sugiya, H. (2019). Interleukin-1beta promotes interleulin-6 expression via ERK1/2 signaling pathway in canine dermal fibroblasts. *PLoS One*, 14(7), e0220262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220262>
- Klein, M., Hohne, C., Angele, B., Hogen, T., Pfister, H. W., Tufekci, H., & Koedel, U. (2019). Adjuvant non-bacteriolytic and anti-inflammatory combination therapy in pneumococcal meningitis: an investigation in a mouse model. *Clin Microbiol Infect*, 25(1), 108 e109-108 e115. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.03.039>
- Klein, M., Obermaier, B., Angele, B., Pfister, H. W., Wagner, H., Koedel, U., & Kirschning, C. J. (2008). Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Infect Dis*, 198(7), 1028-1036. <https://doi.org/10.1086/591626>
- Klein, R. S., & Hunter, C. A. (2017). Protective and Pathological Immunity during Central Nervous System Infections. *Immunity*, 46(6), 891-909. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.012>
- Kloek, A. T., Brouwer, M. C., Schmand, B., Tanck, M. W. T., & van de Beek, D. (2020). Long-term neurologic and cognitive outcome and quality of life in adults after pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Infect*, 26(10), 1361-1367. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.01.020>
- Koedel, U., Angele, B., Rupprecht, T., Wagner, H., Roggenkamp, A., Pfister, H. W., & Kirschning, C. J. (2003). Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune

- response in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol*, 170(1), 438-444. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.438>
- Koedel, U., Bernatowicz, A., Paul, R., Frei, K., Fontana, A., & Pfister, H. W. (1995). Experimental pneumococcal meningitis: cerebrovascular alterations, brain edema, and meningeal inflammation are linked to the production of nitric oxide. *Ann Neurol*, 37(3), 313-323. <https://doi.org/10.1002/ana.410370307>
- Koedel, U., Klein, M., & Pfister, H. W. (2010a). Modulation of brain injury as a target of adjunctive therapy in bacterial meningitis. *Curr Infect Dis Rep*, 12(4), 266-273. <https://doi.org/10.1007/s11908-010-0116-1>
- Koedel, U., Klein, M., & Pfister, H. W. (2010b). New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis*, 23(3), 217-223. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328337f49e>
- Koedel, U., & Pfister, H. W. (1997). Protective effect of the antioxidant N-acetyl-L-cysteine in pneumococcal meningitis in the rat. *Neurosci Lett*, 225(1), 33-36. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00177-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00177-8)
- Koedel, U., Scheld, W. M., & Pfister, H. W. (2002). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis*, 2(12), 721-736. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00450-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00450-4)
- Koedel, U., Winkler, F., Angele, B., Fontana, A., Flavell, R. A., & Pfister, H. W. (2002). Role of Caspase-1 in experimental pneumococcal meningitis: Evidence from pharmacologic Caspase inhibition and Caspase-1-deficient mice. *Ann Neurol*, 51(3), 319-329. <https://doi.org/10.1002/ana.10103>
- Krauss, P. L., Pfeiffenberger, M., Damerau, A., Buttgererit, T., Chen, Y., Gaber, T., & Buttgererit, F. (2021). Production of IL-6 and Phagocytosis Are the Most Resilient Immune Functions in Metabolically Compromised Human Monocytes. *Front Immunol*, 12, 730672. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.730672>
- Kuno, K., & Matsushima, K. (1994). The IL-1 receptor signaling pathway. *J Leukoc Biol*, 56(5), 542-547. <https://doi.org/10.1002/jlb.56.5.542>
- Legouy, C., Cornic, R., Razazi, K., Contou, D., Legriel, S., Garrigues, E., Buiche, P., Decavele, M., Benghanem, S., Rambaud, T., Aboab, J., Esposito-Farese, M., Timsit, J. F., Couffignal, C., & Sonneville, R. (2024). Intracranial complications in adult patients with severe pneumococcal meningitis: a retrospective multicenter

- cohort study. *Ann Intensive Care*, 14(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s13613-024-01405-z>
- Leib, S. L., & Tauber, M. G. (1999). Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am*, 13(3), 527-548, v-vi. [https://doi.org/10.1016/s0891-5520\(05\)70093-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5520(05)70093-3)
- Leppert, D., Leib, S. L., Grygar, C., Miller, K. M., Schaad, U. B., & Hollander, G. A. (2000). Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis*, 31(1), 80-84. <https://doi.org/10.1086/313922>
- Li, P., & Fan, H. (2023). Pericyte Loss in Diseases. *Cells*, 12(15). <https://doi.org/10.3390/cells12151931>
- Lin, T. Y., Chen, W. J., Hsieh, M. K., Lu, M. L., Tsai, T. T., Lai, P. L., Fu, T. S., Niu, C. C., & Chen, L. H. (2014). Postoperative meningitis after spinal surgery: a review of 21 cases from 20,178 patients. *BMC Infect Dis*, 14, 220. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-220>
- Lind, M., Trindade, M. C., Yaszay, B., Goodman, S. B., & Smith, R. L. (1998). Effects of particulate debris on macrophage-dependent fibroblast stimulation in coculture. *J Bone Joint Surg Br*, 80(5), 924-930. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.80b5.8710>
- Linge, I., Tsareva, A., Kondratieva, E., Dyatlov, A., Hidalgo, J., Zvartsev, R., & Apt, A. (2022). Pleiotropic Effect of IL-6 Produced by B-Lymphocytes During Early Phases of Adaptive Immune Responses Against TB Infection. *Front Immunol*, 13, 750068. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.750068>
- Liu, T., Huang, T., Li, J., Li, A., Li, C., Huang, X., Li, D., Wang, S., & Liang, M. (2023). Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *PLoS One*, 18(7), e0286056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286056>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, X., Zhang, X., Ding, Y., Zhou, W., Tao, L., Lu, P., Wang, Y., & Hu, R. (2017). Nuclear Factor E2-Related Factor-2 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activity by Inhibiting Reactive Oxygen Species-Induced NLRP3 Priming. *Antioxid Redox Signal*, 26(1), 28-43. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6615>

- Lucas, M. J., Brouwer, M. C., & van de Beek, D. (2016). Neurological sequelae of bacterial meningitis. *J Infect*, 73(1), 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.04.009>
- Lyra, E. S. N. M., Goncalves, R. A., Pascoal, T. A., Lima-Filho, R. A. S., Resende, E. P. F., Vieira, E. L. M., Teixeira, A. L., de Souza, L. C., Peny, J. A., Fortuna, J. T. S., Furigo, I. C., Hashiguchi, D., Miya-Coreixas, V. S., Clarke, J. R., Abisambra, J. F., Longo, B. M., Donato, J., Jr., Fraser, P. E., Rosa-Neto, P., . . . De Felice, F. G. (2021). Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*, 11(1), 251. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01349-z>
- Ma, F., Li, Y., Jia, L., Han, Y., Cheng, J., Li, H., Qi, Y., & Du, J. (2012). Macrophage-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 is essential for TGF beta/Smad activation and cardiac fibrosis induced by angiotensin II. *PLoS One*, 7(5), e35144. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035144>
- Malley, R., Henneke, P., Morse, S. C., Cieslewicz, M. J., Lipsitch, M., Thompson, C. M., Kurt-Jones, E., Paton, J. C., Wessels, M. R., & Golenbock, D. T. (2003). Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4), 1966-1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.0435928100>
- Marby, D., Lockhart, G. R., Raymond, R., & Linakis, J. G. (2001). Anti-interleukin-6 antibodies attenuate inflammation in a rat meningitis model. *Acad Emerg Med*, 8(10), 946-949. <https://doi.org/10.1111/j.1553-2712.2001.tb01090.x>
- Martinon, F., Mayor, A., & Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*, 27, 229-265. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132715>
- Martner, A., Dahlgren, C., Paton, J. C., & Wold, A. E. (2008). Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect Immun*, 76(9), 4079-4087. <https://doi.org/10.1128/IAI.01747-07>
- Martner, A., Skovbjerg, S., Paton, J. C., & Wold, A. E. (2009). *Streptococcus pneumoniae* autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines. *Infect Immun*, 77(9), 3826-3837. <https://doi.org/10.1128/IAI.00290-09>

- Marz, P., Cheng, J. G., Gradient, R. A., Patterson, P. H., Stoyan, T., Otten, U., & Rose-John, S. (1998). Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 3251-3256. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3251>
- McNeela, E. A., Burke, A., Neill, D. R., Baxter, C., Fernandes, V. E., Ferreira, D., Smeaton, S., El-Rachkidy, R., McLoughlin, R. M., Mori, A., Moran, B., Fitzgerald, K. A., Tschopp, J., Petrilli, V., Andrew, P. W., Kadioglu, A., & Lavelle, E. C. (2010). Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog*, 6(11), e1001191. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001191>
- Miyaura, C., Onozaki, K., Akiyama, Y., Taniyama, T., Hirano, T., Kishimoto, T., & Suda, T. (1988). Recombinant human interleukin 6 (B-cell stimulatory factor 2) is a potent inducer of differentiation of mouse myeloid leukemia cells (M1). *FEBS Lett*, 234(1), 17-21. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81293-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81293-6)
- Mohd Yasin, Z. N., Mohd Idrus, F. N., Hoe, C. H., & Yvonne-Tee, G. B. (2022). Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review. *Differentiation*, 128, 67-82. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2022.10.001>
- Moller, A. S., Bjerre, A., Brusletto, B., Joo, G. B., Brandtzaeg, P., & Kierulf, P. (2005). Chemokine patterns in meningococcal disease. *J Infect Dis*, 191(5), 768-775. <https://doi.org/10.1086/427514>
- Mook-Kanamori, B. B., Geldhoff, M., van der Poll, T., & van de Beek, D. (2011). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev*, 24(3), 557-591. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-11>
- Muller, A., Schramm, D. B., Kleynhans, J., de Gouveia, L., Meiring, S., Ramette, A., von Gottberg, A., & Hathaway, L. J. (2021). Cytokine response in cerebrospinal fluid of meningitis patients and outcome associated with pneumococcal serotype. *Sci Rep*, 11(1), 19920. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99190-3>
- Nagai, K., Domon, H., Maekawa, T., Oda, M., Hiyoshi, T., Tamura, H., Yonezawa, D., Arai, Y., Yokojii, M., Tabeta, K., Habuka, R., Saitoh, A., Yamaguchi, M., Kawabata, S., & Terao, Y. (2018). Pneumococcal DNA-binding proteins released through autolysis induce the production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor 4. *Cell Immunol*, 325, 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.006>

- Nguyen, H. N., Noss, E. H., Mizoguchi, F., Huppertz, C., Wei, K. S., Watts, G. F. M., & Brenner, M. B. (2017). Autocrine Loop Involving IL-6 Family Member LIF, LIF Receptor, and STAT4 Drives Sustained Fibroblast Production of Inflammatory Mediators. *Immunity*, 46(2), 220-232. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.004>
- Nishimoto, A. T., Rosch, J. W., & Tuomanen, E. I. (2020). Pneumolysin: Pathogenesis and Therapeutic Target. *Front Microbiol*, 11, 1543. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01543>
- Nunes, P. R., Peracoli, M. T. S., Romao-Veiga, M., Matias, M. L., Ribeiro, V. R., Da Costa Fernandes, C. J., Peracoli, J. C., Rodrigues, J. R., & De Oliveira, L. (2018). Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress induces inflammasome activation in term human placental explants. *Pregnancy Hypertens*, 14, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.07.006>
- Ogura, N., Tobe, M., Sakamaki, H., Kujiraoka, H., Akiba, M., Abiko, Y., & Nagura, H. (2002). Interleukin-1 beta induces interleukin-6 mRNA expression and protein production in synovial cells from human temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med*, 31(6), 353-360. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2002.310606.x>
- Opitz, B., Puschel, A., Schmeck, B., Hocke, A. C., Rousseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R. R., Suttorp, N., & Hippenstiel, S. (2004). Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*, 279(35), 36426-36432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403861200>
- Orchanian, S. B., Still, K., Harris, T. H., & Lodoen, M. B. (2024). Deficiency in astrocyte CCL2 production reduces neuroimmune control of *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog*, 20(1), e1011710. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011710>
- Orihuela, C. J., Gao, G., Francis, K. P., Yu, J., & Tuomanen, E. I. (2004). Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis*, 190(9), 1661-1669. <https://doi.org/10.1086/424596>
- Ostergaard, C., Yieng-Kow, R. V., Larsen, C. G., Mukaida, N., Matsushima, K., Benfield, T., Frimodt-Moller, N., Espersen, F., Kharazmi, A., & Lundgren, J. D. (2000). Treatment with a monoclonal antibody to IL-8 attenuates the pleocytosis in experimental pneumococcal meningitis in rabbits when given intravenously, but

- not intracisternally. *Clin Exp Immunol*, 122(2), 207-211. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01357.x>
- Pachter, J. S., de Vries, H. E., & Fabry, Z. (2003). The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62(6), 593-604. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.6.593>
- Paik, S., Kim, J. K., Silwal, P., Sasakawa, C., & Jo, E. K. (2021). An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*, 18(5), 1141-1160. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00670-3>
- Paul, R., Koedel, U., Winkler, F., Kieseier, B. C., Fontana, A., Kopf, M., Hartung, H. P., & Pfister, H. W. (2003). Lack of IL-6 augments inflammatory response but decreases vascular permeability in bacterial meningitis. *Brain*, 126(Pt 8), 1873-1882. <https://doi.org/10.1093/brain/awg171>
- Paul, R., Lorenzl, S., Koedel, U., Sporer, B., Vogel, U., Frosch, M., & Pfister, H. W. (1998). Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Ann Neurol*, 44(4), 592-600. <https://doi.org/10.1002/ana.410440404>
- Perdomo-Celis, F., Torres, M. A., Ostos, H., Gutierrez-Achury, J., Molano, V., Duran, L. F., Gonzalez, G., & Narvaez, C. F. (2015). Patterns of Local and Systemic Cytokines in Bacterial Meningitis and its Relation with Severity and Long-Term Sequelae. *Biomark Insights*, 10, 125-131. <https://doi.org/10.4137/BMI.S35005>
- Pereira, J. M., Xu, S., Leong, J. M., & Sousa, S. (2022). The Yin and Yang of Pneumolysin During Pneumococcal Infection. *Front Immunol*, 13, 878244. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.878244>
- Pfister, H. W., Feiden, W., & Einhaupl, K. M. (1993). Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study. *Arch Neurol*, 50(6), 575-581. <https://doi.org/10.1001/archneur.1993.00540060015010>
- Pinto, S. M., Kim, H., Subbannayya, Y., Giambelluca, M. S., Bosl, K., Ryan, L., Sharma, A., & Kandasamy, R. K. (2021). Comparative Proteomic Analysis Reveals Varying Impact on Immune Responses in Phorbol 12-Myristate-13-Acetate-Mediated THP-1 Monocyte-to-Macrophage Differentiation. *Front Immunol*, 12, 679458. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.679458>
- Podor, T. J., Jirik, F. R., Loskutoff, D. J., Carson, D. A., & Lotz, M. (1989). Human endothelial cells produce IL-6. Lack of responses to exogenous IL-6. *Ann N Y*

*Acad Sci*, 557, 374-385; discussion 386-377.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2660697>

Polfliet, M. M., Zwijnenburg, P. J., van Furth, A. M., van der Poll, T., Dopp, E. A., Renardel de Lavalette, C., van Kesteren-Hendrikx, E. M., van Rooijen, N., Dijkstra, C. D., & van den Berg, T. K. (2001). Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *J Immunol*, 167(8), 4644-4650.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4644>

Puttmann, S., Senner, V., Braune, S., Hillmann, B., Exeler, R., Rickert, C. H., & Paulus, W. (2005). Establishment of a benign meningioma cell line by hTERT-mediated immortalization. *Lab Invest*, 85(9), 1163-1171.

<https://doi.org/10.1038/labinvest.3700307>

Quagliarello, V. J., Wispelwey, B., Long, W. J., Jr., & Scheld, W. M. (1991). Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest*, 87(4), 1360-1366. <https://doi.org/10.1172/JCI115140>

Ren, P., Zhang, J., Yu, L., Qu, Y., Jiang, X., Zhou, Y., Hu, D., & Gao, C. (2019). Impact of different *Streptococcus pneumoniae* on the secretion of interleukin and adhesin from THP-1 monocytes. *J Clin Lab Anal*, 33(7), e22927. <https://doi.org/10.1002/jcla.22927>

Riesenfeld-Orn, I., Wolpe, S., Garcia-Bustos, J. F., Hoffmann, M. K., & Tuomanen, E. (1989). Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect Immun*, 57(7), 1890-1893. <https://doi.org/10.1128/iai.57.7.1890-1893.1989>

Rock, R. B., Hu, S., Sheng, W. S., & Peterson, P. K. (2006). Morphine stimulates CCL2 production by human neurons. *J Neuroinflammation*, 3, 32. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-3-32>

Royer, P. J., Rogers, A. J., Wooldridge, K. G., Tighe, P., Mahdavi, J., Rittig, M. G., & Ala'Aldeen, D. (2013). Deciphering the contribution of human meningotheelial cells to the inflammatory and antimicrobial response at the meninges. *Infect Immun*, 81(11), 4299-4310. <https://doi.org/10.1128/IAI.00477-13>

- Sato, K., Kuratsu, J., Takeshima, H., Yoshimura, T., & Ushio, Y. (1995). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in meningioma. *J Neurosurg*, 82(5), 874-878. <https://doi.org/10.3171/jns.1995.82.5.0874>
- Scheld, W. M. (1984). Bacterial meningitis in the patient at risk: intrinsic risk factors and host defense mechanisms. *Am J Med*, 76(5A), 193-207. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(84\)90265-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(84)90265-1)
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813(5), 878-888. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>
- Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. C., & Dinarello, C. A. (1990). Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, 75(1), 40-47. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2294996>  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120858157?via%3Dihub>
- Schneider, O., Michel, U., Zysk, G., Dubuis, O., & Nau, R. (1999). Clinical outcome in pneumococcal meningitis correlates with CSF lipoteichoic acid concentrations. *Neurology*, 53(7), 1584-1587. <https://doi.org/10.1212/wnl.53.7.1584>
- Schroder, K., Zhou, R., & Tschoopp, J. (2010). The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science*, 327(5963), 296-300. <https://doi.org/10.1126/science.1184003>
- Sebire, G., Emilie, D., Wallon, C., Hery, C., Devergne, O., Delfraissy, J. F., Galanaud, P., & Tardieu, M. (1993). In vitro production of IL-6, IL-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha by human embryonic microglial and neural cells. *J Immunol*, 150(4), 1517-1523. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8432992>
- Shabo, Y., Lotem, J., Rubinstein, M., Revel, M., Clark, S. C., Wolf, S. F., Kamen, R., & Sachs, L. (1988). The myeloid blood cell differentiation-inducing protein MGI-2A is interleukin-6. *Blood*, 72(6), 2070-2073. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3264198>  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120821752?via%3Dihub>
- Shimodaira, T., Matsuda, K., Uchibori, T., Sugano, M., Uehara, T., & Honda, T. (2018). Upregulation of osteopontin expression via the interaction of macrophages and

- fibroblasts under IL-1b stimulation. *Cytokine*, 110, 63-69.  
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.04.025>
- Simberkoff, M. S., Moldover, N. H., & Rahal, J., Jr. (1980). Absence of detectable bactericidal and opsonic activities in normal and infected human cerebrospinal fluids. A regional host defense deficiency. *J Lab Clin Med*, 95(3), 362-372.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6986445>
- Spanaus, K. S., Nadal, D., Pfister, H. W., Seebach, J., Widmer, U., Frei, K., Gloor, S., & Fontana, A. (1997). C-X-C and C-C chemokines are expressed in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis and mediate chemotactic activity on peripheral blood-derived polymorphonuclear and mononuclear cells in vitro. *J Immunol*, 158(4), 1956-1964. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9029138>
- Spreer, A., Kerstan, H., Bottcher, T., Gerber, J., Siemer, A., Zysk, G., Mitchell, T. J., Eiffert, H., & Nau, R. (2003). Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(8), 2649-2654.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2649-2654.2003>
- Srinivasula, S. M., Poyet, J. L., Razmara, M., Datta, P., Zhang, Z., & Alnemri, E. S. (2002). The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem*, 277(24), 21119-21122. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200179200>
- Stack, J. H., Beaumont, K., Larsen, P. D., Straley, K. S., Henkel, G. W., Randle, J. C., & Hoffman, H. M. (2005). IL-converting enzyme/caspase-1 inhibitor VX-765 blocks the hypersensitive response to an inflammatory stimulus in monocytes from familial cold autoinflammatory syndrome patients. *J Immunol*, 175(4), 2630-2634. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2630>
- Stahel, P. F., Nadal, D., Pfister, H. W., Paradis, P. M., & Barnum, S. R. (1997). Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis. *Lancet*, 349(9069), 1886-1887.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)63877-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)63877-9)
- Stucki, A., Cottagnoud, M., Winkelmann, V., Schaffner, T., & Cottagnoud, P. (2007). Daptomycin produces an enhanced bactericidal activity compared to ceftriaxone, measured by [<sup>3</sup>H]choline release in the cerebrospinal fluid, in experimental meningitis due to a penicillin-resistant pneumococcal strain without lysing its cell

- wall. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(6), 2249-2252.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.01000-06>
- Stuertz, K., Schmidt, H., Trostdorf, F., Eiffert, H., Mader, M., & Nau, R. (1999). Lower lipoteichoic and teichoic acid CSF concentrations during treatment of pneumococcal meningitis with non-bacteriolytic antibiotics than with ceftriaxone. *Scand J Infect Dis*, 31(4), 367-370. <https://doi.org/10.1080/00365549950163806>
- Surabhi, S., Cuypers, F., Hammerschmidt, S., & Siemens, N. (2020). The Role of NLRP3 Inflammasome in Pneumococcal Infections. *Front Immunol*, 11, 614801.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.614801>
- Surabhi, S., Jachmann, L. H., Shumba, P., Burchhardt, G., Hammerschmidt, S., & Siemens, N. (2022). Hydrogen Peroxide Is Crucial for NLRP3 Inflammasome-Mediated IL-1beta Production and Cell Death in Pneumococcal Infections of Bronchial Epithelial Cells. *J Innate Immun*, 14(3), 192-206.  
<https://doi.org/10.1159/000517855>
- Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*, 19(8), 477-489.  
<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
- Ta, A., & Vanaja, S. K. (2021). Inflammasome activation and evasion by bacterial pathogens. *Curr Opin Immunol*, 68, 125-133.  
<https://doi.org/10.1016/j.co.2020.11.006>
- Tanabe, S., & Grenier, D. (2009). Endothelial cell/macrophage cocultures as a model to study *Streptococcus suis*-induced inflammatory responses. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 55(1), 100-106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00507.x>
- Teske, N. C., Dyckhoff-Shen, S., Beckenbauer, P., Bewersdorf, J. P., Engelen-Lee, J. Y., Hammerschmidt, S., Kalin, R. E., Pfister, H. W., Brouwer, M. C., Klein, M., Glass, R., van de Beek, D., & Koedel, U. (2023). Pericytes are protective in experimental pneumococcal meningitis through regulating leukocyte infiltration and blood-brain barrier function. *J Neuroinflammation*, 20(1), 267.  
<https://doi.org/10.1186/s12974-023-02938-z>
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., & et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta

processing in monocytes. *Nature*, 356(6372), 768-774.  
<https://doi.org/10.1038/356768a0>

Tomlinson, G., Chimalapati, S., Pollard, T., Lapp, T., Cohen, J., Camberlein, E., Stafford, S., Periselneris, J., Aldridge, C., Vollmer, W., Picard, C., Casanova, J. L., Noursadeghi, M., & Brown, J. (2014). TLR-mediated inflammatory responses to *Streptococcus pneumoniae* are highly dependent on surface expression of bacterial lipoproteins. *J Immunol*, 193(7), 3736-3745.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401413>

Too, L. K., Yau, B., Baxter, A. G., McGregor, I. S., & Hunt, N. H. (2019). Double deficiency of toll-like receptors 2 and 4 alters long-term neurological sequelae in mice cured of pneumococcal meningitis. *Sci Rep*, 9(1), 16189.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52212-7>

Tsuchiya, K., Toyama, K., Tsuprun, V., Hamajima, Y., Kim, Y., Ondrey, F. G., & Lin, J. (2007). Pneumococcal peptidoglycan-polysaccharides induce the expression of interleukin-8 in airway epithelial cells by way of nuclear factor-kappaB, nuclear factor interleukin-6, or activation protein-1 dependent mechanisms. *Laryngoscope*, 117(1), 86-91.  
<https://doi.org/10.1097/01.mlg.0000244182.81768.31>

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 26(2), 171-176. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910260208>

Tuomanen, E., Liu, H., Hengstler, B., Zak, O., & Tomasz, A. (1985). The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis*, 151(5), 859-868. <https://doi.org/10.1093/infdis/151.5.859>

Van Damme, J., Cayphas, S., Opdenakker, G., Billiau, A., & Van Snick, J. (1987). Interleukin 1 and poly(rI).poly(rC) induce production of a hybridoma growth factor by human fibroblasts. *Eur J Immunol*, 17(1), 1-7.  
<https://doi.org/10.1002/eji.1830170102>

van de Beek, D., Brouwer, M., Hasbun, R., Koedel, U., Whitney, C. G., & Wijdicks, E. (2016). Community-acquired bacterial meningitis. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16074.  
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.74>

- van de Beek, D., Brouwer, M. C., Koedel, U., & Wall, E. C. (2021). Community-acquired bacterial meningitis. *Lancet*, 398(10306), 1171-1183.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00883-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00883-7)
- van der Poll, T., Keogh, C. V., Guirao, X., Buurman, W. A., Kopf, M., & Lowry, S. F. (1997). Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*, 176(2), 439-444.  
<https://doi.org/10.1086/514062>
- van Furth, A. M., Roord, J. J., & van Furth, R. (1996). Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy. *Infect Immun*, 64(12), 4883-4890.  
<https://doi.org/10.1128/iai.64.12.4883-4890.1996>
- van Lieshout, M. H. P., de Vos, A. F., Dassing, M. C., de Porto, A., de Boer, O. J., de Beer, R., Terpstra, S., Florquin, S., Van't Veer, C., & van der Poll, T. (2018). ASC and NLRP3 impair host defense during lethal pneumonia caused by serotype 3 Streptococcus pneumoniae in mice. *Eur J Immunol*, 48(1), 66-79.  
<https://doi.org/10.1002/eji.201646554>
- Vogele, M., Bhaskara, R. M., Mulvihill, E., van Pee, K., Yildiz, O., Kuhlbrandt, W., Muller, D. J., & Hummer, G. (2019). Membrane perforation by the pore-forming toxin pneumolysin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(27), 13352-13357.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1904304116>
- Waage, A., Halstensen, A., Shalaby, R., Brandtzaeg, P., Kierulf, P., & Espevik, T. (1989). Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med*, 170(6), 1859-1867. <https://doi.org/10.1084/jem.170.6.1859>
- Wall, E. C., Gordon, S. B., Hussain, S., Goonetilleke, U. R., Gritzfeld, J., Scarborough, M., & Kadioglu, A. (2012). Persistence of pneumolysin in the cerebrospinal fluid of patients with pneumococcal meningitis is associated with mortality. *Clin Infect Dis*, 54(5), 701-705. <https://doi.org/10.1093/cid/cir926>
- Wang, Y., Shi, P., Chen, Q., Huang, Z., Zou, D., Zhang, J., Gao, X., & Lin, Z. (2019). Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation. *J Mol Cell Biol*, 11(12), 1069-1082.  
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz020>

- Wannamaker, W., Davies, R., Namchuk, M., Pollard, J., Ford, P., Ku, G., Decker, C., Charifson, P., Weber, P., Germann, U. A., Kuida, K., & Randle, J. C. (2007). (S)-1-((S)-2-{[1-(4-amino-3-chloro-phenyl)-methanoyl]-amino}-3,3-dimethylbutanoyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid ((2R,3S)-2-ethoxy-5-oxo-tetrahydrofuran-3-yl)-amide (VX-765), an orally available selective interleukin (IL)-converting enzyme/caspase-1 inhibitor, exhibits potent anti-inflammatory activities by inhibiting the release of IL-1 $\beta$  and IL-18. *J Pharmacol Exp Ther*, 321(2), 509-516. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.111344>
- Watanabe, S., Ogura, N., Akutsu, M., Kawashima, M., Hattori, T., Yano, T., Ito, K., & Kondoh, T. (2017). **Pro-inflammatory Cytokine Production in Co-culture of Human Monocytes and Synovial Fibroblasts from the Human Temporomandibular Joint**. *International Journal of Oral-Medical Sciences*, 15(3-4), 107-113. <https://doi.org/10.5466/ijoms.15.107>
- Wells, D. B., Tighe, P. J., Wooldridge, K. G., Robinson, K., & Ala' Aldeen, D. A. (2001). Differential gene expression during meningeal-meningococcal interaction: evidence for self-defense and early release of cytokines and chemokines. *Infect Immun*, 69(4), 2718-2722. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2718-2722.2001>
- Wieseler-Frank, J., Jekich, B. M., Mahoney, J. H., Bland, S. T., Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2007). A novel immune-to-CNS communication pathway: cells of the meninges surrounding the spinal cord CSF space produce proinflammatory cytokines in response to an inflammatory stimulus. *Brain Behav Immun*, 21(5), 711-718. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.07.004>
- Witzenrath, M., Pache, F., Lorenz, D., Koppe, U., Gutbier, B., Tabeling, C., Reppe, K., Meixenberger, K., Dorhoi, A., Ma, J., Holmes, A., Trendelenburg, G., Heimesaat, M. M., Bereswill, S., van der Linden, M., Tschoopp, J., Mitchell, T. J., Suttorp, N., & Opitz, B. (2011). The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol*, 187(1), 434-440. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003143>
- Woehrli, B., Brouwer, M. C., Murr, C., Heckenberg, S. G., Baas, F., Pfister, H. W., Zwinderman, A. H., Morgan, B. P., Barnum, S. R., van der Ende, A., Koedel, U., & van de Beek, D. (2011). Complement component 5 contributes to poor disease

- outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *J Clin Invest*, 121(10), 3943-3953. <https://doi.org/10.1172/JCI57522>
- Wolvekamp, M. C., & Marquet, R. L. (1990). Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunol Lett*, 24(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(90\)90028-o](https://doi.org/10.1016/0165-2478(90)90028-o)
- Wu, Z., Zhang, J., & Nakanishi, H. (2005). Leptomeningeal cells activate microglia and astrocytes to induce IL-10 production by releasing pro-inflammatory cytokines during systemic inflammation. *J Neuroimmunol*, 167(1-2), 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.06.025>
- Yang, J., Li, Y., Bhalla, A., Maienschein-Cline, M., & Fukuchi, K. I. (2023). A novel co-culture model for investigation of the effects of LPS-induced macrophage-derived cytokines on brain endothelial cells. *PLoS One*, 18(7), e0288497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288497>
- Yao, Y., & Tsirka, S. E. (2014). Monocyte chemoattractant protein-1 and the blood-brain barrier. *Cell Mol Life Sci*, 71(4), 683-697. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1459-1>
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R., & Golenbock, D. (1999). Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol*, 163(1), 1-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384090>  
<https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/163/1/1.full.pdf>
- Yoshimura, T., & Leonard, E. J. (1990). Secretion by human fibroblasts of monocyte chemoattractant protein-1, the product of gene JE. *J Immunol*, 144(6), 2377-2383. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2313097>
- Zwijnenburg, P. J., van der Poll, T., Florquin, S., Roord, J. J., & Van Furth, A. M. (2003). IL-1 receptor type 1 gene-deficient mice demonstrate an impaired host defense against pneumococcal meningitis. *J Immunol*, 170(9), 4724-4730. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4724>
- Zysk, G., Bruck, W., Huitinga, I., Fischer, F. R., Flachsbarth, F., van Rooijen, N., & Nau, R. (1997). Elimination of blood-derived macrophages inhibits the release of interleukin-1 and the entry of leukocytes into the cerebrospinal fluid in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol*, 73(1-2), 77-80. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(96\)00173-7](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(96)00173-7)

Zysk, G., Schneider-Wald, B. K., Hwang, J. H., Bejo, L., Kim, K. S., Mitchell, T. J., Hakenbeck, R., & Heinz, H. P. (2001). Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 69(2), 845-852. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.845-852.2001>

## **Publikationen**

Inhalte dieser Arbeit wurden bereits in der folgenden Publikation aus Gründen der Aktualität veröffentlicht:

Teske, N. C., Dyckhoff-Shen, S., Beckenbauer, P., Bewersdorf, J. P., Engelen-Lee, J. Y., Hammerschmidt, S., Kalin, R. E., Pfister, H. W., Brouwer, M. C., Klein, M., Glass, R., van de Beek, D., & Koedel, U. (2023). Pericytes are protective in experimental pneumococcal meningitis through regulating leukocyte infiltration and blood-brain barrier function. *J Neuroinflammation*, 20(1), 267. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02938-z>. Open Access unter der Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Abbildung 26 (Kapitel 4.3, Seite 66) wurde von mir unter Verwendung der Daten der oben genannten Veröffentlichung neu erstellt.

**Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation  
mit der elektronischen Fassung**

Beckenbauer, Paul

---

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Untersuchungen zur Interaktion von leptomeningealen Zellen und Makrophagen  
bei der Induktion der Immunantwort im Rahmen einer Infektion mit Streptococcus pneumoniae**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

---

München, 12.12.2025

Ort, Datum

---

Paul Beckenbauer

Unterschrift Paul Beckenbauer